

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ

Часть X

Учебное пособие

Под редакцией
профессора Д.Б. Гелашвили

Рекомендовано ученым советом Института биологии и биомедицины
для студентов ННГУ, обучающихся по направлениям подготовки
05.03.06 «Экология и природопользование», 06.03.01 «Биология»

Нижний Новгород
2019

УДК 574
ББК Е 087
Э-40

Рецензенты:
д.б.н., профессор А.И. Дмитриев,
д.б.н., доцент В.А. Воденеев

Э-40 **Экологический мониторинг. Часть X:** учебное пособие / под ред. проф. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. – 188 с.
ISBN 978-5-91326-542-5

В учебном пособии рассмотрен широкий спектр вопросов экологического мониторинга наземных и водных экосистем, а именно: состояние антиоксидантной системы растений, лейкоцитарный состав крови рептилий, методика оценки риска здоровья населения, цитогенетические методы оценки состояния окружающей среды, мониторинг ценотической активности растений, представлены методы изучения фитобентоса пресных водоемов, измерения функционального разнообразия биотических сообществ, в том числе при ординации гидробиоценозов, разобраны методы оценки загрязнения почв тяжелыми металлами, а также методы биодиагностики состояния водных экосистем.

Для студентов (бакалавриат и магистратура), аспирантов и преподавателей, занимающихся вопросами биоиндикации и экологического мониторинга наземных и водных экосистем.

Ответственный за выпуск:
председатель методической комиссии ИББМ ННГУ к.б.н. Е.Л. Воденеева

ISBN 978-5-91326-542-5

УДК 574
ББК Е 087

© Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, 2019

ПРЕДИСЛОВИЕ

Вниманию читателей предлагается X часть многотомного учебного пособия «Экологический мониторинг». Концепция этого учебного пособия была сформулирована в предисловии к первой части: «В отличие от существующих руководств по экологическому мониторингу, как правило, имеющих монотематическую направленность, в данном пособии и его последующих выпусках реализуется попытка «политематического» изложения материала, что позволит одновременно использовать каждый выпуск более широкому контингенту студентов и специалистов». Эта концептуальная направленность сохранялась редколлекцией на протяжении практически всех выпусков.

Концептуальным подходом к изданию учебного пособия – «Экологический мониторинг» – является ориентация на тесное сотрудничество с коллегами из институтов Российской академии наук (РАН) и ведущих университетов страны и ближнего зарубежья. Результатом такой интеграции стало участие в авторском коллективе пособия специалистов из Института экологии Волжского бассейна РАН (ИЭВБ РАН), Института водных проблем РАН (ИВП РАН), Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН), Института прикладной физики РАН (ИПФ РАН), Института экологии растений и животных РАН (ИЭРиЖ РАН), «АтлантНИРО», Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиней» Роспотребнадзора, Московского государственного университета им. М.И. Ломоносова (МГУ), Воронежского государственного университета, Марийского государственного университета, Николаевского государственного аграрного университета, Казанского (Приволжского) Федерального университета.

Такая интеграция позволила существенно расширить «географию» научных контактов сотрудников, аспирантов и студентов кафедры экологии ННГУ, способствовала привлечению ведущих специалистов РАН к подготовке специалистов в высшей школе.

«Стратегия развития Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского – Национального исследовательского университета до 2020 года» предусматривает, что ННГУ-2020 будет функционировать на основе концепции «треугольника знаний» – триединой функции развития образования, науки и инноваций. Определяющим конкурентным преимуществом ННГУ-2020 в среде участников развития инновационного общества знаний станет подготовка высококвалифицированных специалистов-творцов, обладающих качествами инноваторов, предпринимателей, занятие лидирующих мировых позиций по ряду научных направлений, сформулированных в «Стратегии» в виде «платформ» развития.

Именно этим целям служит предлагаемое вниманию читателей издание – учебное пособие «Экологический мониторинг. Часть X». Пособие рассчи-

тано на широкую читательскую аудиторию, включая бакалавров, магистров, аспирантов, а также специалистов в области экологии и охраны окружающей среды. Нижегородский госуниверситет и авторы готовы к сотрудничеству в области экологического образования и просвещения и с признательностью примут замечания и предложения, направленные на улучшение этого пособия.

Редактор учебного пособия, профессор

Д.Б. Гелаишвили

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

1.1. Активные формы кислорода и процесс перекисного окисления у растений

Появление на Земле первых фотосинтезирующих организмов, благодаря которым в атмосфере появился кислород, предопределило доминирование на планете аэробных форм жизни. Сейчас кислородный фотосинтез и аэробное дыхание – два фундаментальных процесса, обеспечивающих энергией клетки растений. Оба эти процесса связаны с окислительно-восстановительными превращениями молекулярного кислорода. Участие молекулярного кислорода, который является сильным окислителем, в метаболизме возможно благодаря тому, что молекула кислорода относительно стабильна и спонтанно не реагирует с биомолекулами. Однако все аэробные организмы находятся перед лицом постоянной опасности, связанной с образованием в клетках активных форм кислорода, АФК (*ROS, Reactive Oxygen Species*). Под термином «активные формы кислорода» объединяют совокупность короткоживущих взаимопревращающихся и относительно реакционноспособных форм кислорода, возникающих в результате его электронного возбуждения или окислительно-восстановительных превращений. Активные формы кислорода способны окислять практически все классы биологических молекул – липиды, белки, нуклеиновые кислоты. В нормально функционирующих растительных клетках содержание АФК поддерживается на низком уровне, так как существует антиоксидантная система, неферментные (каротиноиды, аскорбиновая кислота, глутатион, альфа-токоферол, флавоноиды) и ферментные (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза) компоненты которой регулируют уровень АФК (Полесская, 2007).

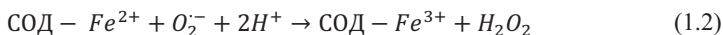
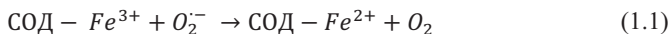
К АФК относятся синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксил-радикал ($\text{HO}^\bullet$). В результате захвата молекулой O_2 одного электрона образуется супероксид-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) или его протонированная форма гидропероксил-радикал ($\text{HO}_2^\bullet$). Восстановление вторым электроном формирует перекись водорода (H_2O_2), а в результате присоединения третьего электрона образуется гидроксил-радикал ($\text{HO}^\bullet$). АФК могут образовываться в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, цитозоле и апопласте (Полесская, 2007).

АФК в хлоропластах. Основным местом образования АФК в растительной клетке считаются хлоропласты. В хлоропластах постоянно образуются синглетный кислород, супероксид-радикал и перекись водорода.

Синглетный кислород образуется при взаимодействии молекулярного кислорода, который находится преимущественно в триплетном состоянии (валент-

ные электроны имеют параллельные спины), с хлорофиллом, поглотившим квант света и находящимся в возбужденном триплетном состоянии (Хл^T). Так как время жизни хлорофилла в триплетном состоянии относительно большое ($\sim 10^{-3}$ с), он «успекает» передать избыток энергии O_2 . В результате чего у триплетного кислорода происходит обращение спина одного из валентных электронов и образуется синглетный кислород. $^1\text{O}_2$ способен окислять белки фотосинтетического аппарата, молекулы хлорофилла, липиды тилакоидных мембран. Транс-каротиноиды способны «тушить» возбужденные состояния Хл^T и $^1\text{O}_2$, то есть обладают уникальной способностью при взаимодействии с Хл^T и $^1\text{O}_2$ «отбирать» и диссипировать в тепло избыточную энергию этих молекул. Важную роль в этом процессе играет виолаксантиновый (ксантофилловый) цикл. В составе антенных комплексов фотосистемы I и II присутствует ксантофилл виолаксантин, который при достаточно сильном освещении переходит в зеаксантин (при участии фермента дезпоксидазы). При низкой освещенности или в темноте зеаксантин вновь превращается в виолаксантин (при участии фермента эпоксидазы). У виолаксантина (эпокси-форма) возбужденное синглетное состояние по уровню энергии выше, чем синглетное состояние у хлорофилла Хл^{S1} . Поэтому виолаксантин при поглощении света передает энергию на хлорофилл, т.е. работает как светособирающая антенная молекула. У зеаксантина, наоборот, уровень энергии в синглетном возбужденном состоянии ниже, чем у Хл^{S1} . Это значит, что возможен синглет-синглетный перенос энергии от Хл^{S1} к молекуле зеаксантина, которая затем рассеивается в виде тепла.

Супероксид-радикал образуется при перехвате кислородом электронов с электронотранспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов. Основным сайтом генерации O_2^- считается фотосистема I. В реакционном центре фотосистемы I есть 4Fe-4S-кластеры, с которых O_2 легко перехватывает электроны. Кроме того, отдавать электрон кислороду может восстановленный ферридоксин, который связывается и восстанавливается в этих же сайтах. Восстановление кислорода на уровне фотосистемы I называют реакцией Меллера – по имени открывшего этот процесс ученого. По некоторым оценкам, при насыщающей интенсивности света около 10–25% общего нециклического электронного потока может идти на образование супероксид-радикала. Кроме того, генерация O_2^- возможна и на уровне реакционного центра фотосистемы II, предположительно в Q_A и Q_B сайтах. Образованный в реакции Меллера O_2^- нейтрализуется в результате реакций, получивших название «вода-вода», или цикл Halliwell-Asada. В данном случае ЭТЦ работает «вхолостую»: отнятые у воды электроны переносятся на кислород, который в конечном итоге восстанавливается до воды. Это происходит следующим образом. Электроны ЭТЦ хлоропластов перехватываются O_2 с образованием O_2^- , который при участии железосодержащей супероксиддисмутазы (Fe-COD) дисмутирует с образованием перекиси водорода:



Образованная перекись восстанавливается аскорбатпероксидазой до воды за счет аскорбата, пул которого в хлоропластах очень высок. У растений аскорбатпероксидаза является основным ферментом, ликвидирующим избыток H_2O_2 . Обеспечивая сброс избытка электронов на кислород, цикл «вода–вода» поддерживает скорость электронного транспорта и предотвращает перевозбуждение антенных комплексов и образование синглетного кислорода (Полесская, 2007).

АФК в митохондриях и пероксисомах. В митохондриях спонтанное «не-санкционированное» одноэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксидрадикала происходит на комплексах I, II, III дыхательной цепи. Сайты, где возможен перехват электронов кислородом и образование O_2^- точно не установлены, но потенциально ими могут быть многие редокс-центры, содержащие железосерные кластеры, гемы и связанные хиноны. Известно, что генерация O_2^- в митохондриях усиливается, если электронный транспорт в цепи тормозится в силу дыхательного контроля. В ситуации «перевосстановления цепи» кислород легко перехватывает электроны, по-видимому, у многих восстановленных редокс-центров. Эта проблема является достаточно серьезной, поэтому в митохондриях действуют специальные механизмы, которые препятствуют перевосстановлению цепи. Один из них – частичное разобщение электронного транспорта с фосфорилированием с помощью жирных кислот и UCP-белков. Данный механизм является общим для митохондрий животных и растений. Кроме того, в растительных митохондриях к ускорению электронного транспорта приводит активация альтернативной оксидазы (АОХ), которая окисляет восстановленный убихинон QH_2 и восстанавливает кислород до воды, конкурируя с комплексом IV. В растительных митохондриях с пула убихинона электронный поток расходится по двум направлениям – по цитохромному (через комплексы III и IV) и альтернативному путям. Электронный транспорт через альтернативную оксидазу не сопровождается генерацией электрохимического потенциала за счет градиента H^+ на внутренней мембране митохондрий, в этом случае большая часть энергии электронного потока рассеивается в виде тепла. Таким образом, АОХ препятствует перевосстановлению ЭТЦ митохондрий. Образующийся в митохондриях супероксид-радикал ликвидирует Mn-SOD, возникающая при этом перекись водорода восстанавливается до воды аскорбатпероксидазой, которая использует в качестве донора электронов аскорбиновую кислоту.

Пероксисомы, как и хлоропласты, традиционно считаются одним из основных источников АФК в растительной клетке, особенно это касается пероксисом фотосинтетических тканей. В фотосинтезирующем листе C_3 -растений пероксисомы вовлечены в процесс фотодыхания, обусловленный двойной функцией рибулуро-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (Рубиско). Этот основной фермент темновой стадии фотосинтеза осуществляет реакцию и карбоксилирования, и оксигеназную. Оксигеназная функция Рубиско проявляется при дефиците CO_2 и избытке O_2 . В этом случае фермент, присоединяет кислород к рибулуро-1,5-бисфосфату, что приводит к образованию одной молекулы

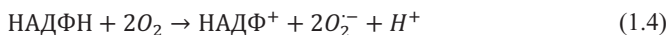
фосфоглицериновой кислоты и фосфогликолата. Выходя из хлоропласта, фосфогликолат превращается в гликолат, который поступает в пероксисому. В пероксисоме гликолат реагирует с поглощаемым клеткой кислородом; в результате образуются глиоксилат и перекись водорода. Перекись тотчас же разлагается каталазой на воду и кислород:



При низких концентрациях перекись восстанавливается до воды аскорбатпероксидазой пероксисом, которая имеет более высокое сродство к субстрату, чем каталаза. В настоящее время фотодыхание рассматривается как процесс, поддерживающий работу фотосинтетической цепи и препятствующий фотопоглощению, и таким образом предотвращающий неконтролируемое образование АФК.

АФК в цитозоле и апопласте. В цитозоле образование АФК может быть связано с протеканием некоторых биохимических реакций. Перекись водорода образуется в реакциях, катализируемых флавиновыми оксидазами. Супероксидный радикал – при работе сложного ферментного комплекса, который называется *цитохром P₄₅₀-зависимой монооксигеназой*. Этот комплекс интегрирован в мембраны эндоплазматической сети клеток животных и растений. Его функции связаны с деградацией выводимых из метаболизма соединений и детоксикацией органических ксенобиотиков. За ликвидацию АФК в цитозоле отвечают CuZn-СОД и аскорбатпероксидаза.

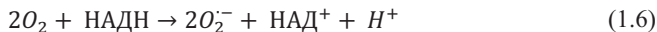
Образование АФК на уровне плазмалеммы и в апопласте играет ключевую роль в сигналинге биотического стресса, а также в некоторых процессах роста и развития. На внешней стороне плазмалеммы и в фазе клеточных стенок локализованы одни из наиболее мощных систем генерации АФК в растительной клетке. За образование супероксид-радикала в апопласте в первую очередь отвечает локализованная в плазмалемме НАДФН-оксидаза, катализирующая реакцию:



НАДФН-оксидаза является трансмембранным ферментом единственной функцией которого является образование $O_2^{\cdot-}$. В образовании АФК в апопласте участвуют также фенольные пероксидазы клеточной стенки. В классической «пероксидазной» реакции они используют H_2O_2 для окисления фенольных соединений, при этом образуются фенольные радикалы, участвующие в биосинтезе лигнина:



В то же время фенольные пероксидазы способны инициировать НАДФН-зависимые реакции, ведущие к образованию H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$:



При этом фенольные пероксидазы начинают генерировать образование АФК при стрессе, особенно вызванном патогенными микроорганизмами (Полесская, 2007).

1.2. Перекисное окисление липидов у растений

Клеточные мембраны, особенно тилакоидов, являются основными мишенями АФК и легко ими повреждаются, поскольку АФК провоцируют цепной процесс разрушения мембран, обусловленный перекисным окислением липидов. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – свободнорадикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот в биологических системах. Это цепной процесс, инициируемый свободными радикалами (в основном $O_2^{\cdot-}$ и $HO^{\cdot}$) и самоподдерживающийся за счет возникновения свободных радикалов в каждой новой его реакции.

Процесс ПОЛ протекает в три стадии: инициирования, развития (продолговывание) и завершения (терминации). Инициирование ПОЛ происходит в результате взаимодействия АФК и полиненасыщенных жирных кислот мембран. Легче всего отрыв атомов водорода происходит в α -положении к двойной связи, что связано с ослаблением связи C–H вблизи двойной связи. В результате инициации образуется радикал жирной кислоты:



Образующийся свободный радикал жирной кислоты способен присоединять кислород с образованием пероксила, который в дальнейшем взаимодействует с другими остатками жирных кислот. То есть процесс вступает в стадию продолговывания, после которой процесс повторяется:

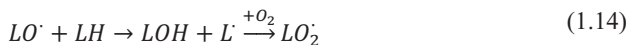


Цепная реакция ПОЛ заканчивается в случае взаимодействия двух свободных радикалов, нейтрализующих друг друга с образованием циклической перекиси:



Ионы металлов с переменной валентностью (Cu^+ , Fe^{2+}) могут многократно усиливать ПОЛ в биомембранах, что приводит к окислительному взрыву. Ионы

таких металлов разлагают перекиси, в результате чего происходит разветвление цепи и усиление образования свободных радикалов:



В норме цепь реакций ПОЛ обрывается за счет действия антиоксидантных систем клетки. Усиление ПОЛ в биологических мембранах приводит к резкому изменению их свойств: потере вязкости, падению мембранного потенциала, повышению проницаемости для ионов.

Неферментативный процесс ПОЛ может быть активирован ферментом липоксигеназой, особенно в хлоропластах. Липоксигеназа катализирует прямое включение кислорода в молекулы полиненасыщенных фосфолипидов с образованием гидропероксидов:



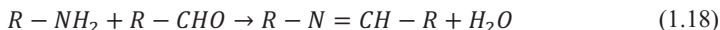
В норме липоксигеназа не активна. Активация этого фермента наблюдается при стрессах, особенно связанных с повреждением растений, при нападении насекомых или травоядных животных. В результате биохимических реакций, инициируемых липоксигеназой, образуется спектр летучих соединений, среди которых преобладают спирты, альдегиды, эфиры. Эмиссия этих соединений в атмосферу резко возрастает при повреждении листьев (Полесская, 2007).

ПОЛ приводит к образованию в клетке целого ряда веществ. Первичный продукт ПОЛ – гидроперекиси. На первых стадиях метаболической цепи 92–98% всех продуктов окисления составляют гидроперекиси (ROOH), образованию которых предшествует появление гидроперекисного радикала ROO $\cdot$. Этот радикал образуется в акте одноэлектронного восстановления, что сопровождается появлением системы сопряженных двойных связей:



Молекулы с двумя сопряженными связями называются диеновыми конъюгатами. Может образоваться и три сопряженных двойные связи, тогда возникают триеновые конъюгаты. Из них образуются более стабильные соединения: альдегиды и кетоны. Среди вторичной продукции наиболее часто встречается малоновый диальдегид. По его содержанию определяют интенсивность ПОЛ у растений (ОНС–CH₂–СНО). Далее, альдегиды и кетоны могут с помощью ковалентных связей взаимодействовать с белками с образованием конечных про-

дуктов ПОЛ – оснований Шиффа, для которых характерно наличие фрагмента – N=C:



Основания Шиффа – весьма реакционноспособные соединения, приводящие к полимеризации и поликонденсации молекул, межмолекулярным сшивкам (Камышников, 2002).

1.3. Антиоксидантная система растений

Роль поддержания концентрации АФК на относительно стабильном низком уровне отводится многокомпонентной системе регуляции процессов активации кислорода, без которой функционирование клеток в аэробной среде было бы невозможно. В биологических системах антиоксидантами называются вещества, способные ингибировать процессы свободнорадикального окисления.

Антиоксидант – это любое химическое соединение, которое в более низкой концентрации, чем концентрация окисляемого вещества, существенно замедляет или предотвращает окисление этого вещества (Шарова, 2016).

По одной из классификаций антиоксиданты делят ферментные антиоксиданты (каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидазы) и неферментные низкомолекулярные соединения, которые могут быть гидрофильными и находиться в цитозоле и матриксе органелл (пролин, аскорбиновая кислота и др.) и гидрофобными, локализованными в мембранах клетки (каротиноиды, витамин Е и многие другие).

Кроме того, антиоксиданты делят на первичные и вторичные. Первичный антиоксидант обладает следующими свойствами. Во-первых, он должен быть донором электронов и атомов водорода, иными словами, иметь низкий стандартный окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал). В международной научной литературе окислительно-восстановительный потенциал в последние годы часто называют восстановительным потенциалом (*reduction potential*). Восстановительный потенциал – это количественная мера способности соединения принимать или терять электроны. Второе необходимое свойство первичного антиоксиданта заключается в том, что, отдавая электроны или атомы водорода, он должен превращаться в радикал с низкой реактивностью, который легко гасится. Низкая реактивность обычно обусловлена способностью стабилизировать и делокализовать неспаренный электрон. Благодаря этим свойствам первичный антиоксидант обрывает цепную реакцию свободнорадикального окисления. На примере гашения пероксидации липидов роль антиоксиданта (АН) выглядит следующим образом:



Вторичные антиоксиданты предотвращают реакции окисления другими способами: хелатированием переходных металлов; гашением синглетного кислорода; удалением супероксид-радикала и пероксида водорода (СОД, каталаза и другие ферменты антиоксидантной защиты и их субстраты-восстановители).

Некоторые вещества одновременно являются первичными и вторичными антиоксидантами, например, аскорбиновая кислота (Шарова, 2016). Низкомолекулярные антиоксиданты имеют наибольшее значение на самых ранних этапах активации повышенного образования АФК и вместе с ферментом супероксиддисмутазой составляют первую линию защиты от АФК. Однако, в дальнейшем их количество быстро истощается и зависит от активности восстанавливающих их ферментов. Эти вещества, отдавая свой атом водорода, превращают свободные радикалы в стабильные молекулы и предупреждают цепное развитие реакций перекисного окисления.

К низкомолекулярным антиоксидантам относится очень большое число веществ различной химической природы: фенолы и полифенолы, витамины группы Е, С, Р и А, а также фосфолипиды и серосодержащие соединения.

Наиболее значительный вклад в антиоксидантную защиту вносят глутатион (GSH) и аскорбиновая кислота (Аск). Они находятся в водной фазе клетки. Эти вещества перехватывают свободные радикалы, восстанавливают АФК и продукты окисления мембран. Основной антиоксидантный эффект этих соединений реализуется посредством их участия в работе ферментов, субстратами которых они являются.

L-Аскорбиновая кислота (аскорбат, витамин С) – необходимое вещество, которое находится в большом количестве в растительных тканях и играет очень важную роль. Она оказывает существенное влияние на некоторые физиологические процессы растений, включая рост, дифференциацию тканей и органов, метаболизм. Функция аскорбата – восстановление многих свободных радикалов, и минимизация разрушения окислительного стресса.

Антиоксидантные свойства аскорбата основаны на существовании одно-электронных циклических переходов между дигидро-, монодегидро- и дегидро-аскорбатными формами. Как антиоксидант аскорбат реагирует с супероксидом кислорода, перекисью водорода и радикалом токоферола, при этом окисляясь до монодегидроаскорбиновой кислоты (МДГА) или дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА). Окисленные формы превращаются в аскорбат с помощью редуктаз МДГА и ДГА соответственно. В первом случае используется восстановленный эквивалент НАДФН+Н⁺, а во втором – глутатион (Полесская, 2007).

В клетках аскорбиновая кислота (АК) выполняет целый ряд важных антиоксидантных функций (Шарова, 2016), а именно обрывает цепные реакции окисления органических соединений (формула 1.22) и прямо реагирует с АФК, например, с гидроксил-радикалом (формула 1.23):



Особенно детально охарактеризована способность аскорбиновой кислоты к детоксикации озона (O^3), происходящей в клеточных стенках растений. АК может восстанавливать другие важные антиоксиданты – фенольные вещества и витамин Е. Благодаря способности восстанавливать витамин Е аскорбиновая кислота, хоть и является гидрофильным соединением, фактически препятствует окислению мембранных липидов. Кроме того, АК служит субстратом аскорбатпероксидазы – основного фермента, с помощью которого в тканях растений удаляется пероксид водорода:



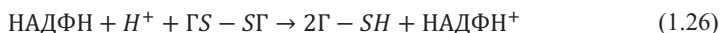
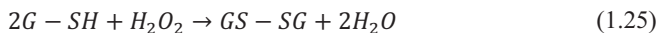
Аскорбатпероксидаза была открыта в 1979 г. Это один из важнейших ферментов антиоксидантной защиты растений.

Аскорбатпероксидаза (ЕС 1.11.1.11) относится к I классу гемсодержащих пероксидаз. Пероксидазы I класса – внутриклеточные ферменты, которые, в отличие от экстраклеточных пероксидаз III класса, не имеют сигнального пептида, адресующего белки в клеточную стенку, и дисульфидных мостиков, не содержат Ca^{2+} . Аскорбатпероксидазы выявлены у широкого круга растительных организмов, от зеленых водорослей до цветковых. Кроме того, они обнаружены у красных водорослей и у некоторых протистов.

Глутатион – это маленький пептид, состоящий из трех аминокислотных остатков (γ -Глу, Цис, Гли), гамма-глутамилцистеинилглицин. Необычный структурный элемент молекулы – амидная связь, образованная взаимодействием амидной группы цистеина и γ -карбоксильной группы глутаминовой кислоты.

Глутатион защищает тиольные группы белков, инактивирует радикальные частицы, разрушает перекисные соединения, реагирует с активными формами кислорода. Он может стабилизировать мембранные структуры, удаляя ацильные перекиси, образующиеся в ходе ПОЛ. При этом восстановленная форма глутатиона $\Gamma - SH$ превращается в окисленную $\Gamma S - \Gamma G$. Восстанавливается окисленный глутатион под действием фермента глутатионредуктаза (ГР).

Глутатион является кофактором ферментов глутатионпероксидазы (ГП) – восстанавливает H_2O_2 до воды при окислении глутатиона (формула 1.25) и глутатионредуктазы (ГР) (формула 1.26), которая постоянно находится в клетке в активном состоянии, катализируя восстановление окисленного глутатиона при участии $НАДФН + H^+$:



Глутатион участвует в глутатион-аскорбатном цикле, восстановления дегидроаскорбиновую кислоту без апофермента при $pH > 7$ в клетке и концентрации глутатиона $> 1 \text{ mM}$.

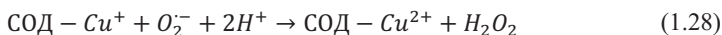
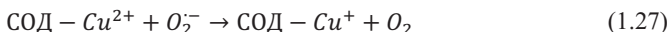
Способность глутатиона перехватывать свободные радикалы обуславливает его противодействие окислительному стрессу. Кроме того, в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами, растения синтезируют металлсвязывающие белки, такие как фитохелатины. Наличие γ -Глу связи в этих пептидах свидетельствует о том, что они не синтезируются через мРНК, а используют молекулы глутатиона в качестве мономеров. Это уменьшает пул GSH.

Снижение количества, восстановленного глутатиона может также наблюдаться в результате недостатка глутатионредуктазы или снижения скорости синтеза. Это может приводить к сильным клеточным повреждениям. Уменьшение пула, восстановленного глутатиона может свидетельствовать о его окислении до GSSG, катализируемом тяжелыми металлами, либо использовании GSH-пероксидазами в процессе ферментативной регенерации перекисей липидов.

Использование GSH в антиоксидантной защите у разных видов может происходить по разным механизмам: с преобладанием процессов его ресинтеза или активного участия в окислительно-восстановительных процессах. Вторым механизмом метаболизма является более уязвимым, так как в условиях стресса при загрязнении ресурс глутатиона истощается. Это может привести к нарушению функционирования глутатионзависимой антипероксидной системы клеток (Полесская, 2007).

Еще один фермент, который участвует в выполнении цитопротекторных функций глутатиона, это глутатион S-трансфераза, которая катализирует конъюгацию эндогенных или экзогенных электрофильных субстратов с глутатионом. Далее конъюгат транспортируется в вакуоль. Показано, что данный фермент вовлекается в механизмы устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим факторам, в том числе и воздействию тяжелых металлов.

Антиоксидантные ферменты характеризуются высокой специфичностью по отношению к АФК и отличаются строго определенной локализацией в клетке. Важнейшим ферментом антиоксидантной защиты является супероксиддисмутаза (СОД), которая катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала:



В результате работы СОД образуется пероксид водорода. Основным ферментом, удаляющим пероксид водорода в клетке, является каталаза и ряд ферментов пероксидаз.

Каталаза представляет собой гемовый фермент, состоящий из четырех субъединиц с общей молекулярной массой около 240 кД. Это металлопротеин с гемовым железом в активном центре. Обнаружено 5 изоформ каталаз. Необходимы достаточно высокие концентрации H_2O_2 для проявления каталитической функции фермента, имеющего невысокое сродство к субстрату и использующего в качестве донора электрона при восстановлении H_2O_2 до воды и молекуляр-

ного кислорода вторую молекулу пероксида. Пероксидазы разрушают H_2O_2 нерадикальным путем и образуют H_2O при окислении не второй молекулы H_2O_2 , как в случае каталазы, а других субстратов (AH_2):



Пероксидазы различаются по субстратам окисления и строению активного центра. Это металлопротеины, содержащие железо в гемовой форме. Источником АФК для работы пероксидаз могут быть также органические гидроперекиси. Наиболее распространена в растениях гваяколовая пероксидаза, участвующая в биосинтезе лигнина.

Особое место занимает глутатионпероксидаза, использующая водород сульфгидрильной группы глутатиона для восстановления гидроперекисей липидов в соответствующие спирты и восстановление пероксида водорода до воды. При восстановлении глутатиона глутатионредуктазой донором электронов служит НАДФН, образующийся, например, в световых реакциях фотосинтеза или окислении глюкозы (Полесская, 2007).

Свободный пролин способен снижать скорость ПОЛ и снижать количество АФК у растений. Однако механизмы уменьшения содержания пероксида водорода и возможно других АФК в клетках растений под влиянием пролина объяснить довольно сложно. Его структурные особенности дают основания рассматривать возможность прямой инактивации радикальных форм кислорода. Так, пролин может образовывать устойчивый радикал, поскольку содержит третичный углеродный атом. Образование такого устойчивого радикала приводит к «тушению» или обрыву каскада свободнорадикальных реакций, запускаемых супероксид-радикалом, пероксид-радикалом или гидроксилрадикалом (Колупаев и др., 2014).

К настоящему времени накоплен огромный фактический материал, позволяющий заключить, что усиление свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов является одной из универсальных клеточных реакций на воздействие различных по своей природе стрессовых факторов как у животных, так и у растений. Кроме того, в последнее время накапливается все больше данных, показывающих, что увеличение интенсивности ПОЛ и свободнорадикальных процессов при стрессе является не только следствием нарушения антиоксидантно-прооксидантного гомеостаза, а представляет собой важный компонент фенотипической адаптации. Показано, что некоторые АФК ($^1\text{O}_2$; O_2^- , H_2O_2) и продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-ноненаль) являются сигнальными молекулами, в том числе и при развитии стрессовой реакции у растений (Полесская, 2007). В частности, выявлена способность малонового диальдегида регулировать экспрессию генов. Малоновый диальдегид широко используется в качестве биомаркера интенсивности ПОЛ у растений и животных. Повышенный уровень ПОЛ наблюдается и при действии антропогенных стресс-факторов на растительные объекты. Соответственно антиоксидантная система, регулирующая уровень АФК и интенсивность ПОЛ в клетках, также неспецифически реагирует на воздействие любых стрессовых

факторов среды, включая любые типы антропогенных воздействий, поэтому изменение состояния ее компонентов может быть использовано для оценки растений в условиях техногенной нагрузки.

Далее мы приводим описание методик оценки активности наиболее важных антиоксидантных ферментов и уровня некоторых низкомолекулярных антиоксидантов у растений.

1.4. Методы оценки состояния антиоксидантной системы растений

Активность гваякол-зависимых пероксидаз (общая пероксидазная активность). Чаще всего оценивается по методике Ridge and Osborn (1971) в модификации Шевяковой Н.И. с соавт. (2002). 1 г листовых пластинок гомогенизируют в ступке, замороженной в лед, с 17 мл 0.066 М К/Na-фосфатного буфера (pH=7.4), который охлаждают с добавлением поливинилпирролидона (1–3 мг/л буфера). В центрифужные пробирки добавляют 1 мл 0.066 М К/Na-фосфатного буфера (pH=7.4) и 1 мл гомогената. Пробирки центрифугируют в течение 15 мин при 10000 g. Реакционная смесь содержит 80 мМ гваякол и 10 мМ H₂O₂ в 0.066 М фосфатном буфере (pH = 7.4). Реакцию в кювете запускают добавлением 0.1 мл супернатанта к 3 мл реакционной смеси. Временную динамику изменения оптической плотности при 470 нм регистрируют в течение 3 мин каждые 2 сек на спектрофотометре СФ 2000, используя программу «Кинетика». Пероксидазную активность выражают в изменении оптической плотности в минуту на г сырой ткани листа ($\Delta E \text{ мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$ сырой ткани листа).

Определение активности супероксиддисмутазы. Одним из наиболее распространенных методов определения общей активности СОД является метод Beauchamp and Fridovich (1971). В этом методе используется фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия, в результате которого образуется формазан – вещество синего цвета. В качестве источника супероксид радикала служит система метионин/рибофлавин. В присутствии СОД данный процесс ингибируется, так как СОД диспропорционирует часть супероксид радикалов. В результате такого ингибирования количество образующегося формазана уменьшается. Оптическая плотность формазана измеряется при 560 нм и служит основой для расчета активности фермента (Молекулярно-генетические..., 2012).

В 0.1–0.3 г растительного материала растирают в жидком азоте. Экстракцию растворимых белков проводят 0.066 М К/Na-фосфатным буфером, pH=7.4, содержащим 1 мМ дитиотриитола (DTT), 0.5 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF) в DMSO (диметилсульфоксид), 1–3 мг поливинилпирролидона (ПВП). Все используемые вещества необходимы для стабилизации белков в растительном экстракте, стабилизации pH, предотвращения окислительно-восстановительных реакций, возникающих в результате разрушения клеточных органелл и выхода их содержимого в гомогенат. После центрифугирования гомогената при 10000 g в течение 20 мин при 4 °С полученный супернатант используют как ферментный препарат для определения активности СОД. Реакционная смесь объемом 2 мл содержит 40 мкл ферментного препарата; 40 мМ

Трис-НСI буфера, рН=7.8; 10 мМ L-метионина; 54 мкМ нитросинего тетразолия; 0.025% Тритон Х-100 и 3 мкМ рибофлавина. Реакцию проводят при освещении люминесцентными лампами модели F36W/54 (Philips, Венгрия) в течение 30 мин.

Необходимо очень тщательно располагать пробирки с реакционной смесью для достижения равномерной и одинаковой освещенности. В качестве контроля используют реакционную смесь без ферментного препарата. Оптическую плотность раствора измеряют при 560 нм на спектрофотометре. Расчет активности фермента проводят по формуле:

$$A = \frac{\log \left(\frac{E_{\text{контр.}}}{E_{\text{обр.}}} \right)}{\log 2 \times m_{\text{бел.}}}, \quad (1.29)$$

где A – активность СОД, усл. ед. активности/мг белка; $E_{\text{контр.}}$ – оптическая плотность контрольного образца; $E_{\text{обр.}}$ – оптическая плотность опытного образца; $m_{\text{бел.}}$ – масса белка в объеме препарата, используемого для анализа, мг.

Активность СОД выражается в условных единицах активности на мг белка в препарате. Использование $\log$ в расчетах обусловлено логарифмической зависимостью оптической плотности от количества фермента, кроме того, достоверным считаются значения оптической плотности, соответствующие 50% ингибированию реакции с нитросиним тетразолием. В связи с этим используется $\log 2$ как коэффициент (Молекулярно-генетические..., 2012).

Определение активности каталазы. Определение активности каталазы достаточно часто проводят по методу Vitoria et al. (2001). Растительный материал (0,1-0,3 г) гомогенизируют в фарфоровой ступке с жидким азотом. Экстракцию растворимых белков проводят 0.05 М К/Na-фосфатным буфером, рН=7.8, содержащим 1 мМ DTT, 0.5 мМ PMSF в DMSO, 1–3 мг ПВП. Суспензию центрифугируют при 10000 g в течение 20 мин при 4 °С. Реакционную смесь объемом 2 мл содержит 0.05 М К/Na-фосфатный буфер, рН=7.8; 50 мкл супернатанта. Непосредственно перед измерением в реакционную смесь добавляют 0.1 мл 0.1 М перекиси водорода. Динамику изменения оптической плотности регистрируют на спектрофотометре в течение 3 мин при длине волн 240 нм. Показания снимают каждые 2 с. В качестве контроля используют исходный буфер. Расчет активности каталазы проведен с помощью калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям H_2O_2 :

$$A = \frac{1000 \times \Delta E_{\text{min}} \times V_{\text{общ.}}}{k \times m_{\text{белка}}}, \quad (1.30)$$

где A – количество вещества израсходованной H_2O_2 в минуту 1 мг белка препарата; E_{min} – среднее изменение оптической плотности за 1 мин; $V_{\text{общ.}}$ – общий объем реакционной среды, мл; k – коэффициент молярной экстинкции, 32.57;

$m_{\text{белка}}$ – масса белка в объеме препарата, используемого для анализа, мг (Молекулярно-генетические..., 2012).

Определение активности аскорбатпероксидазы. Активность аскорбатпероксидазы определяют по методу Nakano and Asada (1981) по уменьшению количества содержания аскорбата при 290 нм (аскорбат окисляется в этой реакции).

0.5 г растительного материала растирается с 1 мл охлажденного 0.1 М фосфатного буфера (pH=7.0), содержащего 1 мМ DTT, 0.5 мМ PMSF в DMSO в охлажденной ступке. Суспензию центрифугируют при 10000 g в течение 20 мин при 4 °С. Реакционная смесь (3 мл) содержит: 50 мМ фосфатный буфер (pH=7.0), 0.5 мМ аскорбиновую кислоту, 0.1мМ ЭДТА, 0.1мМ H_2O_2 и 0.05–0.1 мл ферментного препарата (растительного экстракта). Реакция начинается добавлением перекиси водорода, изменение оптической плотности измеряется при 290 нм в течение 3 мин. Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta \bar{E}_{\min} \times \left(\frac{V_H}{1000} + V_{\text{буф.}} + V_{\text{H}_2\text{O}_2} \right)}{k \times m_{\text{белка}}}, \quad (1.31)$$

где A – активность фермента, ммоль/мг белка; $E_{\min}$ – среднее изменение оптической плотности за 1 мин; V_H – объем образца, мкл; $V_{\text{буф.}}$ – объем буфера, мл; $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ – объем перекиси водорода, мл; k – коэффициент молярной экстинкции 2,8 нмоль/см; $m_{\text{белка}}$ – масса белка в объеме образца, мг (Молекулярно-генетические..., 2012).

Определение содержания свободного пролина. Чаще всего определение содержания свободного пролина проводят по методу Bates (1973). Навеску растительного материала массой 100 мг растирают в жидком азоте. Растертый материал переносят в химический стакан и заливают 4 мл дистиллированной воды. Стакан с навеской трехкратно доводят до кипения и охлаждают. Образовавшуюся вытяжку фильтруют в мерные пробирки. Полученный экстракт доводят до нужного объема (6–7 мл) и в дальнейшем используют для анализа. Пробирки с 1 мл экстракта, 1 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл нингидринового реактива (1.25 г нингидрина, 20 мл 6 М H_3PO_4 , 30 мл ледяной уксусной кислоты) инкубируют в течение 1 ч на кипящей водяной бане. В контрольный образец вместо экстракта добавляют 1 мл дистиллированной воды. Оптическую плотность полученных окрашенных растворов измеряют на спектрофотометре против контроля при длине волны 520 нм. Содержание пролина рассчитывают с использованием калибровочной кривой по формуле:

$$C_x = \frac{E \times k \times V_{\text{общ.}}}{V_{\text{н}} \times m}, \quad (1.32)$$

где C_x – концентрация пролина, мкмоль/г сырой массы; E – оптическая плотность раствора; k – коэффициент, рассчитанный по калибровочной кривой; $V_{\text{общ.}}$

– общий объем экстракта, мл; V_n – объем экстракта, взятый для анализа, мл; m – масса навески, г.

Недостатком данного метода является возможность образования в минорных количествах нингидриновых производных других аминокислот в этих условиях, что приводит к некоторому завышению полученных значений. Определение свободного пролина в растительных тканях можно проводить и на аминокислотном анализаторе. Во всех случаях пролин, как и другие аминокислоты, определяется в качестве нингидриновых производных. Показано, что сравнение значений для содержания пролина, полученных этим методом и с помощью аминокислотного анализатора, позволяет утверждать, что различия не влияют на обнаруживаемую тенденцию (Молекулярно-генетические..., 2012).

Определение содержания восстановленного глутатиона. Для определения количества восстановленного глутатиона используется реагент Элмана (1959). Растительная ткань (1 г) гомогенизируется в 5 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH=7.4), центрифугируется при 20000 g 15 мин при 4 °C. К супернатанту добавляют 5%-ную трихлоруксусную кислоту, центрифугируют при 20000 g 15 мин при 4 °C. Реакционная смесь содержит 0.2 М фосфатный буфер (pH=8.0), 5%-ную трихлоруксусную кислоту и реактив Элмана, аликвоту растительного экстракта (общий объем 2 мл). Реактив Элмана содержит: 19.8 мг 5.5-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) в 100 мл 0.1%-ного цитрата натрия. Оптическую плотность полученного желтого раствора измеряют при 412 нм. Количество восстановленного глутатиона рассчитывают, используя стандартную кривую (коммерческий препарат восстановленного глутатиона).

Список литературы

Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь, 2002. – Т.2. – 495 с.

Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Проллин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // Вісник харківського національного аграрного університету серія біологія. – 2014. – Вип. 2(32). – С. 6–22.

Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. В.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.

Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.

Шарова Е.И. Антиоксиданты растений: учебное пособие. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2016. – 140 с.

Шевякова Н. И., Стеценко Л. А., Мецераков А. Б., Кузнецов В.В. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцируемого формирования САМ // Физиология растений. – 2002. – Т.49. – С. 670–677.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. – 1973. – V.39. – P. 205–207.

Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Analytical Biochemistry*. – 1971. – V.44. – P. 276–287.

Ellman G.L. Tissue sulphydryl groups // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1959. – V.82. – P. 70–77.

Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol*. – 1981. – V.22. – P. 867–880.

Ridge I., Osborne D.J. Role of peroxidase when hydroxyproline-rich protein in plant cellwall is increased by ethylene // *Nature New Biology*. – 1971. – V.229. – P. 205–208.

Vitoria A.P., Lea P.J., Azevedo R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues // *Phytochemistry*. – 2001. – V.57. – P. 701–710.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО СОСТАВА КРОВИ РЕПТИЛИЙ (ЯДОВИТЫХ И НЕЯДОВИТЫХ ЗМЕЙ) В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Пресмыкающиеся или рептилии (Reptilia) являются первыми настоящими наземными позвоночными животными, чья зависимость от внешних условий среды хорошо известна (Галактионов, 2004; Cooper, 1976; Work et al., 2000; Coico et al., 2003; Zimmerman et al., 2010 и др.). Современные рептилии включают четыре отряда: Клювоголовые (Rhynchocephalia) (с единственным представителем – гаттерией); отряд Чешуйчатые (Squamata), объединяющий ящериц (Lacertilia), хамелеонов (Chameleontes), змей (Ophidia, Serpentes); отряд Крокодилы (Crocodylia) и отряд Черепахи (Chelonia). Вместе с птицами и млекопитающими рептилии формируют группу амниот – первично-наземных высших позвоночных. Эволюционный переход животных от водного к наземному образу жизни сопровождался многими адаптационными преобразованиями и совершенствованием иммунитета рептилий по сравнению с первично-водными: рыбами и амфибиями.

Рептилии – единственные эктотермные амниоты, не подвергающиеся метаморфозу, у которых начинается расхождение клеток по самостоятельным лимфатическим и кровеносным путям (Cuchens, Clem, 1979; Dabrowski et al., 2007). Неспецифические иммунные ответы рептилий во многих случаях протекают сильнее, чем у млекопитающих, но относительно мало изучены. В настоящее время в экологических исследованиях появляется все больше работ, посвященных оценке физиологического стресса рептилий по измерению уровня глюкокортикоидных гормонов (Romero, 2004; Wikelski, Cooke, 2006) и лейкоцитарного профиля крови (Davis et al., 2008 и др.). Реакции же адаптивного иммунитета рептилий, включая клеточный и гуморальный ответы, представлены единичными работами и практически не исследованы (Khokhlova et al., 2004; Kobolkuti et al., 2012; Tripathi, Singh, 2014). Между тем, изучение механизмов иммунной защиты природных популяций рептилий, находящихся под воздействием комплекса биотических и абиотических факторов среды (инфекций, паразитов, загрязняющих веществ, температуры и др.) в естественные периоды жизненной активности, имеет большой научный потенциал и представляет важный шаг на пути к детальному исследованию иммуногемопоза этих животных. Изучение специфических форм защиты от чужеродных агентов у представителей этого класса крайне важно для познания эволюционного становления иммунитета и отслеживания преемственной связи с птицами и млекопитающими, для которых характерен высший уровень иммуноэволюции – интегрированный клеточный и гуморальный иммунитет. Не менее актуальным является исследование иммуногематологических показателей разных видов для получе-

ния характеристик популяционного гомеостаза, обеспечивающего выживание и существование рептилий в условиях антропогенного средового стресса.

Оценка иммунного статуса рептилий предполагает дифференцированную характеристику системы неспецифической резистентности, Т- и В-систем иммунитета. В настоящей главе мы остановимся на оптимальном числе простых и объективных тестов, способных отразить состояние иммунного статуса рептилий в условиях стрессовых факторов среды обитания.

2.1. Определение числа ядросодержащих клеток крови рептилий

В экологических исследованиях изучение модулирующего воздействия комплекса биотических, абиотических и антропогенных факторов среды (патогенов, загрязняющих веществ, температуры и др.) на иммунные реакции рептилий рекомендуется начинать с определения клеточности центральных (тимус, костный мозг), периферических (лимфоузлы, селезенка) органов иммунитета и содержания ядросодержащих клеток в периферической крови.

2.1.1. Лейкоцитарная формула крови и лейкоцитарные индексы

Принцип метода. В основе определения лейкоцитарного состава крови лежит принцип распознавания образа клеток за счет различия их внешнего вида. При дифференцировке форменных элементов крови принимают во внимание межвидовые морфологические характеристики лейкоцитов рептилий (Bounous et al., 1996; Соколова, Павлов, Юсупов, 1997; Salakij et al., 2002; Васильев, 2005; Claver, 2009; Хайрутдинов, Соколова, 2010; Бакиев и др., 2015 и др.), возраст, пол, репродуктивный статус животных, сезон и условия окружающей среды (Sykes, 2008).

Материалы и оборудование

- ❖ Забуференный физиологический раствор (ЗФР), pH=7.2.
- ❖ KH_2PO_4 – 1.09 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2.14 г; NaCl – 9.0 г; H_2O – до 1 л.
- ❖ 1%-ный раствор гепарина – коммерческий препарат. Для приготовления рабочего раствора гепарина (200 ед/мл), к 1 мл раствора 1% раствора гепарина, содержащего 5000 ед/мл, приливают 24 мл стерильного раствора 0.15 M NaCl. Хранят в холодильнике.
- ❖ Раствор риванола.
- ❖ 10%-ный раствор H_2O_2 .
- ❖ Среда 199 (среда Хенкса) – Московское предприятие по производству бакпрепаратов МЗ РФ.
- ❖ 3%-ная уксусная кислота.
- ❖ Краска Романовского-Гимзы – коммерческий препарат.
- ❖ Смесь Никифорова: этиловый спирт с эфиром (1:1).
- ❖ H_2O дистиллированная.
- ❖ Центрифуга, холодильник, микроскоп, счетчик гематологический лабораторный для учета форменных элементов крови, дозаторы пипеточные на 20, 50 и 100 мкл, пробирки, предметные стекла, шпатель для растяжки

мазков крови со шлифованными краями, иммерсионное масло, шприцы объемом 3–5 мл, шприц-зонд, ножницы, глазные пинцеты, стерильные марлевые салфетки, иглы инъекционные.

Забор крови у змей. Для поднятия общей активности змей помещают в террариум с температурой 28–34 °С на 10–15 минут. Затем голову змеи фиксируют пальцами левой руки, плечом этой же руки удерживают заднюю часть туловища. С помощью пинцета раскрывают пасть животного. Ротовую полость обильно орошают риванолом и высушивают стерильной марлевой салфеткой. Забор крови проводят из верхнечелюстной вены (рис. 2.1).

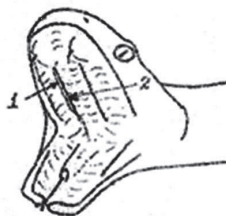


Рис. 2.1. Место отбора крови у змей (по Соколиной, Павловой, Юсупову, 1997)

1 – верхнечелюстная вена; 2 – крыловидная кость

Стерильной иглой (диаметр иглы подбирают с учетом массы животного) делают прокол вены. Стекающую кровь (не более 2.0 мл) собирают в пробирку, края которой смочены раствором гепарина (200 ед./мл). После процедуры заднюю часть тела змеи освобождают. Змею выдерживают в вертикальном положении (3–5 мин), ротовую полость обрабатывают 10%-ным раствором перекиси водорода. Повторный забор крови проводят не ранее 10–14 дней.

Приготовление мазка крови. Мазки крови делают на хорошо очищенных и обезжиренных предметных стеклах. На подготовленное предметное стекло микропипеткой наносят небольшую каплю крови, затем осторожно накладывают под углом 45° гематологический шпатель для растяжки мазков так, чтобы кровь распределялась равномерным тонким слоем между стеклом и шпателем, осторожно проводят шпателем вдоль предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе, затем фиксируют в смеси Никифорова, в течение 20 мин. Зафиксированный препарат окрашивают готовой краской Романовского-Гимзы, состоящей из смеси кислой (эозин) и щелочной (метиленовая синька и азури) красок, в течение 17–20 минут, затем смывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Учет клеток крови проводят под микроскопом при общем увеличении $\times 1500$ с иммерсионной системой, с помощью гематологического лабораторного счетчика.

Дифференцировка лейкоцитарных клеток. С учетом морфологических особенностей в мазках определяют шесть типов лейкоцитарных клеток (в %): гранулоциты (гетерофилы, базофилы, эозинофилы) и агранулоциты (азурофилы, моноциты, лимфоциты). Для точности анализа рекомендуется просчитывать не менее трех мазков крови, приготовленные от одной особи, с учетом в

каждом мазке 200 клеток. Долю лейкоцитарных клеток выражают в процентах (%) к общему количеству сосчитанных клеток.

Гетерофилы – клетки округлой формы, с гранулами в цитоплазме. Ядро овальное или округлое, темное, у некоторых видов ящериц – дольчатой формы. Морфология и количество гранул в гетерофилах разных видов рептилий варьирует. Цвет гранул в цитоплазме может быть бледно-розовым или оранжево-голубым, цитоплазма – светло-голубой или прозрачной. В мазках периферической крови черепах и крокодилов, гетерофилы имеют одно базофильное ядро, расположенное эксцентрично, и эозинофильные веретеновидные гранулы. У чешуйчатых гетерофилы характеризуются округлыми или сегментированными ядрами, эозинофильные гранулы многоугольной или плеоморфной формы. Размеры гетерофилов ящериц варьируют от 13 до 17 мкм. В гетерофилах змей ядра обычно одиночные, гранулы плохо сформированы, у ящериц гетерофилы полиморфноядерные, гранулы веретеновидные, палочковидные или плеоморфные. В молодых гетерофилах ядро обычно овальное, гранулы имеют округлую форму. У игуан максимальное количество кирпичных палочковидных гранул отмечается в зрелых гетерофилах. В молодых клетках красно-оранжевые сферические гранулы, число их в 2–3 раза меньше. У водяных агам, как и у некоторых других ящериц, зрелые гетерофилы сохраняют «ювенильные» черты и содержат округлые и нерегулярные гранулы. Встречается много клеток, где имеется всего 2–3 таких гранулы (LeBlanc, 2001). Гетерофилы гадюк и ужей представляют собой клетки округлой формы с овальным или округлым ядром, светло-голубой или прозрачной цитоплазмой. Цвет гранул может быть бледно-розовым или оранжевым. В отличие от эозинофилов гетерофилы имеют более продолговатые (веретеновидные) гранулы (рис. 2.2).

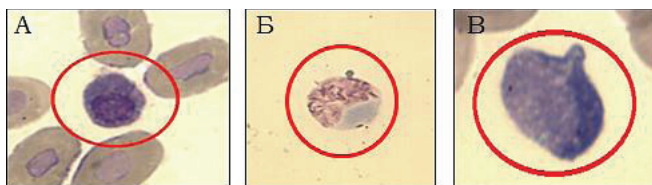


Рис. 2.2. Гетерофилы: А, Б – гадюки обыкновенной (*Vipera berus berus* L., 1758); В – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L., 1758)

Эозинофилы – клетки округлой или неправильной формы, ядро фиолетового цвета, расположено эксцентрично. Цвет гранул варьирует от ярко-розового (в этих же случаях гранулы гетерофилов имеют более тусклый оттенок розового) до голубого (Johnson, 2011). У зеленых игуан эозинофилы крупнее гетерофилов, имеют одиночное ядро и крупные овальные гранулы фиолетового цвета. У черепах и крокодилов эозинофилы по размеру (12–17 мкм) сравнимы с гетерофилами, имеют овальное или двухлопастное эксцентричное ядро и крупные сферические эозинофильные гранулы. У змей эозинофилы крупнее (17–20 мкм), чем у других рептилий. В периферической крови ящериц эозинофилы

встречаются редко. Эозинофилы гадюк и ужей имеют округлую или неправильную форму, крупные размеры (17–20 мкм.). Ядро фиолетового цвета и смещено к краю клетки. Цвет гранул варьирует от ярко-розового до голубого (рис. 2.3).

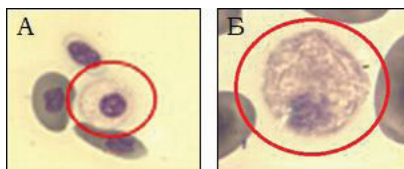


Рис. 2.3. Эозинофилы: А – гадюки обыкновенной (*Vipera berus berus* L., 1758);
Б – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L., 1758)

Базофилы – некрупные клетки округлой формы с обилием гранул в цитоплазме, которые плотно окружают ядро клетки, делая его едва различимым (Лисничая, Ефимов, 2014). Базофилы рептилий окрашиваются метахроматически, что обусловлено наличием в цитоплазме гранул двух типов: крупных темно-базофильных гранул, и мелких гранул, окрашивающихся азурофильно (Васильев, 2005). Цвет гранул темно-пурпурный. Размеры базофилов у ящериц в среднем составляют 8–12 мкм, у змей и черепах они крупнее – до 13–16 мкм, самые крупные базофилы (до 20 мкм) – у гаттерии. Базофилы гадюк и ужей округлой формы, мельче (13–16 мкм), чем другие гранулоциты. Гранулы цитоплазмы крупные, плотно окружают ядро клетки, окрашиваются в темно-пурпурный цвет (рис. 2.4).



Рис. 2.4. Базофилы: А, Б – гадюки обыкновенной (*Vipera berus berus* L., 1758);
В – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L., 1758)

Азурофилы – крупные клетки округлой или слегка овальной формы с единственным ядром. Цитоплазма слабо базофильна (серо-голубая) с большим количеством нежных мелких гранул, напоминающих прозрачные вакуоли (Хайрутдинов, 2008). Ядро округло-овальной формы, окрашивается в сине-фиолетовый цвет, может быть смещено к периферии клетки. Размеры азурофилов меньше, по сравнению с моноцитами. Азурофилы гадюк и ужей имеют округлую или овальную форму, серо-голубую цитоплазму с большим числом мелких гранул, напоминающих прозрачные вакуоли (рис. 2.5).

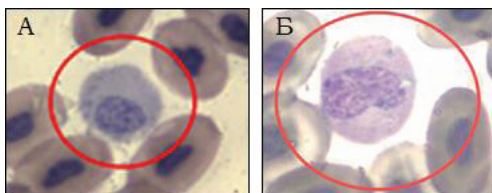


Рис. 2.5. Азурофилы: А – гадюки обыкновенной (*Vipera berus berus* L., 1758);
Б – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L., 1758)

Моноциты – клетки округлой, овальной или неправильной формы. Цитоплазма светлая, серо-голубая, нежно гранулированная, часто содержащая вакуоли. Фиолетовое ядро овальной формы или «в форме почки» расположено эксцентрично и имеет менее конденсированные скопления хроматина, чем лимфоцит (Arıcan, Cicek, 2010). Моноциты – самые крупные клетки периферической крови рептилий, их диаметр у разных видов варьирует от 8 до 20 мкм. У всех рептилий моноциты не многочисленны, порядка 0–10% (у большинства видов 0.5–3%). Однако у некоторых видов змей и ящериц их количество может в норме достигать 10–20% (Васильев, 2005). Моноциты гадюк и ужей имеют округлую, овальную или неправильную форму, цитоплазма серо-голубого цвета занимает большую часть клетки, гранулы единичны или отсутствуют (рис. 2.6).



Рис. 2.6. Моноциты: А, Б – гадюки обыкновенной (*Vipera berus berus* L., 1758);
В – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L., 1758)

Лимфоциты – клетки округлой или овальной формы, относительно редко встречаются клетки с неровными очертаниями. Цитоплазма содержит нежную азурофильную зернистость или мелкие прозрачные включения. По мере созревания лимфоцита уменьшается размер цитоплазматического ободка вокруг ядра. Цвет цитоплазмы изменяется от синего до светло-голубого, она становится менее базофильной (Лисничая, Ефимов, 2014). Как правило, у молодых рептилий и самок абсолютное количество лимфоцитов слегка повышено. Число лимфоцитов возрастает в летние месяцы (у тропических видов во влажный сезон), во время линьки, особенно у змей (Васильев, 2005), и снижается во время зимовки. На практике часто проводят отдельный подсчет мелких (5.5–10 мкм) и крупных (11–14 мкм) лимфоцитов. Лимфоциты гадюк и ужей имеют округлую или овальную форму, небольшие размеры (5.5–14 мкм). Цитоплазма светло –

голубого, синего цвета, незначительного объема. Ядро крупное, занимает центр клетки (рис. 2.7).

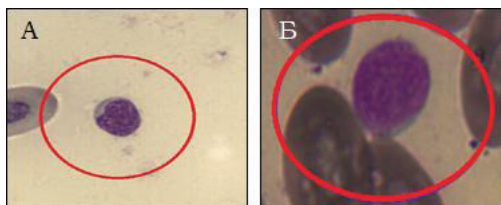


Рис. 2.7. Лимфоциты: А – гадюки обыкновенной (*Vipera berus berus* L., 1758); Б – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L., 1758)

Таблица 2.1

Интегральные лейкоцитарные индексы
(рассчитываются на основании лейкоцитарной формулы)

Лейкоцитарный индекс, отн. ед.	
Индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ)	$\frac{\sum \text{гранулоцитов}}{\sum \text{агранулоцитов}}$
Индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ)	$\frac{Л}{Э}$
Индекс соотношения гетерофилов и эозинофилов (ИСГЭ)	$\frac{Г}{Э}$
Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ)	$\frac{Л \times 10}{Э + Г + Б}$
Индекс соотношения гетерофилов и лимфоцитов (ИСГЛ)	$\frac{Г}{Л}$

Примечание: Л – лимфоциты; Э – эозинофилы; Г – гетерофилы; Б – базофилы.

Оценка результата. Результаты анализа данных по лейкоцитарному составу рептилий позволяют установить количественно-качественные изменения в иммунологических показателях крови. Пониженное содержание лимфоцитов свидетельствует о снижении специфической реакции иммунной системы организма. Иммунологической функцией моноцитов является защита от инфекций и бактерий. Гетерофилы считаются наиболее реактивными лейкоцитами в крови рептилий, они обладают наряду с моноцитами высокой фагоцитарной активностью. Повышенное их содержание в периферической крови рептилий свидетельствует о наличии инфекции, воспаления и стресса, отражает активацию неспецифической защитной системы крови. Эозинофилы и базофилы играют определенную роль в воспалительных процессах и участвуют в фагоцитозе иммунных комплексов, образующихся в присутствии паразитов (Васильев, 2005). Изменение интегральных показателей лейкограмм (лейкоцитарных индексов) – индекса соотношения гетерофилов и лимфоцитов, соотношения лимфоцитов и эозинофилов, сдвига лейкоцитов – позволяет детализировать при-

знаки угнетения/активации иммунной реактивности рептилий, что дает основание рассматривать их в качестве популяционных маркеров иммунного статуса.

2.2. Оценка клеточного звена иммунной системы

2.2.1. Реакция бласттрансформации лимфоцитов *in vitro*

Принцип метода. Метод основан на способности лимфоцитов трансформироваться в бласты при воздействии митогенов (фитогемагглютинина, ФГА; конковалина, КонА), приобретая способность к митотическому делению. При этом в лимфоцитах возрастает синтез РНК, ДНК, белка, они увеличиваются в размерах и делятся. Эту реакцию клеток на антиген *in vitro* оценивают по потреблению глюкозы ортотолуидиновым методом. Принцип метода заключается в образовании в кислой среде при повышенной температуре комплексного соединения глюкозы с ортотолуидином сине-зеленого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в исследуемом растворе и регистрируется спектрофотометрически.

Материалы и оборудование

- ❖ Среда для культивирования клеток RPMI-1640 (Sigma, USA) – коммерческий препарат.
- ❖ Раствор глюкозы (100 мг/мл): в мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг высушенной до постоянной массы при температуре 100 °С глюкозы в 0.2%-ном растворе бензойной кислоты. Вначале готовят раствор бензойной кислоты: 0.2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, нагревают на водяной бане до полного исчезновения кристаллов и охлаждают. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, и доливают до метки дистиллированной водой; хранят в холодильнике.
- ❖ Ортотолуидиновый реактив: 0.15 г тиомочевины растворяют в 94 мл ледяной уксусной кислоты и смешивают с 6 мл бесцветного или слегка желтоватого ортотолуидина; ортотолуидин очищают путем перегонки. Реактив стоек, хранят в холодильнике.
- ❖ Фитогемагглютинин-М (ФГА) (Difco Lab., Welcome Reag Divis, USA).
- ❖ H₂O бидистиллированная или деионизированная.
- ❖ CO₂ – инкубатор или любая герметическая камера, в воздухе которой содержится 5% CO₂, пластиковые 96-луночные иммунологические планшеты, дозаторы пипеточные на 20, 50 и 100 мкл, спектрофотометр СФ-2000.

Порядок проведения реакции. В две параллельные ячейки стерильной 96-луночной планшеты вносят образец крови (по 40 мкл), разбавленный в четыре раза средой RPMI 1640, содержащей антибиотика (пенициллин 1000 МЕ/мл, стрептомицин 1000 мкг/мл). В опытные пробы добавляют фитогемагглютинин-М (PHA) (1 мкл на лунку). Пластины помещают в CO₂-инкубатор (концентрация 5% CO₂) и выдерживают при температуре 20 °С в течение 48 ч.

После инкубации в опытных и контрольных пробах измеряют концентрацию глюкозы ортотолуидиновым методом с использованием стандартного раствора глюкозы (100 мг/л). Для этого 12.5 мкл культурального супернатанта переносят в 0.5 мл ортотолуидинового реагента, подвергают кипячению в течение 8 мин, затем быстро охлаждают холодной водой. Оптическую плотность проб регистрируют на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 610 нм. Индексом реакции бласттрансформации (ТИ) рассчитывают по формуле:

$$TI\% = \left[\frac{MG - SG}{MG} \right] \times 100\%, \quad (2.1)$$

где MG – концентрация глюкозы в культуральной среде RPMI 1640; SG – концентрация глюкозы в контрольном или опытном (с фитогемагглютинином) образце после инкубации.

Оценка результатов. В реакции *in vitro* добавленные в культуру митогены неспецифически стимулируют клетки к бласттрансформации. Полученные показатели характеризуют состояние клеточного иммунитета (включая реакции В-клеток) в данный момент и их общую способность к реакциям. Низкие показатели реакции бласттрансформации (менее 30%) свидетельствуют об угнетении функциональной активности клеточного иммунитета.

2.2.2. Оценка бласттрансформации лимфоцитов с добавлением красителя

Принцип метода. Под влиянием митогенов (фитогемагглютинина, ФГА; конковалина, КонА) и антигенов, к которому сенсибилизированы клетки, лейкоциты (в основном лимфоциты) трансформируются в бластные формы. Нарушение этого процесса диагностируется в реакции восстановления нитросинего тетразолия. Соли тетразолия восстанавливаются в митохондриях метаболически активных клеток в цветной (пурпурного-синего цвета) продукт диформазан. При нарушении метаболизма лейкоциты снижают или теряют способность превращать краситель в восстановленную форму (Berridge et al., 2005).

Материалы и оборудование

- ❖ Среда для культивирования клеток RPMI-1640 (Sigma, USA) – коммерческий препарат.
- ❖ Митогены: липополисахарид, ЛПС; Конковалин А, Кон А (Sigma, USA); Фитогемагглютинин-М, ФГА (Difco Lab., Welcome Reag Divis, USA). Растворы митогенов (1 мг/мл) готовят в 0.2 М фосфатном буфере и дополнительно разбавляют культуральной средой.
- ❖ H₂O бидистиллированная или деионизированная.
- ❖ Красители: трипановый синий, нитросиний тетразолий.
- ❖ Диметилсульфоксид.
- ❖ CO₂ – инкубатор или любая герметическая камера, в воздухе которой содержится 5% CO₂, пластиковые 96–луночные иммунологические планшеты, микроскоп, камера Горяева, пинцеты, ножницы, гомогенизаторы,

нейлоновый фильтр, дозаторы пипеточные на 20, 50 и 100 мкл, многоканальный спектрофотометр SUMAL PE2 (Karl Zeiss, Jena, Германия).

Приготовление суспензии лимфоидных клеток. Для получения ядросодержащих клеток из лимфоидных органов рептилий забивают с помощью эфир, взвешивают на аналитических весах (в г). В асептических условиях выделяют лимфоидные органы (тимус, селезенку, лимфоузлы), взвешивают на торсионных весах (в мг) и рассчитывают относительную массу органов. Клетки из лимфоидных органов тефлоновым пестиком гомогенизируют в среде RPMI-1640. Селезенку и лимфоузлы гомогенизируют в 2 мл, тимус – в 1 мл среды. Полученную лимфоидную суспензию фильтруют через нейлоновый фильтр, 3 раза отмывают от частиц жировой ткани центрифугированием при 1000 об/мин, в течение 3 минут.

Подсчет и определение жизнеспособности лимфоидных клеток. Каплю клеточной суспензии вносят в камеру Горяева, проводят подсчет во всех малых квадратах. Число клеток в 1 мкл (мм^3) вычисляют, исходя из объема камеры и степени разведения, используя формулу для подсчета лейкоцитов.

$$X = \frac{a \times 4000 \times v}{b}, \quad (2.2)$$

где X – количество форменных элементов в 1 мм^3 ; a – число клеток, подсчитанных в определенном объеме; v – разведение; b – количество сосчитанных малых квадратов.

Затем на культуральной среде RPMI-1640 готовят рабочее разведение лимфоидных клеток ($1 \times 10^5/\text{мл}$). Для определения жизнеспособности клеток берут 20 мкл рабочего разведения клеток, добавляют равный объем краски (трипановый синий). Через 3 мин под микроскопом в камере Горяева подсчитывают число окрашенных (мертвых клеток) на 200 клеточных элементов в поле зрения. Жизнеспособность кариоцитов в лимфоидных органах (в %) высчитывают по формуле:

$$N = \frac{N_n - N_o}{N_n} \times 100, \quad (2.3)$$

где: N – жизнеспособность лимфоидных клеток (в %); N_n – число неокрашенных клеток; N_o – число окрашенных клеток.

Порядок проведения реакции. В лунки плоскодонной 96-луночной планшеты вносят по 50 мкл приготовленной суспензии лимфоидных клеток ($1 \times 10^5/\text{мл}$). Добавляют в отдельные лунки растворы митогенов (50 мкл): Кон А – в концентрациях: 5, 10 и 20 мкг/мл; ЛПС – в концентрациях: 10 и 20 мкг/мл; ФГА – в концентрации 10 мкг/мл. Добавляют среду RPMI-1640 по 150 мкл/лунку. Контрольными пробами служат лунки, содержащие суспензию клеток (50 мкл) с 150 мкл среды RPMI-1640, без митогена, для оценки спонтанной пролиферации клеток. Дополнительная лунка, содержащая 200 мкл культу-

ральной среды, является контролем на реактивы. Планшеты помещают в CO₂ – инкубатор при 25 °C на 48 ч. Затем в каждую лунку добавляют по 20 мкл нитросинего тетразолия (5 мг/мл), планшеты снова инкубируют. После инкубации удаляют супернатант и растворяют продукт реакции восстановления нитросинего тетразолия (диформаза) в 100 мкл диметилсульфоксида. Оптическую плотность полученных растворов определяют на многоканальном спектрофотометре при длине волны 570 нм.

Оценка результатов. Количество продукта диформаза, измеренное по объему поглощения, прямо пропорционально количеству живых клеток в культуре (Cory et al., 1991). Индекс пролиферации (ИП) лимфоцитов рассчитывают как отношение показателя оптической плотности стимулированной культуры с митогеном к оптической плотности нестимулированной культуры без митогена. Угнетение функциональной активности клеточного иммунитета сопровождается снижением индекса пролиферации.

2.3. Оценка гуморального звена иммунной системы

2.3.1. Определение циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови

Принцип метода. Метод основан на селективной преципитации комплексов антиген-антитело в растворах полиэтиленгликоля с последующим спектрофотометрическим определением плотности преципитата.

Материалы и оборудование

- ❖ 0.1 М боратный буфер pH=8.4. В 1 л воды растворяют 3.41 г борной кислоты и 4.275 г буры.
- ❖ 4.2%-ый раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ), готовят на боратном буфере.
- ❖ Дистиллированная вода.
- ❖ Многоканальный спектрофотометр SUMAL PE2 (Karl Zeiss, Jena, Германия), центробежная микропроцессорная центрифуга CN-2060 (Hsiangtai Machinery Industry Co. Ltd, Тайвань), термостат (37 °C), холодильник, сушижаровой шкаф, пластиковые 96-луночные иммунологические планшеты, дозаторы пипеточные (50, 100 мкл).

Порядок проведения реакции. Для получения сыворотки образцы крови помещают в термостат на 30 мин при 37 °C, затем центрифугируют при 1308 g в течение 10 мин. Пипеточным дозатором отбирают сыворотку. Сыворотки можно длительно хранить в морозильной камере при – 20 °C.

Реакцию проводят в 96-луночных планшетах. В лунки вносят 196.7 мкл 4.2%-ного раствора ПЭГ на боратном буфере, добавляют 3.3 мкл сыворотки (опыт). Контролем служат лунки с сывороткой крови (3.3 мкл) и боратным буфером (196.7 мкл) без ПЭГ. Для осаждения иммунных комплексов планшеты оставляют при комнатной температуре на 1 час. Затем определяют оптическую плотность растворов на многоканальном спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Оценка результатов. Концентрацию циркулирующих комплексов, выраженную в единицах оптической плотности, рассчитывают путем вычитания от полученного значения опытных проб значение контроля. Иммунные комплексы являются одним из продуктов формирования иммунного ответа организмом. Измерение уровня циркулирующих иммунных комплексов позволяет оценить способность иммунной защиты организма.

2.4. Оценка маркофагального звена иммунной системы

2.4.1. Определение фагоцитарной активности клеток крови

Принцип метода. Важной функцией маркофагов является их способность к захвату чужеродного материала. С целью стандартизации фагоцитоза и более точной обработки результатов исследований реакцию проводят не с микроорганизмами, а с биологически нейтральным материалом, например, частицами сажи, чернилами, тушью и т.п.

Материалы и оборудование

- ❖ Тушь Indian ink.
- ❖ Центробежная микропроцессорная центрифуга CN-2060 (Hsiangtai Machinery Industry Co. Ltd, Тайвань), спектрофотометр СФ-2000, термостат (37 °С), холодильник, сушижаровой шкаф, лабораторные центрифужные пробирки, 5мл, дозаторы пипеточные (50, 100 мкл).

Порядок проведения реакции. Раствор красителя (тушь) центрифугируют при 1308 g в течение 40 мин. Затем к 50 мкл гепаринизированной крови добавляют 2 мкл супернатанта, смесь ресуспендируют. Отбирают 15 мкл и быстро переносят в физиологический раствор (2 мл). Оставшуюся смесь инкубируют в течение 15 мин при 37 °С. Затем операцию повторяют, из этой смеси отбирают 15 мкл и переносят в физиологический раствор, после чего инкубацию продолжают до 30 мин. Все пробы центрифугируют при 419 g, затем определяют оптическую плотность супернатантов на спектрофотометре при длине волны 535 нм.

Оценка результатов. Метод дает информацию о фагоцитарной активности клеток, их способности захватывать чужеродные нейтральные агенты. Со временем, когда частички туши из раствора поглощены клетками, наблюдается уменьшение поглощения. Индекс фагоцитарной активности (ИФ) рассчитывают по формуле:

$$\text{ИФ} = \frac{\ln E_{0-15} - \ln E_{15-30}}{15}, \quad (2.4)$$

где $\ln E_{0-15}$ – величина натурального логарифма показателя оптической плотности фагоцитоза на 0–15 мин; $\ln E_{15-30}$ – величина натурального логарифма показателя оптической плотности фагоцитоза на 15–30 мин.

2.4.2. Определение фагоцитарной активности на мазках и отпечатках лимфоидных органов

Принцип метода заключается в оценке поглотительной функции макрофагов селезенки. Тест основан на фагоцитозе макрофагами частиц дрожжей и накопления их в фагоцитарных вакуолях кариоцитов.

Материалы и оборудование

- ❖ Натрий-фосфатный буфер: 8.00 г NaCl; 0.20 г KCl; 1.44 г Na₂HPO₄; 0.24 г KH₂PO₄ растворяют в 800 мл дистиллированной воды, доводят pH до 7.2 соляной кислотой или гидроксидом натрия, добавляют дистиллированной воды до 1 литра.
- ❖ H₂O бидистиллированная или деионизированная.
- ❖ Коммерческие пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*).
- ❖ Среда для культивирования клеток RPMI-1640 (Sigma, USA) – коммерческий препарат.
- ❖ Трипановый синий.
- ❖ Краска Романовского-Гимзы.
- ❖ Смесь Никифорова: этиловый спирт с эфиром (1:1).
- ❖ Иммерсионное масло.
- ❖ CO₂ – инкубатор или любая герметическая камера, в воздухе которой содержится 5% CO₂, центробежная микропроцессорная центрифуга CN-2060 (Hsiangtai Machinery Industry Co. Ltd, Тайвань), нейлоновые фильтры (размер пор <100 мкм), торсионные весы, спектрофотометр СФ-2000, термостат (80 °C), гемоцитометр, холодильник, сухожаровой шкаф, лабораторные центрифужные пробирки на 5мл, микроскоп, камера Горяева, дозаторы пипеточные (50, 100 мкл).

Приготовление монослоя макрофагов селезенки. В асептических условиях у змей выделяют селезенку, взвешивают на торсионных весах (в мг) и рассчитывают относительную массу органа с учетом массы особи. Затем селезенку гомогенизируют через нейлоновый фильтр в среде RPMI-1640 (2 мл), определяют жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим (удовлетворительным считается результат 97–95%) и клеточность суспензии с использованием камеры Горяева (см. раздел 2.2). 200 мкл суспензии наливают на промытые и стерилизованные стеклянные пластины, затем инкубируют их при 25 °C во влажной атмосфере CO₂ в течение 90 мин. За счет адгезии кариоциты прикрепляются к пластине, среди них доля макрофагов составляет более 90% (Mondal, Rai, 1999). Не прикрепившиеся клетки отмывают 0.2 М фосфатным буферным раствором (pH=7.2).

Приготовление суспензии дрожжевых клеток. 20 мг пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) растворяют в 10 мл 0.2 М натрий-фосфатного буфера. Выдерживают суспензию в термостате при 80°C в течение 15 минут, затем три раза промывают клетки буфером, ресуспендируют в среде RPMI-1640, и доводят до концентрации 1×10^8 клеток/мл. К приготовленному ранее монослою макрофагов селезенки добавляют суспензию дрожжевых клеток и инкубируют в течение 90 мин при 25 °C в CO₂ – инкубаторе. После инкубации пластины

промывают буфером, фиксируют в смеси спирта с эфиром, окрашивают и просматривают под микроскопом с масляной иммерсией. В каждом препарате анализируют 100 макрофагов и подсчитывают число дрожжевых клеток, захваченных каждым макрофагом.

Оценка результатов. Метод дает информацию о способности макрофагов захватывать ксенобиотики. По результатам анализа рассчитывают фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Фагоцитарный индекс – это среднее число захваченных дрожжевых клеток на один подсчитанный макрофаг. Фагоцитарное число – количество фагоцитирующих макрофагов на 100 клеток.

Повышение показателей фагоцитоза по сравнению с контролем свидетельствует о напряжении, а снижение – об угнетении неспецифических факторов естественной резистентности организма.

Список литературы

Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашивили Д.Б., Горелов Р.А., Доронин И.В. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: Vipera) Волжского бассейна. Часть 1. – Тольятти: Кассандра, 2015. – 234 с.

Васильев Д.Б. Ветеринарная герпетология: ящерицы. – М.: Проект-Ф, 2005. – 480 с.

Лисничая Е.Н., Ефимов В.Г. Особенности исследования морфологического состава крови рептилий // Биобезопасность и экологический контроль ресурсов. – 2014. – Т.2. – №1. – С. 61–72.

Соколова Ф.М., Павлов А.В., Юсупов Р.Х. Гематология пресмыкающихся. – Казань: Казанский гос. ун-т., 1997. – 31 с.

Хайрутдинов И.З., Соколова Ф.М. Характеристика крови рептилий и её связь с условиями среды обитания: учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский гос. ун-т., 2010. – 44 с.

Arican H., Cicek K. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish herpetofauna // Acta Herpetologica. – 2010. – Vol. 5. – No. 2. – P. 179–198.

Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // Functional Ecology. – 2008. – Vol. 22. – P. 760–772.

Khokhlova I.S., Spinu M., Krasnov B.R., Degen A.A. Immune response to fleas in a wild desert rodent: effect of parasite species, parasite burden, sex of host and host parasitological experience // Journal of Experimental Biology. – 2004. – Vol. 207. – P. 2725–2733.

Kobolkuti L., Cadar D., Czirjak G., Niculae M., Kiss T., Sandru C., Spinu M. The Effects of Environment and Physiological Cyclicity on the Immune System of Viperinae // The Scientific World Journal. – Vol. 2012. – Article ID 574867. – P. 6.

LeBlanc C.J., Heatley J.J., Mack E.B. A review of the morphology of lizard leukocytes with a discussion of the clinical differentiation of bearded dragon *Pogona vitticeps*, leukocytes // J. Herpetol. Med. Surg. – 2000. – Vol. 10. – P. 27–30.

Salakij C., Salakij J., Chanhom L. Comparative hematology, morphology and ultrastructure of blood cells in Monocellate cobra (*Naja kaouthia*), Siamese spitting cobra (*Naja siamensis*) and Golden spitting cobra (*Naja sumatrana*) // Kasetsart J. (Nat. Sci.). – 2002. – Vol. 36. – P. 291–300.

Tripathi M.K., Singh R. Melatonin modulates splenocyte immune response in the freshwater snake, *Natrix piscator* // Herpetol. Conserv. Biol. – 2014. – Vol. 9(2). – P. 257–266.

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ РИСКА ЗДОРОВЬЮ В МОНИТОРИНГЕ КАЧЕСТВА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ежедневно на человека воздействует одновременно сложный комплекс множества факторов окружающей среды. Одним из них является химическое загрязнение выбросами предприятий и автотранспорта атмосферного воздуха, почвы, водных объектов. Деятельность особо вредных производств приводят к ухудшению экологической обстановки как в отдельных регионах, так и в целом мире, постоянно увеличивая опасность для жизни и здоровья населения.

В настоящее время в качестве главного механизма разработки и принятия управленческих решений как на международном, государственном или региональном уровнях, так и на уровне отдельного производства или другого потенциального источника загрязнения окружающей среды, используется концепция оценки риска.

Основным нормативным документом, используемым при анализе риска отечественными эпидемиологами, является «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду» Р 2.1.10.1920-04. Приведем основные термины, используемые при анализе риска здоровью.

Риск (*risk*) – вероятность причинения вреда жизни или здоровью граждан, имуществу физических или юридических лиц, государственному или муниципальному имуществу, окружающей среде, жизни или здоровью животных и растений с учетом тяжести этого вреда (№ 184-ФЗ «О техническом регулировании»). Это определение интегрирует несколько разноплановых понятий о риске (здоровью, экологический, повреждений имуществу и пр.), что соответствует совокупному риску.

Риск для здоровья (*human health risk*) – вероятность развития угрозы жизни или здоровью человека, либо угрозы жизни или здоровью будущих поколений, обусловленная воздействием факторов среды обитания.

Рассчитывают индивидуальный и популяционный риски для здоровья населения.

Индивидуальный риск (*individual risk*) – оценка вероятности развития неблагоприятного эффекта у экспонируемого индивидуума.

Популяционный риск (*population risk*) – агрегированная мера ожидаемой частоты вредных эффектов среди всех подвергшихся воздействию людей (Р 2.1.10.1920-04).

3.1. Алгоритм анализа риска здоровью

Согласно современной концепции экологического риска анализ риска ставит своей целью выбор оптимальных в данной конкретной ситуации путей устранения или снижения риска.

Анализ риска включает три взаимосвязанных элемента:

- ❖ оценка риска для здоровья;
- ❖ управление риском;
- ❖ информирование о риске.

Оценка риска для здоровья человека (*human health risk assessment*) – это количественная и/или качественная характеристика вредных эффектов, способных развиться в результате воздействия факторов среды обитания человека на конкретную группу людей при специфических условиях экспозиции.

Управление риском (*risk management*) – процесс принятия и выполнения управленческих решений, направленных на снижение вероятности возникновения неблагоприятного результата и минимизацию возможных потерь проекта, вызванных его реализацией. Управление риском базируется на совокупности политических, социальных и экономических оценок полученных величин риска, сравнительной характеристике возможных ущербов для здоровья людей и общества в целом, возможных затрат на реализацию различных вариантов управленческих решений по снижению риска и тех выгод, которые будут получены в результате реализации мероприятий (например, сохраненные человеческие жизни, предотвращенные случаи заболеваний и др.).

Информирование о риске (*risk communication*) – процесс распространения результатов определения степени риска для здоровья человека и решений по его контролю среди заинтересованной части населения (например, среди врачей, научных сотрудников, политиков, лиц, принимающих управленческие решения и др.). Полученные в процессе оценки риска данные должны быть полностью понятны специалистам по регулированию риска и, кроме того, доступны для представителей прессы и заинтересованных групп населения. При распространении информации о риске необходимо принимать во внимание особенности восприятия риска разными группами населения. Население в своем восприятии риска ориентируется не только на его количественные характеристики и возможные последствия для здоровья, но на уже сформировавшееся мнение общественности («факторы возмущения»). Далее более подробно будет рассмотрена процедура оценки риска здоровью.

3.1.1. Оценка риска здоровью

Оценка риска в общем виде подразумевает процесс идентификации, оценки и прогнозирования негативного воздействия на окружающую среду и/или здоровье и благосостояние людей в результате функционирования промышленных и иных производств и объектов, которые могут представлять опасность для населения и окружающей среды.

Полная (базовая) схема оценки риска предусматривает проведение четырех взаимосвязанных этапов:

- ❖ идентификация опасности;
- ❖ оценка зависимости «доза-ответ»;
- ❖ оценка экспозиции;
- ❖ характеристика риска.

3.1.2. Идентификация опасности

Идентификация опасности (*hazard identification*) – обнаружение и установление количественных, временных, пространственных и иных характеристик, необходимых и достаточных для разработки профилактических и оперативных мероприятий, направленных на обеспечение жизнедеятельности. Этап идентификации опасности включает в себя:

- ❖ сбор и анализ данных;
- ❖ выбор показателей опасности потенциально вредных факторов, в том числе;
- ❖ анализ информации о показателях опасности химических канцерогенов;
- ❖ анализ информации о показателях опасности химических неканцерогенов;
- ❖ выбор приоритетных для исследования веществ;
- ❖ ранжирование химических соединений.

3.1.3. Сбор и анализ данных

С целью определения перечня приоритетных для последующих исследований потенциально вредных химических соединений первоначально составляется максимально полный список всех химических веществ, способных воздействовать на человека на исследуемой территории. При оценке риска конкретного объекта, например, промышленного предприятия, наиболее важным источником информации являются сведения о качественном и количественном составе выбросов или сбросов от данного объекта, их пространственных и временных характеристиках.

В предварительный список должны быть включены:

- ❖ компоненты выбросов от источников загрязнения атмосферного воздуха;
- ❖ компоненты сбросов сточных вод в водоем;
- ❖ химические соединения и продукты их трансформации, попадающие в питьевую воду из водисточника;
- ❖ компоненты загрязнения почвы.

3.1.4. Выбор показателей опасности потенциально вредных факторов

Источниками данных о потенциальной опасности химического вещества являются его физико-химические свойства, результаты эпидемиологических исследований, сообщения о нарушении состояния здоровья лиц, подвергавших-

ся вредному воздействию, результаты клинических исследований, экспериментов на лабораторных животных, опытов *in vitro*, анализа зависимости «химическая структура – биологическая активность».

При выборе показателей учитываются приоритетные пути их попадания в организм человека, а также способность вызывать канцерогенные и неканцерогенные эффекты.

Канцерогенный риск (*carcinogenic risk*) – вероятность развития злокачественных новообразований на протяжении всей жизни человека, обусловленная воздействием потенциального канцерогена. Канцерогенный риск представляет собой верхнюю доверительную границу дополнительного пожизненного риска. Международное Агентство по изучению рака (МАИР) разделило неблагоприятные факторы окружающей и природной среды по степени их канцерогенной опасности для человека на 4 группы.

К группе 1 отнесены факторы, в отношении которых имеются безусловные доказательства опасности возникновения опухолей у человека, контактировавшего с ними.

Группа 2 подразделяется на две подгруппы. В группу 2А входят вероятные канцерогены, в отношении которых имеются ограниченные доказательства канцерогенной опасности для человека. К группе 2В относятся возможные канцерогены, т.е. факторы, в отношении которых имеются ограниченные доказательства их канцерогенности в экспериментах на животных.

В группу 3 включены вещества, которые не классифицируют как канцерогены для человека.

К группе 4 отнесены вещества, не обладающие канцерогенным эффектом.

3.1.5. Выбор приоритетных для исследования веществ

Основной задачей этапа идентификации опасности является выбор приоритетных, индикаторных химических веществ, изучение которых позволяет с достаточной надежностью охарактеризовать уровни риска нарушений состояния здоровья населения и источники его возникновения в районе размещения предприятия.

Исключение химических соединений из первоначального перечня анализируемых веществ осуществляется с использованием следующих критериев:

- ❖ отсутствие результатов измерений концентраций вещества или ненадежность имеющихся данных;
- ❖ концентрация неорганического соединения (железа, кальция и др.) ниже естественных фоновых уровней;
- ❖ вещество обнаружено только в одной или двух средах, в небольшом числе проб (менее 5 %);
- ❖ концентрация вещества существенно ниже референтных (безопасных) уровней воздействия;
- ❖ отсутствие выраженной токсичности и подозрений в отношении канцерогенности для человека (группы 3 и 4 по классификации МАИР);

- ❖ концентрация эссенциального элемента находится в пределах его рекомендуемого суточного поступления.

Основной параметр для оценки канцерогенного риска воздействия канцерогенного агента – фактор канцерогенного потенциала (*carcinogenic potential factor, CPF*), или фактор наклона (*slope factor, SF*), характеризующий степень нарастания канцерогенного риска с увеличением воздействующей дозы на одну единицу. Фактор наклона имеет размерность $(\text{мг}/(\text{кг} \cdot \text{день}))^{-1}$. Этот показатель отражает верхнюю, консервативную оценку канцерогенного риска за ожидаемую продолжительность жизни человека (70 лет). Значения SF устанавливаются раздельно для ингаляционного (SF_i) и перорального (SF_o) поступления химических канцерогенов (Р 2.1.10.1920-04. Приложение 2).

Для неканцерогенов учитывают референтную дозу (*reference dose, RfD*) (при пероральном пути поступления химического вещества) или референтную концентрацию (*reference concentration, RfC*) (при ингаляционном пути поступления химического вещества) – суточное воздействие химического вещества в течение всей жизни, которое устанавливается с учетом всех имеющихся современных научных данных и, вероятно, не приводит к возникновению неприемлемого риска для здоровья чувствительных групп населения.

3.1.6. Метод ранжирования химических соединений

При выявлении в ходе инвентаризации выбросов канцерогенов вычисляется ранговый индекс канцерогенной опасности (*hazard rating index, HRI_{канц.}*) по формуле:

$$HRI_{\text{канц.}} = \frac{E \times W_c \times P}{10000}, \quad (3.1)$$

где E (exposure) – величина условной экспозиции (объем годового выброса, т/год). При сравнении опасности загрязнений различных объектов окружающей среды, величину E следует представлять в баллах: поступление в количестве < 10 т/год – 1 балл, $10-100$ – 2 балла, $100-1000$ – 3 балла, $1000-10000$ – 4 балла, > 10000 – 5 баллов; W_c – весовой коэффициент канцерогенной активности (табл. 3.1); P (population) – численность популяции под воздействием (чел.). При выраженных различиях в численности населения на сравниваемых территориях, значения P следует представлять в баллах: < 1000 чел. – 1 балл, $1000-100000$ чел. – 2 балла, $100000-10000000$ чел. – 3 балла, > 10000000 чел. – 4 балла.

Единицы измерения параметров, входящих в формулу, должны быть одинаковыми для всех сопоставляемых химических веществ.

Для неканцерогенов вычисляется ранговый индекс неканцерогенной опасности (*hazard rating index, HRI_{неканц.}*) по формуле:

$$HRI_{\text{неканц.}} = \frac{E \times TW_c \times P}{10000}, \quad (3.2)$$

где E – величина условной экспозиции (объем годового выброса, т/год); TW – весовой коэффициент неканцерогенной активности (табл. 3.2); P – численность популяции под воздействием (чел.).

Таблица 3.1

Весовые коэффициенты для оценки канцерогенных эффектов (W_c)

Фактор канцерогенного потенциала (мг/кг)	Группа по классификации US EPA	
	1/2A	2B
< 0.005	10	1
0.005–0.05	100	10
0.05–0.5	1000	100
0.5–5.0	10000	1000
5.0–50.0	100000	10000
> 50.0	1000000	1000000

Таблица 3.2

Весовые коэффициенты для оценки неканцерогенных эффектов (W)

Референтная (безопасная) доза, мг/кг	Референтная (безопасная) концентрация, мг/м ³	Весовой коэффициент
<0,00005	<0.000175	100000
0,00005-0,0005	0.000175–0.00175	10000
0,0005-0,005	0.00175–0.0175	1000
0,005-0,05	0.0175–0.175	100
0,05-0,5	0.175–1.75	10
>0,5	>1.75	1

Примечание: значения референтных доз и концентраций должны иметь одинаковый период усреднения экспозиции (например, референтные концентрации для условий острого, подострого и хронического воздействия)

3.1.7. Оценка зависимости «доза-ответ»

Оценка зависимости «доза-ответ» (*dose-response assessment*) – это процесс количественной характеристики токсикологической информации и установления связи между воздействующей дозой (концентрацией) загрязняющего вещества и случаями вредных эффектов в экспонируемой популяции. Целью данного этапа является обобщение и анализ всех имеющихся данных о гигиенических нормативах, безопасных уровнях воздействия (референтных дозах и концентрациях), критических органах/системах и вредных эффектах. Важно помнить о двух крайних проявлениях вредного эффекта: канцерогенном и неканцерогенном. Международная методология оценки риска предполагает, что:

- ❖ для неканцерогенных веществ и канцерогенов с негенотоксическим механизмом действия предполагается существование пороговых уровней, ниже которых вредные эффекты не возникают;

- ❖ канцерогенные эффекты при воздействии химических канцерогенов, обладающих генотоксическим действием, могут возникать при любой дозе, вызывающей инициирование повреждений генетического материала (СанПиН 2.1.6.1032-01).

Канцерогенный и неканцерогенный эффекты имеют разную геометрическую форму зависимости «доза-ответ». Канцерогены не имеют порога, поэтому их зависимость «доза-эффект» проходит через ноль, т.е. риск отсутствует только при нулевом значении. (рис. 3.1А). Факторами канцерогенного потенциала являются фактор наклона (SF) и единичный риск (UR).

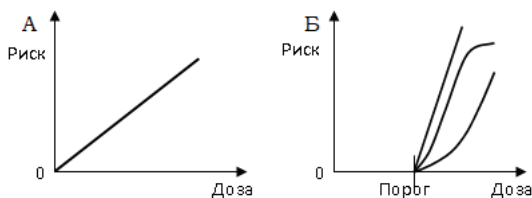


Рис 3.1. Зависимость риска угрозы здоровью от дозы загрязнителя: А – линейная зависимость (беспороговый загрязнитель); Б – сложная связь (пороговый загрязнитель)

Фактор наклона (*slope factor, SF*) отражает степень увеличения канцерогенного риска при возрастании действующей дозы (раздел 3.1.3).

Единичный риск (*unit risk, UR*) представляет собой верхнюю, консервативную оценку канцерогенного риска у человека, подвергающегося на протяжении всей своей жизни постоянному воздействию анализируемого канцерогена в концентрации 1 мкг/м³ (атмосферный воздух) или 1 мкг/л (питьевая вода). Для расчета единичного риска используются средние значения массы тела человека (70 кг), (20 м³/сут.) и питьевой воды (2 л/сут.). При ингаляционном воздействии канцерогена на организм человека используется формула (3.3), при пероральном – формула (3.4):

$$UR_i = SF_i \cdot V_{\text{воздуха}}/m, \quad (3.3)$$

$$UR_o = SF_o \cdot V_{\text{воды}}/m, \quad (3.4)$$

где SF – фактор наклона, мг/(кг·день)⁻¹; $V_{\text{воздуха}}$ – объем суточного потребления воздуха, 20 м³/сут.; $V_{\text{воды}}$ – объем суточного потребления воды, 2 л/сут.; m – масса тела человека, 70 кг

Для неканцерогенов строится S-образная (сигмовидная) кривая, левая ветвь которой совмещается с абсциссой в точке, соответствующей нулевому эффекту, так как данные агенты вызывают риск только при превышении порогов или безопасных (референтных) уровней воздействия (рис. 3.1Б).

На последнем этапе оценки зависимости «доза-ответ» выделяют органы и системы органов, на которые рассматриваемые химические вещества оказывают критический эффект.

3.1.8. Оценка экспозиции

Экспозиция (воздействие) (*exposure assessment*) – контакт организма (рецептора) с химическим, физическим или биологическим агентом. Величина экспозиции определяется как измеренное или рассчитанное количество агента в конкретном объекте окружающей среды, находящееся в соприкосновении с так называемыми пограничными органами человека (легкие, пищеварительный тракт, кожа) в течение какого-либо точно установленного времени. Экспозиция может быть выражена как общее количество вещества в окружающей среде (в единицах массы, например, мг), или как величина воздействия – масса вещества, отнесенная к единице времени (например, мг/день), или как величина воздействия, нормализованная с учетом массы тела мг/(кг· день). Этап оценки экспозиции обычно включает в себя:

- ❖ характеристику окружающей обстановки, которая предусматривает анализ основных физических параметров исследуемой области (климат, метеоусловия, геологическое строение, растительность, гидрологию подземных вод, описание поверхностных водоемов и т.д.) и характеристику популяций, потенциально подверженных воздействию.
- ❖ идентификацию маршрутов воздействия, источников загрязнения, потенциальных путей распространения и точек воздействия на человека.
- ❖ количественную характеристику экспозиции, которая предусматривает установление и оценку величины, частоты и продолжительности воздействий для каждого анализируемого пути поступления вредного вещества.

Для расчета поступления химических веществ в организм человека используются три категории переменных:

- ❖ воздействующие концентрации;
- ❖ величина контакта, частота и продолжительность воздействия, масса тела;
- ❖ время осреднения экспозиции.

В качестве количественной меры экспозиции в исследованиях по оценке риска воздействия неканцерогенных веществ рекомендуется использовать потенциальную дозу – количество химического вещества, которое потребляется или вдыхается.

Общая потенциальная доза (*total potential dose, TPD*) рассчитывается с помощью следующего стандартного уравнения:

$$TPD = C \times IR \times ED, \quad (3.5)$$

где C – концентрация загрязняющего вещества в объекте окружающей среды (воздух, почва и т.д.), контактирующей с телом человека (выражается в единицах мг/м³ или мг/кг); IR – величина (скорость) поступления, зависящая от скорости ингаляции (объема легочной вентиляции), объема потребляемой воды и др.; ED – продолжительность воздействия, лет.

При оценке риска потенциальные дозы, как правило, усредняются с учетом массы тела и времени воздействия. Такая доза носит название средней суточ-

ной потенциальной дозы (*average daily dose*, ADD_{pot}) и обычно рассчитывается путем деления потенциальной дозы на массу тела (BW) и время осреднения воздействия (AT), формула:

$$ADD_{pot} = \frac{TPD}{(BW \times AT)}. \quad (3.6)$$

При оценке канцерогенных рисков используют средние суточные дозы, усредненные с учетом ожидаемой средней продолжительности жизни человека (70 лет), невзирая на длительность воздействия.

Среднесуточная доза в течение жизни (*life average daily dose*, $LADD$) рассчитывается по формуле:

$$LADD = \frac{C \times CR \times ED \times EF}{BW \times AT \times 365}, \quad (3.7)$$

где $LADD$ – средняя суточная доза в течение жизни, мг/(кг × день); C – концентрация вещества в загрязненной среде, мг/л, мг/м³, мг/см², мг/кг; CR – скорость поступления воздействующей среды (питьевой воды, воздуха, продуктов питания и т.д.), л/день, м³/день, кг/день и др.; ED – продолжительность воздействия, лет; EF (*exposure frequency*) – частота воздействия, дней/год; BW – масса тела человека, кг; AT (*averaging time*) – период усреднения экспозиции (для канцерогенов $AT = 70$ лет); 365 – число дней в году.

3.1.9. Характеристика риска для здоровья населения

Характеристика риска (*risk characterization*) – завершающий этап оценки риска, на котором синтезируются данные, полученные на предшествующих этапах исследований. Ведущими принципами характеристики риска являются:

- ❖ интеграция информации, полученной в процессе идентификации опасности, оценки экспозиции и зависимости "доза-ответ";
- ❖ представление информации о характеристиках риска в понятной и доказательной форме.

3.1.10. Оценка риска канцерогенных эффектов

Расчет индивидуального канцерогенного риска осуществляется с использованием данных о величине экспозиции и значениях факторов канцерогенного потенциала (фактор наклона, единичный риск). Как правило, для канцерогенных химических веществ дополнительная вероятность развития рака у индивидуума на всем протяжении жизни оценивается по величине канцерогенного риска (*carcinogenic risk*, CR), которая рассчитывается с учетом среднесуточной дозы в течение жизни ($LADD$):

$$CR = LADD \times SF, \quad (3.8)$$

где $LADD$ – среднесуточная доза в течение жизни, $\text{мг}/(\text{кг} \times \text{день})$; SF – фактор наклона, $(\text{мг}/(\text{кг} \times \text{день}))^{-1}$.

При воздействии нескольких канцерогенов суммарный канцерогенный риск для данного пути поступления (например, перорального или ингаляционного) (комбинированное воздействие) рассчитывается по формуле:

$$CR_T = \sum CR_j, \quad (3.9)$$

где CR_T – общий канцерогенный риск для пути поступления T ; CR_j – канцерогенный риск для j -го канцерогенного вещества.

При одновременном воздействии нескольких канцерогенных веществ, поступающих в организм человека различными путями (комплексное воздействие) расчет общего риска (*total carcinogenic risk*, TCR) проводится по формуле:

$$TCR = \sum CRT. \quad (3.10)$$

Однако при расчете суммарных канцерогенных рисков необходимо принимать во внимание различия в степени выраженности канцерогенного действия химических веществ при разных путях поступления. В тех случаях, когда значения при различных путях воздействия различаются, расчет рисков на основе суммарных доз правомерен только для одинаковых путей поступления.

Определение величин популяционных канцерогенных рисков (*population carcinogenic risk*, PCR), отражающих дополнительное (к фоновому) число случаев злокачественных новообразований, способных возникнуть на протяжении жизни вследствие воздействия исследуемого фактора, проводится по формуле:

$$PCR = CR \times POP, \quad (3.11)$$

где CR – индивидуальный канцерогенный риск; POP – численность исследуемой популяции, чел.

Индивидуальный и популяционный канцерогенные риски характеризуют верхнюю границу возможного канцерогенного риска на протяжении периода, соответствующего средней продолжительности жизни человека (70 лет).

3.1.11. Оценка риска неканцерогенных эффектов

Характеристика риска развития неканцерогенных эффектов для отдельных веществ проводится на основе расчета коэффициента опасности (*hazard quotient*, HQ) по формуле:

$$HQ = AD/RfD \text{ или } HQ = AC/RfC, \quad (3.12)$$

где HQ – коэффициент опасности; AD (average dose) – средняя доза, $\text{мг}/\text{кг}$; AC (average concentration) – средняя концентрация, $\text{мг}/\text{м}^3$; RfD – референтная

(безопасная) доза, мг/кг; RfC –референтная (безопасная) концентрация, мг/м³.

Коэффициент опасности рассчитывается отдельно для условий кратковременных (острых), подострых и длительных воздействий химических веществ.

3.1.13. Оценка риска при комбинированном воздействии

Характеристика риска развития неканцерогенных эффектов при комбинированном и комплексном воздействии химических соединений проводится на основе расчета индекса опасности (*hazard index, HI*).

Индекс опасности для условий одновременного поступления нескольких веществ одним и тем же путем (при комбинированном воздействии) рассчитывается по формуле:

$$HI = \sum HQ_i, \quad (3.13)$$

где HQ_i – коэффициенты опасности для отдельных компонентов смеси воздействующих веществ.

При комплексном поступлении химического вещества в организм человека из окружающей среды одновременно несколькими путями, а также при много-средовом и многомаршрутном воздействии критерием риска является суммарный индекс опасности (*total hazard index, THI*) рассчитывается по формуле:

$$THI = \sum HI_j, \quad (3.14)$$

где HI_j – индексы опасности для отдельных путей поступления или отдельных маршрутов воздействия.

Подводя итог рассмотрению алгоритма анализа риска здоровью, следует указать, что в отношении результатов количественной оценки рисков здоровью чаще всего используется классификация, ориентированная на систему критериев приемлемости риска (Анализ риска..., 2014) (табл. 3.3). Данная шкала используется, как правило, при оценке канцерогенного риска.

Таблица 3.3

Шкала риска

Уровень риска	Индивидуальный пожизненный риск
Высокий – не приемлем для производственных условий и населения (необходимо осуществление мероприятий по устранению или снижению риска)	$>10^{-3}$
Средний – допустим для производственных условий (при воздействии на все население необходимы динамический контроль и углубленное изучение источников и возможных последствий неблагоприятных воздействий)	$10^{-4} - 10^{-3}$
Низкий – допустимый риск (уровень, при котором, как правило, устанавливаются гигиенические нормативы для населения)	$10^{-6} - 10^{-4}$
Минимальный – желательная (целевая) величина риска при проведении оздоровительных и природоохранных мероприятий	$< 10^{-6}$

Критерием приемлемости неканцерогенного риска является единица. Если рассчитанные коэффициенты опасности или индексы опасности меньше 1, то считается, что риск отсутствует. Если эти показатели больше 1, то риск есть, и он тем больше, чем больше коэффициенты.

3.2. Пример расчета риска здоровью

Приведем пример пошагового расчета риска здоровью населения в соответствии с изложенной методикой его расчета при следующих условиях ситуационной задачи.

Задача. В городе N с численностью 1 млн человек действует химическое промышленное предприятие M. Оцените индивидуальный и популяционный риск здоровью населения, проживающего на территории данного города за год. Перечень загрязняющих веществ от предприятия представлен в табл. 3.4.

Таблица 3.4

Перечень загрязняющих веществ, выбрасываемых промышленным предприятием

Наименование вещества	Класс опасности	ПДКв*, мг/л		ПДК с.с., мг/м ³		Сброс/ выброс вещества, т/год
		фактически	норматив	фактически	норматив	
Азота диоксид	3	—	—	0.067	0.04	0/300
Азота оксид	3	—	—	0.03	0.06	0/0.562
Анилин	2	0.001	0.1	0.03	0.1	0.10/0.45
Бенз(а)пирен	1	—	0.00001	0,0000015	0.000001	0/15
Железо	3	0.42	0.3	—	0.04	2.0/0
Медь оксид	2	—	—	0.0008	0.002	0/0.046
Мышьяк	1	0.01	0.01	—	—	7/0
Никель оксид	2	—	—	$1 \cdot 10^{-5}$	0.001	0/0.0004
Сажа	3	—	—	0.067	0.05	0/1000
Сера диоксид	3	—	—	0.07	0.05	0/220
Углерод оксид	4	—	—	4.8	3.0	0/1000
Формальдегид	2	—	0.05	0.005	0.003	0/10

Примечание: * – предельно допустимая концентрация в воде водоема хозяйственно-питьевого водопользования.

Этап 1. Идентификация опасности

На первом шаге «3.1.1. Сбор и анализ данных» учитываем концентрации и валовые выбросы загрязняющих веществ, имеющих приоритетные пути поступления в организм человека: ингаляционно и перорально. Соответственно, учитываем и характеристики загрязняющих веществ, выбрасываемых в атмосферный воздух и сбрасываемых в водные объекты предприятием M (табл. 3.4). На втором шаге «3.1.2. Выбор показателей опасности потенциально вредных факторов» определяем перечень канцерогенных и неканцерогенных веществ. Согласно списку веществ, представленному в табл. 3.4, к канцерогенным веще-

ствам относим анилин, бенз(а)пирен, мышьяк, сажа, формальдегид; к неканцерогенным веществам – диоксид и оксид азота, железа оксида, меди оксид, никель оксид, сера оксид, углерод оксид.

На третьем шаге «3.1.3. Выбор приоритетных для исследования веществ» все первоначально включенные и в последующем исключенные химические соединения сводим в таблицу (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Химические вещества, проанализированные на этапе идентификации опасности

Название вещества	Причина включения в список	Причина исключения из списка	Включено (+) или исключено (–) при оценке риска
Анилин	–	3 группа (МАИР)	–
Бензапирен	группа 2А (МАИР)	–	+
Мышьяк	группа 1 (МАИР)	–	+
Сажа	группа 1 (МАИР)	–	+
Формальдегид	группа 2А (МАИР)	–	+
Азота диоксид	концентрация выше референтной дозы	–	+
Азота оксид	–	концентрация ниже референтной дозы	–
Железо	концентрация выше естественного уровня	–	+
Медь оксид	–	концентрация ниже естественного уровня	–
Никель оксид	–	концентрация ниже естественного уровня	–
Сера диоксид	концентрация выше референтной дозы	–	+
Углерод оксид	концентрация выше референтной дозы	–	+

Затем с целью характеристики наличия информации, необходимой на последующих этапах оценки риска канцерогенов, информацию о показателях опасности развития канцерогенных эффектов, приведенную в табл. 3.4, сводим в табл. 3.6.

Таблица 3.6

Сведения о показателях опасности развития канцерогенных эффектов (Приложение 2 Р 2.1.10.1920-04)

Наименование вещества	Ингаляционное воздействие		Пероральное воздействие	
	МАИР	SF _i	МАИР	SF _o
Бенз(а)пирен	2А	3.9	–	–
Мышьяк	–	–	1	1.5
Сажа	1	0.0155	–	–
Формальдегид	2А	0.046	–	–

В свою очередь, информацию о параметрах опасности для веществ, не приводящим к канцерогенным эффектам, приводим в табл. 3.7.

Таблица 3.7

Сведения о параметрах опасности развития неканцерогенных эффектов (Приложение 2 Р 2.1.10.1920-04)

Название вещества	RfD , мг/кг	RfC , мг/м ³
Азота диоксид	—	0.04
Железо	0.3	—
Сера диоксид	—	0.05
Углерод оксид	—	3

На четвертом шаге «3.1.4. Метод ранжирования химических соединений», используя данные о валовых выбросах/сбросах (табл. 3.4), выраженные в баллах (см. формула 3.1), весовые коэффициенты канцерогенной активности (табл. 3.1 и 3.6) и сведения о численности популяции (см. условия задачи и формулу 3.1) рассчитаем ранговый индекс канцерогенной опасности:

$$HRI_{\text{канц. (бенз(а)пирен)}} = (2 \text{ балла} \times 100000 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 60;$$

$$HRI_{\text{канц. (мышьяк)}} = (1 \text{ балл} \times 10000 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 3;$$

$$HRI_{\text{канц. (сажа)}} = (4 \text{ балла} \times 100 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 0.12;$$

$$HRI_{\text{канц. (формальдегид)}} = (2 \text{ балла} \times 1000 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 0.6.$$

При расчете рангового индекса неканцерогенной опасности по формуле (3.2) используем данные о валовых выбросах/сбросах (табл. 3.4), выраженные в баллах (см. формула 3.1), весовые коэффициенты неканцерогенных эффектов (табл. 3.2) и сведения о численности популяции (см. условия задачи и формулу 3.1):

$$HRI_{NO_2} = (2 \text{ балла} \times 10 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 0.006;$$

$$HRI_{Fe} = (1 \text{ балл} \times 10 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 0.003;$$

$$HRI_{SO_2} = (3 \text{ балла} \times 100 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 0.09;$$

$$HRI_{CO} = (4 \text{ балла} \times 1 \times 3 \text{ балла}) / 10000 = 0.0012.$$

Ранжирование осуществляется в порядке убывания значений рангового индекса: веществу, имеющему наибольшее значение рангового индекса, присваивается первый ранг, веществу, имеющему наименьшее значение рангового индекса – последний ранг.

Результаты оценки приоритетности и ранжирования потенциально опасных для здоровья химических веществ вносим в итоговую таблицу (табл. 3.8).

Таблица 3.8

Химические вещества, включенные в дальнейшую оценку риска

Название вещества	Ранг	
	канцерогены	неканцерогены
Бенз(а)пирен	1	—
Мышьяк	2	—
Формальдегид	3	—
Сажа	4	—
Сера диоксид	—	1
Азота диоксид	—	2
Железо	—	3
Углерод оксид	—	4

Этап 2. Оценка зависимости «доза-ответ»

При оценки зависимости «доза-ответ», используя данные ситуационной задачи (табл. 3.4), а также значения фактора наклона (табл. 3.6) по формулам (3.3) и (3.4) для канцерогенных веществ¹ рассчитаем единичный риск:

$$UR_i (\text{бенз(а)пирен}) = 3.9[(\text{кг} \times \text{сут.}) / (\text{мг})] \times 20[\text{м}^3/\text{сут.}] / 70 [\text{кг}] = 1.1154 [\text{м}^3/\text{мг}]$$

$$UR_o (\text{мышьяк}) = 1.5[(\text{кг} \times \text{сут.}) / (\text{мг})] \times 2 [\text{л}/\text{сут.}] / 70 [\text{кг}] = 0.4290 [\text{л}/\text{мг}]$$

$$UR_i (\text{формальдегид}) = 0.046[(\text{кг} \times \text{сут.}) / (\text{мг})] \times 20 [\text{м}^3/\text{сут.}] / 70 [\text{кг}] = 0.0132 [\text{м}^3/\text{мг}]$$

$$UR_i (\text{сажа}) = 0.0155[(\text{кг} \times \text{сут.}) / (\text{мг})] \times 20 [\text{м}^3/\text{сут.}] / 70 [\text{кг}] = 0.0044 [\text{м}^3/\text{мг}]$$

Далее выделяем органы и системы органов, на которые рассматриваемые химические вещества оказывают критический эффект (табл. 3.9).

Таблица 3.9

Критические органы/системы (Приложение 2 Р 2.1.10.1920-04)

Название вещества	Критический эффект
Бенз(а)пирен	развитие, иммунная система
Мышьяк	кожа, ЦНС, нервная система, сердечно-сосудистая система, иммунная система, гормон (диабет), желудочно-кишечный тракт
Сажа	органы дыхания, системн., зубы
Формальдегид	органы дыхания, глаза, иммунная система
Азота диоксид	органы дыхания, кровь
Железо	слизистые, кровь, кожа, иммунная система
Сера диоксид	органы дыхания, смертность
Углерод оксид	кровь, сердечно-сосуд. система, развитие, ЦНС

Этап 3. Оценка экспозиции

На первом шаге² устанавливаются связи между источниками выброса загрязнителей, их местоположением, способами попадания химических веществ в окружающую среду и местами расположения различных популяций населения. На втором шаге идентифицируются маршруты воздействия, источники загрязнения, потенциальные пути распространения и точки воздействия на человека. На третьем шаге, используя формулу (3.5), рассчитаем общую потенциальную дозу для неканцерогенных веществ:

$$TPD_{SO_2} = 0.07 \text{ мг}/\text{м}^3 \times 20 \text{ м}^3/\text{сут.} \times 365 \text{ сут.} = 511.00 \text{ мг}$$

$$TPD_{NO_2} = 0.067 \text{ мг}/\text{м}^3 \times 20 \text{ м}^3/\text{сут.} \times 365 \text{ сут.} = 489.10 \text{ мг}$$

$$TPD_{Fe} = 0.42 \text{ мг}/\text{л} \times 2 \text{ л}/\text{сут.} \times 365 \text{ сут.} = 306.60 \text{ мг}$$

$$TPD_{CO} = 4.8 \text{ мг}/\text{м}^3 \times 20 \text{ м}^3/\text{сут.} \times 365 \text{ сут.} = 35040.00 \text{ мг}$$

Используя формулу (3.6), рассчитаем среднесуточную потенциальную дозу.

$$ADD_{pot SO_2} = 511.00 \text{ мг} / (70 \text{ кг} \times 365 \text{ сут.}) = 0.02 \text{ мг}/(\text{кг} \times \text{сут.})$$

$$ADD_{pot NO_2} = 489.10 \text{ мг} / (70 \text{ кг} \times 365 \text{ сут.}) = 0.019 \text{ мг}/(\text{кг} \times \text{сут.})$$

¹ Для оценки неканцерогенного риска применяются экспертные заключения в соответствии с п. 5.2. Р 2.1.10.1920-04.

² В данной задаче шаги первый и второй опускаются.

$$ADD_{pot Fe} = 306.60 \text{ мг} / (70 \text{ кг} \times 365 \text{ сут.}) = 0.012 \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{сут.})$$

$$ADD_{pot CO} = 35040.00 \text{ мг} / (70 \text{ кг} \times 365 \text{ сут.}) = 1.37 \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{сут.})$$

Для оценки канцерогенных рисков, используя формулу (3.7), рассчитаем среднесуточная доза в течение жизни.

$$LADD_{(бенз(а)пирен)} = (0.0000015 \text{ мг/м}^3 \times 20 \text{ м}^3/\text{сут.} \times 1 \text{ год} \times 365 \text{ дней}) / (70 \text{ кг} \times 70 \text{ лет} \times 365 \text{ дней}) = 6.12 \times 10^{-9} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}).$$

$$LADD_{(мышьяк)} = (0.011 \text{ мг/л} \times 2 \text{ л/сут.} \times 1 \text{ год} \times 365 \text{ дней}) / (70 \text{ кг} \times 70 \text{ лет} \times 365 \text{ дней}) = 4.49 \times 10^{-6} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}).$$

$$LADD_{(формальдегид)} = (0.005 \text{ мг/м}^3 \times 20 \text{ м}^3/\text{сут.} \times 1 \text{ год} \times 365 \text{ дней}) / (70 \text{ кг} \times 70 \text{ лет} \times 365 \text{ дней}) = 2.04 \times 10^{-5} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}).$$

$$LADD_{(сажа)} = (0.067 \text{ мг/м}^3 \times 20 \text{ м}^3/\text{сут.} \times 1 \text{ год} \times 365 \text{ дней}) / (70 \text{ кг} \times 70 \text{ лет} \times 365 \text{ дней}) = 2.73 \times 10^{-4} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}).$$

Этап 4. Оценка риска канцерогенных и неканцерогенных эффектов

Используя формулу (3.8), рассчитаем индивидуальный канцерогенный риск.

$$CR_{(бенз(а)пирен)} = 6.12 \times 10^{-9} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}) \times 3.9 \text{ (мг} / (\text{кг} \times \text{день}))^{-1} = 2.39 \times 10^{-8}$$

$$CR_{(мышьяк)} = 4.49 \times 10^{-6} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}) \times 1.5 \text{ (мг} / (\text{кг} \times \text{день}))^{-1} = 6.74 \times 10^{-6}$$

$$CR_{(формальд.)} = 2.04 \times 10^{-5} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}) \times 0.046 \text{ (мг} / (\text{кг} \times \text{день}))^{-1} = 9.38 \times 10^{-7}$$

$$CR_{(сажа)} = 2.73 \times 10^{-4} \text{ мг} / (\text{кг} \times \text{день}) \times 0.0155 \text{ (мг} / (\text{кг} \times \text{день}))^{-1} = 4.23 \times 10^{-6}$$

Используя формулу (3.9), рассчитаем суммарный канцерогенный риск при комбинированном ингаляционном воздействии.

$$CR_T = CR_{(бенз(а)пирен)} + CR_{(сажа)} + CR_{(формальдегид)} = 2.39 \times 10^{-8} + 4.23 \times 10^{-6} + 9.38 \times 10^{-7} = 5.19 \times 10^{-6}$$

Используя формулу (3.11), рассчитаем пожизненный популяционный канцерогенный риск для 1-миллионного населения исследуемого города.

$$CR_{(бенз(а)пирен)} = 2.39 \times 10^{-8} \times 10^6 = 2.39 \times 10^{-2}$$

$$CR_{(мышьяк)} = 6.74 \times 10^{-6} \times 10^6 = 6.74$$

$$CR_{(формальдегид)} = 9.38 \times 10^{-7} \times 10^6 = 0.94$$

$$CR_{(сажа)} = 4.23 \times 10^{-6} \times 10^6 = 4.23$$

Используя формулу (3.12), рассчитаем коэффициент опасности для исследуемых веществ, не приводящих к канцерогенным эффектам.

$$HQ_{SO_2} = (0.07 \text{ мг/м}^3) / (0.05 \text{ мг/м}^3) = 1.4$$

$$HQ_{NO_2} = (0.067 \text{ мг/м}^3) / (0.04 \text{ мг/м}^3) = 1.68$$

$$HQ_{Fe} = (0.42 \text{ мг/л}) / (0.3 \text{ мг/л}) = 1.4$$

$$HQ_{CO} = (4.8 \text{ мг/м}^3) / (3 \text{ мг/м}^3) = 1.6$$

Для оценки риска при комбинированном воздействии по формуле (3.13), рассчитаем индекс опасности для нескольких веществ, поступающих ингаляционно в организм человека.

$$HI_{ингаляционно} = HQ_{SO_2} + HQ_{NO_2} + HQ_{CO} = 1.68 + 1.4 + 1.6 = 4.68$$

Рассчитаем индекс опасности токсических веществ, влияющих на разные системы органов при комплексном поступлении:

$$THI_{органы дыхания} = HQ_{SO_2} + HQ_{NO_2} = 1.68 + 1.4 = 3.08$$

$$THI_{кровь} = HQ_{NO_2} + HQ_{Fe} + HQ_{CO} = 1.68 + 1.4 + 1.6 = 4.68$$

Следует подчеркнуть, что данный показатель не является мерой риска, его можно рассматривать как индикатор опасности, которая возрастает по мере увеличения значения коэффициента.

Заключение

Подводя итог результатам расчета риска канцерогенных эффектов (с учетом данных табл. 3.3) и оценке коэффициента опасности для неканцерогенных веществ, можно заключить следующее. Значения коэффициента опасности развития неканцерогенных эффектов превышают 1, что дает основания для беспокойства. Уровни индивидуального канцерогенного риска в течение всей жизни, составляют для мышьяка 6.74×10^{-6} и сажи 4.23×10^{-6} , что соответствует *низкому уровню риска*. Уровни индивидуального канцерогенного для бенз(а)пирена и формальдегида менее 1×10^{-6} , что соответствует *минимальному уровню риска*. Расчетные значения популяционного канцерогенного риска свидетельствуют о том, что выбрасываемые в атмосферный воздух поллютанты способны вызвать за год у 1 млн человек следующее количество дополнительных случаев онкологических заболеваний: бенз(а)пирен – 0.024, мышьяк – 6.74, сажа – 4.23, формальдегид – 0.94. В нашей стране пока не определена величина допустимого риска. В США эта величина принята на уровне 1 дополнительного случая смерти на миллион населения. В Нидерландах эта величина составляет 1×10^{-6} в год при оценке отдельного вещества и $1 \cdot 10^{-5}$ в год при комплексном воздействии.

Список литературы

Анализ риска здоровью в стратегии государственного социально-экономического развития: монография / Г.Г. Онищенко, Н.В. Зайцева, И.В. Май [и др.]. – М.; Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2014. – 738 с.

Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест: СанПиН 2.1.6.1032-01. – М.: , 2001. – 12 с.

Киселев А.В. Оценка риска здоровью в системе гигиенического мониторинга. – СПб.: Мед. Акад. последиplomного образования, 2001. – 37 с.

Оценка риска здоровью / А. В. Киселев, К. Б. Фридман, О. Ю. Ломтев и др. – СПб.: Дейта, 2009. – 104 с.

Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Р 2.1.10.1920-04. – М: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 143 с.

Федеральный закон Российской Федерации «О техническом регулировании» № 184-ФЗ от 27 декабря 2002.

Шитиков В.К. Экотоксикология и статистическое моделирование эффекта с использованием R. – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2016. – 149 с.

Шугаева С.Н., Савилов Е.Д. Риск в эпидемиологии: терминология, основные определения и систематизация понятий // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – №6(97). – 2017. – С. 73–78.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Организм на протяжении всего своего развития подвергается воздействию разнообразных внешних и внутренних факторов. Одной из ключевых особенностей живого организма является способность к поддержанию гомеостаза, как на уровне целого организма, так и отдельных его составляющих. В нормальных условиях организм реагирует на воздействие среды посредством сложной системы буферных гомеостатических механизмов. Эти механизмы поддерживают оптимальное протекание процессов развития. Под воздействием неблагоприятных условий эти механизмы могут быть нарушены. Такие нарушения гомеостаза могут происходить до появления изменений, обычно используемых в качестве параметров жизнеспособности живых организмов.

Для понимания возможной опасности для живых организмов тех или иных воздействий недостаточно прямого или опосредованного химико-токсикологического анализа биологического образца. Необходима комплексная оценка реакции организма на различные токсические воздействия.

Человек в своей повседневной деятельности сталкивается с множеством ксенобиотиков – чужеродных для организма синтетических или природного происхождения соединений. Они в огромном количестве используются в промышленности, сельском хозяйстве и в быту. Многие из них обладают генотоксичностью – прямым или косвенным воздействием чужеродного объекта на ДНК, приводящим к мутациям. Обширная группа методов оценки генотоксичности – цитогенетические.

Цитогенетические методы, которые в настоящее время применяются при анализе воздействия различного рода антропогенных факторов (радиация, экотоксиканты и др.), основаны на следующих цитогенетических характеристиках: абберации хромосом, сестринские хроматидные обмены, микроядра, разрывы ДНК (Comet Assay), нарушения мейоза.

В настоящее время наиболее часто используемыми являются тест ДНК-комет и микроядерный тест, тогда как анализ хромосомных аббераций и сестринских хроматидных обменов встречается сравнительно редко.

При анализе цитогенетических нарушений в природных популяциях следует учитывать, что вызывать их могут не только присутствующие в окружающей среде экотоксиканты, но и разнообразные естественные факторы, как абиотической, так и биотической природы. Это могут быть резкие колебания температуры, кислотности, популяционный стресс, вирусные инфекции, паразитарные инвазии, гормональные нарушения и пр. Кроме того, известно, что в процессе онтогенеза может изменяться частота цитогенетических нарушений, например, аббераций хромосом.

В связи с этим при выполнении цитогенетических исследований в природных популяциях необходимо работать с большими выборками, выровненными хотя бы по половому и возрастному составу. В дальнейшем это будет способствовать корректному статистическому анализу. Кроме того, следует по возможности применять методы, исключающие травматические последствия для животных. На начальном этапе исследования рекомендуется выполнять предварительный скрининг на отобранных для исследования полигонах.

Кроме того, для более точной оценки воздействия антропогенных факторов на природные биологические объекты необходимо проводить анализ воздействия этих же факторов, используя лабораторных животных. Для этого можно использовать, например, пробы воды или водные вытяжки с исследуемых территорий, выполнять инкубацию подопытных животных на исследуемых полигонах.

4.1. Хромосомные aberrации, геномные мутации и сестринские хроматидные обмены

Анализ хромосомных aberrаций применяется уже достаточно длительное время при изучении воздействия на живые организмы различных факторов окружающей среды (рис. 4.1, А – Д). Принцип метода заключается в учете нарушений структуры хромосом – хромосомных мутаций. Типы хромосомных aberrаций и методы их анализа хорошо известны и достаточно полно описаны в специализированных учебных руководствах и обзорах. Кроме того, часто при исследовании генотоксичности тех или иных факторов учитывают и геномные мутации, к которым относят анеуплоидию и полиплоидию. Также, особенно на ранних стадиях онтогенеза или в отдельных тканях вместе с истинными aberrациями хромосом учитывают и разнообразные нарушения митотического аппарата клетки, так называемый анафазный метод. Однако в настоящее время он применяется достаточно редко.

Для получения препаратов хромосом используются интенсивно пролиферирующие (делящиеся) ткани: костный мозг у амфибий и млекопитающих, фабрициева сумка у птиц и предпочка у рыб. Кроме того, у беспозвоночных, рыб и амфибий для приготовления препаратов часто используют эмбриональные стадии. Для визуализации хромосом используют либо рутинное окрашивание, либо дифференциальное окрашивание с предварительной предобработкой препаратов. Однако техники дифференциального окрашивания применяются почти исключительно для анализа хромосомных нарушений у человека и для некоторых лабораторных объектов. Для оценки частот aberrаций хромосом у животных из природных популяций применяют обычно только рутинное окрашивание хромосом.

Метод учёта хромосомных aberrаций является трудоемким и требует высокой квалификации оператора. Даже при исследовании контрольных лабораторных образцов высока межлабораторная вариабельность получаемых результатов. Кроме того, ограничены возможности автоматизации данного метода. Кариотипирование остается ручной процедурой, автоматизированию поддаются

ся только некоторые этапы, например, автоматический поиск метафаз. Но даже в этом случае, необходимо участие оператора, особенно при работе с разнообразным исходным материалом.

Метод учёта хромосомных aberrаций хорошо зарекомендовал себя при использовании в природных популяциях животных: например, при исследовании генетических последствий крупных ядерных аварий, или интенсивного использования пестицидов в агроценозах.

Следует также отметить, что различные факторы биологической природы могут являться причиной возникновения aberrантных клеток. Это могут быть инфекционные агенты, возрастные изменения, гормональные и иммунологические нарушения, стресс. Поэтому при анализе aberrаций хромосом в природных популяциях в постнатальном онтогенезе необходимо принимать во внимание, что не только какие-либо физико-химические факторы могут приводить к возникновению aberrантных клеток, но важную роль может играть и функциональное состояние исследуемого организма, а также эпидемиологическая ситуация. В таких условиях необходимо увеличивать размер выборки для получения адекватных результатов.

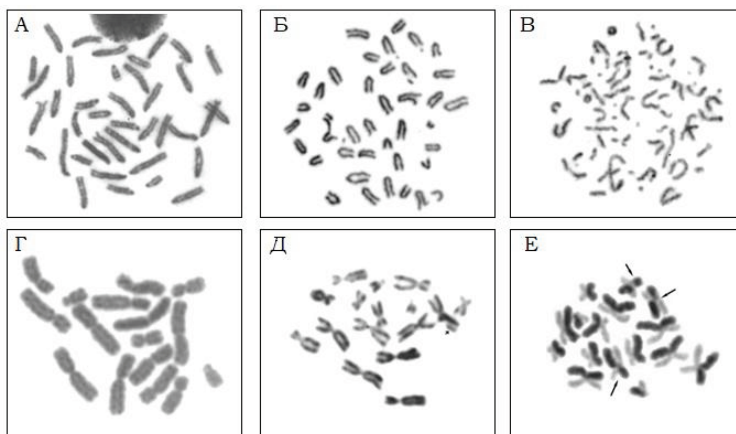


Рис. 4.1. Aberrации хромосом и сестринские хроматидные обмены. А, Б, В – митотические метафазы у мыши *Mus musculus* Linnaeus, 1758 ($2n = 40$). А – нормальная метафаза; Б, В – aberrантные метафазы (множественные разрывы); Г, Д, Е – митотические метафазы у *Nothobranchius rachovii* Ahl, 1926 ($2n = 16$); Г – норма; Д – aberrантная метафаза (хроматидный разрыв); Е – сестринские хроматидные обмены. Фотографии авторов

Анализ частот сестринских хроматидных обменов (СХО) является еще более трудоемким по сравнению с анализом частот aberrантных клеток, но обладает большей чувствительностью (рис. 4.1, Е). В этом случае требуется предварительная инъекция 5-бромдеоксиуридина (БДУ) для получения дифференциально окрашенных сестринских хроматид. Не смотря на трудоёмкость, метод был успешно применен для оценок мутагенности вод из естественных водоемов

и отдельных мутагенов в лабораторных условиях. Суть метода состоит в дифференциальном окрашивании сестринских хроматид после предварительного включения БДУ и подсчета сестринских хроматидных обменов в метафазах. Данный метод обладает высокой чувствительностью, однако для использования в природных популяциях практически не пригоден, поскольку требуется предварительная обработка животных.

Анализ аберраций хромосом и сестринских хроматидных обменов – высокочувствительные тесты для оценки влияния различного рода факторов на геном. СХО в большей степени подходит для оценки воздействия химических агентов. Однако по сравнению с другими тестами они более трудоемкие, пригодны для ограниченного числа объектов и практически не поддаются автоматизации.

4.2. Микроядерный тест

В последние 20 лет тест на микроядра используется как надёжный показатель генотоксического действия самых разных факторов. Простота и надежность этого теста позволяет использовать его как в лабораторных исследованиях токсичности различных веществ, так и при мониторинге состояния природных популяций. Тест на микроядра является наиболее удобным и распространенным методом измерения повреждений хромосом у различных организмов, включая рыб, моллюсков, птиц и млекопитающих как в природе, так и в лабораторных условиях. Наиболее широко он используется в водных экосистемах как биомаркер уровня загрязнения.

Микроядро (МЯ) – это фрагмент ядра клетки, не содержащий полного генома. Микроядра хорошо различимы в световом микроскопе и, как правило, расположены в цитоплазме недалеко от ядра клетки. Интенсивность и структура окрашивания микроядер сходна с окраской основного ядра. МЯ образуются из ацентрических хромосомных (или хроматидных) фрагментов или целых хромосом (хроматид), отстающих в анафазе и не включающихся в основное ядро в телофазе. Ацентрические хромосомные фрагменты образуются в результате повреждений ДНК, а МЯ с целыми хромосомами образуются в результате нарушений сегрегации хромосом в анафазе, вызванными повреждениями веретена деления, кинетохора или дефектами в контроле клеточного цикла.

Одним из существенных достоинств метода является его простота и дешевизна. Частота МЯ подсчитывается на микропрепаратах, полученных из пролиферирующей ткани и окрашенных дифференциальными или флуоресцентными красителями.

Тест на МЯ можно использовать для любых делящихся клеточных популяций независимо от структуры кариотипа. Как правило, используются эритроциты, костный мозг у наземных позвоночных, а также жабры, почки или печень у водных животных. При использовании эритроцитов одним из существенных преимуществ теста на МЯ является возможность применения этого метода без умерщвления животных, что позволяет проводить мониторинг состояния популяции, не нарушая её генетического разнообразия.

Существуют различные механизмы действия генотоксических агентов на структуру ДНК и целостность ядра. Генотоксиканты, приводящие к образованию МЯ, условно делят на два класса: кластогены, приводящие к разрывам хромосом и образованию ацентрических фрагментов в микроядрах, и анеугены, нарушающие веретено деления в процессе митоза и приводящие к образованию МЯ с отдельными хромосомами. Поэтому микроядра, образованные в результате кластогенного или анеугенного действия различаются по своему составу и могут содержать ацентрические фрагменты или целые хромосомы соответственно. Возможность детектировать как кластогенные, так и анеугенные эффекты также является одним из достоинств микроядерного теста.

На образование МЯ могут влиять самые различные факторы. У здоровых особей МЯ образуются под действием внешних факторов, таких как загрязнение, радиация, лекарства, биологически опасные вещества или свободные радикалы. Кроме того, различные генетические заболевания, инфекции, воспалительные процессы или дефицит питательных веществ также приводят к образованию МЯ.

Несмотря на очевидные преимущества, тест на МЯ имеет ряд недостатков. Они прежде всего связаны с низким спонтанным уровнем МЯ и его вариабельностью. Спонтанный уровень МЯ может варьировать у различных видов, в разные сезоны или под действием каких-либо внешних факторов. Кроме того, существенными являются физиологические (возраст, генеративное состояние или сезонные ритмы) и физико-химические факторы (температура, содержание кислорода в воде и др.).

Имеются данные о разном уровне спонтанной частоты МЯ в различных органах и тканях. Во многочисленных исследованиях было показано, что спонтанная частота МЯ существенно варьирует у различных видов и групп животных.

Известно, что на разных стадиях индивидуального развития чувствительность организма к воздействию генотоксикантов меняется. С возрастом возрастает частота хромосомных нарушений и, соответственно, увеличивается частота образования МЯ. Влияние сезона на чувствительность различных видов была отмечена у гидробионтов. Такие сезонные параметры как соленость, температура, уровень pH и доступность пищи могут оказывать существенное влияние на появление МЯ. Кроме того, физиологическое состояние в различные сезоны года, так же, как и генеративное состояние отражается на частоте образования МЯ. Так, было показано, что частота образования МЯ может различаться у самцов и самок.

Исследования в природе показали более высокую изменчивость в частоте образования МЯ в диких популяциях по сравнению с лабораторными животными. Рассматриваются несколько факторов, объясняющих такую изменчивость, в том числе цитотоксичность и адаптация к загрязненной окружающей среде, которая зависит от генетической составляющей популяции.

Кроме того, особенность метаболизма экотоксиканта также может оказывать влияние на образование МЯ. Микроядра образуются в процессе деления клеток, поэтому они могут быть обнаружены в различное время после действия

повреждающего события, в зависимости от кинетики клеточного цикла и механизма образования. Для самых разных групп животных было показано, что виды обладают разной чувствительностью к экотоксикантам.

Таким образом, микроядреный тест является простым и надежным методом для мониторинга состояния природных популяций, однако необходимо учитывать видовую, индивидуальную, физиологическую и сезонную изменчивость спонтанного уровня образования МЯ. Кроме того, постоянное присутствие в окружающей среде различных биотических и абиотических факторов затрудняет интерпретацию результатов: использование батареи тестов, повторные измерения и длительный мониторинг могут позволить снизить влияние изменчивости спонтанного уровня образования МЯ и выявить эффекты, связанные с загрязнением.

4.3. Метод ДНК-комет

Гель-электрофорез единичных клеток (*Comet Assay*) является одним из наиболее перспективных методов в мониторинге генотоксического действия широкого спектра как антропогенных, так и природных факторов на животных и растениях *in vivo* (рис. 4.2.). Данный высокочувствительный метод позволяет оценить первичные повреждения ДНК, которые впоследствии могут приводить к возникновению хромосомных aberrаций и нарушению процессов клеточной пролиферации и дифференцировки, к апоптозу или развитию патологий различных тканей и органов. Следствием нарушений целостности генетического материала может оказаться снижение репродуктивного успеха животных, являющегося залогом успешного существования популяции. Таким образом, экотоксикологические параметры среды обитания и реакции на них биологических объектов представляют особую важность при изучении экологии видов в контексте их взаимодействия с факторами окружающей среды.

Метод ДНК-комет в настоящее время является одним из самых широко применяемых методов биомониторинга и оценки рисков окружающей среды, включая водную среду, которая зачастую выступает конечным звеном в накоплении загрязняющих агентов антропогенной природы.

Основными этапами проведения теста ДНК-комет являются: получение гель-слайдов, получение микропрепаратов клеток, лизис, электрофорез, фиксация, окрашивание и микроскопический анализ слайдов.

Для получения гель-слайдов предметные стекла покрывают 1%-ным агарозным гелем, в который вносят исследуемые клетки. Гель с клетками наносят на подготовленные гель-слайды. После затвердевания геля клетки подвергают лизису, во время которого происходит диссоциация клеточных структур и выпетливание хроматина в поры агарозы. При электрофорезе под влиянием электрического поля ДНК мигрирует к аноду в виде отдельных фрагментов или петь и формирует электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от количества разрывов в ДНК. После электрофореза препараты фиксируют и окрашивают флуоресцентными красителями, применяемыми для визуализации ДНК – бромистый этидий, йодистый пропи-

дий, акридиновый оранжевый, CYBR Green I, YOYO, DAPI. Микропрепараты анализируют на флуоресцентном микроскопе с использованием высокочувствительной камеры и программного обеспечения, что позволяет проводить цифровую обработку геометрии комет. При подобном способе анализа препаратов в качестве показателей поврежденности ДНК используют следующие основные показатели: длина хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте, “момент хвоста” (произведение первых двух перечисленных параметров) и др.

Существует два основных варианта метода ДНК-комет – нейтральный, при котором регистрируются двунитевые разрывы, и щелочной, когда помимо двунитевых регистрируются также и однострунные разрывы. Последний вариант расширяет возможности оценки генотоксических факторов, однако требует дополнительных манипуляций: щелочной денатурации при $pH > 13$, в результате которой щелочно-лабильные сайты реализуются в однострунные разрывы, щелочного электрофореза и нейтрализации слайдов.

Существует большое число модификаций данного метода для оценки разных типов повреждений ДНК – щелочная и нейтральная; оценка апоптоза и окислительного стресса, репарации и т.д.

К числу преимуществ этого метода в его применении для биоиндикации и оценки экологических рисков относят воспроизводимость на большом спектре организмов (растения, млекопитающие, рыбы, ракообразные, моллюски, черви), и, в ряде случаев с определенными ограничениями, доступность использования в полевых условиях. При этом отсутствует необходимость предварительного знания кариотипа или особенностей клеточного цикла объекта.

Экогенотоксикологические исследования окружающей среды определяют и ограничения применения метода ДНК-комет. В подобных исследованиях возникает большое количество дополнительных факторов, которые необходимо принимать во внимание: наличие комплекса физических, химических и биологических факторов, вносящих вклад в генотоксический эффект в природных условиях; выявление таргетных видов и определение наиболее чувствительных к воздействию генотоксикантов стадий жизненного цикла; индивидуальная изменчивость и генетическая восприимчивость и т.д. Помимо таких факторов, как пол и возраст, вышеперечисленные аспекты делают полевые исследования более сложными по сравнению с лабораторными, когда большинство из них возможно контролировать в той или иной степени, а также подчеркивают необходимость наработки исторических контролей (неоднократного повторения контрольного эксперимента в конкретных условиях) и уровней фонового воздействия различных природных генотоксикантов по сравнению с оценкой антропогенного воздействия.

Одним из важнейших этапов оценки рисков методом ДНК-комет является выбор вида и органа-мишени. Несмотря на наличие исследований на амфибиях, морских млекопитающих или ракообразных, наиболее часто и успешно применяемыми для рассматриваемого метода объектами водной среды являются рыбы и моллюски. У рыб чаще всего исследуют печень, жабры, предпочку и периферические эритроциты; у моллюсков – гемолимфу, пищеварительные железы (гепатопанкреас) и клетки жабр. Пищеварительные железы участвуют в

трансформации ксенобиотиков и вследствие этого являются прямым органом-мишенью для ДНК-повреждающих агентов. Клетки жабр – компоненты органов фильтрации и оказываются первым барьером на пути потенциальных загрязняющих агентов и представляют интерес для оценки рисков методом ДНК-комет. Однако при использовании тканей необходимо проводить лизис для точной диссоциации, а этот этап сам по себе сопряжен с риском индицирования повреждений ДНК. Таким образом, для каждого индикаторного вида и органа-мишени необходимо проводить стандартизацию протокола и оценивать базовые уровни повреждений ДНК.

Для получения более точных результатов и дополнения картины исследования метод ДНК-комет применяют в сочетании с другими общепринятыми цитогенетическими и молекулярными подходами – методами подсчета частоты образования микроядер, хромосомных аберраций, а также вариацией метода ДНК-комет – Comet-FISH.

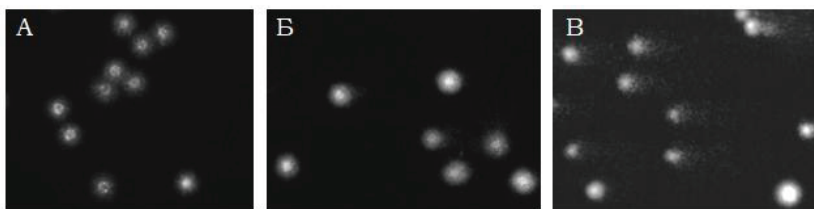


Рис. 4.2. ДНК-кометы в клетках (А) костного мозга мышей *Mus musculus* Linnaeus, 1758, контроль; (Б) печени рыб *Nothobranchius rachovii* Ahl, 1926, контроль; (В) печени рыб *N. rachovii* после воздействия наночастиц CeO_2 . Фотографии авторов

4.4. Анализ нарушений мейоза

Формирующиеся половые клетки высокочувствительны к действию факторов окружающей среды. Наиболее чувствительным этапом формирования половых клеток является деление мейоза, на этапе которого могут проявляться как нарушения, возникшие ранее в соматических клетках, так и нарушения, специфические для мейоза.

Косвенным методом оценки хода мейоза является метод учёта доминантных летелей у млекопитающих. Метод основан на оценке генетических изменений в гаметах подвергавшихся воздействию самцов по выживаемости эмбрионов в скрещиваниях с интактными (нормальными) самками. Считается, что доминантные летели являются результатом численных и структурных изменений хромосом в гаметах, образованных в результате нарушенного мейоза. Для растений существует пылевой тест, который основан на учёте фертильных и стерильных пылевых зёрен и также даёт косвенную оценку хода мейоза в пыльниках подвергавшихся воздействию растений. Метод успешно применялся для анализа загрязнённых территорий.

Прямым методом изучения мейоза является классический метод учёта реципрокных транслокаций, который осуществляется в сперматоцитах I порядка на стадиях диакинеза-метафазы I. В случае наличия реципрокной транслокации на этих стадиях обнаруживается квадριвалент, либо более сложные мультивалентные ассоциации, если транслокаций две и более. Считается, что в сперматогониях (предшественниках сперматоцитов) при воздействиях могут возникать различные типы хромосомных перестроек, но многие из них элиминируются во время митотических делений и до профазы I мейоза доходят только те клетки, которые несут сбалансированные хромосомные перестройки (реципрокные транслокации).

Наиболее точным методом выявления реципрокных транслокаций в мейозе является электронно-микроскопический анализ контрастированных азотно-кислым серебром синаптонемных комплексов (СК) в профазе I мейоза. Благодаря большой чувствительности ультраструктурного анализа, конфигурации СК позволяют выявить не только мелкие транслокации, но и также делеции, внутрихромосомные аберрации, ассоциации аутосом с половым бивалентом и другие нарушения, которые недоступны для анализа в диакинезе-метафазе I. В среднем, частота выявления транслокаций при анализе СК превышает частоту выявления транслокаций в диакинезе-метафазе в 1,8 раза. Современным методом изучения СК является иммунофлуоресцентный анализ с использованием антител к специфичным белкам структурных компонентов СК, кинетохоров, хроматина, рекомбинации (рис. 4.3). Иммунофлуоресцентный анализ кроме структурных нарушений хромосом способен выявить особенности мейотической рекомбинации, поведения полового бивалента, процессов транскрипции, инактивации хроматина. Наиболее точных данных о динамике мейоза можно добиться, комбинируя эти методы (анализ диакинеза – метафазы I, электронно-микроскопический и иммунофлуоресцентный анализы СК).

Метод анализа СК был применён при изучении репродуктивной системы мышей и крыс, подвергавшихся действию ионизирующих (ЧАЭС) и рентгеновских излучений, широкого спектра мутагенов и лекарственных препаратов. На ход мейоза могут оказывать воздействие не только антропогенные, но и естественные биотические и абиотические факторы (температура, концентрация определенных элементов, вирусные инфекции и пр.), что необходимо учитывать при анализе.

В таблице 4.1. приведены основные преимущества и недостатки описанных методов.

Таблица 4.1

Преимущества и недостатки цитогенетических тестов, используемых для оценки состояния окружающей среды

Тест	Преимущества	Недостатки
Аберрации хромосом, мутации генома, сестринские хроматидные обмены (СХО)	1. Высокая чувствительность, особенно при использовании методов дифференциального окрашивания хромосом. 2. Достаточная простота при выявлении анеуплоидных и полиплоидных клеток. 3. Возможность работы в полевых условиях и на разных стадиях онтогенеза.	1. Невозможность автоматизации. 2. Высокая трудоемкость. 3. Высокая стоимость, особенно при использовании флуоресцентных методов анализа. 4. Субъективность в оценке результатов, как следствие квалификации оператора. 5. Трудности при работе с природными образцами (мелкие хромосомы у рыб и их большое число, невысокая митотическая активность и сезонная динамика). 6. Необходимость предварительной предобработки в случае изучения СХО.
Микроядерный тест	1. Простота, надежность и невысокая стоимость. 2. Возможность использовать любые пролиферирующие ткани. 3. Легко выполнять в полевых условиях. 4. Нет необходимости умерщвлять животных. 5. Можно выявлять как кластерные, так и анеугенные эффекты.	1. Невысокая спонтанная частота. 2. Большая видовая, индивидуальная, физиологическая и сезонная изменчивость. 3. Необходимы большие выборки.
Тест ДНК-комет	1. Возможность применять модификации метода для широкого спектра видов, органов, тканей. 2. Относительно невысокая стоимость и трудоемкость. 3. Высокая чувствительность. 4. Возможность выявлять различные эффекты (репарация, апоптоз и др.) и нарушения (одно/двунитевые разрывы). 5. Возможность выполнять часть исследования в полевых условиях. 6. Comet Assay занимает промежуточное положение между молекулярными и цитогенетическими методами	1. Необходимость подбирать специфические условия для работы на различных тканях или с целью выявления тех или иных эффектов (апоптоз, окислительный стресс и пр.) 2. Субъективность в оценке результатов в случае отсутствия автоматизированных систем обеспечения параметров ДНК комет. 3. Регистрируются только потенциальные нарушения.
Анализ нарушений мейоза	1. Анализ клеток зародышевой линии 2. Высокая чувствительность 3. При электронно-микроскопическом анализе синаптонемных комплексов выявляются даже самые мелкие аберрации. 4. При иммунофлуоресцентном анализе – возможен анализ распределения большого количества специфических белков.	1. Как правило, для планового анализа доступны только самцы. Анализ мейоза у самок более трудоемкий, ооцитов в ячниках существенно меньше, чем сперматозоидов в семенниках. 2. Анализ синаптонемных комплексов трудоемкий, дорогостоящий, требует высокой квалификации специалистов.

4.5. Выбор объекта

В качестве природных объектов для оценки цитогенетического показателя среди позвоночных можно рекомендовать представителей рыб, амфибий и мелких млекопитающих, широко распространенных в регионе исследования. Для анализа aberrаций хромосом наиболее пригодны виды, имеющие наименьшее диплоидное число хромосом. В случае применения методов подсчета микроядер и ДНК-комет можно использовать любые широко распространенные в данном регионе виды животных. При анализе мейоза следует помнить, что в средних широтах он имеет сезонную выраженность (разные фазы мейоза могут быть достаточно тесно связаны с сезонами года). Для тропических видов это не так существенно.

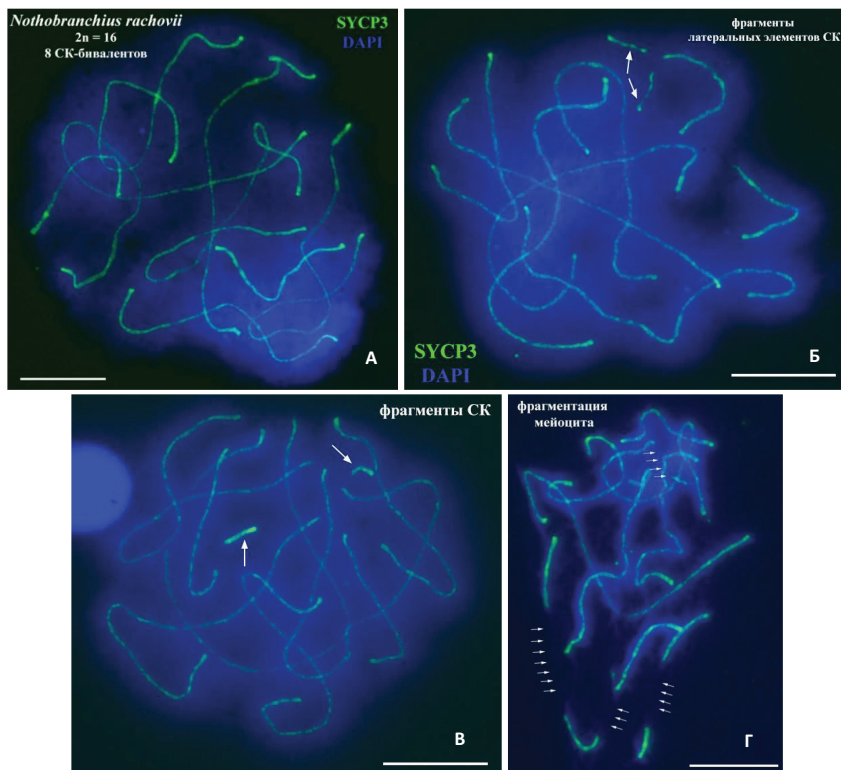


Рис. 4.3. Иммунофлуоресцентное выявление синаптонемных комплексов (СК) в сперматocyтах *Nothobranchius rachovii* Ahl, 1926 (норма) с помощью антител против белка SYCP3 (главный структурный белок латеральных элементов СК). Хроматин окрашен DAPI (серый цвет). А – норма. Б, В, Г – нарушения после воздействия наночастиц CeO_2 . Б – фрагменты латеральных элементов СК, В – фрагменты СК, Г – фрагментация мейоцитов. Масштабные отрезки – 10 мкм. Фотографии авторов

Среди приведенных выше методов наиболее доступным и простым в техническом отношении является метод подсчета микроядер. Для исследования микроядер могут быть использованы различные органы и ткани. Следует лишь учитывать, что они могут обладать разной чувствительностью к экотоксикантам. Метод не требует умерщвления животного и, кроме того, позволяет взять пробы от значительного количества экземпляров, что упрощает последующие статистические расчеты. Кроме того, возможно использование видов разных систематических групп, что повышает объективность оценки. Поэтому в качестве первоначального сканирования выбранной территории мы предлагаем использовать именно его. Необходимо лишь учитывать, что чувствительность данного метода ниже, чем, например, теста ДНК-комет.

Лабораторные эксперименты необходимы при уточнении первоначальных данных, полученных при скрининге природных популяций. Они позволяют использовать ряд методов, таких как тест ДНК-комет, анализ нарушений в мейозе, анализ aberrаций хромосом и сестринских хроматидных обменов, которые трудно применить в полевых исследованиях.

В качестве лабораторного тест-объекта для оценки генотоксичности факторов окружающей среды мы предлагаем использовать тропических рыб *Nothobranchius rachovii* Ahl, 1926. Данный вид имеет минимальное среди рыб и общепринятых лабораторных животных диплоидное число крупных хромосом, равное 16. Достаточно прост в содержании и разведении в лабораторных условиях. Имеет короткий жизненный цикл (3-4 месяца после выклева из икры). Половозрелость наступает через месяц после выклева. Кроме того, для кроветворного органа (предпочка) отмечена высокая митотическая активность, что позволяет получить достаточное количество метафазных пластинок хорошего качества. Это особенно важно для анализа сестринских хроматидных обменов. Также, поскольку в мейозе наблюдаются всего 8 бивалентов, образованных крупными хромосомами, значительно упрощается оценка мейотических нарушений и повышается их точность. Также достаточно прост учет хромосомных aberrаций. Поскольку, при оценке состояния окружающей среды используются водоемы, расположенные на территориях биотестирования, как наибольшие аккумуляторы различного рода экотоксикантов, использование данного вида представляется нам не только оправданным, но и необходимым для получения адекватных результатов. Кроме того, при отсутствии водоемов в зонах тестирования можно использовать водные вытяжки почв.

Результаты, представленные в главе, получены при поддержке РФФИ в рамках проекта 18-29-05023.

Список литературы

Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг / Под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М.: Академия, 2010. – 218 с.

Оценка генотоксических свойств методом «ДНКкомет» in vitro: методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.

Абилев С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. – М., СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.

Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптономный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. – М.: КМК, 2007. – 358 с.

Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: методические рекомендации. – М., 2006. – 28 с.

Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Paris: OECD Publishing, 2016. URL: <https://www.oecd.org/env/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay-9789264264885-en.htm>

МОНИТОРИНГ ФИТОЦЕНОЗОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ В РАМКАХ КОНЦЕПЦИИ ФИТОГЕННОГО ПОЛЯ

Растения, как и другие организмы, активно взаимодействуют в экосистемах с многочисленными внешними биотическими и абиотическими факторами, обмениваясь веществами, энергией и информацией с окружающей средой (Савинов, 2012; Савинов, Никитин, 2017а). При этом активность выступает как наиболее общая и всеохватывающая характеристика живых организмов и биосистем, отражающая всю динамику целеустремленной борьбы за существование посредством целесообразных механизмов (Савинов, Никитин, 2017а, б).

В 9-й части данного учебного пособия были рассмотрены методы оценки ценотической активности видов растений в экосистемах на основе *ценотического, статусного и эргонтического подходов* (Савинов, Никитин, 2017б). Однако следует учитывать, что наряду с ними в отечественной и зарубежной фитоценологии независимо развиваются также методы оценки активности видов растений в рамках концепции фитогенного (экологического) поля (Дуля, 2006; Тиходеева и др., 2010; Жукова, 2012; Журавлева и др., 2012; Mou et al., 1993; Seidl et al., 2012). Этот подход к оценке ценотической активности растений можно условно назвать *фитогенно-полевым подходом*. Анализ работ в этой области показывает, что фитогенно-полевой подход является перспективным как в плане комплексной оценки активности видов растений, так и в аспекте индикации состояния фитоценозов и их мониторинга, в том числе в условиях техногенного загрязнения экосистем.

5.1. Теория и практика использования концепции фитогенного поля в отечественной фитоценологии

Основоположники и последователи *концепции фитогенного поля* исходили и исходят из того, что в процессе своей жизнедеятельности растения любого вида активно взаимодействуют с биотическими и абиотическими факторами среды обитания, в той или иной степени изменяя ее физически, химически и биологически в пределах некоторой области. Эта область получала разные названия, в частности *фитосфера, эдасфера* (Быков, 1957, 1973), но в отечественной литературе в соответствии с концепцией А.А. Уранова (1965) закрепилось понятие «*фитогенное поле*» (ФП) (рис. 5.1).

Согласно концепции А.А. Уранова (1965), ФП имеет две части: а) внутреннюю, находящуюся в пределах общего контура растения, т.е. в зоне кроны и корневой системы, и б) внешнюю – за пределами указанного контура. При этом ФП отличается от физического поля рядом качественных особенно-

стей (Уранов, 1965, с. 252): 1) его напряженность резко изменяется при переходе от внутренней части ФП к внешней, 2) ФП мозаично в плане распределения напряженности из-за расчлененности «активных органов растений» (крон, корневых систем), особенно у вегетативно динамичных растений, что приводит к полицентричности ФП; 3) ФП динамично вследствие изменения условий в биотопе, сопровождающихся адекватной фенотипической изменчивостью растений данного вида из-за наследственно обусловленных ритмов онтогенеза у разных видов растений и специфики развития на каждом этапе онтогенеза. Наряду с этим А.А. Уранов (1965) полагал, что, исследуя взаимодействия растений через их ФП, важно рассматривать два аспекта: 1) как в сообществе растение изменяет сопредельную с ним среду и 2) как реагируют на эти изменения ближайшие сочлены этого сообщества. Представляется, что в плане таких исследований не менее важен также и аспект реакции рассматриваемого растения на влияние ФП указанных сочленов фитоценоза.

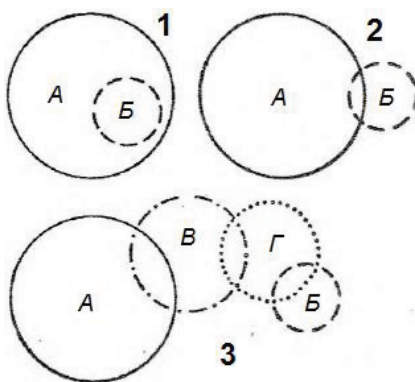


Рис. 5.1. Схема вариантов взаимодействия растений через их фитогенные поля (ФП): ФП растения А находится в пределах ФП растения Б полностью (1) или частично (2); растение А опосредованно влияет на растение Б через ФП растений В и Г (по Уранову, 1965)

В современной популяционной экологии концепция ФП развивается, в частности, с учетом того, что в фитоценозе особи, раметы, клоны ценопопуляций (ЦП) формируют вокруг себя ФП разной степени сложности и конфигурации, взаимодействующие между собой и образующие ФП ценопопуляций (ЦП), а совокупность последних составляет ФП фитоценоза как единой системы (Жукова, 2012). Исследования, проведенные на этой методологической основе в разных типах сообществ, позволили выделить ряд вариантов ФП, различающиеся у растений разных биоморф. В частности, установлено (Жукова, 2012), что простые ФП свойственны моноцентрическим растениям: например, ряду деревьев (*Pinus sylvestris* L., *Betula pendula* L.), а также стержнекорневым (*Trifolium pratense* L., *Taraxacum officinalis* L.), некоторым кистекарневым (*Plantago media* L.) травам (рис. 5.2 А).

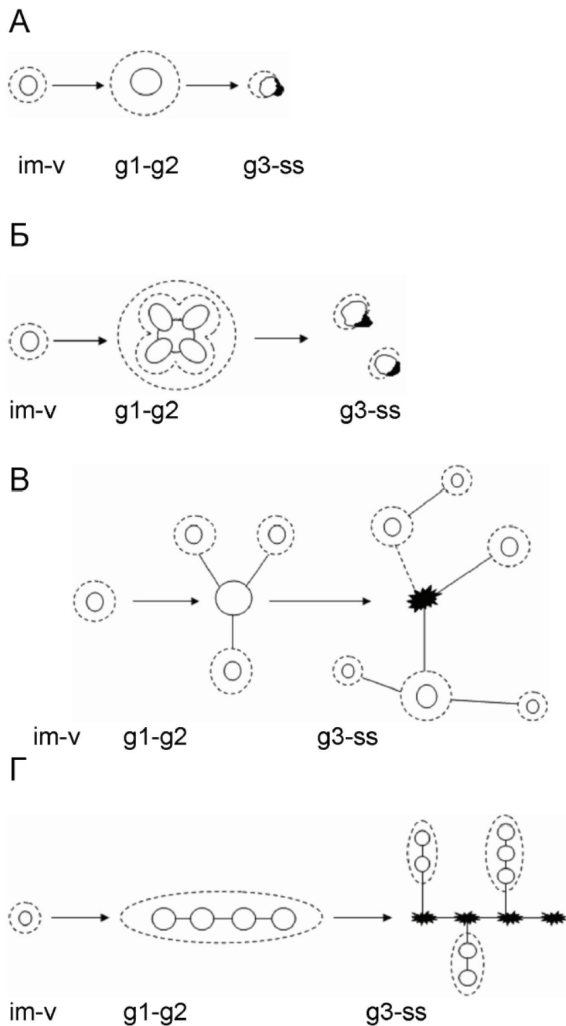


Рис. 5.2. Формирование фитогенного поля (ФП) в онтогенезе растений разных биоморф:
 А – моноцентрическая биоморфа, Б – неявнополицентрическая, В – полицентрическая,
 Г – ацентрическая (сплошная линия – «ядро» ФП, пунктир – внешние границы ФП) (Жукова, 2012)

У них формируется один центр закрепления, сохраняющийся в течение всей жизни, вокруг которого образуется постепенно усиливающееся ФП.

Процесс старческой партикуляции слабо увеличивает занимаемую площадь и продолжительность её захвата, при этом ФП принимает неправильную форму, частично исчезая (Жукова, 2012). Сложные ФП формируются у неявнополицентрических растений: короткокорневищных (например, у *Trollius europaeus* L.), плотно- и рыхлодерновинных (например, у *Dechampsia caespitosa* (L.) Beauv., *Festuca pratensis* Huds.), кистекорневых (в частности, у *Plantago major* L.) (рис. 1 Б). В начале онтогенеза эти растения моноцентричны, далее у них формируется несколько близко расположенных центров закрепления, ФП которых перекрываются (Жукова, 2012). Образующиеся при партикуляции раметы могут разрастаться, увеличивая занятую площадь и силу воздействия ФП. Одновременно часть рамет погибает, а ФП рамет могут существовать изолированно.

Явнополицентрические биоморфы на ранних этапах онтогенеза тоже моноцентричны (рис. 5.2 В). Появляющиеся у них в прегенеративном периоде отбеги или корневища формируют новые центры закрепления на разном расстоянии от материнского (Жукова, 2012). Поэтому возникает значительно большее по размерам, но «размытое» ФП, где в промежутках между центрами закрепления рамет остаётся свободное пространство, доступное для особей того же или других видов. При этом ФП не перекрываются, длительность жизни каждого центра значительно меньше, но благодаря интенсивному разрастанию постоянно происходит захват новых площадей и освоение новых ресурсов (Жукова, 2012). Возникающий пятнистый узор полицентрической особи может быть усложнён формированием не только моноцентрических рамет-побегов (как, например, у *Aegopodium padagraria* L.), но и неявнополицентрических партикулирующих рамет-кустов (как у *Fragaria vesca* L.). Ацентрические биоморфы (например, у *Lysimachia nummularia* L., *Trifolium repens* L.) захватывают территорию напользанием побегов и их ответвлений в пределах ближайшего свободного пространства, образуя простые ФП (рис. 5.2 Г). При этом практически каждый узел плагиотропного побега может стать центром закрепления и сформировать боковое ответвление. И вокруг такого образования возникает плотное ФП, которое способно достаточно долго удерживать территорию, постепенно освобождая часть первоначально завоёванной площади при отмирании старых частей побега (Жукова, 2012).

А.М. Гореловым (2013) в развитие концепции ФП предложено: рассматривать проявление ФП в вещественном, энергетическом и информационном аспектах; выделять две группы факторов (трансформированные растением элементы биотопа и им создаваемые). Отмечено, что вторая группа указанных факторов имеет сигнальный характер, они приоритетны в информационной составляющей фитогенного поля.

Вещественная (субстратная) компонента ФП выражена наиболее наглядно (Горелов, 2013): проявляется в круговороте веществ, в избирательной аккумуляции элементов из окружающей среды, синтезе на их основе разнообразных органических веществ с разной степенью химической и биологической актив-

ности, которые по завершении онтогенезов растений составляют значительную часть опада – важнейшего «участника» почвообразовательного процесса. При этом вещественная составляющая ФП определяется областью корневой системы, где растение воздействует на различные свойства почвенной среды: а) физические (гранулометрический состав почвы, ее вертикальную и горизонтальную структуру, порозность, влажность, теплопроводность и др.); б) химические (минеральный и органический состав, кислотность, щелочность, буферность и др.); в) биологические (состояние почвенной биоты, биологическая активность почвы, аллелопатические явления и др.). С вещественной неразрывно связана энергетическая компонента, выраженная в изменении энергетических параметров пространства в пределах ФП (в частности, в его надземной части наиболее существенные изменения претерпевают световой и температурный режимы) (Горелов, 2013).

Информационная составляющая ФП остается наименее исследованной, хотя прослеживается в явлениях самой различной природы (Горелов, 2013). Это соответствует представлениям о том, что невозможно отделить энергетическое или корпускулярное взаимодействия объектов, в том числе живых организмов, от процессов передачи и приема информации, сопровождающих это взаимодействие. По мнению А.М. Горелова (2013), на организменном уровне ФП играет роль блока восприятия внешней информации и блока структурной организации растения, что обуславливает функции запуска и управления процессами жизнедеятельности с учетом состояния внешней среды, регуляции роста, управления структурообразованием, выбора стратегий управления жизнедеятельностью на каждом этапе онтогенеза.

Количественно оценивать ФП ценопопуляций можно коэффициентами напряженности ($K_{\text{ФП}}$) и мощности ($N_{\text{ФП}}$) этих полей (Жукова, 2012):

$$K_{\text{ФП}} = \frac{\sum k_i \times s_i}{S}, \quad (5.1)$$

$$N_{\text{ФП}} = \frac{\sum k_i \times m_i}{\sum k_i \times s_i}, \quad (5.2)$$

где k_i – количество особей в данной онтогенетической группе, s_i – средняя площадь минимального ФП особи данного онтогенетического состояния, m_i – средняя биомасса особи данного онтогенетического состояния, S – площадь, занимаемая ценопопуляцией.

Коэффициент напряженности ФП демонстрирует, насколько совокупность минимальных ФП элементов больше площади ЦП, а коэффициент мощности ФП показывает, как распределена биомасса ЦП по ее площади (Жукова, 2012). Например, максимальной мощности достигают фитогенные поля ЦП у эксплорента – *F. vesca*, а минимальные фитогенные поля – у патиентного вида *T. europaeus* L. (таблица 5.1).

Таблица 5.1

Характеристики ФП у ценопопуляций (ЦП) некоторых видов растений (Жукова, 2012)

Показатель	<i>Trollius europaeus</i> L.	<i>Fragaria vesca</i> L.	<i>Plantago major</i> L.
Площадь ЦП, м ²	5.0	5.25	4.27
Плотность особей/м ²	8.0–8.2	26.2	42.6
K _{нфп}	0.02–0.126	0.107	0.415
N _{фп}	82–123	2745	369
Число перекрытий ФП	8.8–9.1	3.0–5.9	8.2–9.3

Наряду с этим предложено учитывать и число перекрытий ФП рамет. Например, из таблицы следует, что наибольшее число перекрытий ФП особей обнаружено у *T. europaeus* и *P. major*. Отмечено также, что растения разных ценотипов формируют, как правило, неодинаковые по мощности ФП. По имеющимся данным (Жукова, 2012), мощность ФП ценопопуляций обычно уменьшается в ряду: виоленты – эксплеренты – пациенты.

При картировании фитогенных полей растений и мониторинге ценопопуляций изученных модельных видов в луговых, лесных и экотонных сообществах разных регионов Европейской части России, удалось установить следующие закономерности (Жукова, 2012): 1) размеры фитогенных полей каждого элемента ценопопуляции в процессе онтогенеза увеличиваются от имматурного до зрелого генеративного состояния, а затем сокращаются, приобретая иные очертания; 2) отмечена сезонная динамика фитогенных полей у ряда модельных видов (*F. vesca* и *T. europaeus*): весной и в первую половину лета, в период активного роста растений, увеличиваются размеры фитогенных полей, к осени они сокращаются в результате отмирания более старых частей растений. Таким же образом изменяются напряженность и мощность фитогенных полей.

Следует также учитывать, что одной из причин формирования ФП у каждого элемента ЦП разных видов растений являются их аллелопатические воздействия друг на друга (Жукова, 2012). Высшие растения способны синтезировать вещества, оказывающие существенное влияние на скорость роста и развития особей и рамет, а, следовательно, на разнообразие видового состава фитоценозов. Таким образом, изучение взаимодействий элементов ЦП видов разных биоморф и характера их фитогенных полей в различных экологических условиях может раскрыть пути формирования фитогенных полей сообществ, их динамики и устойчивости (Жукова, 2012).

В отличие от травянистых растений, деревья, из-за своих габитуальных особенностей, формируют качественно и количественно иные ФП, что находит отражение при формализации последних. Кроны деревьев влияют на перераспределение светового потока, определяют мощность опада, а через трансформацию этих важных факторов воздействуют на обилие и характер напочвенного покрова. Например, для определения *силы влияния* (F) (напряженности ФП) дерева данного вида на других представителей фитоценоза предложены следу-

ющие формулы, учитывающие габитуальные параметры дерева (Тиходеева и др., 2010; Журавлева и др., 2012):

$$F = \frac{\sum d \times D(H - h)}{h \times L^2}, \quad (5.3)$$

$$F = \frac{[OH(H - h) \times (100 - C)]}{100 \times h}, \quad (5.4)$$

где d – диаметр ствола, D – диаметр проекции кроны, H – высота дерева, h – высота кроны над землей; L – расстояние от дерева до точки воздействия; O – окружность ствола, R – радиус кроны, C – средняя сквозистость кроны.

По градиенту техногенного загрязнения экосистем морфологические показатели (в частности, указанные в формулах 5.3, 5.4) и физиолого-биохимические параметры растений меняются (см. Савинов и др., 2018). Наряду с этим происходит структурно-функциональная трансформация биоценозов прямо и косвенно, в частности через изменение характера и силы взаимосвязей между организмами и вследствие исчезновения одних их групп и появления других. Все перечисленные факторы в свою очередь качественно и количественно трансформируют ФП (Дуля, 2006). Например, в исследованиях влияния ФП деревьев первого яруса ельников-пихтарников и березняков на обилие и видовую структуру мохового и травяно-кустарничкового ярусов по градиенту загрязнения указанных фитоценозов выбросами Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ) отмечено усиление влияния ФП деревьев на обилие мохового яруса и, напротив, уменьшение этого влияния на обилие и α -разнообразие травяно-кустарничкового яруса в березняках от фоновой к буферной и импактной зонам (рис. 5.3).

В пределах тех же зон загрязнения экосистем выбросами СУМЗ исследовано влияние ФП крупных деревьев ели и березы на пространственную структуру полей концентраций тяжелых металлов (Cu, Pb, Cd, Zn) в лесной подстилке (Воробейчик, Пищулин, 2016). Было установлено, что на фоновой территории деревья формируют регулярную пространственную структуру полей концентраций: по мере удаления от ствола к окну древостоя содержание элементов убывает; но в буферной и импактной зонах эта закономерность не наблюдается.

5.2. Теория и практика использования экологической теории поля (EFT) в зарубежных исследованиях

Зарубежные ученые позже и независимо от отечественных исследователей стали разрабатывать *теорию экологического поля*, или *экологическую теорию поля* (EFT) (Wu et al., 1985; Walker et al., 1989), аналогичную *концепции фитогенного поля* (Быков, 1957, 1973; Уранов, 1965; Жукова, 2012). В зарубежных работах используются понятия, сходные с понятиями, которые используют отечественные исследователи фитогенных полей. Но зарубежные авторы значи-

тельное формализовали эту область исследований в аспекте математического моделирования (Mou et al., 1993; Seidl et al., 2012).

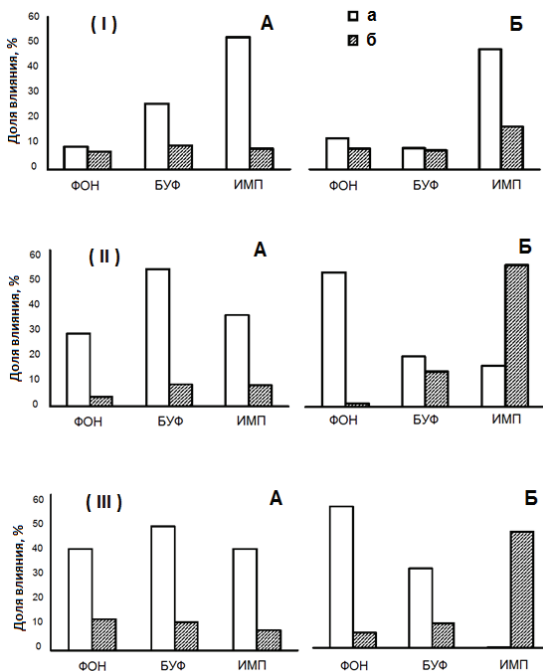


Рис. 5.3. Доли влияния (%) ФП дерева (а) и участка биотопа (б) на обилие мохового яруса (I), обилие (II) и α -разнообразие (III) травяно-устарничкового яруса в ельниках-пихтарниках (А) и березняках (Б) в фоновой (ФОН), буферной (БУФ) и импактной (ИМП) зонах (Дуля, 2006)

По мнению зарубежных исследователей, EFT дает основу для методологии интеграции пространственных взаимодействий между растениями разного размера, функциональных особенностей и формы роста в моделях растительного сообщества и динамики растительного покрова (Walker et al., 1989; Mou et al., 1993; Seidl et al., 2012). При этом было введено понятие *интерференции* как влияния данного растения на окружающую среду, включающую соседние растения, посредством конкуренции с ними за ресурсы, т.е. взаимодействия с ними. Соответственно этому, каждое развивающееся растение обладает *интерференционным потенциалом*, позволяющим проростку преодолеть негативное влияние всех соседних растений, утвердиться и вырасти впоследствии на данном участке (Wu et al., 1985).

Зарубежными авторами (Walker et al., 1989) предложено рассчитывать *интенсивность экологического поля* (I) и с помощью этого показателя оценивать стрессовую реакцию особи на ряд экологических факторов за интервал време-

ни. При этом для определения I первоначально рассчитывается *напряженность экологического поля* (G_s) как отношение *фактической относительной скорости роста площади листа* (ARGR) к *потенциальной относительной скорости роста площади листа* (PRGR), т.е. $ARGR / PRGR$. В свою очередь ARGR и PRGR зависит от особенностей биотопа: локальной температуры (T), освещенности (L), количества доступных из почвы питательных веществ (N), воды (H) и насыщенности почвы солями (S). В свою очередь напряженность экологического поля является функцией *индекса роста растений* (G), рассчитанного как отношение фактических к потенциальным относительным темпам роста площади листа:

$$G_s = \frac{ARGR}{PRGR'} \quad (5.5)$$

$$G = \frac{[f \text{ actual } (H, N, L, T, S)]}{[f \text{ optimal } (H, N) \times f \text{ actual } (L, T, S)]'} \quad (5.6)$$

$$I = 1 - G. \quad (5.7)$$

На основе принципов EFT группой исследователей (Mou et al., 1993) была разработана математическая модель REGROW для прогнозирования динамики роста лесной растительности. Было показано, что взаимодействие растений, которое изменяет для каждого из них доступность ресурсов (света, воды и питательных веществ) (рис. 5.4), играет важную роль в возникающей дифференциации растений по размерам.

Независимо от EFT был предложен принципиально сходный FON-подход (Berger, Hildenbrandt, 2000) к моделированию силы конкурентных взаимодействий древесных растений (рис. 5.5) в зонах их *полей влияния* (FON = field of neighbourhood), и была создана имитационная модель (KiWi) на основе данных о конкуренции деревьев в мангровых лесах. В KiWi смертность деревьев была смоделирована в терминах «функции памяти», то есть с учетом того, что ежегодный прирост ствола каждого дерева сохраняется в его «памяти» в течение определенного периода времени и может отражать жизнеспособность деревьев (Berger, Hildenbrandt, 2000).

Другие исследователи продолжают разработку новых вариантов математических моделей взаимодействий растений в экосистемах на основе положений EFT. В частности, при создании модели в рамках подхода iLand (Seidl et al., 2012) учитывали, что от степени развития экологического поля каждого растения и реакции последнего на конкуренцию зависит успех растения в конкурентной борьбе за ресурсы (рис. 5.6).

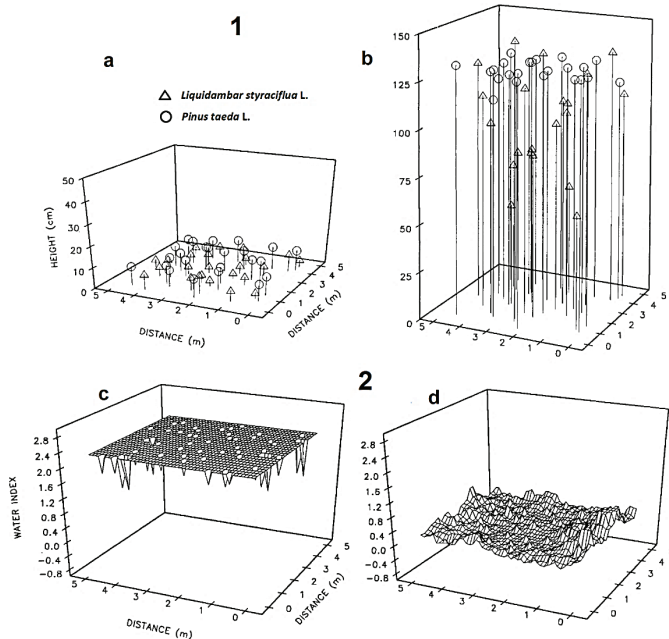


Рис. 5.4. Пространственные графики, показывающие в биотопе динамику 1 – высоты растений (*Liquidambar styraciflua* L. и *Pinus taeda* L.), 2 – доступность для растений воды из почвы (water index) (a, c – начальные, b, d – конечные показатели) (по Mou et al., 1993)

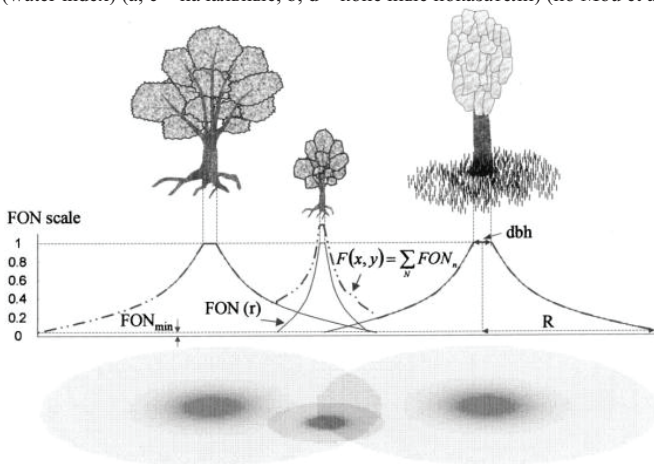


Рис. 5.5. Принципиальная схема FON-подхода для оценки силы конкуренции деревьев в биотопе (*FON* = field of neighbourhood – поле влияния, *R* – радиус зоны влияния дерева, *dbh* – диаметр ствола дерева) (Berger, Hildenbrandt, 2000)

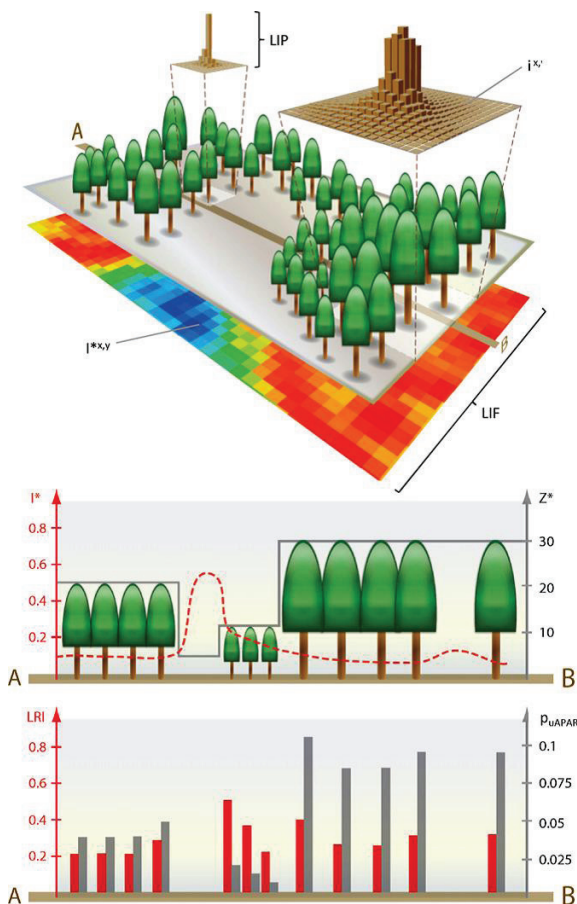


Рис. 5.6. Схематическая иллюстрация подхода к моделированию конкуренции деревьев за свет в лесной экосистеме Исландии. *LIP* – схема интерференции света, отображаемая для двух деревьев (индивидуумов) разных размеров, $i_{x,y}$ – индивидуальная интенсивность помехи световому потоку в ячейке x, y , *LIF* – поле непрерывной световой помехи от взаимодействующих отдельных *LIP*; $I^*_{x,y}$ – суммарная интенсивность помех в точке x, y , масштабированная до локальной высоты купола Z^* , *LRI* – индекс светового ресурса деревьев (определяющий доступность света), зависящий от положения отдельных деревьев в *LIF*, *puAPAR* – доля отдельных деревьев в общем использовании фотосинтетически активного излучения (Seidl et al., 2012)

По мнению авторов модели (Seidl et al., 2012), понимание и прогнозирование динамики, обусловленной сложными взаимодействиями растений, имеет решающее значение для устойчивого управления экосистемами, особенно в контексте быстро меняющихся условий окружающей среды.

Таким образом, следует подчеркнуть, что отечественными и зарубежными исследователями на основе методологически сходных подходов пока независимо разрабатываются методы оценки активности растений в рамках концепции фитогенного (экологического) поля. Представляется, что, учитывая и используя наиболее рациональные элементы имеющихся и разрабатываемых методологий и методов, в том числе эвристически близкой направленности (Савинов, Никитин, 2017а, б), можно упростить и ускорить процесс создания более объективных моделей и методов оценки активности растений в экосистемах. Это, несомненно, будет способствовать совершенствованию методов индикации и мониторинга фитоценозов и способов рационального управления экосистемами. Однако на данном пути предстоит решение многих сложных задач, особенно в аспекте учета симбиотических взаимодействий растений с эндофитными организмами, микоризными грибами и растениями-паразитами (Савинов, 2012).

Список литературы

- Быков Б.А. Геоботанический словарь. – Алма-Ата: Наука, 1973. – 216 с.
- Воробейчик Е.Л., Пищулин П.Г. Промышленное загрязнение снижает роль деревьев в формировании структуры полей концентраций тяжелых металлов в лесной подстилке // Экология. – 2016. – №5. – С. 323–334.
- Горелов А.М. Фитогенное поле и его структура // Вестник МГОУ. – 2013. – №1. – С. 1–10.
- Дуля О.В. Фитогенное поле дерева в условиях химического загрязнения // Экология в меняющемся мире. – Екатеринбург: Академкнига, 2006. – С. 53–62.
- Жукова Л.А. Концепция фитогенных полей и современные аспекты их изучения // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т.14. – №1(6). – С. 1462–1465.
- Журавлева Е.Н., Ипатов В.С., Лебедева В.Х., Тиходеева М.Ю. Изменение растительности на лугах под влиянием сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2012. – №2. – С. 3–12.
- Савинов А.Б. Аутоценоз и демоценоз как симбиотические системы и биологические категории // Журнал общей биологии. – 2012. – Т.73. – №4. – С. 284–301.
- Савинов А.Б., Никитин Ю.Д. Развитие представлений об активности растений, ее экологической роли и способах оценки в экосистемах // Принципы экологии. – 2017а. – №3. – С. 20–39.
- Савинов А.Б., Никитин Ю.Д. Методы мониторинга ценотической активности растений // Экологический мониторинг. Ч. 9. – Нижний Новгород: ННГУ, 2017б. – С. 20–35.
- Савинов А.Б., Ерофеева Е.А., Никитин Ю.Д. Морфологическая изменчивость и биохимические показатели листьев в ценопопуляциях *Aegopodium podagraria* L. (Apiaceae, Apiales) при разных уровнях загрязнения почв тяжелыми металлами // Поволжский экологический журнал. – 2018. – №3. – С. 315–326.

Тиходеева М.Ю., Лебедева В.Х., Ипатов В.С. Оценка влияния древостоя на развитие кроны дерева // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2010. – №1. – С. 15–21.

Уранов А.А. Фитогенное поле // Проблемы современной ботаники. Т.1. – М.-Л.: Наука, 1965. – С. 251–254.

Berger U., Hildenbrandt H. A new approach to spatially explicit modelling of forest dynamics: spacing, ageing and neighbourhood competition of mangrove trees // Ecological Modelling. – 2000. – V.132. – №3. – P. 287–302.

Mou P., Mitchell R.J., Jones R.H. Ecological field theory model: a mechanistic approach to simulate plant interactions in south-eastern forest ecosystems // Canadian Journal of Forest Research. – 1993. – V.23. – №10. – P. 2180–2193.

Seidl R., Rammer W., Scheller R.M., Spies T.A. An individual-based process model to simulate landscape-scale forest ecosystem dynamics // Ecological Modelling. – 2012. – V.231. – P. 87–100.

Walker J., Sharpe P.J.H., Penridge L.K., Wu H. Ecological field theory: the concept and field tests // Vegetatio. – 1989. – V.83. – №1/2. – P. 81–95.

Wu H., Sharpe P.J.H., Walker J., Penridge L.K. Ecological field theory: a spatial analysis of resource interference among plants // Ecological Modelling. – 1985. – V.29. – №1(4). – P. 215–243.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФИТОБЕНТОСА ПРЕСНЫХ ВОДОЕМОВ

Оценка состояния водных экосистем, особенно в регионах, подверженных массированному антропогенному воздействию, является неотъемлемой частью экологического мониторинга. Согласно Европейской Водной Рамочной Директиве (WFD), сообщества водных организмов, населяющих дно водоема, в частности, сообщества донных водорослей, являются ключевыми объектами при проведении процедуры мониторинга качества воды и состояния водных объектов разного типа в странах Европейского Союза. Бентосные водоросли чувствительны к динамике факторов водной среды и адекватно отражают влияние загрязнений различного типа (органические вещества и биогенная нагрузка, тяжелые металлы, нефтепродукты и т.д.). Различные характеристики фитобентоса (состав, таксономическая и экологическая структура, динамика в пространстве и времени) несут обширную и разноплановую информацию как о состоянии самих донных сообществ, так и о качестве среды их обитания. За последние десятилетия были проведены разработки достаточно большого количества индексов оценки качества воды и экологического состояния водных объектов по составу и обилию донных водорослей, в частности диатомовых, активно применяемых в Европе в системе мониторинга речных и озерных экосистем.

К бентосным или донным организмам относят совокупность организмов, приспособленных к существованию в прикрепленном или неприкрепленном состоянии на дне или на разнообразных предметах, живых и мертвых организмах, находящихся в воде на дне водоема. Существование бентосных водорослей определяется совокупностью абиотических и биотических факторов среды, среди которых часто очень важную роль играют конкуренция с другими водорослями и влияние на водоросли животных (например, выедание). Поэтому многие виды водорослей бентоса не всегда встречаются в местах с подходящими значениями светового режима и химического состава воды. Степень использования света сильно связана с температурой, содержанием питательных веществ и их скоростью поступления к слоевищу водорослей, во многом определяющейся степенью подвижности водных масс. Обычно в местах с заметным движением воды отмечается и пышное развитие водорослей-макрофитов. Движение воды особенно важно в ручьях, горных потоках и реках, где развиваются реофильные бентосные группировки. В озерах, при отсутствии заметных стоковых течений, определяющее воздействие оказывают волновые явления.

Температура, как важнейший экологический фактор, определяет скорость роста водорослей, темпы и направление их развития, переход к половому размножению, географическую зональность распространения и ряд других моментов их биологии. Часто интенсивному развитию бентосных водорослей способствует умеренное, но не избыточное содержание в воде биогенных элементов.

В пресных водоемах такие условия можно обнаружить в неглубоких прудах, в прибрежной зоне озер, в речных заводях и т.д. Если в таких местообитаниях имеется достаточное освещение, то развивается богатый видами и продуктивный фитобентос. Если движение воды отсутствует, биогенных элементов мало, наблюдается недостаток света, бентосные водоросли растут плохо.

Большую роль в экологии водорослей бентоса играет характер субстрата, на котором они развиваются. Как правило, заростки водорослей токами воды заносятся на самые различные субстраты, при этом большинство видов не проявляют субстратного предпочтения и способны вегетировать на разных субстратах. У ряда видов показана более тесная субстратная приуроченность. На песчаных и илистых грунтах могут произрастать немногие виды крупных водорослей-макрофитов. На рыхлых грунтах (пески, илы) имеется опасность перемещения грунта течениями и волнениями, в результате чего водоросли механически сильно повреждаются или не достигают заметного роста, как в более стабильных грунтовых условиях. На таких грунтах поселяются мелкие одноклеточные или колониальные водоросли, развивающиеся в неровностях песчинок или в пространстве между ними.

В бентосе континентальных водоемов обычно преобладают диатомовые, зеленые, синезеленые (цианопрокарियोты) и желтозеленые нитчатые водоросли, прикрепленные или не прикрепленные к субстрату (виды родов *Navicula*, *Nitzschia*, *Diatoma*, *Fragilaria*, *Pinnularia*, *Gyrosigma*, *Cladophora*, *Oedogonium*, *Ulothrix*, *Stigeoclonium*, *Spirogyra*, *Mougeotia*, *Zygnema*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Tribonema*, *Vaucheria* и многие другие). Водоросли-макрофиты могут обростать мелкими диатомовыми, синезелеными и представителями других отделов.

При определении понятия фитобентос часто выделяют макро- и микрофитобентос в соответствии с размерами водорослей. Ряд авторов используют термин фитобентос, включая в него как микроскопические одноклеточные водоросли донных отложений и перифитона, так и макроскопические скопления нитчаток. Под микрофитобентосом часто понимают сообщества обростателей дна водоемов и разных предметов, погруженных в водную толщу, в том числе применяя это понятие к обрастаниям высшей водной растительности. Ряд бентосных многоклеточных водорослей (некоторые зеленые, бурые, красные) в силу макроскопических размеров следует отнести к макрофитобентосу. Часть микроскопических водорослей, образующих на дне крупные колонии размером до нескольких сантиметров (например, ряд видов рода *Nostoc*), а также скопления на дне нитчатых и колониальных макроскопических водорослей («тина», войлок, подушки и т.д.) относят мезофитобентосу. Между этими растительными группировками часто невозможно провести четкую границу, и в рамках общего изучения донных растительных сообществ необходимо дифференцированно подходить к методам их исследования. Условную границу между микро- и мезофитобентосом проводят в размерных категориях около 2–5 мм.

Самое общее определение микрофитобентоса – это совокупность фотосинтезирующих микроорганизмов, прикрепленных или свободноживущих на любом подводном или обводненном субстрате. В зависимости от места произрас-

тания, среди бентосных водорослей выделяют (Саут, Уиттик, 1990; Неврова и др., 2015):

- ❖ эпилиты (эпилитон) – сообщества водорослей, развивающихся на поверхности твердого каменистого грунта – камней, скал и т.д.;
- ❖ эпипелиты (эпипелон) – сообщество микроводорослей, ведущих подвижный образ жизни на поверхности донных отложений, в размерном спектре от алевритов до пелитов;
- ❖ эпипсаммон – неподвижные водоросли, прикрепляющиеся к частицам осадков;
- ❖ эпифиты (эпифитон) – развиваются на других водорослях или сосудистых растениях.

Часто выделяют фитоперифитон твердых субстратов (Неврова и др., 2015) или объединяют население, развивающееся на живых и неживых субстратах, общим термином перифитон (Водоросли..., 1989). Выделение перифитона в отдельную экологическую группу основано на том, что организмы перифитона (животные, растения, микроорганизмы и грибы) связаны с субстратом, то есть живут на поверхности предметов, в том числе и живых организмов, находятся в толще воды (как планктон), удалены от дна и обтекаются водой. Удаленность перифитона от дна приводит к тому, что образующие его организмы находятся в условиях иного светового, температурного и пищевого режима, чем организмы истинно донных местообитаний. Перифитон может принести большой практических ущерб человеку: уменьшать скорость движения судов, засорять водозаборные отверстия и трубопроводы на станциях водоподготовки. В перифитоне развиваются водоросли различных систематических групп (главным образом, зеленые, синезеленые, диатомовые и желтозеленые). Они, как правило, обладают специальными участками таллома (у одноклеточных – органоидами) для прикрепления в виде подошвы, стопы, слизистых тяжей (виды родов *Ulothrix*, *Oedogonium*, *Aphanochaete*, *Hydrurus*, *Characium*, *Gomphonema* и другие). Обильны синезеленые, прикрепляющиеся к подводным предметам с помощью слизи (виды родов *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Calothrix*, *Rivularia* и другие) и диатомовые, плотно прикрепляющиеся к субстрату нижней створкой со швом (виды родов *Achnanthes*, *Cocconeis* и другие). У ряда видов водорослей перифитона имеется четкая приуроченность к субстрату, другие могут развиваться на широком наборе предметов, погруженных в воду. К компонентам бентоса относят также и эндолиты, или сверлящие водоросли – виды, внедряющиеся в известковый субстрат (скалы, раковины моллюсков, панцири ракообразных).

На дне неглубоких стоячих водоемов, среди зарослей высших водных растений и нитчаток поселяются неприкрепленные одноклеточные водоросли с крупными клетками (например, *Oocystis*, *Closterium*, *Cosmarium* и другие), колониальные слизистые (*Dispora*, *Tetraspora*) или ценобиальные водоросли (*Pediastrum*, *Scenedesmus*), обычно не имеющие специальных приспособлений к донному образу жизни. Некоторые из них являются компонентами и пелагических, и донных сообществ (*Pediastrum*, *Oocystis* и другие) и относятся к факультативно планктонным и факультативно бентосным организмам, в разные фазы жизненного цикла развивающимся в разных биотопах. Между эпилитами, эпи-

пелитами, эпифитами и организмами перифитона нет резкой границы, особенно это относится к микроскопическим бентосным водорослям.

Наиболее широко используемым и рекомендуемым WFD для сообществ фитобентоса является метод трансект (разрезов), устанавливаемых на различных по экологическим свойствам участках водоема. Перед началом работ необходимо ознакомиться с гидрофизическими особенностями, гидрохимическим режимом района исследований, расположением точечных источников загрязнения, дренажных или природных пресных вод, наличием гидротехнических сооружений и других факторов, влияющих на показатели развития фитобентоса. Основное внимание должно быть уделено прибрежной зоне водоема в пределах фотической зоны (2.5–3.0 величины прозрачности по диску Секки), за пределами которой фитобентос в основном состоит из представителей планктона, осевших в силу тех или иных причин на дно водоема. Разрезы необходимо закладывать с таким учетом, чтобы охватить все имеющиеся в водоеме прибрежные биотопы и формирующиеся на них типы грунта. Разрезы по возможности планируются в одинаковом диапазоне глубин (до 3-х прозрачностей по диску Секки) перпендикулярно береговой линии.

Отбор проб необходимо проводить с учетом сезонности развития фитобентоса, периодичностью 1–2 раза в месяц или в отдельные гидрологические сезоны (весна, лето, осень, зима). При проведении сапробиологического анализа считается наиболее благоприятным сезоном конец биологического лета (вторая половина сентября), характеризующегося стабильными показателями водного и температурного режимов (Комулайнен, 2003). Отбор проб производят в определенное время суток в стабильную ясную штилевую погоду.

На каждом полигоне отбора проб планируют не менее трех разрезов, а каждый разрез должен включать не менее трех станций на разной глубине (как правило, на глубине 1, 2 и 3 величин прозрачности по диску Секки). На каждой станции разреза отбирают не менее двух проб, а в пределах одного полигона следует запланировать не менее 10 станций (20 проб).

Методы отбора проб фитобентоса предусматривают сбор водорослей, обитающих на поверхности донных грунтов и отложений, в их толщине (глубиной до 1 см) и придонном слое воды толщиной 2–3 см. Для оценки видового состава определенное количество грунта с отложениями изымается из воды с помощью методов ручного сбора. На мелководье (до 0.5–1.0 м) отбор проб производят с помощью опущенной на дно пробирки, мейобентосной трубки, шприца или сифона – резинового шланга со стеклянными трубками на концах, в который засасывается наилок. Для количественного сбора необходимо использовать трубки с известным диаметром отверстия и объемом. На больших глубинах пробы отбирают с помощью ведерка или стакана, прикрепленного к палке, а также различными грабельками, «кошками», драгами, дночерпателями, илососами (например, илососом Перфильева) (рис. 6.1).

Основная часть этого прибора – U-образная трубка с неравными концами. К короткому концу трубки подведена тонкая металлическая трубочка, к которой присоединен резиновый шланг с зажимом на свободном конце. На этом же конце U-образной трубки с помощью резиновой пробки закрепляется широко-

горлая склянка. На более длинном открытом конце трубки прикреплен груз. С помощью веревки прибор опускают на дно водоема, где под действием груза длинный конец U-образной трубки врезается в толщу донных отложений. После этого конец резинового шланга, оставшийся на поверхности, освобождают от зажима, давая выход воздуху, и ил с силой засасывается в банку через длинный конец трубки. Прибор извлекают на поверхность, содержимое банки переносят в приготовленную для пробы посуду.

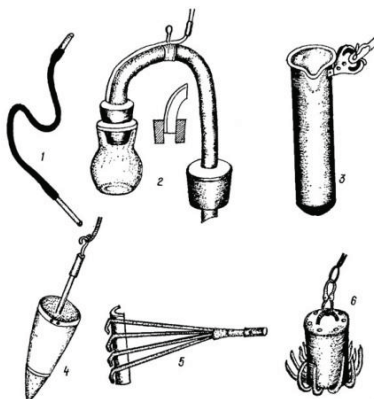


Рис. 6.1. Приборы для отбора проб фитобентоса: 1 – сифон, 2 – илосос Перфильева; 3 – стакан для ила; 4 – ведро для ила; 5 – грабельки; 6 – «кошка» (по: Водоросли..., 1989)

Основная часть микробентометра Владимировой – латунная трубка длиной 25-30 см с внутренним диаметром 4–5 см, на основании которого рассчитывается площадь внутреннего сечения трубки (вырезаемого керна донных отложений). На верхнем конце этой трубки находится втулка с конусообразной воронкой, в которую на рычаге герметично входит притертая крышка-клапан (рис. 6.2 (5)). Трубку с открытой крышкой на разборной деревянной штанге опускают на дно и врезают заточенным нижним концом в толщу донного грунта на несколько сантиметров. Потянув за веревку, закрепленную на свободном конце рычага, закрывают верхнюю втулку трубки крышкой, после чего прибор осторожно извлекают на поверхность. При выходе трубки из воды нижнее ее отверстие закрывают ладонью, чтобы не допустить выпадения грунта. Открыв крышку, осторожно сливают верхние слои воды в стеклянную посуду до появления мути. Эту первую порцию воды, содержащую планктонные организмы, выливают. Оставшиеся в трубке воду, ил и грунт легко встряхивают и переносят в приготовленную для пробы посуду, предварительно измерив ее объем. Микробентометр Владимировой удобен в работе на глубинах 2.0–2.5 м.

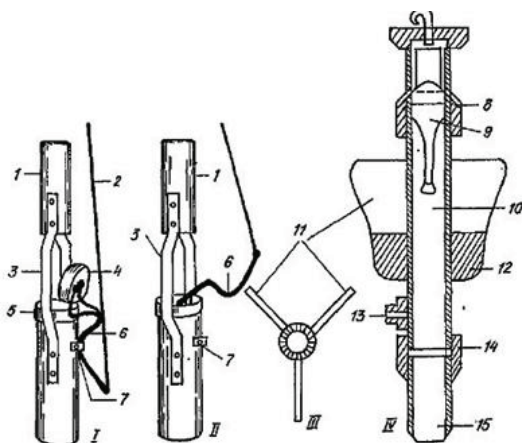


Рис. 6.2. Микробентометры Владимировой в открытом (I) и закрытом (II) виде и Травянко и Евдокимовой в поперечном (III) и продольном (IV) сечении: 1 – железная трубка, соединяющаяся с разборной штангой; 2 – шнур; 3 – кронштейн; 4 – крышка-клапан; 5 – втулка с конусом; 6 – рычаг; 7 – зажим-пружина; 8 – клапанная коробка; 9 – клапан; 10 – основное тело микробентометра; 11 – лопасти стабилизатора; 12 – свинцовый груз; 13 – штуцер для слива придонного слоя воды; 14 – переходная муфта; 15 – трубчатый нож (по: Водоросли..., 1989)

Сходный принцип работы имеют микробентометр В.С. Травянко и Л.В. Евдокимовой (рис. 6.2, III-IV) и разработанный Институтом биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН стратометр С-1 (рис. 6.3). Подробное описание приборов и методов лова приведено в литературе (Методика..., 1975; Водоросли..., 1989). Стратометр С-1 снабжен трубкой из органического стекла со штыковым затвором. Прибор имеет хорошую герметичность, им можно отбирать пробы на разных грунтах, кроме наиболее крупнозернистого песка и жидкого ила.

Пятнистость распределения сообществ фитобентоса на однотипных грунтах преодолевается увеличением числа повторностей (до двух- пятикратной) при отборе проб. Для преодоления влияния взмучивания наилка при отборе проб процесс опускания прибора в придонные слои воды необходимо проводить осторожно. Конструкция прибора должна обеспечить свободное прохождение воды сквозь погружаемую в ил трубку. После подъема прибора из воды на поверхность трубка прибора вставляется в предварительно намеченную вмятину в пластине из пенопласта или затыкается пробкой. Для предотвращения потерь организмов микрофитобентоса нужно в трубке оставить слой воды толщиной не менее 5 см. Если фитопланктон в водоеме в период отбора развит слабо, удаления надколоночной воды следует избегать. Удаляют избыток придонной воды с помощью груши, снабженной стеклянной трубкой с загнутым вверх концом. Микрофитобентос отделяют от колонки грунта взмучиванием ее верхней части (1.5–2.0 см при взятии проб на песчаных грунтах). С ростом за-

ления грунта толщину взмученного слоя сокращают до нескольких миллиметров на тонких илах. Сразу после взмучивания верхнего слоя грунта производят сливание или отсасывание взвеси. Пробы фиксируют формалином до его 4%-ной концентрации в пробе.



Рис. 6.3. Стратометр С-1, разработанный Институтом биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

При отборе донных проб дночерпателем необходимо соблюдать герметичность отобранного субстрата, на котором вегетируют микроводоросли, используя дночерпатели, оборудованные специальными заслонками, предохраняющими массив грунта от смыва его верхнего слоя. При работе на рыхлых грунтах и больших глубинах можно применять дночерпатель Петерсена (рис. 6.4), оборудованный специальными заслонками для препятствия размывания верхних слоев грунта. На каждой станции в двух повторностях отбирают верхний 2–3 см слой массива грунта специальной мейобентосной трубкой (площадь отбора 16 см²) из массива грунта, поднятого дночерпателем. Отобранную количественно пробу донных отложений помещают в склянку и доводят до определенного объема (250, 500 мл и т.д.) 4 %-ным раствором формалина. Из этой же пробы отбирают образцы для определения гранулометрического состава и химического анализа донных отложений.

Непосредственно на водоеме можно приблизительно определить тип донных отложений по следующей глазомерной шкале: каменистый – дно покрывают преимущественно камни; каменисто-песчаный – среди отдельных камней есть участки открытого песчаного грунта; песчаный – преобладает песок, изредка встречаются камни; песчанно-илистый – песок частично или полностью покрыт илом; илисто-песчаный – ил является преобладающей фракцией, при растирании между пальцами ощущается присутствие песка; илистый – при растирании между пальцами не ощущается присутствие песка; глинистый – при растирании ощущается пластичность; задернованные почвы – в искусственных водоемах.

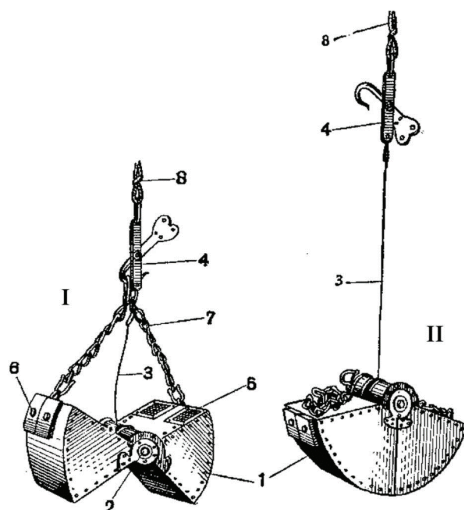


Рис. 6. 4. Ковшовый дночерпатель Петерсена: I – открытый; II – закрытый (1 – ковши, 2 – ось, 3 – замыкающий тросик, 4 – замыкающее приспособление, 5 – окна, 6 – чугунный груз, 7 – цепь, 8 – рабочий трос)

Для изучения видового состава перифитона налет на поверхности подводных предметов (камней, деревянных или бетонных частей гидротехнических сооружений, коряг, вышших водных растений и прочих) снимают с помощью ножа, специальных скребков или ложек. Но лучше собирать донные водоросли вместе с субстратом, который осторожно извлекается на поверхность воды и помещается в приготовленный для пробы сосуд и заливается небольшим количеством воды из этого водоема и исследуется в живом виде или фиксируется формалином. Для количественного учета водоросли тщательно смываются с поверхности субстрата скальпелем, затем щеткой над пластмассовой кюветой и, замерив объем смыва, переносят его в приготовленную для пробы посуду. Площадь субстрата, с которого смываются водоросли, определяют, накрывая указанную поверхность чистой влажной тканью, и обрисовывают ее контуры чернильным карандашом. Полученный контур поверхности субстрата переводят на кальку и вырезают. Из этой же бумаги вырезают квадрат со стороной 1 см (1см^2) и взвешивают. Зная массу бумажного квадрата и массу вырезанного из той же бумаги контура, рассчитывают площадь субстрата. На поверхности плоских субстратов можно отметить размерную площадку (например, 5×5 см) и с нее тщательно смывают водоросли. При изучении перифитона на стеблях или листьях высших водных растений, количественный учет ведется на единицу площади и на единицу массы растения-субстрата. Для этого участок растения, с поверхности которого смываются водоросли, взвешивают, затем высушивают до воздушно-сухого состояния и снова взвешивают. Пробы субстрата любого типа следует отбирать не менее чем в двух повторностях на каждой станции.

Одновременно с отбором проб фитобентоса проводят учет абиотических условий, влияющих на состав и структуру сообществ. Полученные данные записываются в полевой дневник, а затем в стационарный лабораторный. Подробное описание места отбора проб приводится в литературе (Неврова и др., 2015) (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Описание места и условий отбора проб, биотических и абиотических параметров мониторинга микрофитобентоса (по: Неврова и др., 2015, с изменениями)

№ п/п	Описание места отбора проб
1	Дата
2	Расположение трансекты (описание, фото, карта-схема в масштабе 1:50000 или 1:10000)
3	Номер станции
4	Координаты станции (GPS), широта, долгота
5	Глубина станции, м
6	Орудие лова (микробентометр / трубка / дночерпатель)
7	Площадь отобранной пробы, см ²
8	Расстояние от береговой линии до станции (если возможно), м
9	Характер субстрата (визуальная оценка – илистый, илисто-песчаный, песчаный, цвет, наличие наилка, детрита, сероводорода)
10	Наличие каменистого субстрата (валуны, гряды, камни, галька, и пр.), а также крупных предметов, погруженных в воду – стволов, пней деревьев, или субстратов антропогенного происхождения, попавших в прибрежье при захламлении берегов.
11	ФИО исследователя
Биотические переменные	
12	Наличие «цветения» воды (визуальная оценка)
13	Наличие макрофитов (% покрытия на 1 м ²)
Абиотические переменные	
14	Температура воды, °C
15	Прозрачность воды по диску Секки, м
16	pH
17	Eh, mV
18	Минерализация, общее содержание солей в воде, мг/л
19	Органический углерод, мг/г сухого веса грунта
20	Биогенные элементы (P, N, K, Si, Fe др.)
21	Гранулометрический анализ грунта (% фракций алеврита, пелита, песка, гравия)
22	Температура грунта (при отборе донных отложений) или песка (при изучении фитопсаммона), °C
23	Влажность песка (в случае изучения фитопсаммона), %
24	Погодные условия (облачность, направление ветра и др.)
Антропогенные загрязняющие вещества	
25	Тяжелые металлы (Hg, Cu, Cd, Zn, Cr и др.)
26	Нефтепродукты, мг/кг
27	СПАВ, мг/кг и др. компоненты органических загрязнений.

Отобранные на одной станции пробы делят на качественные и количественные, фиксированные и живые. Обработка проб в живом состоянии – обязательный элемент исследований водорослей любых экологических группиро-

вок, поскольку она даст истинную оценку значимости отдельных видов в формировании первичной продукции водоема. При анализе состава диатомовых водорослей применяются специальные методы приготовления постоянных препаратов, содержащих очищенные от органического содержимого створки отдельных видов. Поскольку в донных отложениях содержатся целые панцири диатомовых водорослей, вегетировавших в данном водоеме в прошлом, только анализ нефиксированных проб даст объективную картину состава и соотношения отдельных видов диатомей в момент исследования водного объекта. Данные оценки диатомей только по постоянным препаратам требуют значительной корректировки.

Материал в живом виде помещают в холодильник в стеклянной или полиэтиленовой посуде и просматривают под микроскопом желательно в короткое время. Материал для фиксации помещается также в стеклянную или пластмассовую посуду и фиксируется 40%-ным формалином до конечной концентрации в фиксированной пробе равной 4%. Можно наряду с формалином применять и другие фиксаторы (раствор Люголя, фиксатор Кузьмина, глутаровый альдегид и другие) (Методика..., 1975; Водоросли..., 1989; Неврова и др., 2015).

Затем пробы этикетировуют: на этикетке из плотной бумаги или пергамента простым карандашом или несмываемой водой пастой указывают дату, время и место отбора пробы, тип и название водоема, номер пробы, глубину, прозрачность, фамилию сборщика и другую необходимую информацию. Эти же данные параллельно отмечаются в полевом дневнике, в котором кроме перечисленных данных отмечают результаты всех измерений физических и химических параметров воды и грунта, проведенные при отборе проб.

При обработке качественных проб важно проводить просмотр живого материала в день отбора или при хранении в холодильнике в ближайшие дни. Это позволит определить состояние популяций тех или иных видов водорослей бентоса и адекватно оценить их роль в создании первичной продукции. Для жгутиковых форм применяют специальные методы в зависимости от их таксономического состава (Водоросли..., 1989). Идентификация водорослей чаще всего проводится с помощью светового микроскопирования в проходящем свете или с применением метода фазового контраста. Для микроскопического изучения водорослей делают водные или водно-глицериновые препараты, добавляя в препарат жидкость по мере ее подсыхания. Для длительного наблюдения над объектом часто применяют метод висячей капли, при этом препарат можно во влажной камере сохранять в течение нескольких месяцев. Монадные формы или шовные виды диатомей обездвиживают, осторожно нагревая препарат или добавляя в него раствор вишневого или айвового клея. Параллельно этому можно прибавляя к препарату раствор йода, формалина, хлоралгидрата или другого фиксатора добиться постепенного обездвиживания, фиксации и окраски содержимого клетки. Добавление в препарат раствора туши позволит выявить слизь, часто окружающую талломы разных видов водорослей и без специальных приемов слабо заметную. Часто для идентификации водорослей применяются специальные цитологические методы окрашивания органелл. Например, для подвижных форм применяется прижизненное окрашивание слабыми

растворами красителей: нейтрального красного, метиленового голубого, трипанового красного, бриллиантового синего и др. (Водоросли..., 1989). Это позволяет четко выяснить строение клеточных покровов, папиллы, слизь вакуоли, митохондрии, аппарат Гольджи и другие органеллы.

Кроме временных влажных препаратов применяют приготовление постоянных, например, глицерин-желатиновых препаратов, которые можно в горизонтальном положении хранить несколько лет. Для идентификации диатомовых водорослей требуется изготовление постоянных препаратов, перед приготовлением которых необходимо отделение водорослей от субстрата и по возможности более полное удаление частиц грунта, препятствующих процессу определения. Для отделения водорослей эпипелона и эпипсаммона от частиц грунта пробу в сосудах или пакетах помещают в водяную камеру ультразвуковой установки и обрабатывают в ней в течение 20 минут. Затем пробу тщательно перемешивают, процеживают сквозь мелкоячеистое сито с диаметром отверстий 0.5–1.0 мм, заливают 50 мл дистиллированной воды и взбалтывают в течение 3 минут, а затем снова фильтруют сквозь сито. Эту процедуру проводят три раза, а затем смыв неприкрепленных микроводорослей сгущают методом фильтрации через мелкопористые фильтры. Также можно применять методы седиментации, декантирования или центрифугирования. Центрифугирование позволяет ускорить отмывание пробы от фиксатора и растворимых солей; его проводят, осаждая пробу в течение 10 минут со скоростью не больше 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость или сливают без взмучивания осадка или отсасывают сифоном, после чего снова добавляют дистиллированную воду, осторожно перемешивают и вновь центрифугируют. Процедуру проводят не менее трех-семи раз.

Методы приготовления постоянных препаратов диатомовых водорослей хорошо освещены в литературе (Диатомовый анализ, 1949; Определитель..., 1951; Диатомовые..., 1974; Водоросли..., 1989; Методика ..., 1975; Неврова и др., 2015). После изучения живого материала на водных препаратах желательно провести их подсушивание, при котором легче выявляются щетинки и шипы, часто соединяющие клетки диатомовых водорослей в колонии. Кроме того, эта процедура может помочь выявить тонкопанцирные виды диатомей, которые при дальнейшей общей обработке пробы могут быть полностью разрушены и требуют для их исследования специальной модификации общей методики (например, снижения времени обработки в кислотах или перекиси водорода).

Первым этапом обработки материала для изготовления препаратов является удаление нерастворимых в воде углекислых солей, поскольку при дальнейшей обработке пробы серной кислотой они выпадают в осадок и мешают микроскопированию препарата. Для этого осадок пробы, содержащий панцири диатомовых водорослей, заливают 10%-ной соляной кислотой и выдерживают до окончания реакции, затем отмывают дистиллированной водой путем 7–10 кратного центрифугирования до полного удаления соляной кислоты (проверка лакмусовой бумагой).

После отмывания пробы от углекислых солей при наличии в осадке незначительного количества органического детрита для его удаления возможно при-

менение 30–50%-ного раствора перекиси водорода. Для этого осадок (1 мл) заливают 2–3 мл перекиси и кипятят на водяной бане до полного обесцвечивания от 20 минут до 5 часов. Количество осадка можно увеличить, соответственно увеличивая и количество перекиси водорода. Полноту окисления кроме визуальной оценки по обесцвечиванию осадка можно контролировать микроскопированием на малом увеличении. Затем пробу отмывают дистиллированной водой с последующим центрифугированием (3–4 раза).

При большом содержании органических остатков в пробе осадок заливают концентрированной серной кислотой и выдерживают его до его обугливания в течение суток. Затем в осадок добавляют несколько кристаллов $K_2Cr_2O_7$ до его обесцвечивания и отмывают от кислоты добавлением дистиллированной воды с последующим центрифугированием. Процедуру отмывания и центрифугирования проводят до полного удаления следов серной кислоты (7–10 раз, проверка лакмусовой бумагой). Очищенный осадок панцирей диатомовых водорослей сохраняют в чистом этиловом спирте в стеклянной посуде с плотной пробкой и снабженных этикеткой. Этот же материал может быть использован для проведения электронно-микроскопических исследований (ТЭМ, СЭМ).

Для освобождения панцирей диатомей от органического вещества можно пользоваться методом сжигания при кипячении в концентрированной серной кислоте, вариантами метода холодного сжигания серной кислотой является добавление вместо $K_2Cr_2O_7$ кристаллов перманганата калия или применять вместо серной азотную кислоту. Все работы с концентрированными кислотами необходимо проводить в вытяжном шкафу с соблюдением правил обращения с концентрированными кислотами. При работе с тонкопанцирными видами диатомовых водорослей следует подбирать время обработки кислотами или кипячения в перекиси водорода экспериментально в соответствии с особенностями состава водорослей. Также можно применять для обработки вариант метода, разработанный в ИБВВ РАН им. И.Д. Папанина (Методика..., 1975). Для этого готовят хромовую смесь: 1 г бихромата калия добавляют к 100 мл теплой концентрированной серной кислоты и нагревают при перемешивании до полного его растворения. Эту смесь в количестве 1–2 мл добавляют к отмытому от фиксатора центрифугату водорослей. Время обработки раствором подбирать экспериментально (от 2 минут и более в зависимости от количества органического материала в пробе, размеров клетки и толщины панциря водорослей). Затем в пробу доливают дистиллированной воды и центрифугируют. Отмывание от раствора хромовой смеси проводят не менее трех-четырёх раз.

Постоянные препараты для световой микроскопии диатомовых водорослей готовят используя разные варианты сред с высоким коэффициентом светопреломления: среда Эльяшева, состоящая из анилина, формалина и уксусной кислоты; среды Naphrax® или Meltmount®. Для этого применяют предметные (размеры 75×25 мм, толщиной не более 1.5 мм) и покровные (18×18 или 24×24 мм, толщина не более 0.02 мм) стекла. Каплю суспензии очищенных панцирей водорослей наносят на обезжиренное покровное стекло, равномерно распределяют по всей поверхности и подсушивают либо на воздухе, либо над

электрической плиткой. Если покровное стекло хорошо обезжирено, суспензия водорослей самостоятельно равномерно покрывает всю площадь стекла до его краев, если этого не происходит, стекло грязное. Плотность суспензии водорослей на покровном стекле желательно контролировать при малом увеличении микроскопа, добавляя жидкую суспензию в препарат, если панцирей мало. На предметное стекло помещают небольшой кусочек любой среды и подогревают до расплавления. Покровное стекло с осадком на нижней его поверхности слегка подогревают, кладут на каплю подогретой среды и осторожно прижимают к ней так, чтобы не раздавить стекло. Если среда недостаточно расплавилась или остыла, предметное стекло нагревают над электрической плиткой до повторного ее расплавления. Затем препарат помещают на керамическую, мраморную или слюдяную пластинку для охлаждения. Избыток среды по краям покровного стекла после ее застывания аккуратно удаляют скальпелем. Препарат этикетруют и хранят в лабораторной коллекции.

Таким образом, при работе с фитобентосом, необходимо в лаборатории сохранять часть фиксированной нативной пробы, очищенные панцири диатомовых водорослей в спирту, постоянные препараты на предметных стеклах. Все эти пробы должны иметь этикетки с указанием всей необходимой информации, дублирующей сведения, отраженные в полевом дневнике. Для полноценной идентификации диатомовых водорослей необходимо проводить микрофотографирование панцирей на постоянных препаратах под увеличением не менее $\times 1000$ под СМ с помощью цифровых камер с разрешением не менее 3 мрх. Ультраструктурный морфологический анализ мелкоклеточных видов необходимо проводить под СЭМ или ТЭМ. Методика приготовления проб для работы под СЭМ и ТЭМ описана в литературе (Неврова и др., 2015).

Перед количественной обработкой пробы необходимо просмотреть качественную пробу в живом состоянии и в фиксированном виде. Также желательно просмотреть постоянный препарат створок диатомовых водорослей для уточнения состава видов. При этом на основании анализа качественных нефиксированных и фиксированных проб исследователь создает представление о составе и физиологическом состоянии водорослей фитобентоса, т.к. нередко виды, отмеченные на постоянных препаратах как массовые, на самом деле представлены лишь пустыми створками.

Для количественного учета водорослей применяются счетные камеры различного типа (Горяева, Нажотта, Фукс-Розенталя и др.), наиболее удобны камеры с объемом 0.01–0.1 мл (рис. 6.5). Камеру для подсчета подбирают в зависимости от количества взвесей, обилия водорослей в пробе и размерного спектра видов. Для крупноклеточных и колониальных видов водорослей применяют камеры большего объема (0.01–0.1 мл) или просматривают 1–2 мл пробы на нескольких мокрых препаратах, рассматривая их под малым увеличением и учитывая только крупноклеточные виды или колонии.

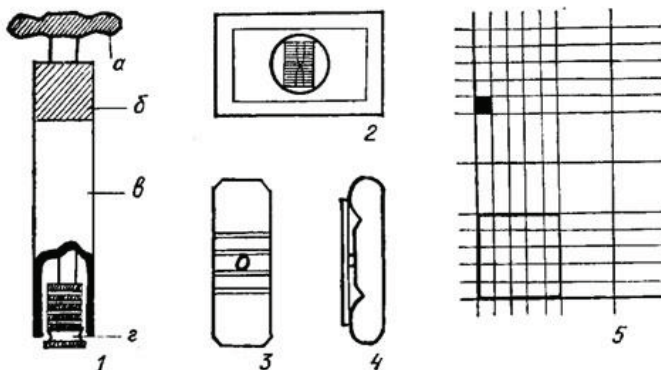


Рис. 6.5. Приборы, применяемые при количественном учете водорослей (по: Водоросли..., 1989): 1 – штемпель-пипетка (а – ручка, б – металлическая обойма, в – стеклянная трубка, г – катушка с выемкой определенного объема); 2 – счетная камера Нажотта; 3, 4 – счетная камера Горяева (3 – вид сверху, 4 – вид сбоку); 5 – фрагмент сетки, на которой производится подсчет клеток водорослей

Количественный учет микроводорослей в пробе рекомендуется проводить при увеличении в 400–600 раз. При оценке общей численности видов необходимо подсчитывать не менее 500 счетных единиц (клеток, колоний), до 1000 счетных единиц для представленности редких видов. При количественном учете необходимо подсчитывать число клеток с живым содержимым и количество пустых створок (для диатомовых). При этом нередко применяется люминесцентная микроскопия. Обычно в бентосных пробах в значительном количестве присутствуют представители планктона или других экологических групп водорослей, поэтому их учет также обязателен, как и истинно бентосных видов. Затем численность клеток пересчитывают на определенный объем пробы (50–500 мл) или на 1 м² поверхности субстрата (6.1), либо на 1 кг сырой массы биафита (для высших водных растений) (6.2):

$$N = \frac{(a \times V)}{(S \times 10^{-4} \times 7 \times 10^{-3})} = \frac{(a \times V) \times 10^7}{7 \times S}, \quad (6.1)$$

где a – число клеток в объеме камеры (в случае камеры Горяева 0.007 мл; V – определенный объем пробы (в данном случае 500 мл); S – площадь поверхности пробы, м²;

$$N = \frac{(a \times V)}{(m \times 10^{-4} \times 7 \times 10^{-3})} = \frac{(a \times V) \times 10^7}{7 \times m}, \quad (6.2)$$

где a – число клеток в объеме камеры (в случае камеры Горяева 0.007 мл); V – определенный объем пробы (в данном случае 500 мл); m – сырая масса базифита (той части растения, с которой смывали водоросли).

Эти формулы расчета численности приведены для камеры Горяева, при работе с которой учитываются все клетки на всей ее площади, а не только на разграфленной сеточке. При этом повышается вероятность учета не только преобладающих, но и редких видов водорослей. В случае применения счетных камер других типов, применяют видоизмененные формулы расчета.

В мелководной зоне водоемов (литорали озер, рипали рек с достаточной для фотосинтеза прозрачностью воды) на рыхлых грунтах (песках с различной степенью заиления, илах) водоросли поселяются не только на поверхности субстрата, но и в более глубоких его слоях. Поэтому при оценке количественных показателей развития микроводорослей бентоса необходимо рассчитывать количество клеток или их биомассу и на объем субстрата. Например, объем пробы, отобранной с помощью пластиковой трубки, составил 20 мл (20 см³). Пробу доводят водой до объема 50 мл и обрабатывают, как было указано ранее. Численность клеток рассчитывают на 1 м³ по следующей формуле:

$$N = \frac{(a \times V)}{V_s \times 7 \times 10^3}, \quad (6.3)$$

где a – число клеток в объеме камеры (в случае камеры Горяева 0.007 мл); V – определенный объем пробы (50 мл); V_s – объем грунта в пробе (20 см³).

При использовании счетных камер другого типа, или иного объема грунта или пробы, в формулу подставляют соответствующие значения a и V (Неврова и др., 2015).

При преобладании в фитобентосе и фитоперифитоне крупных организмов, можно пользоваться штемпель-пипеткой объемом 0.1 см³ (рис. 6.5). Расчет численности водорослей в пробах бентоса и перифитона ведут на 10 см² поверхности субстрата по формуле:

$$N = \frac{a \times 10v}{S}, \quad (6.4)$$

где N – количество организмов на 10 см² поверхности субстрата; a – число организмов в просчитанной капле пробы объемом 0.1 см³; v – объем пробы (см³); S – площадь сечения трубки в микробентометре или площадь поверхности субстрата, с которого смыты водоросли (см²).

При изучении эпифитных водорослей их численность рассчитывается кроме площади субстрата и на 1 г сырой (или воздушно-сухой) биомассы растения субстрата по следующей формуле (Водоросли..., 1989):

$$N = \frac{a \times 10v}{P}, \quad (6.5)$$

где N – количество организмов на 1 г сырой (воздушно-сухой) массы растения-субстрата; a – число организмов в просчитанной капле пробы объемом 0.1 см^3 ; v – объем пробы (см^3); P – сырая или воздушно-сухая масса (г) того участка растения-субстрата, с которого сматы водоросли.

Биомассу водорослей определяют счетно-объемным методом, для чего кроме численности видов необходимо для каждого вида рассчитать средний объем клетки в каждой конкретной пробе. Для определения объема клеток водорослей применяют метод истинного объема или стереометрический метод. При этом форма клетки водоросли приравнивается к какой-либо геометрической фигуре или комбинации фигур, а площадь их поверхности и объем приравниваются к соответствующим параметрам клетки водорослей. Под истинным объемом клетки понимают часть пространства, окруженную клеточным покровом. На основе расчета объема клеток, вычисляют биомассу, которая выражается в массе клеток водорослей на определенную площадь (см^2 или м^2) или на объем (вес) грунта. Биомассу рассчитывают для каждого вида, популяции и сообщества в целом. Разнообразие форм водорослей сводится к нескольким группам, описываемым различными формулами, подробно рассмотренными в литературе (Неврова и др., 2015). Относительную плотность пресноводных водорослей принимают за 1.0-1.05. Счетно-объемный метод оценки биомассы широко используется в практике альгологических исследований при изучении количественных соотношений разных компонентов водных альгоценозов, закономерностей распределения водорослей в одном и том же или в разных водоемах, сезонной динамики показателей структуры сообществ водорослей и т.д.

При обильном развитии в водоеме водорослей можно использовать весовой метод определения их биомассы. При этом исследуемую пробу фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный бумажный фильтр. Параллельно этому через контрольные фильтры фильтруют дистиллированную воду. После этого фильтры взвешивают и сушат в сушильном шкафу при 100°C до постоянной массы. На основании этих данных рассчитывают сырую и сухую массу осадка. Сжигая фильтры в муфельной печи, определяют содержание в осадке органических веществ. Исследуя пробу под микроскопом, определяют видовой состав водорослей и, по глазомерной оценке, соотношение видов в сообществе водорослей. Данным образом можно получить представление лишь о суммарной массе всех взвешенных в пробе живых и неживых организмов, органических остатков различного происхождения. Его применение возможно лишь для ориентировочной оценки участия крупных водорослей в организации донных альгоценозов.

Список литературы

Водоросли. Справочник / Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. – Киев: Наукова думка, 1989. – 608 с.

Диатомовый анализ. Кн. 1. Общая и палеоботаническая характеристика диатомовых водорослей / Под ред. А.И. Прошкиной-Лавренко. – Л.: Гос. изд-во геологической литературы, 1949. – 240 с.

Диатомовые водоросли СССР (ископаемые и современные). Том 1. / Под ред. А.И. Прошкиной-Лавренко. – Л.: Наука, 1974. – 403 с.

Комулайнен С.Ф. Методические рекомендации по изучению фитоперифитона в малых реках / Ред. Г.В. Козлова. – Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2003. – 43 с.

Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. – М.: Наука, 1975. – 240 с.

Неврова Е.Л., Снигирева А.А., Петров А.Н., Ковалева Г.В. Руководство по изучению морского микрофитобентоса и его применению для контроля качества среды. – Севастополь-Симферополь: Н. Оріанда, 2015. – 176 с.

Определитель пресноводных водорослей СССР. Диатомовые водоросли. – Л.: Наука, 1951. Вып.4. – 619 с.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ В БИОТИЧЕСКИХ СООБЩЕСТВАХ

Важнейшей структурной характеристикой биотических сообществ является их разнообразие. В частности, хорошо изучены связи разнообразия с продуктивностью, стабильностью, экосистемными функциями и услугами, мультифункциональностью сообществ. Поэтому важнейшей составляющей мониторинга сообществ является отслеживание динамики их разнообразия.

Для характеристики разнообразия традиционно используются индексы, рассчитываемые на основе набора относительных представленностей видов:

$$p_i = \frac{n_i}{N}, \quad (7.1)$$

где n_i – численность (либо иная мера представленности, например, биомасса или проективное покрытие) вида i , N – суммарная численность всех видов, представленных в анализируемой пробе. Большинство актуальных индексов разнообразия объединены в так называемое семейство индексов эффективного разнообразия (Hill, 1973; Jost, 2007):

$${}^qD = \left(\sum_{i=1}^S p_i^q \right)^{\frac{1}{1-q}}, \quad (7.2)$$

где qD – эффективное разнообразие порядка q , S – число видов, представленных в анализируемой пробе. Порядок разнообразия q определяет степень чувствительности индекса к редким и высокопредставленным видам. Так, вклад видов в эффективное разнообразие первого порядка ${}^1D = e^H$ (H – информационный индекс Шеннона) пропорционален их относительным представленностям, индексы порядков $q < 1$ увеличивают вклад редких видов (например, ${}^0D = S$ не учитывает представленности видов совсем), а индексы порядков $q > 1$ увеличивают вклад представленных видов.

Описанный традиционный подход основывается на предположении о том, что все виды – это уникальные структурные единицы, каждая из которых вносит одинаковый вклад в разнообразие сообщества. Однако хорошо известно, что сосуществующие в сообществе виды обладают той или иной степенью сходства. Есть виды, обладающие сходными признаками и занимающие сходные экологические ниши. В самом крайнем случае сходства говорят о видах-двойниках.

Современный подход к изучению разнообразия оперирует несколькими аспектами разнообразия. Чаще всего выделяют три аспекта. Базовым аспектом является таксономическое разнообразие, не учитывающее взаимоотношения между видами. Функциональный аспект учитывает сходство между видами,

выраженное в функциональных признаках – таких признаках, которые прямо или опосредованно влияют на приспособленность особей. Филогенетический аспект учитывает систему родственных отношений между видами, которые сформировались в ходе эволюционного процесса.

Настоящая глава посвящена методам изучения функционального разнообразия биотических сообществ с акцентом на процедуру измерения сходства и расчет различных индексов. В качестве примера применения будет рассмотрена динамика функционального разнообразия в ходе восстановительной сукцессии в фитоценозах лугового типа.

7.1. Функциональные признаки

Для измерения функционального разнообразия помимо традиционных данных о видовом составе и представленности видов в пробах применяются сведения о функциональных признаках видов.

Функциональный признак – это любая морфологическая, физиологическая или фенологическая особенность, которую можно измерить для отдельных особей, и которая потенциально влияет на приспособленность. Функциональные признаки могут быть измерены в различных шкалах. Это могут быть как количественные признаки (дискретные либо непрерывные), так и качественные (альтернативные и категориальные). Типичным примером непрерывного количественного признака является размер организма. Типичный пример категориального признака – жизненная форма растений. Следует отметить, что не все потенциально измеряемые признаки могут быть признаны функциональными. В частности, многие важные систематические признаки, фигурирующие в определителях, не могут рассматриваться в качестве функциональных, поскольку не очевидна их связь с приспособленностью.

При формировании системы функциональных признаков для работы с тем или иным таксоценозом необходимо выбирать такие признаки, которые могут быть измерены у всех видов таксоценоза. Важно также выбирать признаки, которые обладают существенной изменчивостью у видов, поскольку мало варьирующие признаки не будут вносить вклад в результаты анализа.

Для многих систематических групп уже существуют проработанные системы функциональных признаков. Эти признаки широко используются в исследованиях и аккумулируются в специализированных базах данных. Наиболее детально проработана система функциональных признаков сосудистых растений, которая описана в специальном руководстве, которое подготовлено международным коллективом из 35 авторов (Perez-Harguindeguy et al., 2013). Эта система включает признаки, относящиеся к растению в целом (жизненная форма, форма роста, продолжительность жизни и т.д.), а также признаки листьев, стеблей, подземных и генеративных органов. В указанном руководстве подробно описаны методы измерения для каждого из признаков, включая конкретные рекомендации по отбору материала и настройке измерительного оборудования.

7.2. Индексы функционального разнообразия

На сегодняшний день разработано несколько десятков индексов функционального разнообразия, которые призваны отражать разные аспекты распределения видов в функциональном пространстве. Под функциональным пространством (его также часто называют нишевым пространством) понимается многомерное пространство, измерения которого сформированы функциональными признаками видов. Выделяют три аспекта распределения видов по этому пространству (Mason et al., 2005):

- ❖ функциональное богатство – объем функционального пространства, заполненного видами;
- ❖ функциональная выровненность – степень регулярности распределения представленных видов по функциональному пространству;
- ❖ функциональная дивергенция – степень, в которой распределение представленных по функциональному пространству максимизирует общую изменчивость функциональных признаков в сообществе.

Эти аспекты функционального разнообразия полагаются независимыми, по крайней мере с теоретических позиций. Многие индексы функционального разнообразия могут быть отнесены к этим трем категориям. Некоторые же могут отражать несколько аспектов одновременно, в частности многие индексы отражают богатство и дивергенцию.

Не ставя перед собой задачу выполнения всестороннего обзора существующих индексов функционального разнообразия, мы приведем наиболее актуальные индексы с точки зрения их распространенности в современных исследованиях, а также доступности технических средств для их расчета.

Функциональное богатство. Распространенным индексом функционального богатства является объем выпуклой оболочки (*CHV*, *convex hull volume*, сам индекс часто обозначается как *FRic*, *functional richness*), заключающей все виды в функциональном пространстве (Cornwell et al., 2006). В геометрии выпуклая оболочка множества точек в евклидовом пространстве – это минимальное выпуклое множество, содержащее в себе данное множество точек. В свою очередь, выпуклым называется множество, содержащее все отрезки, соединяющие точки этого множества. При работе с единственным признаком выпуклой оболочкой будет являться отрезок, соединяющий минимальное и максимальное значение признака, а соответствующим объемом – длина этого отрезка (разность между максимальным и минимальным значениями). При работе в многомерном пространстве для определения выпуклой оболочки и расчета ее объема применяются специальные вычислительные алгоритмы. Объем выпуклой оболочки не может быть рассчитан, когда число видов меньше либо равно числу признаков.

Функциональная выровненность. Индекс функциональной выровненности *FEve* (*functional evenness*) является оценкой того, насколько равномерно распределены виды в функциональном пространстве с учетом их представлений (Villegier et al., 2008). Фактически рассчитывается выровненность распределения расстояний до ближайшего вида. Для этого формируется мини-

мальное остовное дерево, которое соединяет все виды в многомерном функциональном пространстве таким образом, что сумма длин ветвей минимальна. Для каждой ветви l минимального остовного дерева рассчитывается взвешенная выровненность:

$$EW_l = \frac{d_{ij}}{p_i + p_j}, \quad (7.3)$$

где d_{ij} – это длина ветви (евклидово расстояние между видами i и j , которые соединяются данной ветвью), p_i – это относительная представленность вида i . Затем рассчитываются нормированные значения выровненности для каждой ветви:

$$PEW_l = \frac{EW_l}{\sum_{l=1}^{S-1} EW_l}, \quad (7.4)$$

где суммирование ведется по всем $S - 1$ ветвям минимального остовного дерева (их число на единицу меньше числа видов S). В случае идеальной выровненности все значения PEW_l будут равны $1/(S - 1)$. Если же значения PEW_l отличаются, индекс функциональной выровненности должен уменьшаться, поэтому на последнем этапе PEW_l сравниваются с $1/(S - 1)$ и рассчитывается нормированная сумма:

$$FEve = \frac{\sum_{l=1}^{S-1} \min\left(PEW_l, \frac{1}{S-1}\right) - \frac{1}{S-1}}{1 - \frac{1}{S-1}}. \quad (7.5)$$

Итоговый индекс $FEve$ принимает значения от 0 до 1 и не зависит от функционального и таксономического богатства. Он уменьшается, когда представленности менее равномерно распределены между видами, либо, когда расстояния между видами отличаются высокой изменчивостью.

Функциональная дивергенция. Индекс функциональной дивергенции $FDiv$ (*functional divergence*) измеряет, насколько сильно распределение представленных смещено к наружным зонам функционального пространства (Villeger et al., 2008). Если наиболее представленные виды располагаются в центре занятого функционального пространства, дивергенция малая. Напротив, если высокопредставленные виды обладают экстремальными значениями признаков (и, соответственно, расположены в наружных областях функционального пространства), дивергенция высокая. При расчете индекса функциональной дивергенции формируется выпуклая оболочка, заключающая все виды. Затем рассчитываются координаты центроида выпуклой оболочки:

$$g_u = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^V x_{ui}, \quad (7.6)$$

где x_{ui} – значение признака u у вида i , а суммирование ведется по V видам, которые формируют вершины выпуклой оболочки. Для каждого вида рассчитываются расстояния до этого центроида:

$$dG_i = \sqrt{\sum_{u=1}^K (x_{ui} - g_u)^2}, \quad (7.7)$$

на основе которых рассчитывается среднее расстояние до центроида:

$$\overline{dG} = \frac{1}{S} \sum_{i=1}^S dG_i. \quad (7.8)$$

После этого рассчитывается взвешенная сумма отклонений от среднего расстояния Δd и аналогичная сумма абсолютных значений соответствующих отклонений $\Delta|d|$:

$$\begin{aligned} \Delta d &= \sum_{i=1}^S p_i \cdot (dG_i - \overline{dG}), \\ \Delta|d| &= \sum_{i=1}^S p_i \cdot (|dG_i - \overline{dG}|). \end{aligned} \quad (7.9)$$

Итоговый индекс:

$$FDiv = \frac{\Delta d + \overline{dG}}{\Delta|d| + \overline{dG}} \quad (7.10)$$

варьирует в пределах от 0 до 1. Он стремится к нулю, когда высоко представленные виды расположены близко к центроиду по сравнению с редкими видами. В этом случае значение Δd будет отрицательным, но оно не может быть меньше $-\overline{dG}$. За счет этого знаменатель в формуле (7.10) всегда положителен. Напротив, когда представленные виды расположены далеко от центроида, индекс $FDiv$ стремится к единице, поскольку в этом случае Δd окажется близким к $\Delta|d|$.

Расчет индексов функционального богатства, выровненности и дивергенции на основе функциональных расстояний. Индексы $FRic$, $FEve$ и $FDiv$ описывают особенности распределения видов в функциональном пространстве, которое сформировано значениями признаков. При этом предполагается, что признаки являются количественными. Однако многие функциональные признаки являются категориальными или дихотомическими и не имеют количественного выражения, что накладывает серьезное ограничение на применение перечисленных индексов. Снять указанное ограничение позволяет применение подхода на основе функциональных расстояний (Laliberte, Legendre, 2010). На первом этапе рассчитывается матрица функциональных расстояний между видами с применением любой метрики, но чаще всего используется расстояние Говера. Затем применяется метод главных координат, который позволяет преобразовать матрицу расстояний между видами в координаты в многомерном пространстве. Измерения этого пространства могут быть рассмотрены в качестве «квази-признаков», которые могут быть использованы при расчете индексов $FRic$, $FEve$ и $FDiv$. Применение такого подхода позволяет также обойти ограничение

индексов, основанных на выпуклой оболочке, объем которой можно рассчитать только когда число видов больше числа признаков. Главные координаты аналогично главным компонентам отранжированы в порядке уменьшения дисперсии, поэтому в случае необходимости их число можно уменьшить за счет отбрасывания наименее информативных.

Особенности расчета индексов функционального разнообразия в среде R. Для работы с индексами функционального разнообразия в R необходимо сформировать два фрейма. Первый должен содержать данные о представленностях видов в разных пробах. Этот фрейм формируется таким образом, чтобы пробы в нем соответствовали строкам, а виды – столбцам. Второй фрейм должен содержать данные о функциональных признаках видов, в нем виды соответствуют строкам, а признаки – столбцам. Эти фреймы необходимо привести в соответствие друг другу: число столбцов фрейма с представленностями должно быть равно числу строк фрейма с признаками (одинаковое число видов), порядок следования видов также должен быть одинаковым. Если применяется осмысленное именование строк и столбцов соответствующих матриц на основе видовых идентификаторов, то порядок следования видов может быть синхронизирован за счет индексирования с использованием вектора идентификаторов.

Для расчета индексов *FRic*, *FEve* и *FDiv* мы рекомендуем использовать пакет FD (Laliberte et al., 2014) в котором реализован рассмотренный выше подход на основе функциональных расстояний (Laliberte, Legendre, 2010). Основная функция этого пакета – `dbFD()` – должна получить фрейм признаков и фрейм представлений. Если во фрейме признаков присутствуют только количественные данные и при этом нет пропущенных значений, рассчитывается матрица евклидовых функциональных расстояний между видами, в противном случае используется расстояние Говера. Функция возвращает список, в котором в том числе присутствуют рассчитанные для каждой пробы значения индексов функционального разнообразия *FRic*, *FEve* и *FDiv* в виде векторов с соответствующими именами. Возможен также вызов функции `dbFD()`, когда вместо фрейма признаков ей передается заранее рассчитанная матрица функциональных расстояний между видами.

7.3. Динамика функционального разнообразия сообществ лугового типа в ходе восстановленной сукцессии

В качестве примера применения описанной методологии рассмотрим динамику изменения различных индексов функционального разнообразия в ходе восстановительной сукцессии в фитоценозах в окрестностях Пустынского заказника.

Объектами исследования являлись четыре участка луговых фитоценозов, находящиеся на разных стадиях вторичной сукцессии. Для изучения были выбраны относительно гомогенные участки протяженностью около 100 м в поперечнике, на каждом из которых было заложено по 65 пробных площадок, которые располагались случайным образом в пределах изучаемого пространства.

Пробная площадка представляет собой квадрат размером 1×1 м. Для каждой площадки определялся видовой состав и проективное покрытие каждого вида в процентах. Описания проводились в конце июня – начале июля с 2014 по 2018 годы.

Один из участков мы рассматриваем как находящийся на финальной стадии сукцессии и называем его луговым. Он характеризуется тем, что на нем регулярно производится кошение, при этом данный участок не использовался в сельском хозяйстве более 50 лет. Остальные участки характеризуются тем, что они ранее возделывались и использовались для выращивания культурных растений. При этом один из участков возделывался последний раз менее 10 лет назад. Этот участок мы условно обозначаем «Поле», поскольку он находится на ранней стадии сукцессии. Два других участка последний раз возделывались 23 и 28 лет назад, они обозначены как «Залежь 1» и «Залежь 2» соответственно.

Для изучения функционального разнообразия использован следующий набор количественных функциональных признаков: высота растений (h , см), площадь листовой пластинки (leaf area, LA, мм²), удельная площадь листовой пластинки (specific leaf area, SLA, мм²/г), содержание сухого вещества в листовой пластинке (leaf dry matter content, LDMC, мг/г), масса семени (seed mass, m , г). Измерение функциональных признаков проводилось в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве (Perez-Harguindeguy et al., 2013). Высота растений измерялась как минимальное расстояние между наивысшей точкой основной фотосинтезирующей части растения (за исключением соцветий) и уровнем земли для 25 типичных экземпляров, результаты измерений усреднялись. Для измерения площади листовой пластинки с 10 типичных здоровых растений отбиралось по 4 листа. Листья сканировались, площадь измерялась по результатам обработки изображений в специализированной программе LeafArea. Листья взвешивались два раза: перед сканированием и после 48-часовой экспозиции в сушильном шкафу при температуре 80°C. Удельная площадь листа рассчитывалась как отношение площади листовой пластинки к исходной массе. Содержание сухого вещества рассчитывалось как отношение сухой массы (в мг) к исходной (в г). Значения массы семян были получены в базе данных LEDA (Kleyer et al., 2008).

Всего за 5 лет наблюдений на 4 участках луговых сообществ было отмечено 136 видов растений. Функциональные признаки измерялись для 61 наиболее обильного вида. Доля проективного покрытия этих видов составляет более 95%. В дальнейших расчетах учитывались только эти виды.

На первом этапе для демонстрации особенностей индексов функционального разнообразия они были рассчитаны на основе двух признаков: высоты растений h и содержания сухого вещества в листе LDMC. В анализируемом наборе из 61 вида высота растений варьирует от 2.56 см у *Sedum acre* L. до 83.52 см у *Melilotus officinalis* L., LDMC варьирует от 69.11 мг/г у *Pilosella officinarum* Vaill. до 488.37 у *Poa pratensis* L. На рис. 7.1–7.3 представлены диаграммы рассеяния видов, представленных на конкретных пробных площадках, в функциональном пространстве, сформированном высотой растений и содержанием сухого вещества в листе. Для удобства сопоставления на графиках ис-

пользованы одни и те же пределы отображения, соответствующие диапазону варьирования этих двух признаков. Для отображения выбраны пробные площади, имеющие одинаковое видовое богатство (14 видов), но максимально контрастные по разным индексам функционального разнообразия.

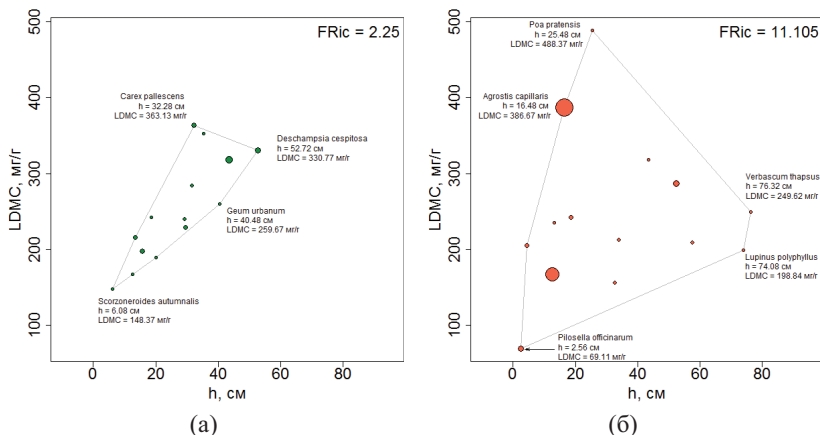


Рис. 7.1. К расчету индекса функционального богатства $FRic$. Символами на графике обозначены виды, представленные на 21 пробной площади участка «Залежь 2» в 2018 г. (а) и на 6 пробной площади участка «Поле» в 2017 г. (б). Размер символов пропорционален проективному покрытию видов. Серыми линиями обозначена выпуклая оболочка

На рис. 7.1 представлены две пробные площади, сильно отличающиеся по уровню функционального богатства $FRic$. Присутствующие в пробах виды отображены на графиках в виде точек, размер которых пропорционален проективному покрытию (чем больше точка, тем выше покрытие). Функциональное богатство рассчитывается как объем выпуклой оболочки, заключающей все виды пробы. На рис. 7.1 выпуклая оболочка отображена в виде замкнутого серого полигона. Поскольку в данном случае речь идет всего о двух признаках, объем выпуклой оболочки соответствует площади этого полигона. Обратите внимание, что при расчете индексов функционального разнообразия в пакете FD признаки нормируются, поэтому отраженные на графиках численные значения индекса $FRic$ значительно меньше площади отображенных полигонов, но они пропорциональны им.

Виды, представленные на 21 пробной площади участка «Залежь 2» в 2018 г. (рис. 7.1а), сгруппированы в центре функционального пространства и формируют узкую выпуклую оболочку небольшой площади. Минимальные значения высоты и LDMC здесь близки к минимумам по всем видам, а максимальные значения сильно не доходят до глобальных максимумов. Напротив, виды, представленные на 6 пробной площади участка «Поле» в 2017 г. (рис. 7.1б), широко разбросаны по функциональному пространству, причем здесь присутствуют виды с глобальными минимумами и максимумами по LDMC и

виды, очень близкие к глобальным экстремумам по высоте. Объем выпуклой оболочки и, соответственно, функциональное богатство здесь почти в 5 раз выше. Обратите внимание, что при расчете индекса функционального богатства представленности видов в расчет не принимаются, потому что имеет значение только распределение видов по функциональному пространству.

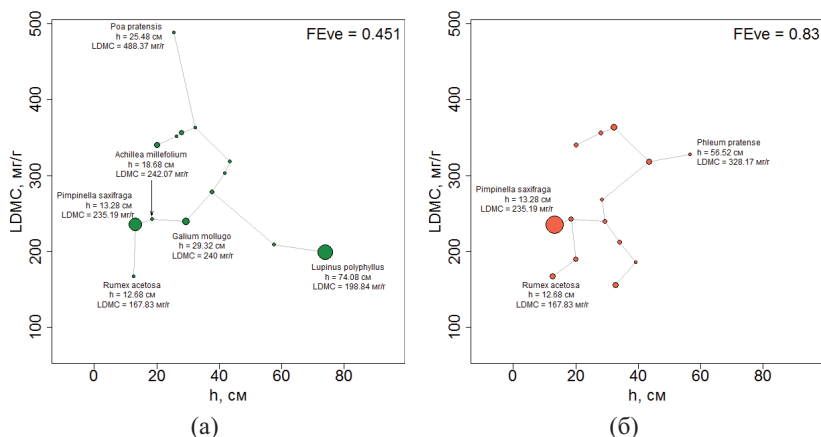


Рис. 7.2. К расчету индекса функциональной выровненности $FEve$. Символами на графике обозначены виды, представленные на 59 пробной площади участка «Залежь 1» в 2017 г. (а) и на 59 пробной площади участка «Залежь 1» в 2015 г. (б). Размер символов пропорционален проективному покрытию видов. Серыми линиями обозначено минимальное остовное дерево

На рис. 7.2 представлены две пробные площади, сильно отличающиеся по уровню функциональной выровненности $FEve$. В основе расчета индекса $FEve$ лежит минимальное остовное дерево, соединяющее все виды таким образом, чтобы сумма длин ветвей была минимальной. Минимальные остовные деревья отображены на рис. 7.2 в виде серых отрезков. Виды, представленные на 59 пробной площади участка «Залежь 1» в 2017 г. (рис. 7.2а), неравномерно распределены по функциональному пространству, в минимальном остовном дереве есть как очень длинные, так и очень короткие ветви. При расчете индекса $FEve$ для каждой ветви рассчитывается индивидуальная выровненность по формуле (7.3). Этот показатель зависит как от длины ветви (расстояние между видами), так и от представленностей видов, причем представленность видов уменьшает выровненность ветви. Таким образом, дополнительную неравномерность создают области повышенной «заселенности» с учетом представленностей видов. В этом отношении можно отметить близко расположенные виды *Galium mollugo* L. и *Pimpinella saxifraga* L., имеющие относительно высокое проективное покрытие и расположенные близко к виду *Achillea millefolium* L., в результате чего соответствующие ветви минимального остовного дерева характеризуются очень низкой взвешенной выровненностью. Неравномерность распределения видов по функциональному пространству ведет к низкому значе-

нию индекса функциональной выровненности. Виды, представленные на 59 пробной площади участка «Залежь 1» в 2015 г. (рис. 7.2б) распределены по функциональному пространству значительно равномернее, минимальное остовное дерево не содержит очень длинных ветвей. Здесь также присутствует ветвь, соединяющая высоко представленный вид *Pimpinella saxifraga* L. и *Achillea millefolium* L., однако настолько невыровненная ветвь одна, причем ярко выраженный доминант *Pimpinella saxifraga* L. занимает внешнюю позицию в минимальном остовном дереве, то есть соединен только с одним ближайшим видом. В итоге индекс выровненности *FEve* для 59 пробной площади участка «Залежь 1» в 2015 г. имеет высокое значение.

На рис. 7.3 представлены две пробные площади, сильно отличающиеся по уровню функциональной дивергенции *FDiv*. При расчете этого индекса определяется положение центроида выпуклой оболочки, такие центроиды отображены на рис. 7.3 в виде крестиков. На рис. 7.3 также отображены круги, радиус которых равен среднему расстоянию от всех видов до центроида. Дивергенция низкая, если высокопредставленные виды расположены близко к центроиду. Именно такую картину мы наблюдаем на рис. 7.3а, где доминирующий по проективному покрытию вид *Alchemilla vulgaris* L. расположен внутри круга, причем расстояние от него до центроида более чем в два раза меньше среднего расстояния. Иная картина наблюдается на рис. 7.3б. Здесь ярко выраженный доминант *Lupinus polyphyllus* Lindl. расположен снаружи круга, а расстояние от него до центроида почти в два раза превышает среднее расстояние. В этом случае дивергенция очень высокая и индекс *FDiv* близок к единице.

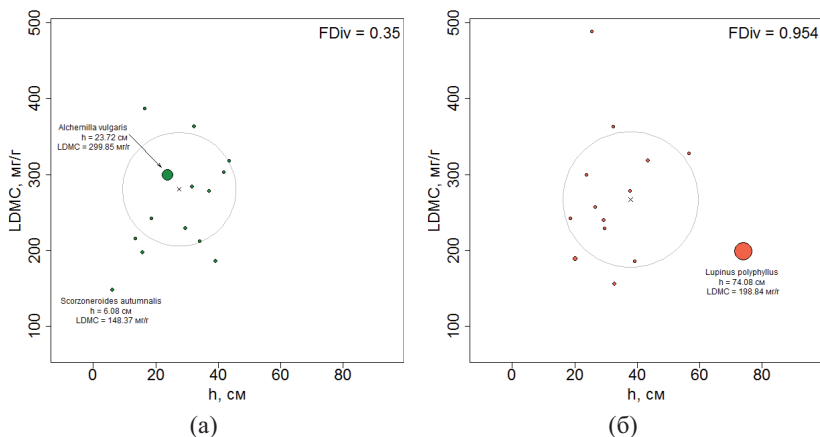


Рис. 7.3. К расчету индекса функциональной дивергенции *FDiv*. Символами на графике обозначены виды, представленные на 8 пробной площади участка «Залежь 2» в 2018 г. (а) и на 16 пробной площади участка «Залежь 1» в 2015 г. (б). Размер символов пропорционален проективному покрытию видов. Крестиком обозначено положение центроида конфигурации видов, образующих выпуклую оболочку, серая окружность соответствует среднему расстоянию от видов до центроида

На втором этапе были рассчитаны индексы функционального разнообразия на основе всех пяти количественных признаков. Именно эти значения использованы при анализе динамики функционального разнообразия в ходе сукцессии. Для сопоставления с традиционными показателями разнообразия для каждой пробной площади были также рассчитаны видовое богатство, индекс выровненности Пиелу и числовой эквивалент энтропии Шеннона.

Поскольку одни и те же пробные площадки были описаны многократно в разные годы исследования, был проведен предварительный анализ межгодовой изменчивости с применением двухфакторных общих линейных моделей (год – количественный предиктор, идентификатор пробной площадки – качественный предиктор). Результаты дисперсионного анализа этих моделей представлены в табл. 7.1. Идентификатор площадки обладает статистически значимым влиянием на все показатели, доля объясненной дисперсии составляет от 33.3% для функциональной выровненности до 60.4% для функционального богатства. Статистически значимое влияние года исследования выявлено только для показателей таксономической и функциональной выровненности, а также функционального богатства. Однако даже в этих случаях доля изменчивости, объясненной систематическим влиянием года наблюдения составляет не более 1.37%. Оставшаяся изменчивость является необъясненной и может быть рассмотрена как несистематическая межгодовая. Ее доля составляет от 38.5 % до 57.5%.

Таблица 7.1

Результаты анализа межгодовой изменчивости показателей разнообразия с применением общих линейных моделей

Предиктор	Показатели таксономического разнообразия								
	<i>S</i>			<i>E</i>			<i>D</i>		
	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>
Год	0.005	0.092	0.762	0.877	12.842	<0.001	0.248	3.786	0.052
Площадка	55.653	3.945	<0.001	43.543	2.462	<0.001	46.465	2.741	<0.001
Остатки	44.342	—	—	55.580	—	—	53.287	—	—
Предиктор	Показатели функционального разнообразия								
	<i>FRic</i>			<i>FEve</i>			<i>FDiv</i>		
	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>
Год	1.149	24.312	<0.001	1.375	17.092	<0.001	0.271	3.840	0.05
Площадка	60.387	4.934	<0.001	33.163	1.592	<0.001	42.216	2.307	<0.001
Остатки	38.464	—	—	65.463	—	—	57.513	—	—

Примечание: *S* – видовое богатство, *E* – индекс выровненности Пиелу, *D* – числовой эквивалент энтропии Шеннона, *FRic* – индекс функционального богатства, *FEve* – индекс функциональной выровненности, *FDiv* – индекс функциональной дивергенции, η^2 – доля дисперсии показателя разнообразия, объясненной предиктором модели (в процентах), *F* – отношение Фишера

Таким образом, ввиду того, что для половины анализируемых показателей систематическая межгодовая изменчивость статистически не значима, а для другой половины доля объясненной дисперсии не превышает полутора процентов, для каждой площадки были рассчитаны межгодовые средние. Именно эти значения использованы в статистическом анализе сукцессионной динамики показателей разнообразия.

На рис. 7.4 представлены диаграммы размахов показателей таксономического и функционального разнообразия для разных стадий восстановительной сукцессии. Анализ сукцессионной динамики проводился с применением однофакторного дисперсионного анализа (табл. 7.2). В случае выявления отличий между стадиями проводились попарные сравнения с применением критерия Стьюдента и поправки Холма. Значимость отличий между стадиями отражена на рис. 7.4 в виде компактных буквенных обозначений. Стадии, не отличающиеся между собой, всегда имеют общую букву, а статистически значимо отличающиеся стадии – разные буквы. Стадия может получить несколько букв, если она занимает промежуточное положение и не отличается от нескольких стадий, которые отличаются между собой.

Видовое богатство увеличивается на поздних сукцессионных стадиях по сравнению с ранними (рис. 7.4а). На самой поздней стадии наблюдается снижение видового богатства по сравнению с предыдущей стадией, однако статистически значимых отличий между этими стадиями не выявлено. Аналогичным образом происходит рост двух других показателей таксономического разнообразия. Вывороченность увеличивается вплоть до самой последней стадии (рис. 7.4в), числовой эквивалент индекса Шеннона также растет, однако на последних этапах рост прекращается и две последние стадии не отличаются статистически по этому показателю (рис. 7.4д).

Показатели функционального разнообразия демонстрируют совершенно иные тенденции изменения в ходе сукцессии. Наиболее ранняя из рассмотренных нами стадия («Поле») характеризуется наибольшим разбросом функционального богатства, но при этом и наибольшим средним значением (рис. 7.4б). Напротив, поздняя стадия («Луг») характеризуется наименьшим разбросом и наименьшим средним значением функционального богатства. Стадии «Залежь 1» и «Залежь 2» занимают промежуточное положение, при этом среднее функциональное богатство выше на стадии «Залежь 2», что может быть связано с высоким видовым богатством на этой стадии. Функциональная вывороченность стабильно высокая. Разные сукцессионные стадии не отличаются по этому показателю (табл. 7.2, рис. 7.4г). Функциональная дивергенция максимальная на ранней стадии, при росте сукцессионного возраста она уменьшается и достигает минимума на стадии «Залежь 2», при переходе к поздней стадии снова наблюдается рост дивергенции (рис. 7.4е).

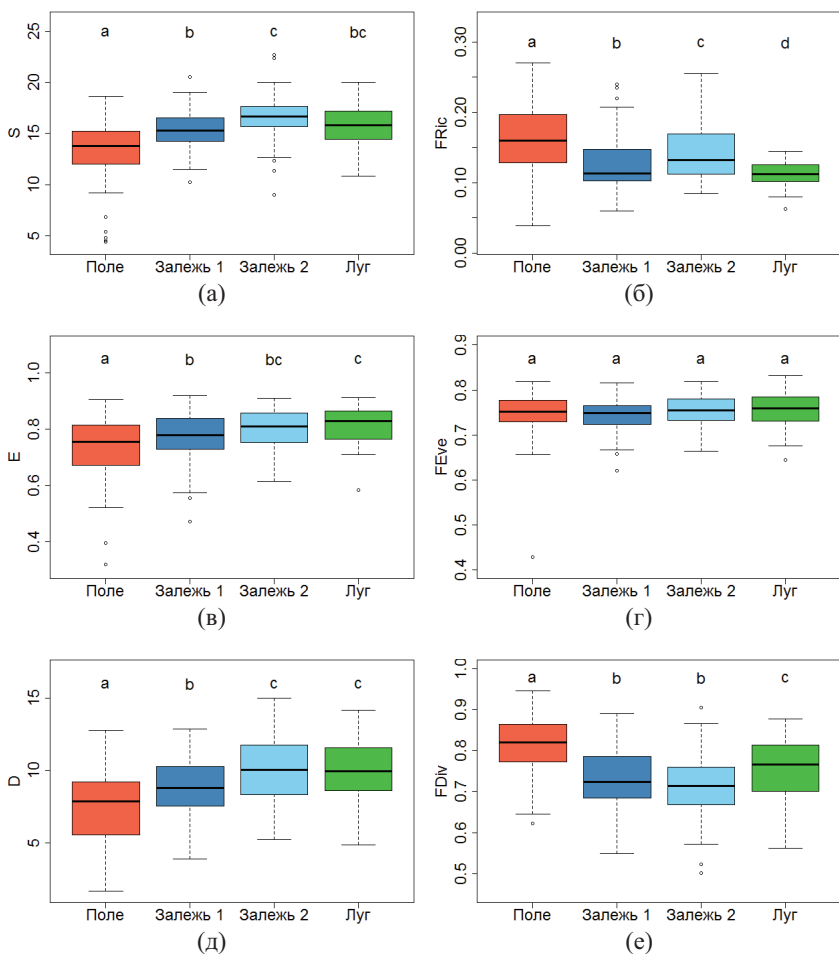


Рис. 7.4. Диаграммы размахов показателей разнообразия на разных стадиях восстановительной сукцессии. (а) видовое богатство S , (б) функциональное богатство $FRic$, (в) индекс выровненности Пиелу E , (г) индекс функциональной выровненности $FEve$, (д) числовой эквивалент энтропии Шеннона D , (е) индекс функциональной дивергенции $FDiv$. Над диаграммами размахов отображены компактные буквенные обозначения, отражающие результаты попарных сравнений между стадиями на основе критерия Стьюдента с поправкой Холма

Таблица 7.2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа зависимости показателей разнообразия от сукцессионной стадии

Фактор	Показатели таксономического разнообразия								
	<i>S</i>			<i>E</i>			<i>D</i>		
	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>
Стадия	21.399	23.232	<0.001	18.281	19.09	<0.001	11.168	10.729	<0.001
Остатки	78.601	—	—	81.719	—	—	88.832	—	—
Фактор	Показатели функционального разнообразия								
	<i>FRic</i>			<i>FEve</i>			<i>FDiv</i>		
	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2	<i>F</i>	<i>p</i>
Стадия	17.852	18.544	<0.001	1.783	1.549	0.202	23.386	26.047	<0.001
Остатки	82.148	—	—	98.217	—	—	76.614	—	—

Обозначения соответствуют таблице 7.1

Заключение

В настоящей главе показано, что на поздних стадиях вторичной восстановительной сукцессии в луговых фитоценозах рост таксономического разнообразия сопровождается уменьшением разнообразия функционального. Этот эффект не связан с изменениями выровненности, поскольку таксономическая выровненность растет, а функциональная не изменяется. Скорее, можно говорить о том, что в ходе сукцессии структура сообщества меняется таким образом, что возрастает сходство между видами. Причинами роста сходства на поздних сукцессионных стадиях может быть снижение доли случайных заносных видов (рудералов), которым сложнее внедряться в стабильное сообщество поздних стадий.

Таким образом, измерение функционального разнообразия является перспективным инструментом в мониторинге биотических сообществ. Его учет позволяет выявить динамические изменения в структуре сообществ, которые не всегда отражаются при использовании традиционного подхода на основе индексов таксономического разнообразия.

Список литературы

- Cornwell W.K., Schilck D.W., Ackerly D.D. A trait-based test for habitat filtering: convex hull volume // Ecology. – 2006. – V.87. – P. 1465–1471.
- Hill M.O. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences // Ecology. – 1973. – V.54. – P. 427–432.
- Jost L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components // Ecology. – 2007. – V.88. – P. 2427–2439.
- Kleyer M., Bekker R.M., Knevel C., Bakker J.P., Thompson K., Sonnenschein M., Poschold P., Van Groenendaal J.M., Klimeš L., Klimešová J., Klotz S., Rusch

G.M., Hermy M., Adriaens D., Boedeltje G., Bossuyt B., Dannemann A., Endels P., Götzenberger L., Hodgson J.G., Jackel A.K., Kühn I., Kunzmann D., Ozinga W.A., Römermann C., Stadler M., Schlegelmilch J., Steendam H.J., Tackenberg O., Wilmann B., Cornelissen J.H., Eriksson O., Garnier E., Peco B. The LEDA traitbase: a database of life-history traits of the northwest European flora // *Journal of Ecology*. – 2008. – V.96. – P. 1266–1274.

Laliberté E., Legendre P. A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits // *Ecology*. – 2010. – V.91. – P. 299–305.

Laliberté E., Legendre P., Shipley B. FD: measuring functional diversity from multiple traits, and other tools for functional ecology. R package version 1.0-12. 2014.

Mason N.W.H., Mouillot D., Lee W.G., Wilson J.B. Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity // *Oikos*. – 2005. – V.111. – P. 112–118.

Perez-Harguindeguy N., Díaz S., Garnier E., Lavorel S., Poorter H., Jauregui-berry P., Bret-Harte M.S., Cornwell W.K., Craine J.M., Gurvich D.E., Urcelay C., Veneklaas E.J., Reich P.B., Poorter L., Wright I.J., Ray P., Enrico L., Pausas J.G., de Vos A.C., Buchmann N., Funes G., Quétier F., Hodgson J.G., Thompson K., Morgan H.D., ter Steege H., van der Heijden M.G.A., Sack L., Blonder B., Poschlod P., Vaieretti M.V., Conti G., Staver A.C., Aquino S., Cornelissen J.H.C. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide // *Australian Journal of Botany*. – 2013. – V.61. – P. 167–234.

Villeger S., Mason N.W., Mouillot D. New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology // *Ecology*. – 2008. – V.89. – P. 2290–2301.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Тяжелые металлы являются одними из приоритетных загрязнителей почвы на территории промышленных центров, крупных городов, вблизи автомагистралей. К тяжелым металлам относятся элементы, атомная масса которых превышает 50 а.е.м (атомная единица массы). В соответствии с ГОСТ 17.4.1.02-83 химические вещества, попадающие в почву, подразделяются на три класса по степени опасности. Крайне опасными для окружающей среды являются вещества первого класса опасности. Так, к высокоопасным элементам относятся Hg, Pb, Cd, As, Se, Zn, F. Ко второму классу умеренно опасных веществ включены Sb, Mo, Cu, Co, Ni, Cr и В. К третьему малоопасному классу отнесены W, Ba, Sr, Mn и V. Необходимость постоянного мониторинга почвенного покрова на содержания в них тяжелых металлов определяется высокой токсичностью (вещества 1–3 классов опасности) и способностью к аккумуляции из-за их высокой устойчивости в окружающей среде. Таким образом, исследования содержания в почвах химически активных форм тяжелых металлов актуальны в связи с их особой опасностью и потенциальной возможностью миграции и попадания в воду и пищевые цепи.

Основные источники поступления любого металла в окружающую среду можно разделить на природные (естественные) и техногенные. К природным источникам тяжелых металлов в первую очередь относятся горные породы, из продуктов выветривания которых сформировался почвенный покров. Важным природным источником поступления тяжелых металлов в атмосферу являются также вулканы. Кроме вулканов, природными источниками загрязнения воздуха тяжелыми металлами могут являться: лесные пожары, космическая пыль, эрозия почв, испарения с поверхности морей и океанов, а также выделение этих элементов растительностью (Добровольский, 1987, 1992). Из техногенных источников наибольший вклад в загрязнение почв вносят отходы предприятий по выплавке цветных металлов (алюминиевые, глиноземные, медно-цинковые, свинцово-плавильные, никелевые, титано-магниевого, ртутные и др. заводы), а также по переработке цветных металлов (радиотехнические, электротехнические, приборостроительные, гальванические и пр.). Под влиянием обогащенных металлами выбросов формируются ареалы загрязнения ландшафта преимущественно на региональном и локальном уровнях (Мотузова, Безуглова, 2007).

Также велико воздействие предприятий энергетики на загрязнение окружающей среды, которое обусловлено не концентрацией в их отходах металлов, а их огромным количеством. Отходы предприятий энергетики, например, зола углей, отличается присутствием в них металлоидов, такие как бор, сурьма, селен, молибден и др., но степень их концентрирования в отходах относительно невысока и редко достигает высоких значений. Пахотные почвы загрязняются

ртутью, мышьяком, свинцом, бором, медью, оловом, висмутом, которые попадают в почву в составе ядохимикатов, биоцидов, стимуляторов роста растений, структурообразователей. Некоторые удобрения, изготавливаемые из различных отходов, часто содержат большой набор загрязняющих веществ с высокими концентрациями. Загрязнение почв происходит при поступлении в окружающую среду техногенных соединений металлов и металлоидов в любом фазовом состоянии. В целом на планете преобладает аэрозольное загрязнение. При этом наиболее крупные частицы аэрозолей (>2 мкм) выпадают в непосредственной близости от источника загрязнения (в пределах нескольких км), формируя зону с максимальной концентрацией поллютантов (Мотузова, Безуглова, 2007).

Аккумуляция основной части загрязняющих веществ наблюдается преимущественно в гумусово-аккумулятивном почвенном горизонте. Связываются они алюмосиликатами, несиликатными минералами, органическими веществами за счет различных реакций взаимодействия. Часть их удерживается этими компонентами прочно и не только не участвует в миграции по почвенному профилю, но и не представляет опасности для живых организмов. Характер распределения элементов токсикантов в естественных и техногенных ландшафтах существенно различается. Так, для техногенных территорий характерен регрессионно-аккумулятивный тип распределения, проявляющийся в повышенном накоплении металлов в гумусовом горизонте и резком понижении их содержания в нижележащих (Киришин, 1996). На перераспределение элементов по профилю почв влияют разные факторы: гранулометрический состав, реакция среды почвенного раствора, особенности гидрологического режима, содержание органического вещества, емкость поглощения катионов и другие химические показатели, наличие геохимических барьеров, дренаж и др. Также отрицательные экологические последствия загрязнения почв связаны с подвижными соединениями металлов и металлоидов. В условиях промывного режима потенциальная подвижность металлов и металлоидов возрастает, и они могут быть вынесены за пределы почвенного профиля, являясь источниками вторичного загрязнения подземных вод. Соединения тяжелых металлов, входящие в состав тончайших частиц (микронных и субмикронных) аэрозолей, могут поступать в верхние слои атмосферы и переноситься на большие расстояния, т. е. участвовать в глобальном переносе веществ (Мотузова, Безуглова, 2007).

Методической основой оценки содержания в почве тяжелых металлов, сбора почвенных образцов и проведения химических анализов являются следующие нормативные документы: ГОСТ 17.4.3.01-83. «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб»; РД 52.18.685-2006 «Методические указания. Определение массовой доли металлов в пробах почв и донных отложений. Методика выполнения измерений методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии»; РД 52.18.191-89 «Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли кислоторастворимых форм металлов в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом»; РД 52.18.289-90 «Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли подвижных форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия, кобальта, хрома, марганца) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом»; РД 52.18.575-96 «Методи-

ческие указания. Определение валового содержания нефтепродуктов в пробах почвы методом инфракрасной спектрометрии. Методика выполнения измерений»; ГОСТ 26483-85 «Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО»; ПНД Ф 16.1.1-96 «Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой концентрации ртути в пробах почв методом беспламенной атомной абсорбции с термическим разложением проб (с Изменением N 1)».

8.1. Методика отбора проб

Отбор проб почвы для дальнейшего химического анализа на содержание тяжелых металлов, а также их транспортировку и хранение осуществляется в соответствии с методическими указаниями РД 52.18.191-89 (1990) и государственными стандартами (ГОСТ 17.4.3.01-83, ГОСТ 17.4.4.02-84, ГОСТ 28168-89). Для отбора проб почвы с целью их дальнейшего анализа применяется ГОСТ 17.4.3.01-83. Данный стандарт устанавливает требования к отбору проб почвы при общих и локальных загрязнениях. При этом к пробной площади относится часть исследуемой территории, характеризующаяся сходными условиями. Точечной пробой является материал, взятый из одного места горизонта или одного слоя почвенного профиля, типичный для данного горизонта или слоя. К объединенной пробе относится смесь не менее двух точечных проб. Однородный почвенный покров – это покров, содержащий не менее 70% основной почвенной разности. Неоднородным почвенным покровом является покров, содержащий менее 70% основной почвенной разности. К общим загрязнениям относятся загрязнения, вызванные применением химических средств защиты растений, органических и неорганических удобрений, орошения сточными водами, а также загрязнения, вызванные выбросами промышленности, транспорта, распространенные на большие территории. Локальные загрязнения – загрязнения на ограниченных территориях, вызванные точечными источниками загрязнения: свалками, фермами, складами химических веществ и др.

Отбор проб проводится с учетом вертикальной структуры, неоднородности покрова почвы, рельефа и климата местности, а также с учетом особенностей, загрязняющих веществ или организмов. Отбор проб проводится на пробных площадках, закладываемых так, чтобы исключить искажение результатов анализов под влиянием окружающей среды. При необходимости получения сравнительных результатов пробы незагрязненных и загрязненных почв отбирают в идентичных естественных условиях. При общем загрязнении почв пробные площадки намечают по координатной сетке, указывая их номера и координаты. Пробные площадки на почвах, загрязненных предположительно равномерно, намечают по координатной сетке с равными расстояниями. Пробные площадки на почвах, загрязненных предположительно неравномерно, намечают по координатной сетке с неравномерными расстояниями между линиями. Расстояния между линиями сетки намечаются с учетом расстояния от источника загрязнения и преобладающего направления ветра.

При локальном загрязнении почв для определения пробных площадок применяют систему концентрических окружностей, расположенных на дифференцированных расстояниях от источника загрязнения, указывая номера окружностей и азимут места отбора проб. В направлении основного распространения загрязняющих веществ систему концентрических окружностей продолжают в виде сегмента, размер которого зависит от степени распространения загрязнения. Пробы отбирают по профилю из почвенных горизонтов или слоев с таким расчетом, чтобы в каждом случае проба представляла собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов или слоев данного типа почвы. При исследовании загрязнений почв сельскохозяйственных угодий патогенными организмами и вирусами пробы отбирают с пахотного горизонта с глубины от 0 до 5 см и от 5 до 20 см. В зависимости от цели исследования размер пробной площадки, количество и вид пробы должны соответствовать указанным в таблице 8.1.

Таблица 8.1

Размер пробной площадки для отбора проб в зависимости
от характеристики почвенного покрова

Цель исследования	Размер пробной площадки, га		Количество проб
	однородный поч- венный покров	неоднородный поч- венный покров	
Определение содержания в почве химических ве- ществ	От 1 до 5	От 0,5 до 1	не менее одной объ- единенной пробы
Определение физических свойств и структуры почвы	От 1 до 5	От 0,5 до 1	от 3 до 5 точечных проб на один почвен- ный горизонт

При мощности горизонта или слоя свыше 40 см отбирают отдельно не менее двух проб с различной глубины. Масса объединенной пробы должна быть не менее 1 кг. Монолиты следует отбирать объемом не менее 100 см³. Отобранные пробы необходимо пронумеровать и зарегистрировать в журнале, указав следующие данные: порядковый номер и место взятия пробы, рельеф местности, тип почвы, целевое назначение территории, вид загрязнения, дату отбора. Пробы должны иметь этикетку с указанием места и даты отбора пробы, номера почвенного разреза, почвенной разности, горизонта и глубины взятия пробы, фамилии исследователя. Упаковку, транспортирование и хранение проб осуществляют в зависимости от цели и метода анализа. Пробы, отобранные для химического анализа, следует упаковывать, транспортировать и хранить в емкостях из химически нейтрального материала. Пробы, предназначенные для анализа на содержание летучих химических веществ, следует помещать в стеклянные банки с притертыми пробками. Пробы, отобранные для определения физических свойств почвы, должны сохранить структуру почвы. При содержании скелетной части почвы свыше 10% объема поверхность монолитов следует покрывать парафином или другими защитными материалами.

8.2. Методика оценки загрязнения почв сельскохозяйственных земель

В целях оценки степени загрязнения почв сельскохозяйственных земель применяются нормативы, приведенные в «Методических рекомендациях по выявлению деградированных и загрязненных земель» (1995). Данный нормативный документ был разработан в соответствии с Земельным кодексом Российской Федерации на основании постановления Правительства Российской Федерации от 5 августа 1992 года N 555 "Об утверждении Положения о порядке консервации деградированных сельскохозяйственных угодий и земель, загрязненных токсичными промышленными отходами и радиоактивными веществами" и определяет порядок организации и проведения работ по выявлению деградированных и загрязненных земель. Целью обследований является выявление деградированных и загрязненных земель с установлением степени их деградации (загрязнения), в том числе эродированных, засоленных, заболоченных (в результате подтопления или нарушения экологических требований) земель; земель, подверженных опустыниванию, имеющих просадки поверхности вследствие добычи полезных ископаемых или других вмешательств человека; пастбищ с нарушением почвенно-растительного покрова; агрогенно-истощенных земель; земель, загрязненных в результате хозяйственной деятельности человека (остатками пестицидов, тяжелыми металлами, нефтепродуктами и другими органическими и неорганическими токсикантами). Методические рекомендации не распространяются на земли, загрязненные радиоактивными веществами, выявление которых осуществляется в установленном порядке в соответствии с имеющимися методическими документами. Выявление деградированных и загрязненных земель производится путем проведения почвенных, агрохимических, почвенно-мелиоративных и других необходимых обследований. По содержанию работ обследование может быть полным (выявляются все типы деградации или загрязнения) или неполным (проводится целевое обследование по одному–двум типам деградации или загрязнения). Для выявления зон с наибольшей техногенной нагрузкой в первую очередь устанавливается перечень потенциальных источников загрязнения территории. К ним относятся:

- ❖ промышленные и транспортные предприятия, предприятия энергетики, аэропорты, различного рода заправочные станции;
- ❖ предприятия добычи, переработки, хранения и транспортировки нефти;
- ❖ предприятия минерально-сырьевого комплекса;
- ❖ полигоны и места захоронения отходов промышленности (в том числе, атомной энергетики, предприятий военно-промышленного комплекса и вооруженных сил (ракетное топливо, опасные вещества, образующиеся в результате испытаний вооружения, горюче-смазочные материалы и т.п.), коммунально-бытового хозяйства;
- ❖ дорожно-транспортная сеть.

Конечным итогом предварительного этапа работы является выявление зон наиболее неблагоприятных и уязвимых в отношении загрязнения земель, дается примерная оценка площади и интенсивности загрязнения в этих зонах, определяются участки территории с повышенными требованиями к уровню их загрязнения, определяется стратегия пробоотбора почв и их анализа на первом этапе картографирования. Наличие почвенной карты и очерка предыдущих обследований является основой для проведения работ по выявлению деградированных и загрязненных земель. К проведению обследований готовятся копии почвенной карты и сопровождающих ее документов предыдущих работ на планируемую территорию. При отсутствии таких материалов используются данные, полученные на прилегающих территориях проектными и научно-исследовательскими учреждениями. Под химическим загрязнением земель понимается возникшее под воздействием промышленности, сельскохозяйственной, бытовой или иной деятельности человека изменение химического состава почв, вызывающее снижение их плодородия и качества. Под приоритетным загрязняющим почву химическим веществом понимается вещество, подлежащее контролю в первую очередь. Фоновое содержание химических соединений и элементов в почвах - содержание, соответствующее их естественным концентрациям в почвах различных почвенно-климатических зон, не испытывающих заметного антропогенного воздействия. Задачей первого (рекогносцировочного) этапа является выявление загрязненных земель и, если они имеются, приблизительное оконтуривание ареалов их распространения, а также окончательное определение видов загрязняющих веществ, подлежащих количественному определению на втором (детальном) этапе обследования. В ходе полевого обследования отбирают образцы почв по заранее намеченной и откорректированной на местности схеме во время маршрутных поездок. Схема размещения мест пробоотбора зависит от типа источника загрязнения и характера пространственного распределения загрязняющих химических веществ в почвах обследуемой территории. Задача второго этапа обследования – составление детальных картограмм загрязнения земель на участках территории, которые признаны загрязненными по итогам рекогносцировочного этапа и определены в качестве первоочередных по срокам и необходимости их картографирования. Итоговая документация по результатам обследования деградированных и загрязненных земель включает следующие документы:

- ❖ картограммы с нанесением контуров деградированных (загрязненных) почв и земель различной степени деградации (загрязнения);
- ❖ пояснительная записка к картограммам;
- ❖ сводная экспликация земель с указанием степени деградации (загрязнения), площади и структуры деградированных (загрязненных) земель;
- ❖ заключение по существующему состоянию земель, дальнейшему их использованию (специальный режим использования, изменение целевого

назначения, консервация) и приведением перечня мероприятий по устранению отрицательного воздействия деградированных и загрязненных земель, рекомендаций по их восстановлению. Оценка загрязнения почв сельскохозяйственных угодий химическими веществами (тяжелыми металлами) проводится по таблице 8.2 (Методические рекомендации по выявлению..., 1995).

Таблица 8.2

Показатели уровня загрязнения земель химическими веществами

Элемент	Содержание (мг/кг), соответствующее уровню загрязнения				
	1 уров.	2 уров.	3 уров.	4 уров.	5 уров.
Cd	<ПДК	от ПДК до 3	от 3 до 5	от 5 до 20	> 20
Pb	<ПДК	от ПДК до 125	от 125 до 250	от 250 до 600	> 600
Hg	<ПДК	от ПДК до 3	от 3 до 5	от 5 до 10	> 10
As	<ПДК	от ПДК до 20	от 20 до 30	от 30 до 50	> 50
Zn	<ПДК	от ПДК до 500	от 500 до 1500	от 1500 до 3000	>3000
Cu	<ПДК	от ПДК до 200	от 200 до 300	от 300 до 500	> 500
Co	<ПДК	от ПДК до 50	от 50 до 150	от 150 до 300	> 300
Ni	<ПДК	от ПДК до 150	от 150 до 300	от 300 до 500	> 500
Mo	<ПДК	от ПДК до 40	от 40 до 100	от 100 до 200	> 200
Sn	<ПДК	от ПДК до 20	от 20 до 50	от 50 до 300	> 300
Ba	<ПДК	от ПДК до 200	от 200 до 400	от 400 до 2000	>2000
Cr	<ПДК	от ПДК до 250	от 250 до 500	от 500 до 800	> 800
V	<ПДК	от ПДК до 225	от 225 до 300	от 300 до 350	> 350

Примечание: 1 уровень – допустимый; 2 уровень – низкий;
3 уровень – средний; 4 уровень – высокий; 5 уровень – очень высокий

Для всех тяжелых металлов, приведенных в таблице 5.2, допустимым уровнем является их содержание ниже ПДК, при этом их содержание для низкого – высокого уровней варьирует у разных металлов, для низкого уровня загрязнения концентрация металлов варьирует от ПДК до 3–500 мг/кг. Для почв сельскохозяйственного назначения, загрязненных химическими веществами, разработаны рекомендации по их использованию (СанПиН 2.1.7.1287-03). Так, в зависимости от характеристики загрязненности почв рекомендуется возможное использование территории и предложены рекомендации по оздоровлению почв (табл. 5.3).

Таблица 8.3

Гигиеническая оценка почв сельскохозяйственного назначения и рекомендации по их использованию (по СанПиН 2.1.7.1287-03 Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы)

Категория загрязнённости почв	Характеристика загрязнённости почв	Возможное использование территории	Рекомендации по оздоровлению почв
1-я допустимая	Содержание химических веществ в почве превышает фоновое, но не выше ПДК	Использование под любые культуры	Снижение уровня воздействия источников загрязнения почвы. Осуществление мероприятий по снижению доступности токсикантов для растений (известкование, внесение органических удобрений и т.п.)
2-я умеренно опасная	Содержание химических веществ в почве превышает их ПДК при лимитирующем общесанитарном, миграционном водном и миграционном воздушном показателях вредности, но ниже допустимого уровня по транслокационному показателю	Использование под любые культуры при условии контроля качества сельскохозяйственных растений	Мероприятия, аналогичные категории 1. При наличии веществ с лимитирующим миграционным водным или миграционным воздушным показателями проводится контроль за содержанием этих веществ в зоне дыхания сельскохозяйственных рабочих и в воде местных водоемов
3-я высоко опасная	Содержание химических веществ в почве превышает их ПДК при лимитирующем транслокационном показателе вредности	Использование под технические культуры. Использование под сельскохозяйственные культуры ограничено с учетом растений-концентраторов	Кроме мероприятий, указанных для категории 1, обязательный контроль за содержанием токсикантов в растениях – продуктах питания и в кормах. При необходимости выращивания растений-концентраторов.

8.3. Критерии санитарно-гигиенической оценки загрязнения почв тяжелыми металлами

Важное место в оценке степени загрязнения почв тяжелыми металлами принадлежит санитарно-гигиеническим нормативам. В основном они разработаны с антропоцентрических позиций и определяют качество почвы с точки зрения безопасного для человека уровня. Санитарно-гигиенические показатели загрязнения почв химическими веществами, в т.ч. тяжелыми металлами и методы проведения такой оценки изложены в соответствующих нормативных документах: СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы»; СанПиН 2.1.7.2197-07 Изменение №1 к СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы»; МУ 2.1.7.730-99 «Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест»; ГОСТ 17.4.3.03-85 «Охрана природы. Почвы. Номенклатура показателей санитарного состояния»; ГОСТ 17.4.3.01-81 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб»; ГОСТ 26204-84, 26213-84 «Почвы. Методы анализа»; ГН 2.1.7.2041-06 «Гигиенические нормативы. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве»; ГН 2.1.7.2042-06 «Гигиенические нормативы. Ориентировочно-допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве»; ГН 1.2.1323-03 «Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды»; ГОСТ 17.4.3.06-86 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к классификации почв по влиянию на них химических загрязняющих веществ»; ГОСТ 17.4.3.04-85 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к контролю и охране от загрязнения»; ГОСТ 17.4.3.03-85 «Охрана природы. Почвы. Номенклатура показателей санитарного состояния»; ГОСТ 17.4.4.02-84 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического и гельминтологического анализа»; ГОСТ 26204-84, 26213-84 «Почвы. Методы анализа»; ГОСТ 17.4.3.01-83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб» и др.

Одним из важнейших санитарно-гигиенических нормативов, позволяющих оценивать степень загрязнения почвы химическим веществом, является предельно допустимая концентрация (ПДК), данные по значениям которой приведены в соответствии с ГН 2.1.7.2041-06 в таблице 8.4 (для валовой формы) и 8.5 (для подвижной формы), или ориентировочно допустимая концентрация (ОДК) химических веществ почвах в соответствии с ГН 2.1.7.2511-09, приведенная в таблице 8.7. ПДК химического вещества в почве представляет собой комплексный показатель безвредного для человека содержания химических веществ в почве, т.к. используемые при ее обосновании критерии отражают возможные пути воздействия загрязнителя на контактирующие среды, биологическую активность почвы и процессы ее самоочищения. Обоснование ПДК химических веществ в почве базируется на 4

основных показателях вредности, устанавливаемых экспериментально: транслокационном, характеризующим переход вещества из почвы в растение, миграционный водный характеризует способность перехода вещества из почвы в грунтовые воды и водонесточники, миграционный воздушный показатель вредности характеризует переход вещества из почвы в атмосферный воздух, и общесанитарный показатель вредности характеризует влияние загрязняющего вещества на самоочищающую способность почвы и ее биологическую активность. При этом каждый из путей воздействия оценивается количественно с обоснованием допустимого уровня содержания по каждому показателю вредности. Наименьший из обоснованных уровней содержания является лимитирующим и принимается за ПДК. При полиэлементном загрязнении оценка степени опасности загрязнения почвы допускается по наиболее токсичному элементу с максимальным содержанием в почве.

Таблица 8.4

Предельно допустимые концентрации валовых форм химических веществ в почве (по ГН 2.1.7.2041-06)

Наименование вещества	ПДК, мг/кг, с учетом фона (кларка)	Лимитирующий показатель вредности
БП (бенз(а)пирен)	0.02	общесанитарный
Ванадий	150.0	общесанитарный
Ванадий+марганец	100+1000	общесанитарный
Марганец	1500	общесанитарный
Мышьяк	2.0	транслокационный
Нитраты по NO ₃	130.0	водно-миграционный
Ртуть	2.1	транслокационный
Свинец	32.0	общесанитарный
Свинец+ртуть	20.0+1.0	транслокационный
Сера	160.0	общесанитарный
Серная кислота (по S)	160.0	общесанитарный
Сурьма	4.5	водно-миграционный
Хром шестивалентный	0.05	общесанитарный

Для некоторых элементов приведены данные по ПДК с учетом их совместного воздействия – для ванадия и марганца, а также для свинца и ртути (табл. 8.4).

Данные таблицы 8.5 свидетельствуют, что наиболее токсичными являются вещества 1–2-го классов опасности, поэтому их содержание наиболее низкое для ПДК – для меди, никеля, свинца и др., по сравнению с веществом 3-го класса опасности – марганцем. Распределение тяжелых металлов по классам опасности приведено в таблице 8.6.

Таблица 8.5

Предельно допустимые концентрации подвижных форм химических веществ в почве (по ГН 2.1.7.2041-06)

Наименование вещества	ПДК, мг/кг, с учётом фона	Лимитирующий показатель
Кобальт *	5.0	общесанитарный
Марганец, извлекаемый 0,1 Н, SO ₄ чернозём	700.0	общесанитарный
Дерново-подзолистая pH=4.0	300.0	общесанитарный
pH=5.1–6.0	400.0	общесанитарный
pH>6.0	500.0	общесанитарный
Извлекаемый ацетатно-аммонийным буфером с pH=4,8 чернозём	140.0	общесанитарный
дерново-подзолистая pH=14.0	60.0	общесанитарный
pH=5.1–6.0	80.0	общесанитарный
pH>6,0	100.0	общесанитарный
Медь **	3.0	общесанитарный
Никель **	4.0	общесанитарный
Свинец **	6.0	общесанитарный
Хром трехвалентный **	6.0	общесанитарный
Цинк **	23.0	транслокационный

Примечание: * – подвижная форма кобальта извлекается из почвы аммонийно-натриевым буферным раствором с pH=3.5 для серозёмов и с pH=4.7 для дерново-подзолистой почвы;

** – подвижная форма элемента извлекается из почвы ацетатно-аммонийным буферным раствором с pH=4.8

Таблица 8.6

Отнесение химических веществ, попадающих в почву из выбросов, сбросов, отходов, к классам опасности (по ГОСТу 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения: Госстандарт. М., 1983 г.)

Класс опасности	Химическое вещество
I	Мышьяк, кадмий, ртуть, свинец, селен, цинк, фтор, бензапирен
II	Бор, кобальт, никель, молибден, медь, сурьма, хром
III	Барий, ванадий, вольфрам, марганец, стронций, ацетофенон

Почвы, в которых обнаружено превышение 1 ПДК ТМ, в соответствии с СанПиНом 2.1.7.1287-03, не могут быть отнесены к допустимой категории загрязнения (Ежегодник..., 2018). Опасность загрязнения тем выше, чем выше концентрация ТМ в почве и выше класс опасности ТМ (табл. 8.8).

Таблица 8.7

Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) валовых форм тяжелых металлов и мышьяка в почве (в соответствии с ГН 2.1.7.2511-09)

Наименование вещества			ОДК, мг/кг, с учетом фона (кларка)
Кадмий	Песчаные и супесчаные		0.5
	Суглинистые и глинистые	pH _{KCl} <5,5	1.0
		pH _{KCl} >5,5	2.0
Медь	Песчаные и супесчаные		33.0
	Суглинистые и глинистые	pH _{KCl} <5,5	66.0
		pH _{KCl} >5,5	132.0
Никель	Песчаные и супесчаные		20.0
	Суглинистые и глинистые	pH _{KCl} <5,5	40.0
		pH _{KCl} >5,5	80.0
Свинец	Песчаные и супесчаные		32.0
	Суглинистые и глинистые	pH _{KCl} <5,5	65.0
		pH _{KCl} >5,5	130.0
Цинк	Песчаные и супесчаные		55.0
	Суглинистые и глинистые	pH _{KCl} <5,5	110.0
		pH _{KCl} >5,5	220.0
Мышьяк	Песчаные и супесчаные		2.0
	Суглинистые и глинистые	pH _{KCl} <5,5	5.0
		pH _{KCl} >5,5	10.0

При определении загрязнения почвы веществами, для которых отсутствуют ПДК или ОДК, сравнение уровней загрязнения проводят с естественными фоновыми уровнями или кларками, приведёнными в таблице 8.9 по А.П. Виноградову (1957).

Массовые доли ТМ, растворимых в 5 н азотной кислоте (кислоторастворимые формы), сравнивают с ПДК, т.к. ошибкой в данном случае можно пренебречь (Ежегодник..., 2018). При загрязнении почвы одним веществом оценку степени загрязнения (очень сильная, сильная, средняя, слабая) проводят в соответствии с МУ 2.1.7.730-99. Массовая доля ТМ на уровне 3 Ф (фоновый уровень) или более служит показателем загрязнения почвы данным ТМ (табл. 8.10, 8.11).

Таблица 8.8

Оценка степени химического загрязнения почвы (в соответствии с СанПин 2.1.7.1287-03)

Категории загрязнения	Суммарный показатель загрязнения	Содержание в почве (мг/кг)					
		I класс опасности		II класс опасности		III класс опасности	
		Органические соединения	Неорганические соединения	Органические соединения	Неорганические соединения	Органические соединения	Неорганические соединения
Чистая*	–	От фона до ПДК	От фона до ПДК	От фона до ПДК	От фона до ПДК	От фона до ПДК	От фона до ПДК
Допустимая	<16	От 1 до 2 ПДК	От 2 фоновых значений до ПДК	От 1 до 2 ПДК	От 2 фоновых значений до ПДК	От 1 до 2 ПДК	От 2 фоновых значений до ПДК
Умеренно опасная	16-32	–	–	–	–	От 2 до 5 ПДК	От ПДК до $K_{\max}$
Опасная	32-128	От 2 до 5 ПДК	От ПДК до $K_{\max}$	От 2 до 5 ПДК	От ПДК до $K_{\max}$	>5 ПДК	> $K_{\max}$
Чрезвычайно опасная	>128	>5 ПДК	> $K_{\max}$	>5 ПДК	> $K_{\max}$	–	–

Примечание: $K_{\max}$ – максимальное значение допустимого уровня содержания элемента по одному из четырех показателей вредности (см. таблицу 8.11)

* – категория загрязнения относится к объектам повышенного риска.

Таблица 8.9

Средние массовые доли элементов в почвах мира

Наименование элемента	Средняя массовая доля элемента, мг/кг
Ванадий	100
Железо	38000
Кадмий	0.5
Кобальт	8
Марганец	850
Медь	20
Молибден	2
Мышьяк	5
Никель	40
Олово	10
Свинец	10
Стронций	300
Титан	4600
Хром	200
Цинк	50

Таблица 8.10

Критерии оценки степени загрязнения почв химическими веществами (по МУ 2.1.7.730-99)

Содержание в почве (мг/кг)	Категория загрязнения почвы		
	веществами 1 класса опасности	веществами 2 класса опасности	веществами 3 класса опасности
Загрязнение почв неорганическими веществами			
> К _{мах}	очень сильная	очень сильная	сильная
От ПДК до К _{мах}	очень сильная	сильная	средняя
От 2 фоновых значений до ПДК	слабая	слабая	слабая
Загрязнение почвы органическими веществами			
> 5 ПДК	очень сильная	очень сильная	сильная
От 2 до 5 ПДК	очень сильная	сильная	средняя
От 1 до 2 ПДК	слабая	слабая	слабая

Таблица 8.11

Максимальные значения допустимого уровня содержания элемента по одному из четырех показателей вредности (K_{max}) для валовых форм химических веществ, мг/кг, приведенные в МУ 2.1.7.730-99)

Наименование вещества	Класс опасности	Форма содержания	K _{max}	
			Значение	Наименование показателя вредности
Медь	2	Подвижные формы, извлекаемые из почвы ацетатно-аммонийным буфером с pH 4,8	72	водно-миграционный
Хром	2		6	общесанитарный
Никель	2		14	водно-миграционный
Цинк	1		200	водно-миграционный
Марганец чернозём	3		1860	водно-миграционный
Марганец дерново- подзоли- стая почва с pH 4			1000	водно-миграционный
Марганец дерново- подзоли- стая почва с pH 4-5,6			1000	водно-миграционный
Марганец дерново- подзоли- стая почва с pH ≥ 6			1600	водно-миграционный
Марганец чернозём		9300	водно-миграционный	
Марганец дерново- подзоли- стая почва с pH 4		5000	водно-миграционный	
Марганец дерново- подзоли- стая почва с pH 5,1-6		5000	водно-миграционный	
Марганец дерново- подзоли- стая почва с pH ≥ 6		8000	водно-миграционный	
Кобальт	2	Подвижные формы, извлекаемые аммонийно-натриевым буфе- ром с pH 3,5 для серозёмов, с pH 4,7 для дерново-	>1000	водно-миграционный
Фтор	1	Водорастворимый	25	общесанитарный
Сурьма	2	Валовая	50	общесанитарный
Марганец	3	Валовая	15000	водно-миграционный
Ванадий	3	Валовая	350	водно-миграционный
Марганец + ванадий	3	Валовая	2000+20	водно-миграционный
Свинец	1	Валовая	260	водно-миграционный
Мышьяк	1	Валовая	15	водно-миграционный
Ртуть	1	Валовая	33.3	водно-миграционный
Свинец + ртуть	1	Валовая	30+2	общесанитарный
Нитраты	–	Валовая	225	общесанитарный
Сернистые соединения (S): элементарная сера	–	Валовая	380	водно-миграционный
Сероводород	–	Валовая	160	общесанитарный
Серная кислота	–	Валовая	380	водно-миграционный
БП (Бенз(а)пирен)	1	Валовая	0.5	водно-миграционный

В соответствии с ИСО 110741 фоновая концентрация – это средняя концентрация вещества в исследуемых почвах, зависящая от геологических и почвообразующих условий (Ежегодник..., 2018). Фоновыми массовыми долями химических элементов и соединений в почве можно считать их концентрации в почвах ландшафтов, не подвергающихся импактному техногенному воздействию, удалённых от источника выбросов примерно на 15 км и более в зависимости от мощности источника. При этом почвы фоновых участков (т.е. участков, почвы которых содержат фоновые концентрации изучаемых веществ) и элементы рельефа должны быть аналогами загрязнённых. Коэффициент вариации естественных массовых долей химических элементов в верхних горизонтах почв может достигать 30% и более (Методические рекомендации..., 1981). Значения фоновых массовых долей ТМ используют для оценки опасности загрязнения почвы комплексом металлов по суммарному показателю загрязнения Z_{ϕ} согласно МУ 2.1.7.730-99 и СанПиН 2.1.7.1287-03, который рассчитывают по формуле 8.1:

$$Z_{\phi} = \sum_{i=1}^n K_{\phi i} - (n - 1), \quad (8.1)$$

где n - количество определяемых металлов, $K_{\phi i}$ -коэффициент концентрации металла, равный отношению массовой доли i -го металла в почве загрязнённой территории к его фоновой массовой доле.

Формула 8.1 имеет определённые ограничения. Её с осторожностью следует применять в том случае, когда почвы обеднены микроэлементами, а фоновая массовая доля ТМ очень мала или ниже предела обнаружения (Ежегодник..., 2006). Суммарный показатель загрязнения является индикатором неблагоприятного воздействия на здоровье населения. Ориентировочная оценочная шкала опасности загрязнения почв по суммарному показателю загрязнения представлена в соответствии с МУ 2.1.7.730-99 в таблице 8.12.

Таблица 8.12

Ориентировочная шкала опасности загрязнения почв по суммарному индексу загрязнения Z_{ϕ}

Категория загрязнения почв	Величина Z_{ϕ}	Изменение показателей здоровья населения в очагах загрязнения
Допустимая	$Z_{\phi} < 16$	Наиболее низкий уровень заболеваемости детей и минимальная частота встречаемости функциональных отклонений
Умеренно опасная	$16 \leq Z_{\phi} < 32$	Увеличение общей заболеваемости
Опасная	$32 \leq Z_{\phi} < 128$	Увеличение общей заболеваемости, числа часто болеющих детей, детей с хроническими заболеваниями, нарушениями функционального состояния сердечно-сосудистой системы
Чрезвычайно опасная	$Z_{\phi} \geq 128$	Увеличение заболеваемости детского населения, нарушение репродуктивной функции женщин (увеличение токсикоза беременности, числа преждевременных родов, мертворождаемости, гипотрофий новорожденных)

Показатель загрязнения почв Z_{ϕ} не является универсальным, учитывающим уровень загрязнения почв каждым отдельным ТМ. Основным критерием гигиенической оценки загрязнения почв каждым отдельным металлом является ПДК и/или ОДК ТМ в почве. Почвы, в которых обнаружено превышение 1 ПДК ТМ, не могут быть отнесены к допустимой категории загрязнения. Сравнение уровней массовых долей ТМ в очагах загрязнения почв ТМ, для которых не разработаны ПДК и ОДК, проводится с их фоновыми (Ф) массовыми долями. Значение массовой доли ТМ, составляющее от 3 до 5 Ф и более (в каждом конкретном случае) служит показателем загрязнения почв данным ТМ. Опасность загрязнения тем выше, чем выше концентрация ТМ в почве и выше класс опасности ТМ.

В большинстве случаев на территории наблюдений встречаются почвы, различающиеся разновидностью (песчаные и супесчаные, суглинистые и глинистые) и кислотностью ($pH_{KCl} > 5.5$; $pH_{KCl} < 5.5$). Среднее значение ($Cr_{одк}$) массовой доли определённого ТМ в почвах территории наблюдений, выраженного в количестве ОДК определённого ТМ, имеющего разные ОДК в упомянутых выше почвах, рассчитывают по формуле 8.2:

$$Cr_{одк} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^G \frac{k_i Cr_i}{ОДК_i}, \quad (8.2)$$

где N – количество проб почв, отобранных на территории наблюдений, G – количество групп почв с разными ОДК ($G=1, 2, 3$), k_i – количество проб почв в i -й группе почв, Cr_i – средняя массовая доля ТМ i -й группы почв в мг/кг, $ОДК_i$ – ОДК i -й группы почв в мг/кг.

Работы по определению содержания токсикантов промышленного происхождения в пробах почвы в Нижегородской области проводятся в рамках государственного экологического мониторинга территориальным Центром по мониторингу загрязнения окружающей среды (ЦМС) ФГБУ «Верхне-Волжское УГМС», в рамках которой используются МВИ и ГОСТ, указанные в РД.52.18.596-96 «Федеральный перечень методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении работ в области мониторинга загрязнения окружающей природной среды».

Для оценки загрязнения почв при проведении государственного мониторинга состояния окружающей среды в Нижегородской области Центром по мониторингу загрязнения окружающей среды (ЦМС) ФГБУ «Верхне-Волжское УГМС» в 2018 году в пробах почвы определялись:

- ❖ валовые формы меди, кобальта, никеля, свинца, цинка, марганца, кадмия, хрома, железа, магния, ртути;
- ❖ подвижные формы меди, цинка, никеля, свинца, кадмия;
- ❖ кислотность pH_{KCl} ;
- ❖ нефтепродукты.

Количественное определение тяжелых металлов в почве проводится в лаборатории физико-химических методов анализа ЦМС ФГБУ «Верхне-Волжское УГМС» с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра «Квант-

2АТ». Определение pH проводится с использованием pH-метра «Hanna pH-211», определение содержания нефтепродуктов осуществляется с использованием концентратомера нефтепродуктов «КН-2»; определение содержания ртути выполняется методом атомной абсорбции в холодном паре с помощью «УКР-1 МЦ».

Качество аналитической работы по определению ТМ в пробах почвы оценивается по результатам внешнего (пяти контрольных образцов в пяти повторностях) и внутрилабораторного контроля. Внутрилабораторный контроль состоит из статистического контроля точности и контроля воспроизводимости полученных результатов (РД 52.18.718-2008).

Для расчета средних и фоновых концентраций содержания валовых форм металлов в почве все концентрации, определенные ниже пределов обнаружения, приняты равными нижним пределам обнаружения используемой МВИ: медь – 5 млн⁻¹, кобальт – 8 млн⁻¹, никель – 10 млн⁻¹, свинец – 10 млн⁻¹, цинк – 1 млн⁻¹, марганец – 5 млн⁻¹, кадмия – 0.5 млн⁻¹, хром – 10 млн⁻¹, железо – 10 млн⁻¹, магний – 60 млн⁻¹, ртути – 0.02 млн⁻¹. Нижние пределы обнаружения подвижных форм металлов составляют: меди – 0.1 млн⁻¹, цинка – 1.0 млн⁻¹, свинца – 0.4 млн⁻¹, кадмия – 0.1 млн⁻¹.

Оценка уровня загрязнения почв тяжелыми металлами проводится методом сравнения массовых долей элементов (средних и максимальных) в контролируемых пробах почвы с ПДК, ОДК и фоновыми значениями содержания металлов в почвах обследованного района.

Фоновые массовые доли химических веществ в почвах вокруг районов локальных источников загрязнения включают естественные массовые доли химических веществ, добавку за счёт глобального переноса химических веществ антропогенного происхождения и добавку, связанную с распространением загрязнений от конкретных местных источников при мезомасштабном переносе загрязнений. Именно над этим уровнем выделяются очаги высоких локальных значений массовых долей ТМ в почвах в непосредственной близости от источника.

Наблюдения за загрязнением почв металлами ОНС проводят в основном в районах источников промышленных выбросов металлов в атмосферу. В качестве источника загрязнения может выступать одно предприятие, группа предприятий или город в целом. В 2017 году в почвах измеряли массовые доли алюминия, железа, кадмия, кобальта, марганца, меди, мышьяка, никеля, свинца, ртути, хрома и цинка в различных формах. Приоритет при выборе пунктов наблюдений за загрязнением почв ТМ отдают районам с присутствием предприятий цветной и чёрной металлургии, энергетики, машиностроения и металлообработки, топливной и энергетической, химической и нефтехимической промышленности, предприятий по производству стройматериалов, строительной промышленности.

Высокая неоднородность (пятнистость) загрязнения почв ТМ вблизи источников промышленных выбросов, медленный процесс самоочищения, консервативность почв и другие факторы в большинстве случаев не позволяют достоверно утверждать об изменениях уровней массовых долей ТМ в почвах за

пятилетний или даже за более продолжительный период наблюдений. В целом почвы территорий вокруг промышленных предприятий и районов, к ним прилегающих, загрязнены ТМ, которые могут накапливаться при постоянном техногенном воздействии загрязняющих веществ, поступающих из атмосферы и другими путями. В основном с 2008 года явного накопления общего содержания ТМ в обследованных ОНС в 2017 году почвах городов и их окрестностей не наблюдается (Ежегодник..., 2018), за исключением, возможно, марганца в почвах г. Нижнего Новгорода.

Список литературы

Виноградов А.П. Геохимия редких и рассеянных элементов в почвах. – М.: Изд-во АН СССР. – 1957.

ГН 1.2.1323-03 Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды.

ГН 2.1.7.2041-06 Гигиенические нормативы. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2006

ГН 2.1.7.2042-06 Гигиенические нормативы. Ориентировочно-допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве.

ГН 2.1.7.2511-09 Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. № 14121 от 23.06.2009 г.

ГОСТ 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения: Госстандарт. – М., 1983 г.

ГОСТ 17.4.3.01–83 Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. – М.: Стандартинформ, 2004. – 4 с.

ГОСТ 17.4.4.02–84 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2008. – 8 с.

ГОСТ 17.4.3.03-85 «Охрана природы. Почвы. Номенклатура показателей санитарного состояния»;

ГОСТ 26204-84, 26213-84 «Почвы. Методы анализа».

ГОСТ 17.4.3.06-86 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к классификации почв по влиянию на них химических загрязняющих веществ».

ГОСТ 17.4.3.04-85 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к контролю и охране от загрязнения».

ГОСТ 28168–89 Почвы. Отбор проб. М.: Стандартинформ, 2008. 7 с.

ГОСТ 26483-85 Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО.

Добровольский В.В. Глобальная биохимия свинца // Свинец в окружающей среде. М.: Наука, 1987. С. 7–19.

Добровольский В.В. Основные черты геохимии цинка и кадмия // Цинк и кадмий в окружающей среде. М.: Наука, 1992. С. 7–18.

Ежегодник. Загрязнение почв Российской Федерации токсикантами про-

мышленного происхождения в 2005 году / Под. ред. Л.В. Сатаевой. М.: Метео-агентство Росгидромета. 2006.

Ежегодник. Загрязнение почв Российской Федерации токсикантами промышленного происхождения в 2017 году / Под. ред. Л.В. Сатаевой. Обнинск: ФГБУ «НПО «Тайфун». 2018.

ИСО 11074-1: 1996 Термины и определения в области загрязнения и охраны почв.

Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды металлами / Под ред. Н.Г. Зырина и С.Г. Малахова. М.: Гидрометеиздат, 1981.

Методические рекомендации по выявлению деградированных и загрязненных земель, Методические рекомендации Минсельхоза России от 15 февраля 1995 года.

МУ 2.1.7.730-99 Гигиеническая оценка качества почвы населённых мест. М.: Минздрав России. 1999

Кирюшин В. И. Экологические основы земледелия: учебник. Москва: Колос, 1996. 367 с.

Мотузова Г.В., Безуглова О.С. Экологический мониторинг почв: учебник. М.: Академический Проект; Гаудеамус, 2007. 237 с.

МУ 2.1.7.730-99 Гигиеническая оценка качества почвы населённых мест. М.: Минздрав России. 1999.

ПНД Ф 16.1.1-96 Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой концентрации ртути в пробах почв методом беспламенной атомной абсорбции с термическим разложением проб.

РД 52.18.191–89 Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли кислоторастворимых форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом.

РД 52.18.289-90 Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли подвижных форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия, кобальта, хрома, марганца) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом.

РД 52.18.685-2006 Методические указания. Определение массовой доли металлов в пробах почв и донных отложений. Методика выполнения измерений методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии.

РД 52.18.575-96 Методические указания. Определение валового содержания нефтепродуктов в пробах почвы методом инфракрасной спектрометрии. Методика выполнения измерений

СанПиН 2.1.7.1287-03 Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2005.

СанПиН 2.1.7.2197-07 Изменение №1 к СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ В МЕТОДАХ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА И ОРДИНАЦИИ ГИДРОБИОЦЕНОЗОВ

Традиционные подходы к классификации и ординации структуры гидробиоценозов основаны на представлении о видах как элементарных структурных единицах, каждый из которых уникален. Однако хорошо известно, что в структуре гидробиоценозов выделяются функциональные блоки, состоящие из сходных видов. Виды внутри таких функциональных блоков обладают сходными признаками, предъявляют сходные требования к условиям окружающей среды и используют сходные стратегии.

Традиционным способом учета таких функциональных блоков является метод функциональных групп, когда все виды разделяются на дискретные категории и анализируется соотношение между суммарными представленностями видов таких категорий.

В последние годы наблюдается все возрастающий интерес к изучению функциональных признаков видов, то есть таких признаков, которые прямо или косвенно влияют на приспособленность особей (Violle et al., 2007). Наличие данных о функциональных признаках позволяет задействовать эту информацию в различных методах анализа структуры сообществ, в том числе при анализе разнообразия и при классификации и ординации сообществ.

Для учета функционального сходства видов в методах классификации и ординации гидробиоценозов используются индексы функционального сходства между пробами, рассчитываемые на основе представленностей видов в пробах, а также матрицы функционального сходства, которая в свою очередь рассчитывается на основе значений функциональных признаков видов. Рассчитанная таким образом матрица индексов функционального сходства между пробами преобразуется в соответствующую матрицу функциональных расстояний, которая используется в алгоритмах кластерного анализа и ординации.

Данная глава посвящена современным подходам к анализу видовой структуры гидробиоценозов с учетом функциональных признаков зоопланктона на примере мониторинга верхней речной части Чебоксарского водохранилища и устья р. Оки.

9.1. Измерение функционального сходства видов

Для измерения степени сходства между видами, которое выражено в функциональных признаках, применяется несколько индексов, простейшим из которых является евклидово расстояние:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{u=1}^K (t_{ui} - t_{uj})^2}, \quad (9.1)$$

где d_{ij} – расстояние между видами i и j , K – число признаков, t_{ui} – нормированное значение признака u у вида i .

Евклидово расстояние можно применять в случае, когда все признаки измерены в количественных шкалах. Многие важные функциональные признаки не имеют количественного выражения и имеют качественную природу. При этом чаще всего исследователь имеет дело со смешанным набором качественных и количественных функциональных признаков. В этом случае для измерения сходства между видами используется индекс Говера (Gower, 1971):

$$S_{ij} = \frac{\sum_{u=1}^K s_{uij}}{\sum_{u=1}^K \delta_{uij}}, \quad (9.2)$$

где S_{ij} – это общее сходство между видами i и j , s_{uij} – сходство между видами i и j по признаку u , δ_{uij} – индикатор того, что по признаку u между видами i и j возможно сравнение (принимает значение 1, если сравнение возможно, и значение 0 в противном случае). Если все сравнения возможны, $\sum_{u=1}^K \delta_{uij}$ будет равна числу признаков K , в противном случае эта сумма будет равна числу признаков, по которым сравнение возможно. Если ни по одному из признаков сравнение невозможно, сходство считается неопределенным.

При расчете индекса Говера различаются количественные, категориальные и дихотомические признаки. Для количественных признаков сходство рассчитывается на основе разности значений признака, отнесенной к ширине диапазона варьирования данного признака у всех видов, фигурирующих в исследовании:

$$s_{uij} = 1 - \frac{|t_{ui} - t_{uj}|}{t_u^{(max)} - t_u^{(min)}}, \quad (9.3)$$

где t_{ui} – исходное ненормированное значение u -го признака у вида i , $t_u^{(max)}$ и $t_u^{(min)}$ – максимальное и минимальное значения признака u у всех видов.

Для качественных индексов сходство s_{uij} составляет 1, если значения данного признака у видов совпадают, в противном случае сходство равно 0. Особую категорию признаков составляют так называемые дихотомические признаки. Это альтернативные признаки, имеющие смысл наличия либо отсутствия некоего свойства. При этом считается, что при наличии данного свойства у двух видов их сходство по дихотомическому признаку составляет 1, наличие свойства у одного вида и отсутствие у другого соответствует нулевому сходству, а в случае отсутствия свойства у обоих видов их сопоставление считается невозможным ($\delta_{uij} = 0$). Для признаков всех типов сопоставление невозможно в слу-

чае отсутствия данных о значении признака хотя бы у одного из сравниваемых видов.

Индекс Говера представляет собой среднее значение сходства между двумя видами по всем признакам, причем сходство приведено к диапазону (0.1). Для получения расстояния среднее сходство вычитается из единицы:

$$d_{ij} = 1 - S_{ij} . \quad (9.4)$$

9.2. Использование функционального сходства видов в кластерном анализе и методах ординации

Базовый алгоритм иерархического кластерного анализа заключается в последовательном объединении объектов в совокупности – кластеры. Основанием для такого объединения на первом этапе являются расстояния между объектами, а на поздних этапах – расстояния между кластерами. Стандартная версия кластерного анализа совокупности проб из одного или нескольких сообществ оперирует матрицей расстояний между пробами, которые рассчитываются на основе традиционных для экологии индексов сходства – Жаккара, Сёренсена, Брэя-Кёртиса и т.п. Для учета степени сходства между видами при расчете сходства между пробами разработаны специальные индексы, которые являются обобщением традиционных индексов сходства (Pavoine, Ricotta, 2014).

Предположим, что мы работаем с двумя пробами, каждая из которых характеризуется векторами представленностей x_i и z_j . Мера представленности может быть любой. Это могут быть натуральные численности, биомасса, относительные представленности. Это могут быть индексы присутствия/отсутствия видов (1/0), в этом случае речь будет идти о качественных пробах. Тогда при наличии информации о функциональном сходстве между видами S_{ij} можно сконструировать несколько индексов сходства между пробами. Индекс

$$S_{jaccard} = \frac{\sum_{ij} x_i z_j S_{ij}}{\sum_{ij} x_i x_j S_{ij} + \sum_{ij} z_i z_j S_{ij} - \sum_{ij} x_i z_j S_{ij}} . \quad (9.5)$$

является обобщением классического индекса сходства Жаккара. Если x_i и z_i отражают присутствие/отсутствие видов, а сами виды полагаются максимально отличными, то есть $S_{ij} = 0$ при $i \neq j$ и $S_{ij} = 1$ в противном случае, тогда числитель $\sum_{ij} x_i z_j S_{ij} = a$ – это число общих видов, а компоненты знаменателя соответствуют $\sum_{ij} x_i x_j S_{ij} = a + b$ – видовому богатству первой пробы (здесь b – это число уникальных видов первой пробы) и $\sum_{ij} z_i z_j S_{ij} = a + c$ – видовому богатству второй пробы (здесь c – это число уникальных видов второй пробы). Легко видеть, что формула (9.5) редуцируется до:

$$\frac{a}{(a + b) + (a + c) - a} = \frac{a}{a + b + c} \quad (9.6)$$

традиционного индекса сходства Жаккара. Если x_i и z_i являются относительными представленностями видов, а виды максимально отличны друг от друга то формула (9.5) редуцируется до

$$\frac{\sum_{ij} x_i z_j S_{ij}}{\sum_{ij} x_i x_j S_{ij} + \sum_{ij} z_i z_j S_{ij} - \sum_{ij} x_i z_j S_{ij}} = \frac{\sum_i x_i z_i}{\sum_i x_i^2 + \sum_i z_i^2 - \sum_i x_i z_i} \quad (9.7)$$

индекса Уишарта, который представляется собой количественную версию индекса Жаккара (Wishart, 1969).

Аналогичным образом, индекс

$$S_{\text{Sørensen}} = \frac{\sum_{ij} x_i z_j S_{ij}}{\frac{1}{2} \sum_{ij} x_i x_j S_{ij} + \frac{1}{2} \sum_{ij} z_i z_j S_{ij}} \quad (9.8)$$

представляет собой обобщение традиционного индекса Сёренсена, поскольку при работе с качественными данными и максимально отличными видами формула (9.8) сводится к $\frac{a}{2a+b+c}$. Можно показать, что количественная версия этого индекса для случая максимально отличных видов сводится к индексу Мориситы-Хорна:

$$\frac{\sum_{ij} x_i z_j S_{ij}}{\frac{1}{2} \sum_{ij} x_i x_j S_{ij} + \frac{1}{2} \sum_{ij} z_i z_j S_{ij}} = \frac{\sum_i x_i z_i}{\frac{1}{2} \sum_i x_i^2 + \frac{1}{2} \sum_i z_i^2} \quad (9.9)$$

Если же в знаменателе выражения (9.8) перейти от арифметического среднего к геометрическому, получим

$$S_{\text{Ochiai}} = \frac{\sum_{ij} x_i z_j S_{ij}}{\sqrt{\sum_{ij} x_i x_j S_{ij}} \sqrt{\sum_{ij} z_i z_j S_{ij}}} \quad (9.10)$$

обобщение индекса Очаи (Ochiai, 1957), поскольку в случае качественных данных и максимально отличных видов формула (9.10) сводится к $\frac{a}{\sqrt{a+b}\sqrt{a+c}}$. Отметим также, что количественная версия этого индекса для случая максимально отличных видов

$$\frac{\sum_{ij} x_i z_j S_{ij}}{\sqrt{\sum_{ij} x_i x_j S_{ij}} \sqrt{\sum_{ij} z_i z_j S_{ij}}} = \frac{\sum_i x_i z_i}{\sqrt{\sum_i x_i^2} \sqrt{\sum_i z_i^2}} \quad (9.11)$$

представляет собой хордовое расстояние в многомерном векторном пространстве, измерения которого соответствуют представленностям видов (Orlóci, 1967; Шурганова и др., 2007; Шурганова, Черепенников, 2011).

Интеграция данных о функциональных признаках видов в кластерный анализ структуры сообщества достигается за счет того, что матрица расстояний между пробами рассчитывается на основе индексов (9.5), (9.8) либо (9.10). Эти индексы могут принимать значения от 0 до 1, поэтому для использования в алгоритмах кластерного анализа они преобразуются в расстояния путем вычитания из единицы аналогично формуле (9.4). После формирования матрицы расстояний между пробами применяются стандартные алгоритмы кластерного анализа: можно использовать разные алгоритмы объединения объектов в кластеры (методы ближнего соседа, средней связи, Уорда и пр.), строить визуальный образ кластеризации в виде дендрограммы, рассчитывать оптимальное число кластеров различными методами (Якимов и др., 2016; Экологический мониторинг..., 2017).

Методы ординации структуры сообществ позволяют упорядочить пробы и получить представление об их взаимном расположении в многомерном векторном пространстве представленных за счет проецирования в пространство меньшей размерности, чаще всего на плоскость. Стандартным методом ординации является анализ главных компонент, позволяющий выделить оси максимального варьирования для совокупности количественных переменных, которыми в случае анализа структуры сообществ являются представленности видов. В этом случае ординация основана на исходной матрице пробы×виды. Преимуществом анализа главных компонент является прямая возможность отображения на ординационной диаграмме не только проб, но и видов, что позволяет получить представление о вкладе видов в группировку проб. Метод главных компонент хорошо работает в случае нормально распределенных переменных, а представленности видов обычно имеют сильно скошенное вправо распределение, поэтому при ординации структуры сообществ часто используется другой подход. Рассчитывается матрица расстояний между видами на основе хорошо апробированных в экологии индексов сходства. Затем эта матрица расстояний используется в алгоритме многомерного шкалирования. Эта процедура также часто называется анализом главных координат. Она формирует многомерное пространство, в котором объекты (пробы) размещаются таким образом, чтобы евклидовы расстояния между ними максимально соответствовали исходной матрице расстояний. Полное совпадение между этими расстояниями возможно, если исходная матрица расстояний обладает свойством евклидовости. Новое многомерное пространство формируется таким образом, что оси упорядочены по изменчивости. В этом смысле получаемые переменные аналогичны главным компонентам, поэтому они часто именуются главными координатами. Для формирования итоговой ординационной диаграммы используются две первые главные координаты.

Для учета функциональных особенностей видов при ординации сообществ можно использовать метод главных координат, но их нужно рассчитывать на основе матрицы функциональных расстояний между пробами. Полученная на основе формул (9.5), (9.8) либо (9.10) матрица функциональных расстояний является положительной полуопределенной матрицей. Эта матрица не во всех случаях обладает свойством евклидовости, то есть не всегда может быть преоб-

разована в многомерное евклидово пространство методом главных координат. Однако простое преобразование расстояний путем взятия квадратного корня позволяет добиться евклидовости итоговой матрицы, что облегчает использование метода главных координат.

Итак, и кластерный анализ, и метод главных координат основаны на матрице расстояний между пробами. Если на вход соответствующих алгоритмов будет поступать матрица функциональных расстояний (Pavoine, Ricotta, 2014), будет осуществляться классификация и ординация проб с учетом функционального сходства между видами. Метод главных координат чувствителен к свойству евклидовости матрицы расстояний, поэтому применяется дополнительная операция взятия квадратного корня. Для возможности прямого сопоставления дендрограмм и ординационных диаграмм рекомендуется применять преобразованные расстояния в обеих процедурах.

9.3. Анализ структуры зоопланктоценозов речной части Чебоксарского водохранилища

Проиллюстрируем изложенные подходы на примере анализа структуры зоопланктоценозов речной части Чебоксарского водохранилища.

Представленные в анализе пробы зоопланктона отбирались в июне, июле и сентябре 2016 г. на акваториях верхней речной части Чебоксарского водохранилища (от плотины Нижегородской ГЭС до г. Бор, ст. 1–7) и устьевого участка р. Оки (ст. 8–9) (рис. 9.1) с борта экспедиционного судна сетью Джели (диаметр входного кольца 18 см, нейлоновое сито размером ячеек 82 мкм) путем тотальных ловов от дна до поверхности и фиксировались 4%-ным формалином. Камеральную обработку проводили по стандартной методике (Методические рекомендации, 1982).



Рис. 9.1. Схема расположения станций отбора проб зоопланктона на акватории зоны речной гидравлики Чебоксарского водохранилища и устьевой области р. Оки: 1 – ниже г. Городец, 2 – выше г. Балахна, 3 – ниже г. Балахна, 4 – п. Большое Козино, 5 – ниже Сормовского р-на, 6 – г. Нижний Новгород, 7 – г. Бор, 8 – устье р. Оки, 9 – 3.5 км выше устья р. Оки

За период исследования на акватории верхней речной части Чебоксарского водохранилища и устьевого участка р. Ока было идентифицировано 82 вида зоопланктона. Из них 79 видов обнаружено в Чебоксарском водохранилище (Ро-

tifera – 39, Cladocera – 26, Copepoda – 14), 50 – в устьевом участке р. Оки (Rotifera – 24, Cladocera – 16, Copepoda – 10).

Для расчета матрицы функциональных расстояний между видами требуется создание базы функциональных признаков для идентифицированных видов зоопланктона. Для составления такой базы функциональных признаков пресноводного зоопланктона нами были использованы собственные данные, а также ряд определителей, монографий и научных статей (Рылов, 1948; Кутикова, 1970; Смирнов, 1972; 1976; Сушня, 1975; Монаков, 1976; Чуйков, 1981; 2000; Боруцкий и др., 1991; Монаков, 1998; Orlova-Bienkowskaja, 2001; Маркевич, 2003 а,б; Коровчинский, 2004; Крылов, 2005; Кутикова, 2005; Kotov, Stifter, 2006; Определитель ..., 2010; Котов, 2013; Стойко и др., 2016; Kotov, Bekker, 2016; Bledzki, Rybak, 2016; Korovchinsky, 2018). Однако даже в обширном поле научной литературы часто недостаточно информации по многим признакам, поэтому в данном примере мы остановимся на учёте четырех функциональных признаков: максимальный размер тела – количественный признак, трофическая группа – качественный признак (категории: хищник, нехищник), тип питания – качественный признак (категории: захват, первичная фильтрация, вторичная фильтрация, вертикация, всасывание, собирание), тип локомоции – качественный признак (категории: плавание, ползание, прикрепление). Поскольку многие виды зоопланктона обладают смешанным типом питания и локомоции, последние два признака рассматривались как наборы дихотомических признаков, соответствующих каждой категории (то есть в анализе задействованы переменные вида вертикатор/невертикатор, плавает/не плавает). На основе описанной системы признаков была рассчитана матрица функционального сходства между видами зоопланктона с применением индекса Говера (9.2).

Для анализа структуры зоопланктоценозов речной части Чебоксарского водохранилища использованы кластерный анализ и ординация на основе метода главных координат. Оба метода реализованы в двух вариантах. В традиционном варианте использована матрица расстояний между пробами, рассчитанная с использованием количественного индекса сходства Мориситы-Хорна. Второй вариант учитывает информацию о функциональных признаках видов и основан на матрице сходства, которая рассчитана с применением индекса функционального сходства Сёренсена (9.8), который в случае использования количественных данных соответствует индексу сходства Мориситы-Хорна. Полученные дендрограммы и соответствующие диаграммы ординации представлены на рис. 9.2. Известно, что Чебоксарское водохранилище формируется за счет двух разнородных по комплексу гидрофизических и гидрохимических характеристик водных потоков, поступающих из Горьковского водохранилища и р. Оки. В рамках предыдущих исследований показано, что зоопланктонные сообщества этих двух потоков различаются по составу и структуре доминирующих видов (Шурганова, 2007; Shurganova et al., 2018). Поэтому на рис. 9.2 отмечена принадлежность пробы к «окскому» или «вожскому» потоку.

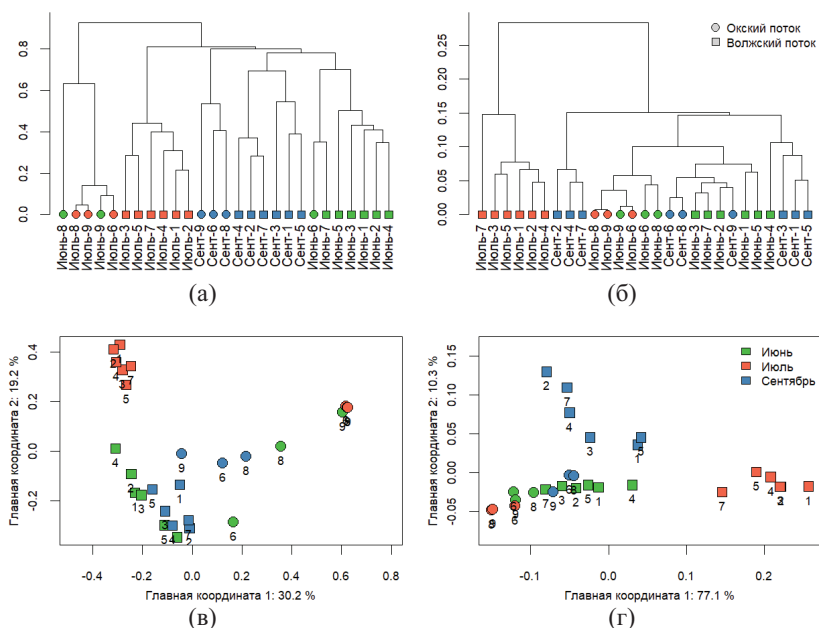


Рис. 9.2. Результаты анализа структуры зоопланктоценозов речной части Чебоксарского водохранилища на основе традиционного индекса Мориситы-Хорна (а, в) и на основе функционального индекса Сёренсена (б, г); дендрограммы сходства проб, построенные по итогам кластерного анализа (а, б); ординационные диаграммы, построенные методом главных координат (в, г). Точки на графиках соответствуют пробам, тип символа отражает принадлежность пробы к окскому и волжскому потокам, цвет отражает время отбора проб. На ординационных диаграммах цифры отражают номера станций отбора проб, на осях указаны значения доли общей изменчивости, объясняемой соответствующими главными координатами

Данные дендрограммы, построенной на основе традиционного индекса Мориситы-Хорна (рис. 9.2а), отражают это разделение. В рамках всех исследуемых периодов (июнь, июль, сентябрь) пробы «волжского» и «окского» потока группируются в отдельные кластеры. И в целом, пробы окского потока июньского и июльского периодов отстоят наиболее далеко от остальных проб. Исключение составляла лишь станция №6 в июньский период, что связано с большими попусками воды плотиной Нижегородской ГЭС в это время, в результате чего часть водохранилищного планктона попадала в правобережный окский поток. Кроме различия двух потоков, хорошо заметны и сезонные различия видовой структуры – пробы волжского потока каждого сезона группируются в отдельные кластеры.

На дендрограмме, построенной на основе функционального индекса Сёренсена (рис. 9.2б), больше заметны как раз сезонные различия видовой структуры. Наиболее отделен от других кластер проб июльского волжского потока, затем – волжские сентябрьские пробы (разделенные на два кластера), а после уже выделяются кластер проб окского потока в июньский и июльский периоды,

и кластер, объединяющий окские пробы в сентябрьский период и волжские пробы июня. Таким образом, в данном случае различия видовой структуры планктонных сообществ двух потоков менее заметны, поскольку при учете функциональных признаков пробы, принадлежащие разным сообществам, оказываются гораздо ближе друг к другу, чем при расчете традиционных таксономических индексов. Это отражается и на расстоянии между элементами классификации в целом – расстояния между пробами при функциональном подходе значительно меньше, чем при учете только таксономической структуры. Это естественно вытекает из используемой методологии, поскольку мы снижаем расстояние между видами зоопланктона, обладающими сходными функциональными признаками.

Как и результаты кластеризации, результаты ординации с помощью двух подходов (рис. 9.2в, г) во многом согласуются между собой – в обоих случаях наиболее далеко от других проб расположены пробы, отобранные в июле на акватории Чебоксарского водохранилища, а также пробы окского потока. Однако таксономический подход большее значение придает различиям проб Чебоксарского водохранилища и р. Оки (на диаграмме они сгруппированы вдоль первой главной координаты, отображающей 30.2% от общей дисперсии), в то время как подход с учетом функциональных признаков располагает наиболее далеко от основной массы пробы волжского потока, отобранные в июле (на диаграмме расположены вдоль первой главной координаты, отображающей 77.1% от общей дисперсии) и в сентябре (располагаются вдоль второй главной координаты, отображающей 10.3% дисперсии). Очевидно, это связано с доминированием разных функциональных групп зоопланктона на протяжении вегетационного сезона, обусловленным сезонной динамикой составляющих исследуемые сообщества популяций видов зоопланктона. В частности, в июльский период в сообществе «волжского потока» доминировали крупные виды рачкового планктона, относящиеся к первичным фильтраторам (*Daphnia galeata* (G.O. Sars, 1863), *Eudiaptomus gracilis* (Sars, 1862)) и активным хищникам (*Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857)), в то время как в июне и в сентябре в большей степени доминировали мелкие коловратки-вертикаторы, такие как *Keratella cochlearis* (Gosse, 1851), *Conochilus unicornis* (Rousselet, 1892), *Euchlanis dilatata* (Ehrenberg, 1832). В окском планктоне на протяжении вегетационного сезона также доминировали коловратки-вертикаторы: *Brachionus calyciflorus* (Pallas, 1776), *Synchaeta pectinata* (Ehrenberg, 1832) и *Brachionus quadridentatus* (Hermann, 1783), что обуславливает близость на ординационной диаграмме проб зоопланктона р. Оки к пробам Чебоксарского водохранилища в июне и сентябре.

Фактически, в нашем случае учет функциональных признаков свёл большую часть дисперсии структуры зоопланктона к первой главной координате, что во многом упрощает визуальный анализ различий.

Для упрощения интерпретации значений главных координат можно выявить их связь со средневзвешенными значениями признаков в пробах (community-weighted mean, CWM):

$$CWM_u = \sum_i t_{ui} p_i, \quad (9.12)$$

где суммирование ведется по всем видам пробы, t_{ui} – значение признака u у вида i , p_i – относительная представленность вида i .

Конкретно для использованных нами для анализа сообществ зоопланктона признаков можно сказать, что CWM для размера представляет собой средний размер особей в конкретной пробе, а CWM для всех остальных дихотомических признаков представляет собой долю особей, являющихся носителями данного признака. Для интерпретации главных координат мы рассмотрели их взаимосвязи со средневзвешенными значениями всех признаков в виде регрессионных моделей. Подчеркнем, что CWM и значения главных координат не являются независимыми, поскольку для расчета и тех, и других используются представленности видов в пробах. Поэтому статистический анализ соответствующих регрессионных моделей используется не для доказательства наличия взаимосвязи, а исключительно для выявления наиболее очевидных связей.

На рис. 9.3 представлены графики зависимости среднего размера, долей хищников, вертикаторов и первичных фильтраторов от первой главной координаты при использовании подхода на основе функциональных признаков. Следует отметить, что ось абсцисс на рис. 9.3 полностью соответствует ординационной диаграмме на рис. 9.2г, поэтому пробы расположены в том же порядке: все пробы р. Оки, затем пробы, взятые в июне и сентябре на Чебоксарском водохранилище, и, наконец, июльские пробы Чебоксарского водохранилища. Из рис. 9.3 следует, что в таком порядке систематически возрастает доля крупного планктона, количество хищников, (соответственно, снижается доля нехищного зоопланктона), доля первичных фильтраторов, тогда как доля вертикаторов снижается.

Действительно, мы знаем, что в зоопланктоценозе «окского» потока (с реофильными чертами) на протяжении вегетационного сезона доминировали преимущественно мелкие коловратки-вертикаторы, в первую очередь – *Brachionus calyciflorus*. Данный вид являлся фактически монодоминантом в июне и июле, а в сентябре к числу доминирующих видов присоединялись *Synchaeta pectinata* и *Brachionus quadridentatus*. В водохранилищном (лимнофильном) зоопланктоценозе «волжского» потока доля крупного рачкового планктона была гораздо более существенной по сравнению с сообществом «окского» потока. Особенно ярко это было выражено в июле, когда в ценозе доминировали активный хищник *Mesocyclops leuckarti*, а также первичные фильтраторы, в частности – *Daphnia galeata*, и копепоиды Copepoda и др. Поэтому рис. 9.3 хорошо отражает различия структуры двух планктонных сообществ, а также закономерности их сезонной динамики.

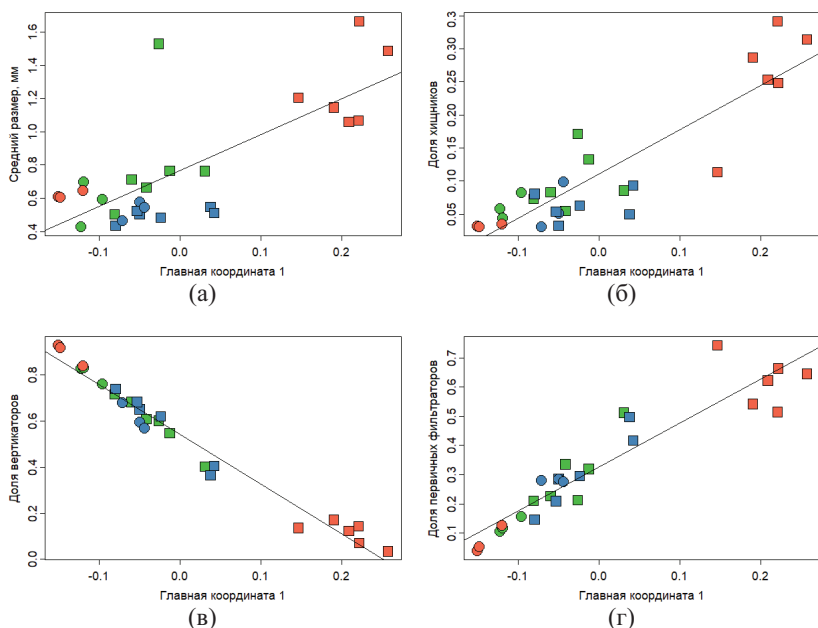


Рис. 9.3. Зависимость средневзвешенных значений признаков от первой главной координаты ординационной диаграммы, построенной на основе функционального сходства (см. рис. 9.2г). Система обозначений проб соответствует рис. 9.2

Таким образом, при сравнении двух подходов к кластерному анализу и ординации зоопланктоценозов можно сделать вывод о том, что учет функциональных признаков зоопланктона позволяет получить более обобщенную, интегральную картину. При этом, акцентируется внимание на сезонных изменениях состава доминирующих функциональных групп в исследуемых сообществах, и меньше внимания уделяется таксономическим различиям между ними. Функциональному подходу в настоящее время уделяется всё большее внимание учёных в связи с тем, что полученные на его основе данные позволяют фокусироваться не на изучении таксономических групп, а на выявлении закономерностей функционирования экологических сообществ. Кроме того, учет функциональных признаков зоопланктона позволяет наглядно представить происходящие в сообществах функциональные изменения, что может быть полезно в практике экологического мониторинга.

Список литературы

- Баканов А.И.* Количественная оценка доминирования в экологических сообществах // Фундаментальный обзор индексов обилия и доминирования. Рукопись деп. в ВИНТИ 08.12.1987, № 8593-B87. – 63 с.
- Боруцкий Е.В., Степанова Л.А., Кос М.С.* Определитель Calanoida пресных вод СССР. – Л.: Наука, 1991. – 504 с.
- Коровчинский Н.М.* Ветвистоусые ракообразные отряда Stenopoda мировой фауны (морфология, систематика, экология, биогеография). – М.: КМК, 2004. – 410 с.
- Котов А.А.* Морфология и филогения Anomopoda (Crustacea: Cladocera). – М.: КМК, 2013. – 638 с.
- Крылов А.В.* Зоопланктон равнинных малых рек. – М.: Наука, 2005. – 263 с.
- Кутикова Л.А.* Бделлоидные коловратки фауны России. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 315 с.
- Кутикова Л.А.* Коловратки фауны СССР. – Л.: Наука, 1970. – 742 с.
- Маркевич Г.И.* Морфофункциональные аспекты питания пресноводных Calanoida (Crustacea, Copepoda) // Трофические связи в водных сообществах и экосистемах: Материалы междунар. конф. 28–31 октября 2003. – Борок, 2003б. – С. 80.
- Маркевич Г.И.* Трофические адаптации ротаторий. Челюстной аппарат и пищевые спектры // Трофические связи в водных сообществах и экосистемах: Материалы междунар. конф. 28–31 октября 2003. – Борок, 2003а. – С. 79.
- Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидро-биологических исследованиях на пресноводных водоемах // Зоопланктон и его продукция. – Л.: Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва, 1982. – 33 с.
- Монаков А.В.* Питание и пищевые предпочтения пресноводных копепод. – Л.: Наука, 1976. – 170 с.
- Монаков А.В.* Питание пресноводных беспозвоночных. – М.: Тип. Россельхозакадемии, 1998. – 306 с.
- Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 1. Зоопланктон / Под ред. В.Р. Алексеева, С.Я. Цалолихина. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – 495 с.
- Рылов В.М.* Cuscloroida пресных вод Фауна СССР. Ракообразные / Т.3, вып. 3. Изд-во Академии наук СССР. – Москва – Ленинград, 1948. – 162 с.
- Смирнов Н.Н.* Chydoridae фауны мира. Фауна СССР. Ракообразные / Т.1. Вып. 2. – Л.: Наука, 1971. – 553 с.
- Смирнов Н.Н.* Macrotrichidae и Moinidae фауны мира. Фауна СССР. Ракообразные / Т.1. Вып. 3. – Л.: Наука, 1976. – 237 с.
- Стойко Т.Г., Мазей Ю.А., Сенкевич В.А.* Планктонные коловратки Пензенских водоемов. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2016. – 166 с.
- Суцены Л.М.* Количественные закономерности питания ракообразных. – Минск, «Наука и техника», 1975. – 208 с.

Чуйков Ю.С. Анализ трофической структуры планктонного сообщества // Основы изучения пресноводных экосистем. – Л.: Зоологический ин-т АН СССР. – 1981. С. 45 – 52.

Чуйков Ю.С. Материалы к кадастру планктонных беспозвоночных бассейна Волги и Северного Каспия. Коловратки (Rotatoria). – Тольятти, 2000. – 195 с.

Шурганова Г.В. Динамика видовой структуры зоопланктоценозов в процессе их формирования и развития (на примере водохранилищ Средней Волги: Горьковского и Чебоксарского): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Нижний Новгород, 2007. – 48 с.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В. Методы выделения и идентификации сообществ гидробионтов // Экологический мониторинг. Методы биологического и физико-химического мониторинга. Часть VII: Учебное пособие под ред. проф. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2011. – С. 121–155.

Экологический мониторинг. Часть 9: учебное пособие / под ред. проф. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2017. – 151 с.

Якимов В.Н., Шурганова Г.В., Черепенников В.В. и др. Методы сравнительной оценки результатов кластерного анализа структуры гидробиоценозов (на примере зоопланктона реки Линда Нижегородской области) // Биология внутренних вод. – 2016. – № 2. – С. 94–103.

Benedetti F., Gasparini S., Ayata S. Identifying copepod functional groups from species functional traits // Journal of Plankton Research. – 2016. – Vol.38– №1. – P. 159–166.

Bledzki I., Rybak J. Freshwater Crustacean Zooplankton of Europe Cladocera & Copepoda (Calanoida, Cyclopoida). – Switzerland: Springer International Publishing, 2016. – 918 p.

Korovchinsky N. Cladocera: Ctenopoda. Families Sididae, Holopedidae & Pseudopenilidae (Branchiopoda: Cladocera). Identification Guides to the Plankton and Benthos of Inland Waters. – Backhuys Publishers Margraf Publishers GmbH, 2018. – 204 p.

Kotov A., Bekker E. Cladocera: Family Euryterceridae (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda). Identification Guides to the Plankton and Benthos of Inland Waters. – Backhuys Publishers Margraf Publishers GmbH, 2016. – 97 p.

Kotov A., Stifter P. Cladocera: Family Ilyocryptidae (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda). Identification Guides to the Plankton and Benthos of Inland Waters. – Backhuys Publishers, Kenobi Productions, 2006. – 177 p.

Ochiai A. Zoogeographical studies on the soleoid fishes found in Japan and its neighbouring regions // Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. – 1957. – V.22. – №.9. – P. 526–530.

Orloci L. An Agglomerative Method for Classification of Plant Communities // Journal of Ecology. – 1967. – V.55. – №.1. – P. 193–206.

Orlova-Bienkowskaja M. Cladocera: Anomopoda. Daphniidae: genus Simocephalus. Identification Guides to the Plankton and Benthos of Inland Waters. – Backhuys Publishers, 2001. – 135 p.

Shurganova G.V., Kudrin I.A., Yakimov V.N., Gavrilko D.E., Zhikharev V.S., Zolotareva T.V. Spatial Distribution of Zooplankton on the Upper Part of the Cheboksary Reservoir // *Inland Water Biology*. – 2018. – Vol.11. – №3. – P. 317-325.

Violle C., Navas M., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I., Garnier E. Let the concept of trait be functional! // *Oikos*. – 2007. – V.116. – №5. – P. 882–892.

БИОДИАГНОСТИКА В КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Антропогенное загрязнение водной среды продолжает оставаться одной из актуальных экологических проблем современного общества (Моисеенко, 2009). Это диктует необходимость проведения исследований влияния антропогенного загрязнения водной среды на организмы и структурно-функциональные характеристики отдельных популяций гидробионтов, их сообществ и целых водных экосистем, нормирования допустимого уровня содержания загрязняющих веществ в водных объектах, осуществления экологического мониторинга и прогнозирования экологических рисков. Одним из главных современных подходов в решении названных задач является система комплексной оценки состояния водных экосистем (Чуйко и др., 2018).

В основе такой системы, наряду с методами физико-химического количественного и качественного анализа антропогенных и экзогенных природных факторов, лежат методы **биодиагностики**, позволяющие оценить степень и последствия действия этих факторов на водные организмы и экосистемы (рис.10.1).



Рис. 10.1. Компоненты комплексной системы оценки эколого-токсикологического состояния водных объектов

Под **биодиагностикой** подразумевают использование ответных реакций биологических систем на разных уровнях их организации на действие природных и антропогенных факторов для оценки состояния биоты и качества среды ее обитания (рис. 10.2) (Чуйко и др., 2018). Биодиагностика включает биомаркирование, биотестирование и биоиндикацию в соответствии с уровнями биологической организации: суборганизменный, целый организм, надорганизменный.

Биомаркирование служит для оценки степени воздействия этих факторов на состояние здоровья гидробионтов с использованием **биомаркеров** – морфо-функциональных показателей, регистрируемых на суборганизменном и орга-

низменном уровнях биологической организации, таких как молекулярно-генетический, биохимический, физиологический и гистологический (Adams, 2002; Лукьянова, 2001; Чуйко, 2014).

Биотестирование позволяет оценить токсичность воды и донных отложений по общим биологическим реакциям на уровне целого организма (выживаемость, размножение, рост, двигательная активность и т.п.) с использованием лабораторных культур тест-организмов разных экологических уровней (микроорганизмы, простейшие, одноклеточные водоросли, беспозвоночные, икра, мальки и взрослые рыбы) (Флеров, 1983).

Биоиндикация – это обнаружение и определение экологического значения антропогенных нагрузок на водный объект на основе определения качественных (видовой состав) и количественных (численность, биомасса, видовое разнообразие) характеристик различных биоценозов гидробионтов (Никаноров, Иваник, 2014). Еще одно определение биоиндикации – оценка качества среды обитания и её отдельных характеристик по состоянию её биоты в природных условиях (Снакин, 2008), но оно носит более общий характер.

При этом разные методы системы комплексной оценки не конкурируют, а взаимно дополняют друг друга. Каждый из них имеет свои преимущества и ограничения. Только их использование в комплексе может дать наиболее информативную картину экотоксикологического состояния водного объекта.

Количественный и качественный анализ физико-химическими методами позволяет оценить природу действующего фактора и дать его количественные характеристики, но не дает ответа на вопрос о степени его влияния на биоту.

Главное преимущество биодиагностики перед физико-химическими методами анализа – способность выявить биологические последствия действия отдельно взятого стресс-фактора или их совокупности. При этом биодиагностические методы позволяют регистрировать аддитивность, антагонизм и синергичность их совместного действия.

Биомаркирование от других биодиагностических методов (биотестирования и биоиндикации) отличает оперативность ответа от нескольких минут до нескольких дней, высокая чувствительность и достаточная специфичность, т.е. возможность зарегистрировать происходящие в биологической системе изменения на ранних этапах действия факторов при их низкой интенсивности и при этом идентифицировать природу стресс-фактора. В отношении ксенобиотиков (соединений, имеющих чужеродное для организма происхождение) – это выявление их действия на организм или уровня их биоаккумуляции при хронических экспозициях в сублетальных дозах (концентрациях), когда еще другими методами это воздействие зарегистрировать не представляется возможным, и установление природы действующего вещества (тяжелые металлы, фосфорорганические пестициды, хлорорганические соединения, полициклические ароматические углеводороды и т.д.). Однако экологическая значимость ответа биомаркеров не всегда и не столь очевидна (Чуйко, 2014; Чуйко и др., 2018).

Биотестирование обладает меньшей оперативностью ответа, чем биомаркирование (от нескольких часов до нескольких недель), но экологическая значимость на уровне основных биологических функций отдельной особи более

очевидна: гибель организма, снижение репродуктивной способности вплоть до прекращения воспроизводства, нарушение роста, развития и различных типов поведения и т.д.



Рис. 10.2. Блок-схема эффектов, вызываемых на разных уровнях биологической организации при воздействии стресс-факторов (Чуйко и др., 2018)

Биоиндикация характеризуется достаточно большим временем запаздывания ответных реакций надорганизменных биосистем (популяция, сообщество,

экосистема) на действие стресс-фактора от нескольких недель до нескольких лет. В то же время она даёт возможность более адекватно и надёжно оценить изменения в экосистемах, произошедших за длительный промежуток времени действия негативного фактора, спрогнозировать варианты дальнейшего развития экосистем, т.е. биоиндикация имеет высокую экологическую значимость.

Схема соотношения чувствительности и оперативности биологического ответа с его эколого-биологической значимостью для разных компонентов биодиагностики представлена на рис. 10.3.



Рис. 10.3. Соотношение чувствительности и оперативности биологического ответа с его экологической значимостью для разных компонентов биодиагностики

На современном этапе развития системы биодиагностики и ее полноценного практического использования одной из важных задач является выявление причинно-следственных связей между ответами, полученными на разных уровнях биологической организации: суборганизменном для биомаркеров, целого организма при биотестировании (выживаемость, рост, размножение) и надорганизменном при биоиндикации, характеризующем состояния популяции, сообщества, экосистемы. Вторая важная задача – установить зависимости «доза (концентрация) – биологический эффект» на всех уровнях биологической организации.

В связи с особенностями ответных реакций на разных уровнях биологической организации биомаркирование и биотестирование чаще используется в **оперативном**, а биоиндикация – в **долгосрочном биомониторинге** экологического состояния пресноводных объектов и антропогенного влияния на них. При этом применяются как активные, так и пассивные приемы биомониторинга.

В случае **активного экологического биомониторинга** тест-организмы из лабораторных культур, природных популяций или искусственные тест-системы (биосенсоры и биочипы) в лабораторных условиях подвергают дозированным воздействиям природного (природные и сточные воды, донные отложения) или экспериментального (растворы химических веществ, физические воздействия) фактора или заселяют (помещают) их в тестируемую внешнюю среду *in situ* (Чуйко и др., 2018). У этих тест-организмов или тест-систем регистрируют биологические ответы и их динамику. При активном биомониторинге применяют такие методы биодиагностики как биомаркирование и биотестирование.

В случае **пассивного экологического биомониторинга** используются только тест-организмы из природных популяций, отловленные в естественных условиях при их постоянном контакте с факторами внешней среды, и у них регистрируют биологические ответы и их динамику (Чуйко и др., 2018). При этом наиболее подходящими биодиагностическими методами являются биомаркирование и биоиндикация. Используя биомаркеры, следует иметь в виду, что их ответы при пассивном и активном экологическом биомониторинге могут несколько отличаться. В первом случае тест-организмы, биомаркеры которых используются, адаптированы к конкретным природным условиям, в том числе и к наличию в среде их обитания загрязняющих веществ, в то время как во втором случае они адаптированы к лабораторным условиям, характеризующимся стабильностью и отсутствием негативных факторов в среде их обитания.

Таким образом, биодиагностика, включающая биомаркирование, биотестирование и биоиндикацию, играет важную роль в современной комплексной системе оценки экологического состояния водных объектов и антропогенного влияния на них. В основе использования методов биодиагностики лежит концепция связи дозы (концентрации) воздействующего фактора со степенью выраженности ответной биологической реакции биоты, с одной стороны, и причинно-следственных связей биологических ответов на разных уровнях биологической организации, с другой.

10.1. Биомаркеры и биомаркирование

История введения в практику и использования биомаркеров в гидроэко-токсикологических исследованиях достаточно подробно описаны ранее (Чуйко, 2014; Чуйко и др., 2018). Следует лишь отметить, что идея разработки и использования *биомаркеров* сформировалась в 50-е – 70-е гг. XX столетия по мере осознания того, что регистрация токсичности только по показателю смертности является недостаточной для правильной оценки влияния антропогенного загрязнения и других неблагоприятных факторов окружающей среды на водные организмы и экосистемы.

Биомаркер, сокращенное от *биологический маркер* – термин, обозначающий измеряемый параметр или событие (процесс, явление), происходящее в биологической системе или биологическом образце на суборганизменном и организменном уровне биологической организации (молекула, клетка, ткань, физиологическая система, организм).

В гидроэко-токсикологии *биомаркеры* обычно используются как индикаторы состояния здоровья или риска проявления патологии (нарушения функции) гидробионтов, либо как индикаторы воздействия на организм химических загрязняющих веществ или *ксенобиотиков* (соединений, имеющих чужеродное для организма происхождение).

Результаты, полученные на уровне организма, интерпретируются как отражение более общего состояния организма (выживаемость, рост, размножение) или состояния популяции, сообщества, экосистемы. Взаимосвязь эффектов на разных уровнях биологической организации, вызываемых действием загрязняющих веществ, представлена на схеме (рис. 10.4).

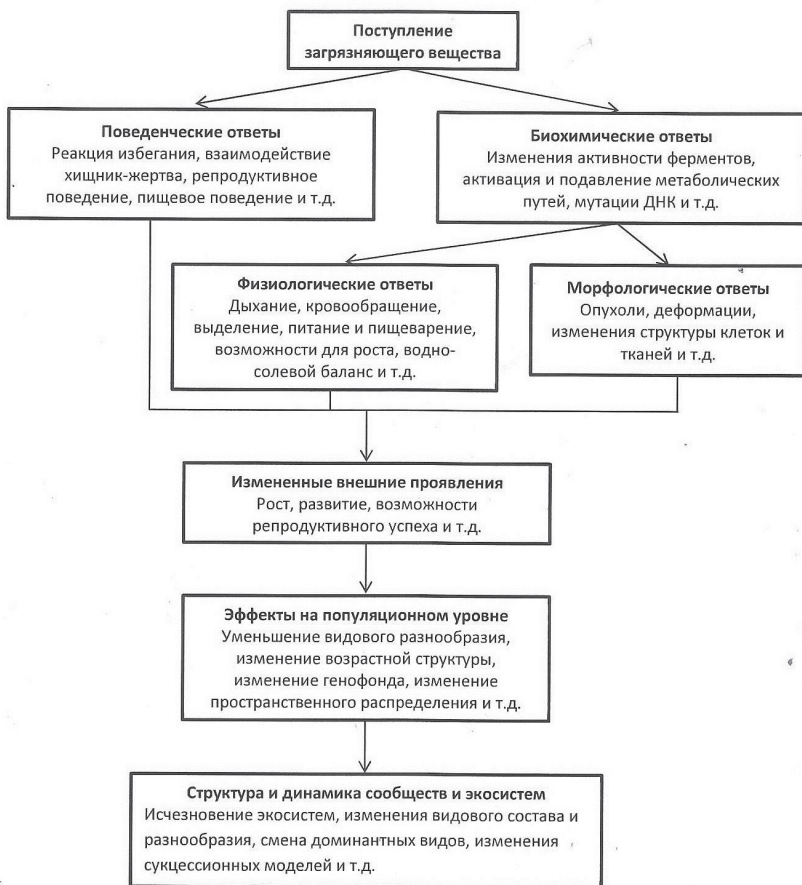


Рис. 10.4. Блок-схема эффектов, которые может вызывать на разных уровнях биологической организации воздействие загрязняющих веществ (Sheehan, 1984, цит. по Чуйко и др., 2018)

В настоящее время в качестве биомаркеров используют следующие параметры организма: молекулярно-генетические изменения на уровне ДНК; функциональные белки, включая ферменты; метаболиты; неспецифические иммунологические, гистопатологические и физиологические ответы. Однако не каждый показатель, отражающий изменения на суборганизменном уровне в ответ на действие стресс-фактора может претендовать на роль *биомаркера*. Более подробно критерии этого выбора описаны ранее (Чуйко, 2014; Чуйко и др., 2018).

На блок-схеме показаны последовательность изменений в организме и их возможные последствия для него при антропогенном воздействии на окружающую среду (рис. 10.5).

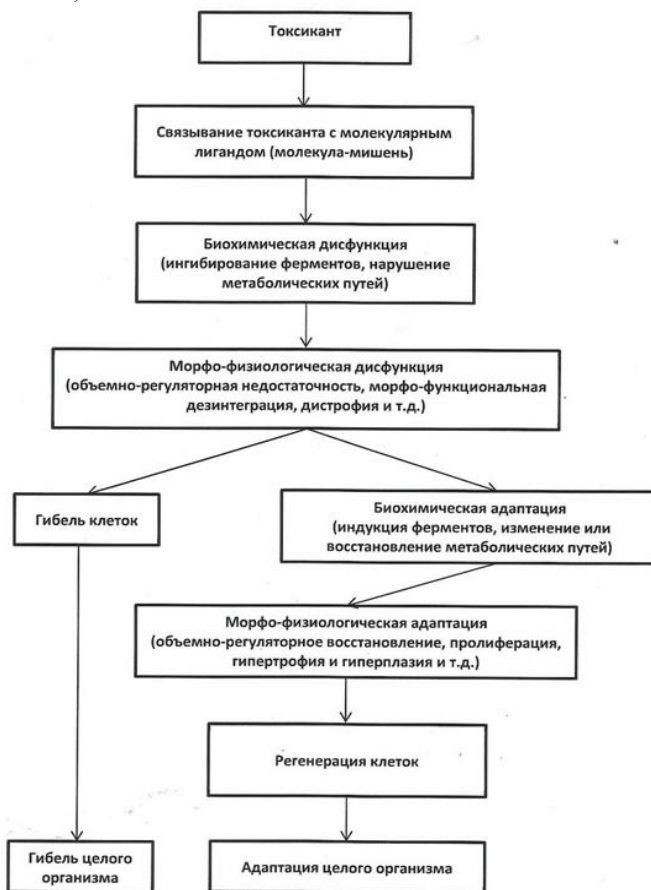


Рис. 10.5. Блок-схема двух вариантов интегрированного биохимического, морфофункционального и целостного ответа организма на действие токсиканта (модифицировано по: Hinton and Lauren, 1990, цит: по Чуйко и др., 2018)

Многие *биомаркеры* были разработаны и успешно применялись с целью количественной оценки токсических эффектов в лабораторных условиях и, прежде всего, в медицине и ветеринарии для человека и животных в диагностических целях. На решение важных экологических проблем, и в частности, гидроэкологических, эти методы направлены не были. Чтобы иметь применение в гидроэкологической, физиологические и биохимические показате-

ли токсического действия или токсических эффектов должны включать разные группы гидробионтов и быть применимы не только в лабораторных, но и в полевых условиях и отвечать ряду требований.

Во-первых, использование *биомаркеров* в гидроэкотоксикологии ограничивается недостатком базовых данных по биохимии и физиологии гидробионтов в «нормальных» физиологических диапазонах (норма реакции). Развитие таких знаний для каждого *биомаркера* наряду с установлением статистической значимости его определения является существенным для их внедрения в практику.

Во-вторых, гидробионты в своей массе относятся к *конформерам*, т.е. состояние их внутренней среды следует за изменениями внешней среды. Эти различия не позволяют механически использовать данные, полученные на млекопитающих и человеке, и требуют отдельного и тщательного изучения адаптивных реакций и токсических эффектов у гидробионтов. Решение проблемы четкого разделения адаптивных ответов и токсических эффектов у водных организмов позволит проводить правильный выбор *биомаркеров* для выполнения гидроэкотоксикологических исследований и задач.

На рис. 10.6 сравнивается характер ответов гидробионтов на биохимическом/морфофункциональном и организменном/популяционном уровнях в зависимости от интенсивности действия внешнего фактора. В гомеостатическом и адаптивных диапазонах воздействия фактора организм или популяция функционирует нормально. При этом биохимические и морфофункциональные параметры организма меняются в пределах нормы реакции или его адаптивных возможностей. При более сильных воздействиях, соответствующих токсическому диапазону, когда превышены адаптивные возможности организма или популяции на биохимическом и морфофункциональном уровнях, в биологической системе развиваются патологические изменения. Еще более сильные воздействия приводят к гибели организма или популяции.

Экологическая полезность и информативность многих биомаркеров у гидробионтов до сих пор не установлена, т.к. их проверка и всесторонняя оценка в полевых условиях все ещё не выполнена. Поэтому, хотя полевые исследования и более сложны для проведения, чем лабораторные эксперименты, выяснение экологической значимости биомаркеров должно быть приоритетным интересом исследователей.

В идеальном случае ответ биомаркера должен позволять спрогнозировать эффекты в биологической системе на более высоком уровне биологической организации. Как было отмечено выше, для каждого биомаркера, чтобы быть эффективно применимым в полевых условиях, должна быть установлена связь с такими биологически значимыми показателями как выживаемость, рост или размножение и т.п. Значимым может считаться любой эффект, который обуславливает изменения в размере, структуре или состоянии популяции, сообщества или экосистемы.

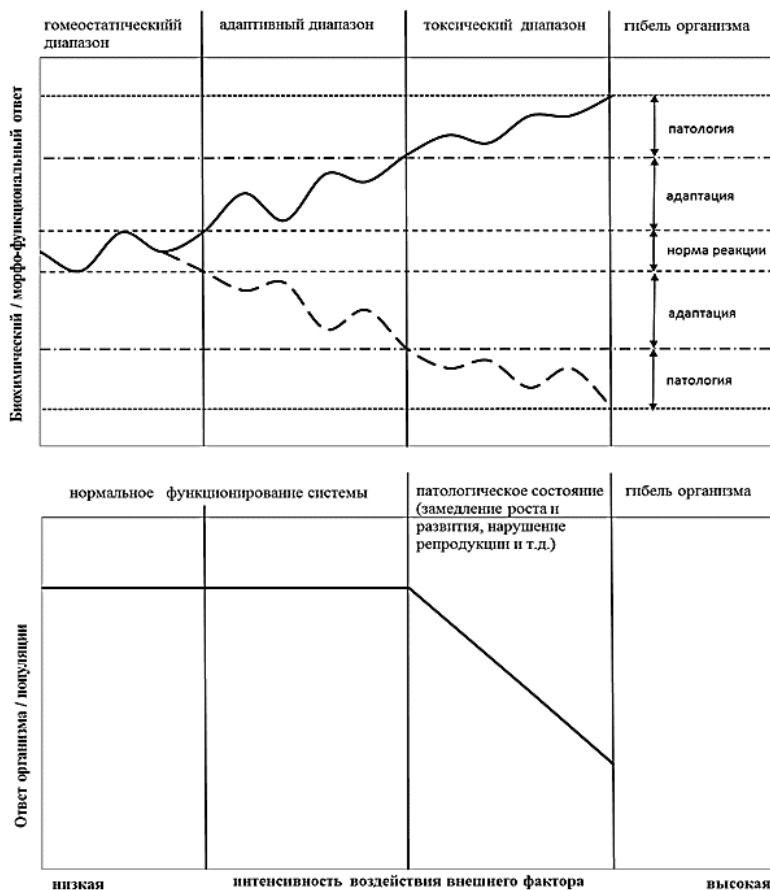


Рис. 10.6. Сравнение биохимических и морфофункциональных ответов с ответами целого организма и популяции гидробионтов при действии разных по интенсивности факторов внешней среды (модифицировано по: Versteeg et al., 1988, цит: по Чуйко и др., 2018)

Биомаркеры можно условно разбить на три большие группы: биомаркеры воздействия, биомаркеры эффекта и биомаркеры чувствительности. Однако некоторые биомаркеры могут быть одновременно отнесены к разным группам (Чуйко, 2014; Чуйко и др., 2018).

Биомаркером воздействия может выступать экзогенное соединение (или его метаболит) внутри организма (биологической системы), продукт взаимодействия между соединением (или метаболитом) и эндогенным компонентом,

либо другое событие, связанное с воздействием конкретного химического или физического экзогенного фактора.

Биомаркеры воздействия являются *специфическими* и позволяют выявить факт воздействия конкретного фактора на организм или его присутствия в окружающей среде. Примером *биомаркера* этого типа может быть содержание метаболитов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в желчи, полихлорированных бифенилов (ПХБ), хлорорганических пестицидов (ХОП) и металлотионеинов в тканях, активность АХЭ в мозге или крови, индукция ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени рыб и др. Оценка *биомаркеров воздействия* должна проводиться с учетом временных особенностей экспозиции и применительно к различным составным частям (компартаментам) организма. Наибольшую прогностическую ценность имеют те *биомаркеры воздействия*, для которых установлена функциональная или потенциальная корреляция с нарушениями здоровья организма или гидробионтов.

Биомаркером эффекта может выступать эндогенный компонент или параметр функциональной способности, либо другой показатель состояния равновесия организма или системы органов, на которые оказано воздействие, признаваемый как морфофункциональное нарушение или заболевание. Примером *биомаркера* этого типа могут служить показатели состояния окислительного стресса, белки теплового шока (БТШ) или стресс-белки, активность АХЭ в мозге, содержание глюкозы в крови, индукция ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени и др. *Биомаркеры эффекта*, как правило, являются индикаторами отклонений от нормального состояния организма. Обычно они указывают на изменения функции клеток, тканей, отдельных органов и организма в целом. Эти биомаркеры могут быть *специфическими* и *неспецифическими*. *Специфические биомаркеры* указывают на биологический эффект конкретного типа воздействия. Примером такого *биомаркера* служит активность АХЭ в мозге рыб. В результате ее снижения под действием ФОП и карбаматов, нарушается проведение нервного импульса в холинергических синапсах, и развиваются симптомокомплексы отравления организма нейропаралитического типа. *Неспецифические биомаркеры* не указывают на конкретную причину эффекта, но отражают общий, комплексный характер комбинированного воздействия. К такому типу *биомаркеров* относятся набор показателей, указывающий на развитие в клетке состояния *окислительного стресса*: продукты перекисного окисления липидов ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты,) и содержание карбонильных групп в белках, изменение активности ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза, глутатион-S-трансфераза и др.) и содержания низкомолекулярных компонентов (восстановленный и окисленный глутатион, каротиноиды, витамин С (аскорбат), витамин Е (токоферол) и другие антиоксиданты) системы антиоксидантной защиты в различных тканях организма. К этому же типу относятся БТШ.

Биомаркерами чувствительности являются показатели, связанные с природными особенностями функционирования организма гидробионтов (стадии онтогенеза, периоды годового цикла и т.д.), которые делают его более восприимчивым к воздействию ксенобиотиков. Примером могут служить биомаркеры,

регистрируемые у рыб на ранних стадиях онтогенеза – эмбриональное развитие и личиночная стадия, когда их организм наименее устойчив к токсическому воздействию.

Таким образом, в настоящее время *биомаркеры* являются важным инструментом в гидрэкотоксикологии, который используется при изучении антропогенного влияния на водные организмы и экосистемы, помогает понять механизмы этого влияния и оценить его последствия. Разработка новых *биомаркеров* и совершенствование уже имеющихся является одной из важных задач ученых-экологов. Подобно другим инструментам *биомаркеры* имеют свои преимущества и недостатки, которые должны быть учтены при их выборе, применении и интерпретации полученной с их помощью информации. Необходимы дополнительные развернутые исследования нормы реакции базовых уровней всех показателей, используемых в настоящее время и претендуемых на использование в качестве *биомаркеров* у широкого ряда видов гидробионтов.

Вместе с тем, на основе научных знаний требуется более широкое внедрение *биомаркеров* в природоохранную деятельность и сферу практической экологии. Понимание их значимости и активное использование специалистами и руководителями, работающими в сфере промышленной экологии и управления природными ресурсами, поможет им принимать правильные административные решения при прогнозировании последствий влияния на окружающую водную среду хозяйственной деятельности человека и оценки состояния водных ресурсов и экосистем. При этом нужно понимать, что *биомаркеры* не являются альтернативой существующих методов химического контроля содержания загрязняющих веществ в водной среде. Они их удачно дополняют и в комплексе с другими методами биодиагностики представляют собой целостную систему мониторинга, позволяющую дать полную количественную и качественную оценку антропогенного загрязнения, выявить эффекты его влияния на биоту и спрогнозировать влияние на экосистему водного объекта.

Заключительным этапом должно быть нормативно-правовое и законодательное подтверждение применения *биомаркеров* в различных областях человеческой деятельности.

10.2. Биотестирование

Длительное время химический анализ был единственным методом оценки качества окружающей природной среды. Однако химический анализ – это лишь констатация факта существования или отсутствия каких-либо химических элементов в пробе. Он не отражает «поведение» химических веществ, влияния на живые объекты, как прямого, так и косвенного. Токсические вещества должны быть доступными для гидробионтов. Так как даже при возможности определения содержания всех загрязняющих веществ в объекте исследования, такая информация была бы недостаточна для прогнозов. Кроме того, результат комбинированного действия двух и более токсических веществ, имеющихся в исследуемом образце в небольших количествах, предсказать достаточно сложно. Нетоксичные соединения при изолированном действии могут вызывать значи-

тельный негативный эффект при комбинированном. Поэтому для оценки токсичности природных вод, донных отложений, почвы, промышленных сбросов и прочих объектов окружающей среды, а также новых химических веществ используют тесты на различных живых организмах.

Биотестирование как метод исследования используют специалисты различных областей науки: в экотоксикологии – для анализа воды, донных отложений и почв, в гуманитарной и ветеринарной медицине – для исследования свойств внутренних сред высших организмов, в сельском хозяйстве – для экспресс-тестирования кормов на токсичность, в химии – для первичной оценки свойств новых веществ и т.д. При этом, само понятие "биотестирование" зачастую истолковывают по-разному, приспосабливая этот термин к тому или иному узкому кругу задач и объектов.

Слово «тест» означает опыт, исследование, испытание. У американских и западноевропейских токсикологов существуют термины «bioassay» и «biotest», которые означают оценку действия токсических веществ на живые организмы в стандартных условиях. Такое же определение дано в докладе Временной научно-технической комиссии «О современном состоянии и перспективах развития научно-исследовательских работ по биотестированию природных и сточных вод»: «под «биотестом» понимается оценка (испытание) в строго определенных условиях действия вещества или комплекса веществ на подопытные организмы путем регистрации изменений того или иного биологического (или физиолого-биохимического) показателя исследуемого объекта по сравнению с контролем» (Флеров, 1983).

Более короткое определение **биотестирования** – это оценка токсических свойств окружающей среды по их воздействию на биологические объекты или процессы в стандартных условиях. Данная формулировка включает в сферу рассмотрения любые методы, в которых используются биологические объекты. Это позволяет анализировать и сопоставлять биологические тесты, применяемые в разных областях, с единой точки зрения.

Цель биотестирования – выявление на гидробионтах степени и характера токсичности сред (вода, водная вытяжка, донные отложения, почва и т.д.), загрязненных биологически опасными веществами, и оценка потенциальной опасности этой среды для водных и других организмов в контролируемых (лабораторных) условиях (Гелашвили и др., 2016).

В процедуре биологического тестирования различают: острые тесты продолжительностью от нескольких минут до 96 часов по показателям выживаемости различных тест-объектов; краткосрочные хронические тесты длительностью 7 суток, которые заканчиваются как правило после получения первого поколения тест-объектов; хронические тесты, охватывающие полный жизненный цикл или несколько поколений организмов, в которых оцениваются нарушения жизненных функций организмов (плодовитость, стадии развития и морфоанатомические изменения, сокращение продолжительности жизни).

Характеристика и качество выполнения биотестирования зависят от выбора: тест-организмов; условий проведения эксперимента; выбора тест-реакции и тест-критерия организмов. Выбор тест-организмов определяется их

распространенностью, простотой содержания и культивирования в лабораторных условиях, чувствительностью к загрязняющим веществам. Наиболее распространенными биологическими тест-объектами являются: микроорганизмы, водоросли, простейшие, планктонные рачки, насекомые и другие группы беспозвоночных, позвоночные животные, растения, клеточные культуры. Рекомендуются для целей биотестирования группы гидробионтов и методы учета представлены в работе (Чуйко и др., 2018).

При биотестировании оперируют рядом понятий и определений.

Токсичность – (от греч. *toxikon* – яд), способность химических соединений вызывать патологию (заболевание) или гибель организмов. Токсичность можно охарактеризовать как степень химического воздействия, нарушающего биологические системы на различных уровнях организации. Различают острую и хроническую токсичность. Под острой токсичностью понимается гибель или глубокая патология организмов, развивающаяся за короткий промежуток времени. Как правило, токсикологические острые опыты имеют экспозицию 24, 48 и 96 часов. Хроническая токсичность выявляется при длительном воздействии токсикантов (недели, месяцы, года или полный жизненный цикл).

Критерии токсичности определяются уровнем организации биологических систем. Критерий токсичности на организменном уровне (по Н.С. Строгонову) – снижение выживаемости, воспроизводства (плодовитости) и качества потомства. Это основные критерии сохранности вида. На популяционном уровне приняты следующие критерии: сохранение баланса между рождаемостью и смертностью, снижение продуктивности, сдвиги в соотношении полов в сторону преобладания самцов, переход от партеногенеза к половому размножению, появление карликовых форм. На биоценотическом – критерием токсичности является сохранение устойчивой структуры биоценоза (видовой состав, доминантные формы, численность биомассы, соотношение основных систематических групп в биоценозе). Критерий токсичности на экосистемном уровне – сдвиг равновесия в экосистеме в сторону снижения соотношения первичной продукции и деструкции, поскольку в основе функционирования экосистем лежит биотический круговорот, включающий два противоположных процесса: первичное продуцирование, базирующееся на фотосинтезе, и расход органического вещества в сети потребления – деструкция. В норме соотношение продукции к деструкции равно единице. Чем дальше от 1 и ближе к 0, тем более глубоко нарушена экосистема.

Тест-объект – организм, используемый при оценке токсичности химических веществ, природных и сточных вод, почв, донных отложений, кормов и др. По определению Л.П. Брагинского тест-объект – «датчик» сигнальной информации о токсичности среды и заменитель сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) водной среды («да» или «нет»), независимо от того, обусловлена ли она наличием одного аналитически точно определяемого вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ, например, сточные воды.

Тест-реакция (функция) – изменение (ответ) какого-либо морфологического, биохимического, поведенческого или функционального показателя тест-организма под воздействием токсических веществ, содержащихся в окружающей среде или тестируемом объекте. Тест-функции в биотестировании носят общий, неспецифический характер. Однако количество загрязняющих веществ, попадающих в окружающую среду, неуклонно возрастает и не исключено, что какое-либо вещество, или смесь веществ, может привести к возникновению специфических реакций у тест-объектов, особенно на клеточном или тканевом уровнях организации.

Тест-параметр – количественное выражение тест-реакции.

Чувствительность – способность организмов реагировать на различные раздражители, это проявление первой реакции на химические вещества.

Устойчивость – способность переносить внешние воздействия, т.е. выживать в условиях загрязнения среды обитания. Оценка устойчивости организма проводится по концентрации загрязняющих веществ, вызывающих определенный процент гибели тест-объектов. Обычно устанавливается 50%-ная гибель организмов за 24, 48 или 96 часов. Это основная токсикологическая характеристика.

Измерительная система (прибор) – дает количественную характеристику ответной реакции тест-объекта на воздействие внешних факторов.

Воспроизводимость результатов – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по данной методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разные операторы, разные лаборатории, разное время).

Сходимость результатов – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, в одних условиях (один оператор, одна лаборатория, одно и то же время).

В настоящее время в мировой практике для исследовательских целей используется более сотни различных методов биотестирования.

Биотестирование как метод оценки токсичности водной среды используется:

- ❖ при проведении токсикологической оценки загрязненных природных, промышленных, сточных бытовых, сельскохозяйственных, дренажных и прочих вод с целью выявления потенциальных источников загрязнения;
- ❖ в контроле аварийных сбросов высокотоксичных сточных вод;
- ❖ при проведении оценки степени токсичности сточных вод на разных стадиях формирования при проектировании локальных очистных сооружений;
- ❖ для оценки состояния водных экосистем (токсичность природной воды и донных отложений);
- ❖ для определения ПДК новых химических соединений и экологической экспертизы новых материалов;
- ❖ оценки токсичности почвы;
- ❖ оценки токсичности воздуха;

- ❖ оценки токсичности лекарственных препаратов и продуктов питания;
- ❖ при скрининге токсичности вновь синтезируемых химических веществ;
- ❖ для установления класса опасности твердых бытовых отходов.

Развиваются два основных направления работ по биотестированию: 1) подбор методик с использованием гидробионтов, охватывающих основные иерархические структуры водной экосистемы и звенья трофической цепи; 2) поиск наиболее чувствительных тест-организмов, которые позволили бы уловить низкий уровень токсичности при обеспеченной гарантии надежности информации.

Требования, предъявляемые к методикам биотестирования:

- ❖ чувствительность тест-организмов к малым концентрациям загрязняющих веществ;
- ❖ доступность тест-организмов для сбора, простота культивирования и содержания в условиях лаборатории;
- ❖ возможность получать надежные результаты, метрологическая обеспеченность методик;
- ❖ простота выполнения процедуры и технических приемов биотеста;
- ❖ низкая себестоимость работ по биотестированию.

Факторы, влияющие на результаты биотестирования: 1) факторы, влияющие на тест-организмы (в лабораторных условиях – экспозиция, условия культивирования; в природе – условия жизни растений и животных; возраст, сезон года, обеспечение тест-организмов пищей, температура, освещенность); 2) факторы, определяющие физико-химические свойства тестируемой среды, от которых зависит ее токсичность для тест-организмов (свежесть пробы, наличие в ней взвешенных частиц, гранулометрический состав и т.д.).

В результате биотестирования проб на основе регистрации показателей токсичности делают оценку токсичности по критериям, установленным для каждого тест-объекта. Результаты биотестирования опытной пробы с исследуемого участка сравнивают с контрольной, заведомо нетоксичной пробой и по разнице в контроле и опыте судят о наличии токсичности. При этом эффекты воздействия разделяют на острые и хронические. Их обозначают как острое и хроническое токсическое действие (ОТД и ХТД) или как острую и хроническую токсичность (ОТ и ХТ). Эти термины и используют для выражения результатов биотестирования.

Острое токсическое действие – действие, проявляющееся за период экспозиции к токсическому фактору не более 96 ч и заканчивающееся гибелью организма. Токсикометрический критерий: ЛК₅₀ (LC₅₀) – летальная (смертельная) концентрация (lethal concentration), вызывающая гибель 50% и более тест-организмов по сравнению с контролем за 24-96 ч экспозиции или ЛД₅₀ (LD₅₀) – летальная (смертельная) доза (lethal dose), вызывающая гибель 50% и более тест-организмов за 24-96 ч экспозиции.

Хроническое токсическое действие – действие, проявляющееся за период экспозиции к токсическому фактору более 96 ч и проявляющееся в специфическом симптомокомплексе отравления, который включает изменение внешнего вида, нарушение поведения и проявления физиологических функций организ-

ма. Измеряют по тест-реакциям: выживаемость, плодовитость, изменение роста, изменение массы, поведенческие реакции (двигательная активность, реакция избегания, интенсивность питания) и т.п. Токсикометрический критерий: ЭК₂₀ (ЕС₂₀) – эффективная концентрация (effect concentration), вызывающая изменения в регистрируемых параметрах у 50% тест-организмов более чем за 96 ч экспозиции или ЭД₂₀ (ED₂₀) – эффективная доза (effect dose), вызывающая изменения в регистрируемых параметрах у 20% тест-организмов за более чем 96 ч экспозиции.

Основные группы тест-организмов, применяемые для целей биотестирования, включают:

Низшие ветвистоусые ракообразные. Низшие ракообразные используются в биотестировании с начала XX века. Сегодня многие из них закреплены в качестве стандартных тест-культур в международных и российских документах по оценке качества водных сред. Самым распространенным тест-организмом является *Daphnia magna*.

Биологические особенности *D. magna* делают этих рачков ценными тест-организмами с явными преимуществами перед другими видами (Олькова, Фокина, 2015):

- ❖ удобство и относительная простота культивирования;
- ❖ использование генетически однородной молодежи в биотестировании, что обеспечивается партеногенетическим размножением и поддержанием синхронизированной культуры, которой считается группа особей, находящихся на одной стадии развития;
- ❖ быстрое созревание рачков: при оптимальной температуре ($+20\pm 2^{\circ}\text{C}$) и хорошем питании – 5-8 суток, длительность эмбрионального развития 3–4 дня;
- ❖ регулярное (каждые 3–4 дня) и многочисленное появление молодежи (количество молодежи у молодых самок – 10–15, у зрелых – до 40 особей);
- ❖ достаточно высокий уровень организации (что особенно важно – наличие кровеносной и нервной систем), позволяющий экстраполировать токсикологические результаты на других многоклеточных представителей экосистем и даже человека;
- ❖ крупные размеры особей, дающие возможность проводить визуальные наблюдения за многими ответными реакциями без использования специальных средств измерений;
- ❖ чувствительность дафний к широкому спектру загрязняющих веществ; - сравнительная простота выполнения эксперимента, не требующая высокой квалификации исполнителя.

В 1984 году представители американской школы Д. Маунт и Т. Норберг предложили для целей биотестирования наряду с *D. magna* и *D. pulex* использовать вид *Ceriodaphnia affinis*. По сравнению с тестом на дафниях он позволяет за более короткий срок дать заключение о наличии хронической токсичности водной среды.

Одноклеточные водоросли. Одноклеточные водоросли – следующая популярная группа тест-организмов, в основном это *Scenedesmus quadricaudata*, *S.*

capricornutum и *Chlorella vulgaris*. Основные факторы, определяющие выбор одноклеточных водорослей в качестве тест-объектов – это высокий темп деления клеток, способность водорослей развиваться в условиях клональной, моно- и смешанной культуры, приспособленность к регулярному пересеву. В качестве тест-параметра используют рост водоросли за 96 часов – интенсивность фотосинтеза, основанную на ассимиляции меченой углекислоты за 24 ч. В опытах с хлореллой учитывают видимые изменения, происходящие с колониями: изменение количества, размеров, цвета и структуры поверхности.

На современном этапе развития биотестирования чаще используются «приборные» методы по определению уровня флуоресценции хлорофилла клеток и прироста биомассы. Основным недостатком определения токсичности с использованием водорослей является высокая восприимчивость к биогенным элементам, что проявляется в стимуляции роста даже на фоне присутствия в пробе токсических веществ.

Простейшие. Широкое распространение получили методы биотестирования, основанные на изучении роста простейших, чаще всего инфузорий. Эти тест-объекты имеют короткий жизненный цикл развития, технически легко выращиваются в больших количествах в лабораторных условиях и позволяют получать экспресс-информацию об интегральном качестве окружающей среды. Наиболее известные тест-организмы – инфузории *Tetrachymena pyriformis*, *Stylonichia mytilus*, *Paramecium caudatum*. Наряду с выживаемостью, самая распространенная тест-реакция – положительный или отрицательный хемотаксис. Кроме того, о токсичности среды можно судить и по некоторым физиологическим реакциям: образованию пищеварительных и работе сократительных вакуолей. Используется и инфузория *Spirostoma ambiguum* (Сарапульцева, Тушмалова, 2011). Спиростомы широко распространены в природных водоемах и хорошо размножаются в лабораторных условиях. Относительно большие размеры (длина до 1 мм, ширина до 50 мкм) позволяют анализировать многие морфофункциональные характеристики этих простейших с помощью микроскопического оборудования. Регистрируемые параметры: двигательная активность, форма тела, темпы деления, выживаемость.

Рыбы. Опыт токсикологических исследований свидетельствует, что и рыбы и дафнии являются лимитирующим объектом в 77% случаев (Филенко, 1989). Для биотестирования используют аквариумных живородящих рыбок гуппи *Poecilla reticulata* или данио *Danio rerio*. Регистрируемые параметры: выживаемость, продолжительность эмбрионального развития, количество выклюнувшихся свободных предличинок и число уродливых особей.

Некоторые из методов биотестирования используются только в научных исследованиях, другие аттестованы и допущены для экологического и государственного контроля. Специалистами Госкомэкологии РФ в 1997 г. рекомендовано использовать для государственного экологического контроля 8 тест-организмов (табл. 10.1).

**Методы биотестирования, рекомендованные для государственного
экологического контроля (Жмур, 1997)**

Методы биотестирования	Тест-организмы	Критерии токсичности
Определение токсичности воды, почв и донных отложений по ферментативной активности бактерий	Линофилизированные мутантные бактерии <i>Escherichia coli</i>	Изменение интенсивности окрашивания исследуемой среды
Определение токсичности воды по ингибированию темпа роста водорослей	Зеленые водоросли <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedecmus quadricauda</i>	Изменение численности клеток водорослей за 96 час экспозиции (острая токсичность). Изменение численности водорослей за 14 сут (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий	инфузории <i>Paramecium caudatum</i>	Хемотаксическая реакция (хемотаксис)
Определение токсичности воды по жизнедеятельности дафний	ветвистоусые рачки <i>Daphnia magna</i>	Смертность 50% за 96 час (острая токсичность). Достоверное снижение плодовитости за 30 сут в сравнении с контролем (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды по жизнедеятельности цериодафний	ветвистоусые рачки <i>Ceriodaphnia dubia (affinis)</i>	Смертность 50% за 48 час (острая токсичность). Достоверное снижение плодовитости за 7 сут в сравнении с контролем (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды по жизнедеятельности рыб	рыбы <i>Poecilia reticulata</i> <i>Danio rerio</i>	Смертность 50% за 96 час. Статистически значимое снижение плодовитости за 30 сут экспозиции

Наиболее универсальными тест-объектами по чувствительности, адекватности реагирования на содержание в воде различных загрязняющих веществ являются дафнии и цериодафнии. Однако при содержании тест-культуры возникают трудности, т.к. эти ветвистоусые рачки могут реагировать на присутствие в лаборатории паров различных химических веществ и фоновое загрязнение (например, железа) в культивационной воде.

Культивирование водорослей – при тщательном соблюдении условий культивирования менее сложная процедура. Но при наличии в исследуемой воде повышенного содержания биогенных веществ сложно интерпретировать результаты из-за регистрируемого стимулирующего эффекта.

Использование в качестве тест-организма инфузорий упрощает процедуру биотестирования, но имеет свои трудности в интерпретации результатов. Так, *Paramecium caudatum* обладает низкой чувствительностью к содержанию тяжелых металлов, а к действию органических соединений может иметь положительный хемотаксис.

Использование аквариумных рыб в качестве тест-объекта характеризуется относительно низкой чувствительностью к действию токсических веществ и сложностью культивирования.

Контактные методы биотестирования

В последнее время активно развиваются *контактные методы биотестирования*, востребованные для оценки качества таких субстратов как почва, донные отложения, твердые бытовые отходы. Особенно это касается донных отложений, т.к. использование донных отложений в качестве индикатора состояния водной среды имеет ряд преимуществ: во-первых, они имеют более длительную “память” на внешнее воздействие, чем такая динамичная среда, как вода. Во-вторых, уровни содержания химических элементов в донных отложениях на несколько порядков превышают их концентрацию в толще воды. В-третьих, относительно простая процедура отбора, хранения и подготовки проб делает такие работы доступными для сравнительно скромно оборудованных лабораторий.

Цель биотестирования донных отложений – определение опасности для бентосных организмов всего комплекса содержащихся в их составе загрязняющих веществ. Выбор тест-организмов для биотестирования донных отложений должен базироваться на соответствии природным реалиям и соображениям практического характера. Так, для биотестирования твердой фазы должны использоваться организмы бентоса, для водной вытяжки – представители планктона. При этом необходимо соблюдать следующие условия:

- ❖ чувствительность тест-объектов к изучаемым веществам;
- ❖ возможность стандартизации используемых методик;
- ❖ тест-организмы должны иметь прямой контакт с донными отложениями;
- ❖ возможность культивирования тест-организмов в лабораторных условиях или доступность при полевом сборе;
- ❖ используемые организмы должны легко идентифицироваться и иметь экологическую значимость.

В качестве тест-организмов при оценке токсичности нативных донных отложений используются поденки *Hexagenia limbata*. Регистрируемые показатели: смертность, сроки линьки и реакция избегания. Изменения в поведении поденки при строительстве норки может также служить признаком загрязнения донных отложений токсикантами.

Виды рода *Chironomus* широко применяются при тестировании цельного грунта, который служит одновременно и местом обитания, и питательным субстратом. Личинки комаров считаются относительно нечувствительными тест-организмами. В качестве тест-объектов используются такие виды, как *Chironomus riparius*, *Ch. plumosus*, *Ch. dorsalis*, *Ch. decorus*, *Paratanytarsus parthenogeneticus*. Регистрируемые параметры: выживаемость, линейный рост, продолжительность развития до стадии куколки, процент вылета имаго. В качестве дополнительного показателя используют частоту встречаемости морфологических нарушений хирономид, в т.ч. деформаций ротового аппарата.

Для адекватной оценки качества донных отложений тесты по определению их токсичности желательно проводить в комбинации с другими методами, такими как оценка состояния бентосных сообществ (биоиндикация). Видовой состав и количественные характеристики бентосных организмов служит хорошим, а в ряде случаев и единственным, гидробиологическим показателем за-

загрязнения грунта. В достаточно чистых водоемах донные сообщества в хорошо аэрируемых участках дна характеризуется высоким видовым разнообразием, что свидетельствует о нормальном их состоянии. В загрязненных водоемах выпадают группы организмов, наиболее чувствительные к отдельным загрязнителям, происходит видоизменение состава биоценоза, иногда катастрофическое. Однако изменение структуры бентосного сообщества или отсутствие тех или иных видов бентосных организмов не обязательно является следствием токсического эффекта.

Специализированные методы биотестирования

Заслуживают внимания *специализированные методы биотестирования*: интенсивно развиваются *биосенсорные* методы выявления токсичности вод. Биосенсорами, т.е. чувствительными элементами в них, служат ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты, микробные клетки. К числу явных преимуществ биосенсорных методов анализа можно отнести их направленность на определение конкретных загрязняющих веществ. При разработке новых биосенсорных методик биотестирования токсичности водной среды особое внимание в ряду тест-объектов занимают светящиеся бактерии. Природные штаммы этих бактерий, а также генно-инженерные конструкции, используют в качестве биологической основы биосенсоров – биоэлектронных систем, позволяющих в режиме *on line* регистрировать гибель, или изменение параметров метаболизма живых систем.

В основе механизма действия *биочипов* лежит молекулярное распознавание анализируемых молекул молекулами биополимерами, нанесёнными на чип. Распознавание построено либо на взаимодействии рецепторов с лигандами (например, антител с антигенами), либо на гибридизации комплементарных цепей ДНК. Устройство представляет собой обычно стеклянную или пластиковую пластину с микротестами на основе ДНК или белков, чаще ферментативных, которые при облучении светом могут излучать люминесценцию разного цвета. На поверхности ДНК-чипа иммобилизованы олигонуклеотиды. При добавлении анализируемого образца комплементарная таргетная ДНК в образце формирует дуплекс с олигонуклеотидом на чипе. В результате генерируется сигнал, свидетельствующий о наличии в пробе соответствующего объекта (инфекции, онкомаркера и т. п.). Технология микрочипов нашла широкое применение в связи с высокой чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения и широким спектром анализа, и, конечно, низкой стоимостью проведения процедуры.

«Приборные» методы биотестирования

Microtox, Toxcontrol Biomonitor, «Биотокс»

Предназначен для быстрого количественного контроля на основе биoluminesцентного анализа степени интегральной токсичности проб воды и водных вытяжек из различных объектов окружающей среды в лабораторных условиях для медицинских, санитарно-гигиенических, экологических целей. Регистрируемые параметры: интенсивность биoluminesценции лиофилизированных морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum*.

В РФ на основе генно-инженерной технологии разработан биосенсор “Эколом”, который был положен в основу прибора “Биотокс-10”. Основные области применения: 1) исследование питьевой воды, природных водоемов, почвы и воздуха на содержание вредных веществ; 2) контроль возможной токсичности материалов и лекарственных средств; 3) контроль безопасности продуктов питания.

Algae Toximeter

Образец тестируемой воды постоянно накачивается в тестовую камеру прибора, где концентрация и активность живущих в природе водорослей – т.е. смеси разных видов – определяется с помощью фотосинтетической активности хлорофилла в зеленых водорослях. Затем точно определенное количество водорослей из ферментера добавляется в тестовую камеру. Активность добавленных водорослей остается постоянной до тех пор, пока в воде не появятся вредные вещества. В случае наличия химического соединения, его взаимодействие с центрами фотосинтеза приводит к подавлению активности водорослей (и продукции кислорода). Это подавление измеряется количественно и после превышения заранее выбранного порога срабатывает сигнал тревоги. Применяется для системы водоснабжения, мониторинга поверхностных вод, мониторинга очищенных сточных вод.

Daphnia Toximeter

Система раннего оповещения, включающая плавательное поведение планктонных рачков дафний, использовалась многие годы для биомониторинга поверхностных вод. В последние годы была разработана улучшенная система, использующая анализ видео изображения рачков. Тестируемая вода постоянно проходит через камеру с дафниями. Фотоснимки, записанные вэб-камерой, обрабатываются в реальном времени. Проводится анализ следующих изменений в поведении тест-организмов: статистически значимые изменения скорости движения (средней скорости, распределения по скоростям, высота плавания), пространственное расположение рачков в колонке воды, фрактальные показатели размерности (измерения поворотов и круговых движений, закручиваний), определение количества и размера дафний (рост).

Fish Toximeter

Разработана система биомониторинга на основе использования рыб в качестве тест-организмов. Первоначально, хемотаксис или эффект избегания были теми изменениями в поведении, которые использовались как индикаторы наличия токсикантов в воде. Рыбам позволялось выбирать между водой из чистого источника и тестируемой водой (дихотомические каналы). Параллельно, положительный реотаксис (свойство плыть против течения) и способность плыть против течения (стамина) был использован, как биологический ответ, который нашел применение в системе Aqua-Tox-Control. В настоящее время в качестве модельного тест-объекта используется *Danio rerio*. Регистрируемые параметры: скорость движения, местоположение в пространстве, повороты, вращательные движения, живые/мертвые особи, ростовые показатели.

MusselMonitor®, *Dreissena Monitor®*

Биологическая система, разработанная в Нидерландах и производимая под торговой маркой «Musselmonitor», применяемая во многих странах мира в основном для контроля пресных и, иногда, прибрежных морских вод, а также в водопроводе г.Будапешт (Венгрия), для контроля качества хлорированной питьевой воды путем мониторинга степени раскрытия раковин двустворчатых моллюсков. Принцип работы этой системы, впервые примененной в 1980-е (Kramer et al., 1989, цит: по Чуйко и др., 2018), заключается в том, что при дыхании и питании створки раковин моллюсков открыты. При стрессе они закрывают створки, и это рассматривается как поведение избегания. При стрессе, вызванном химическим загрязнением воды, моллюски могут значительно изменять частоту открытий-закрытий. При измерении текущее поведение створок сравнивается с поведением створок того же моллюска примерно за 1 час до этого. Значительные изменения, когда, например, 5 из 8 моллюсков закрыты в течение 5 минут, приводят к выработке сигнала тревоги (de Zwart et al., 1995, цит: по Чуйко и др., 2018).

Перечисленные методы не исчерпывают области применения биотестов для оценки загрязнения окружающей среды и прогноза влияния токсикантов на живую природу. На современном этапе основной принцип практического лабораторного биотестирования водных сред – применение одновременно 3-4 методов с использованием тест-организмов, представляющих разные трофические группы: бактерии (сапрофиты и нитрофикаторы, осуществляющие процессы самоочищения; водоросли и высшие растения – первичные продуценты, дающие начало большинству пищевых цепей в водоеме; дафнии, один из основных фильтраторов и седиментаторов в пресных водоемах (Гелашвили и др., 2016)). Все условия проведения биотестирования (состав культивационных сред, световой и температурный режимы и др.) должны быть максимально стандартизированы, что необходимо для получения воспроизводимых результатов, выполняемых в разных лабораториях.

Методы биотестирования прочно закрепились в природоохранной практике, хотя перечень используемых аттестованных методик и тест-функций крайне ограничен. Необходима разработка новых методик биотестирования, ориентированных на оценку тест-функций ранней диагностики, предусматривающих использование современного оборудования.

10.3. Биоиндикация

Биоиндикация в гидробиологии – это обнаружение и определение экологического значения антропогенных нагрузок на водный объект на основе определения качественных (видовой состав) и количественных (численность, биомасса, видовое разнообразие) характеристик различных биоценозов гидробионтов (Никаноров, Иваник, 2014: цит. по Чуйко и др., 2018).

При биоиндикации изменения биологических систем всегда зависят как от антропогенных, так и от природных факторов среды. Эти системы реагируют на воздействие среды в целом в соответствии со своей предрасположенностью,

т.е. такими внутренними факторами, как условия питания, возраст, генетически контролируемая устойчивость и уже присутствующие нарушения.

Если различные антропогенные факторы вызывают одинаковые реакции, то говорят **о неспецифической биоиндикации**. Если же те или иные происходящие изменения можно связать только с одним фактором, то речь идет о **специфической биоиндикации** (Биологический контроль..., 2007: цит. по Чуйко и др., 2018).

Биоиндикаторы (от гр. *bios* – жизнь и лат. *indico* – указываю, определяю) – организмы, присутствие, количество или особенности развития которых служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды (Снакин, 2008: цит. по Чуйко и др., 2018).

В зависимости от типа ответной реакции биоиндикаторы подразделяют на **чувствительные** и **кумулятивные**. Чувствительные биоиндикаторы реагируют на стресс значительным отклонением от жизненных норм, а кумулятивные накапливают антропогенное воздействие, значительно превышающее нормальный уровень в природе, без видимых изменений.

Индикаторная значимость определяется экологической толерантностью биологической системы. В пределах зоны толерантности организм способен поддерживать свой гомеостаз. Любой фактор, если он выходит за пределы «зоны комфорта» для данного организма, является стрессовым. В этом случае организм реагирует ответной реакцией различной интенсивности и длительности, проявление которой зависит от вида и является показателем его индикаторной ценности.

В качестве биоиндикаторов могут быть использованы представители всех «царств» живой природы и их сообщества (Биологический контроль..., 2007: цит. по Чуйко и др., 2018).

Использование методов биоиндикации имеет ряд ограничений:

1. Необходимость привлечения специалистов-биологов различного, иногда достаточно узкого профиля;
2. В ряде случаев биоиндикаторы неспособны обозначить основную причину изменений, происходящих в природных экосистемах при одновременном воздействии многих факторов.
3. До сих пор не разработаны универсальные шкалы измерения силы (уровня) ответных реакций биоиндикаторов, позволяющие определить порог предельно допустимого отклонения значений биологических параметров от нормы (Котегов, 2007: цит. по Чуйко и др., 2018).

Требования, предъявляемые к биоиндикаторам

Требования, предъявляемые к биологическим индикаторам фоновых уровней загрязнения, выработаны эмпирически и в основном сводятся к следующему (Степанов, 1988).

Широкий ареал. Эндемичные виды и даже виды с узким ареалом не обеспечивают охвата всего многообразия физико-географических и иных условий достаточно крупных регионов.

Эвритопность. Виды, приуроченные к определенным стадиям сукцессии, не подходят для биоиндикационных исследований. С другой стороны, при ра-

боте с высокоэвритопными видами следует учитывать стадии сукцессии, на которых проводятся наблюдения. В противном случае в трактовке результатов могут быть ошибки.

Оседлость. Максимально допустимая миграция вида должна ограничиваться рамками одного ботанико-географического района.

Антисинантропность. Виды-индикаторы должны принадлежать к естественным сообществам и не быть связанными с человеком.

Индикационная пластичность вида. Наиболее удобен для биоиндикации загрязнений вид, совмещающий чувствительность и толерантность, т.е. способность функционировать при поступлении больших доз загрязняющих компонентов. При прочих равных условиях предпочтение следует отдавать организмам с коротким жизненным циклом, накопление экотоксикантов у которых отражает их содержание в окружающей среде в данный момент.

Достаточная масса пробы. Для получения представительных и пригодных для сопоставления с установленными в иных регионах (или в другое время) результатов приходится отбирать довольно большие пробы.

Удобство отбора проб. Биоиндикатор должен находиться в условиях, удобных для отбора проб (Исидоров, 1999: цит. по Чуйко и др., 2018).

Кумулятивные индикаторы должны характеризоваться положительной корреляцией между концентрацией загрязняющих веществ в организме-индикаторе и объекте исследования (Биологический контроль..., 2007: цит. по Чуйко и др., 2018).

В качестве биоиндикаторов загрязнения воды выступают отдельные таксоны, экологические группировки (например – фитопланктон, зоопланктон, макрозообентос, перифитон и т.д.), физиологически сходные организмы (например, имеющие одинаковый тип питания), размерные группы.

Обилие видов живых существ, населяющих водоем, сложность их взаимодействия как между собой, так и с окружающей средой, послужили причиной создания многочисленных вариантов методов оценки состояния природных вод. Большинство этих методов основано на оценке совокупности показателей: числа видов, численностей и биомасс популяций, населяющих водоем. Показатели можно разделить на следующие группы (Шитиков и др., 2005):

- ❖ простые, непосредственно характеризующие какой-либо индивидуальный компонент экосистемы (например, численность, биомасса или число видов в сообществе);
- ❖ комбинированные, отражающие компоненты с разных сторон (например, видовое разнообразие учитывает, как число видов, так и распределение их обилия);
- ❖ комплексные, использующие сразу несколько компонентов экосистемы (например, продукция, самоочищающая способность, устойчивость).

10.3.1. Биоиндикация по планктону

Планктон (от греч. *planktos* – блуждающий) – совокупность организмов толщи воды, не способных противостоять переносу течением.

Для индикации краткосрочных воздействий, вызывающих непродолжительные обратимые изменения среды, удобно ориентироваться по состоянию сообществ фито-, зоо- и бактериопланктона (табл. 10.2).

Таблица 10.2

Представители планктона внутренних водоемов

Группа	Представители
Вириопланктон	Планктонные вирусы, бактериофаги
Бактериопланктон	Аэробные сапрофитные бактерии (гетеротрофы), азотфиксирующие, хемосинтезирующие, споры бактерий
Фитопланктон	Цианобактерии, зеленые водоросли, золотистые, желтозеленые, диатомовые, пиропитовые, эвгленовые
Зоопланктон	Инфузории, коловратки, ветвистоусые рачки (дафнии, босмины), веслоногие рачки (циклопы)

Бактерии гетеротрофы чутко реагируют на загрязнение водоемов органическими веществами и используются как индикаторы для оценки степени её загрязнения. При оценке качества воды определяется отношение численности бактерий-сапрофитов к их общему количеству (Каплин, 2001: цит. по Чуйко и др., 2018).

Зоопланктон часто применяется в индикации трофности, причем существенная роль отводится коловраткам (Макрушин, 1974), которые являются фильтраторами-седиментаторами и питаются бактериями, детритом и водорослями. По мере эвтрофирования в планктоне увеличивается численность и биомасса мелких видов коловраток (Бакаева, Никаноров, 2006: цит. по Чуйко и др., 2018).

Признаком эвтрофирования можно считать резкое увеличение численности коловраток из семейств *Brachionidae* (*Brachionus angularis*, *B. calyciflorus*, *B. diversicornis*, *Keratella cochlearis*) и *Trichocercidae*, ветвистоусых ракообразных *Bosmina longirostris*, *Chydorus sphaericus*, *Daphnia cucullata* и некоторых других видов, а при устойчивом видовом составе – смену доминантов (Кутикова, 1976; Андроникова, 1993: цит. по Чуйко и др., 2018).

При эвтрофировании вследствие обогащения водоёма биогенными элементами и общего увеличения фито- и бактериопланктона часто наблюдается повышение общей численности зоопланктона. В различных озерах при эвтрофировании средняя численность зоопланктона или отдельных его групп за летний или вегетационный сезон может увеличиться в 2-5 раз. Увеличение биомассы обычно прослеживается не столь четко, т. к. это связано со структурной перестройкой сообщества и увеличением доли мелких форм.

По величине биомассы зоопланктона С.П. Китаев выделяет следующие трофические типы водоемов (Китаев, 1984: цит. по Чуйко и др., 2018):

- ❖ $< 0,5 \text{ г/м}^3$ – α -олиготрофный;
- ❖ 0,5-1,0 – β -олиготрофный;
- ❖ 1,0-2,0 – α -мезотрофный;
- ❖ 2,0-4,0 – β -мезотрофный;
- ❖ 4,0-8,0 – α -эвтрофный;
- ❖ 8,0-16,0 – β -эвтрофный;
- ❖ $\geq 16,0$ – гиперэвтрофный.

10.3.2. Биоиндикация по зообентосу

Зообентос (от греч. *зоон* – животное и *бентос*) совокупность животных, обитающих на грунте и в грунте морских и материковых водоёмов (Снакин, 2008: цит. по Чуйко и др., 2018).

Длительное воздействие загрязнения лучше оценивать по состоянию зообентоса, поскольку это долгоживущий компонент гидробиоценоза. Кроме того, он наиболее доступен учету и подробно изучен. Основу пресноводного макрозообентоса чаще всего составляют личинки насекомых, которые, по сравнению с другими гидробионтами, отличаются повышенной чувствительностью к токсическим воздействиям и другим изменениям среды.

Зообентос принято делить на микро-, мезо- (или мейо-) и макробентос. К мейобентосу относятся организмы длиной менее 0.1 мм, к мезобентосу – длиной от 0,1 до 2 мм, к макробентосу – более крупные.

По составу и структуре зообентоса предложено наибольшее количество методов биоиндикации:

- ❖ выявление видов-индикаторов сапробности (Pantle, Buck, 1955; Sládeček, 1973: цит. по Чуйко и др., 2018);
- ❖ индикация по соотношению числа видов или численности, или биомассе крупных таксонов (типов или классов) – олигохет, ракообразных, моллюсков; отрядов насекомых; подсемейств хирономид (Goodnight, Whitley, 1961; Пареле, 1975; Зиновьев, 1987; Балущкина, 1976: цит. по Чуйко и др., 2018);
- ❖ расчет биотических индексов (Woodiwiss, 1964; Пшеницына, 1986: цит. по Чуйко и др., 2018);
- ❖ оценка уровня таксономического разнообразия (Мэгарран, 1992; Протасов, Павлюк, 2004: цит. по Чуйко и др., 2018);
- ❖ индикация по соотношению трофических групп (Яковлев, 2000; Pavluketal., 2000: цит. по Чуйко и др., 2018);
- ❖ комбинированные индексы (Балущкина, 1995; Баканов, 2000; Зинченко и др., 2000: цит. по Чуйко и др., 2018).

Кроме достоинств, имеются и существенные недостатки использования зообентоса как биоиндикатора (Resh, 1995: цит. по Семенченко, 2004):

- ❖ требуется большое количество проб для осуществления достаточной выборки, что может оказаться дорогостоящим;

- ❖ факторы, воздействующие не прямым образом на качество воды, могут влиять на распределение и изобилие организмов;
- ❖ сезонные колебания могут усложнять интерпретацию и сравнение данных;
- ❖ явление дрифта может вносить существенный вклад в распределение организмов;
- ❖ слишком много методов используется для анализа;
- ❖ для некоторых групп неизвестна таксономия;
- ❖ макрозообентос не чувствителен к некоторым загрязнениям (болезнетворными организмами и некоторыми загрязняющими веществами).

Все методы биоиндикации существенно различаются по степени подробности учета структуры макрозообентоса. Для расчёта различных биоиндикационных индексов требуются разные исходные показатели, характеризующие:

- 1) тотальный макрозообентос (всё сообщество в целом, без учета его структуры);
- 2) отдельные группы, объединяющие бентонтов различных видов по принципу филогенетического, структурного или функционального сходства;
- 3) некоторые виды сообщества, обладающие наибольшей биоиндикационной ценностью (без учета всего видового состава макрозообентоса);
- 4) все виды, входящие в изучаемое сообщество.

В указанной последовательности (1-4) закономерно и взаимосвязано возрастают: степень подробности учета структуры сообществ; трудоемкость работы и требования к квалификации исследователя; точность и надежность результатов биоиндикации.

При этом исходные показатели из категорий 2-4, характеризующие структуру сообществ, могут быть:

- ❖ качественными, т.е. фиксировать только наличие или отсутствие особей конкретного вида (или представителей какой-либо группы видов);
- ❖ количественными, т.е. учитывать также показатели обилия особей данного вида или представителей данной группы.

Использование количественных исходных показателей, дополняющих качественные, обычно увеличивает диагностическую ценность биоиндикации.

Методам биоиндикации по уровню развития зообентоса, посвящено большое количество монографий (см., например, Руководство по ..., 1992; Семенченко, 2004; Шитиков и др., 2005: цит. по Чуйко и др., 2018), обзоров (Баканов, 2000; Безматерных, 2007: цит. по Чуйко и др., 2018), и учебных пособий (Алексеевнина, 2003; Крылов, 2006; Четропруд, Четропруд, 2010; Алексеевнина, Поздеев, 2016: цит. по Чуйко и др., 2018).

Список литературы

Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова,

Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 288 с.

Гелашвили Д.Б., Безель В.С., Романова Е.Б., Безруков М.Е. и др. Принципы и методы экологической токсикологии. – Нижний Новгород: изд-во Нижегородского университета, 2016. – 702 с.

Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. – М.: Международный дом сотрудничества, 1977. – 117 с.

Каплин В.Г. Биоиндикация состояния экосистем. Самарская ГСХА. – Самара, 2001. – 143 с.

Лукиянова О.Н. Молекулярные биомаркеры. – Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 2001. – 196 с.

Макрушин А.В. Биологический анализ качества вод. – Л: АН СССР, 1974. – 60 с.

Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. – М.: Наука, 2009. – 400 с.

Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. – М.: Мир, 1992. – 179 с.

Никаноров А.М., Иваник В.М. Словарь-справочник по гидрохимии и качеству вод суши. – Ростов н/Д.: Центр Печатных Технологий АртАртель, 2014. – 548 с.

Олькова А.С., Фокина А.И. *Daphnia magna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – № 4. – С. 380–389.

Сарапульцева Е.И., Тушмалова Н.А. Поведенческая активность простейших: место в иерархии критериев биотестирования окружающей среды // Вестник Московского ун-та. – 2011. – №3. – С. 3–6.

Семенченко В.П. Принципы и системы биоиндикации текучих вод. – Минск: Орех, 2004. – 125 с.

Филенко О.Ф. Некоторые принципы биотестирования токсичности загрязняемых природных вод // Методы биондикации и биотестирования природных вод. – Л.: Гидрометеиздат, 1989. – С. 185–193.

Флёров Б.А. Биотестирование: термины, задачи, перспективы // Теоретические вопросы биотестирования. – Волгоград, 1983. – С. 13–20.

Чуйко Г.М. Биомаркеры в гидроэкоотоксикологии: принципы, методы и методология, практика использования // Экологический мониторинг. Часть VIII. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем: Учебное пособие / Под ред. проф. Д.Б. Гелашвили, проф. Г.В. Шургановой. – Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского госуниверситета, 2014. – С. 310–326.

Чуйко Г.М., Томилина И.И., Холмогорова Н.В. Комплексная оценка биоэкологических и химических систем: учебное пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2018. – 140 с.

Adams S.M. (Ed). Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society Symposium 8. – Bethesda: AFS, 1990. – 191 p.

ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА ВАСИЛЬЕВИЧА ЧЕРЕПЕННИКОВА – НАСТАВНИКА, УЧИТЕЛЯ, ДРУГА, ЕДИНОМЫШЛЕННИКА, СОРАТНИКА

Что может связать людей на долгие годы? Единомыслие. Единомышленники, несмотря на разницу в возрасте и различия в статусе и образовании, одинаково реагируют на многие события, убеждаются в общем понимании и восприятии происходящего вокруг. Во многом это касается и формирования взглядов на научные проблемы. В обсуждениях этих проблем, порой связанных с преодолением мучительных сомнений, рождается понимание, ясность и уверенность в правильности выбранного вектора исследований. И тогда единомышленники становятся ещё и соратниками. Рождается желание работать и передавать этот настрой своим ученикам. И если они, ученики, тоже оказываются единомышленниками и соратниками, в этом и заключается большая сила и счастье учителя.

Терять единомышленников и соратников чрезвычайно трудно.

4 января 2019 г. перестало биться сердце нашего единомышленника, соратника, очень скромного, но очень талантливого, творческого и мудрого человека, который для многих стал учителем, многих вывел на нелегкий и интересный путь науки – Владимира Васильевича Черепенникова.

Владимир Васильевич – коренной нижегородец. Он родился 28 октября 1946 г. С золотой медалью закончил автозаводскую школу и поступил на радиофизический факультет Горьковского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. С университетом была связана вся его жизнь. Во время обучения в университете он специализировался на кафедре бионики и статистической радиофизики, студенты которой на протяжении двух лет обучались параллельно на биологическом факультете. Именно это позволило ему заложить университетские основы знаний по некоторым направлениям биологической науки: зоологии, анатомии, гистологии, физиологии человека и животных и др. Эти знания оказались очень полезными при дальнейшей работе с биологическими объектами и помогли грамотно анализировать происходящие в живой природе процессы.

После окончания университета Владимир Васильевич остался работать на кафедре бионики и статистической радиофизики ГГУ под руководством талантливого ученого и исследователя Аскольда Николаевича Малахова. Параллельно с работой на кафедре Владимир Васильевич несколько лет работал в НИИ прикладной математики и кибернетики, участвовал в интереснейших экспедициях, проходивших на Дальнем Востоке, на Черном море и других уголках нашей Родины. Уникальным проектом было строительство подводного дома на Черном море, прототипа современного экодому.

Наряду с занятиями на радиофизическом факультете более двух десятилетий читал лекции и вел практические занятия по курсу «Математика» для студентов направления «Биофизика» биологического факультета ННГУ.

Более четверти века Владимир Васильевич был ученым секретарем диссертационного совета по специальности «Радиофизика». Многие и многие кандидаты и доктора наук-радиофизики благодарны ему за помощь и поддержку на нелегком этапе защиты диссертаций и оформлении документов, которые всегда были подготовлены идеально, совет все эти годы работал без нареканий.

Трудно переоценить роль Владимира Васильевича в становлении и укреплении школы гидробиологов на кафедре экологии ННГУ. Он знал все проблемы и трудности гидробиологов, начиная от сбора материала в полевых условиях (на водоемах и водотоках), до грамотной обработки и публикации материала. Часто сам, не раздумывая, предлагал свою помощь – на своей машине выезжал на водные объекты и участвовал в сборе гидробиологических проб.

Владимир Васильевич много сил и времени уделял грамотной обработке собранного материала. До сих пор предложенный им оригинальный подход и метод многомерного векторного анализа в приложении к гидробиологическому материалу успешно и широко используется гидробиологами нашего университета и России. Метод многомерного векторного анализа позволяет получить «геометрические образы», адекватные видовой структуре сообществ гидробионтов, на основе представления видовой структуры зоопланктона как многомерной динамической системы. Владимир Васильевич впервые предложил и реализовал алгоритм выделения зоопланктоценозов, установления компонентов их различий. Это позволило провести количественную идентификацию планктонных сообществ, выявить расположение и динамику занимаемых ими акваторий водохранилищ и границ, определить направления и скорости перестроек видовой структуры сообществ зоопланктона на разных этапах существования водохранилищ. Анализ расположения областей, изображающих видовую структуру планктонных сообществ в многомерном пространстве, показал их дискретный, компактный характер. Этот подход вносит существенный вклад в решение теоретической проблемы континуальности и дискретности видовой структуры биотических сообществ.

Владимир Васильевич привносил культуру в исследования, беспокоясь о том, что биологи часто некорректно используют статистические методы для



Владимир Васильевич
Черепенников
(28.10.1946–04.01.2019)

динамических систем, тем самым сильно искажая результаты. Обобщение многолетних результатов исследований, решение ряда фундаментальных и традиционных в экологии проблем на новом методическом уровне позволило Владимиру Васильевичу совместно с гидробиологами кафедры экологии опубликовать ряд методических публикаций, которые помогают не только гидробиологам в их научной работе, но и чрезвычайно ценны как методические пособия и используются в учебном процессе Института биологии и биомедицины ННГУ, используются в ряде дисциплин: «Учение о гидросфере», «Морские и пресноводные экосистемы», «Современные проблемы гидробиологии» и др. Опубликованные в двух выпусках учебного пособия «Экологический мониторинг» (часть VII, VIII) методические разработки широко востребованы гидробиологами России. Научные исследования опубликованы в ряде престижных журналов из перечня ВАК, входящих в международные базы данных и системы цитирования: «Биология внутренних вод», «Поволжский экологический журнал», «Журнал Сибирского федерального университета», «Вода: химия и экология», «Известия Самарского научного центра РАН», «Inland Water Biology».

Большую помощь и реальную поддержку Владимир Васильевич оказывал соискателям-гидробиологам при подготовке диссертаций. Он был строгим, принципиальным и очень грамотным ученым, глубоко вникающим в тему научного исследования и способным вывести результаты исследований на новый уровень. Он привносил культуру исследований, и тем самым воспитывал будущих ученых.

Увлеченность и неравнодушие Владимира Васильевича, его вклад в формирование и становление коллектива гидробиологов, его неоценимая помощь и поддержка способствовали укреплению интереса к науке, формированию коллектива единомышленников и соратников.

Будем помнить, будем почитать, будем благодарить!

Сотрудники и выпускники кафедры экологии
Института биологии и биомедицины
ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Избранные публикации
Владимира Васильевича Черепенникова

Шурганова Г.В., Черепенников В.В., Артельный Е.В. Динамика пространственного распределения основных зоопланктоценозов Чебоксарского водохранилища // Поволжский экологический журнал. – 2003. – №3. – С. 297–304.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В., Артельный Е.В. Динамика численности дискриминантных видов основных зоопланктоценозов Чебоксарского водохранилища // Поволжский экологический журнал. – 2004. – №2. – С. 200–209.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В., Мельникова Е.И., Артельный Е.В. Многолетняя динамика некоторых показателей трофической структуры зоопланктонных сообществ Чебоксарского водохранилища // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. – 2004. – Вып. 3(5). – С. 97–102.

Черепенников В.В., Шурганова Г.В., Гелашвили Д.Б., Артельный Е.В. Исследование различий видовой структуры основных зоопланктоценозов Чебоксарского водохранилища методом многомерного анализа // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2004. – Т.6. – №2(12). – С. 328–333.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В., Крылов А.В., Артельный Е.В. Пространственное размещение и особенности зоопланктоценозов Горьковского водохранилища // Биологические ресурсы пресных вод: беспозвоночные. – Рыбинск: Изд-во ОАО «Рыбинский дом печати», 2005. – С. 384–396.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В. Мультифрактальный анализ видового разнообразия зоопланктоценозов водохранилищ Средней Волги (на примере Горьковского и Чебоксарского) // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. – 2005. – Вып.1(9). – С. 222–234.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В., Артельный Е.В. Динамика антропогенной сукцессии основных зоопланктоценозов Чебоксарского водохранилища // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. – 2005. – Вып. 2(10). – С. 107–114.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В. Формирование и развитие зоопланктонных сообществ водохранилищ Средней Волги // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2006. – Т.8. – №1. – С. 241–247.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В. Динамика видовой структуры зоопланктоценозов двух волжских водохранилищ в процессе их формирования и развития // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2010. – №3. – С. 267–277.

Шурганова Г.В., Черепенников В.В. Методы выделения и идентификации сообществ гидробионтов // Экологический мониторинг. Методы биологического и физико-химического мониторинга. Часть VII: Учебное пособие под ред. проф. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2011. – С. 121–155.

Шурганова Г.В., **Черепенников В.В.**, Тарбеев М.Л., Маслова Г.О. Видовая структура зоопланктона р. Сережа Нижегородской области // Вестник ННГУ. – 2012. – №3. – С. 120–125.

Шурганова Г.В., Кудрин И.А., Ильин М.Ю., **Черепенников В.В.** Характеристика пространственной и видовой структуры зоопланктона и оценка качества вод рек Кудьма и Линда Нижегородской области // Вода: химия и экология. – 2014. – №1(66). – С. 28–35.

Шурганова Г.В., **Черепенников В.В.**, Кудрин И.А., Ильин М.Ю. Характеристика современного состояния видовой структуры и пространственного размещения сообществ зоопланктона Чебоксарского водохранилища // Поволжский экологический журнал. – 2014. – №3. – С. 417–421.

Тарбеев М.Л., Шурганова Г.В., **Черепенников В.В.** Сезонные изменения пространственного размещения и видовой структуры зоопланктонных сообществ малой реки (на примере р. Линда Нижегородской области) // Вода: химия и экология. – 2014. – №12. – С. 48–56.

Шурганова Г.В., **Черепенников В.В.**, Кудрин И.А., Ильин М.Ю. Пространственное размещение сообществ зоопланктона пресноводных водоёмов и водотоков // Экологический мониторинг. Часть VIII. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем: Учебное пособие / Под редакцией проф. Д.Б. Гелашвили, проф. Г.В. Шургановой. – Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского Госуниверситета, 2014. – С. 335–345.

Якимов В.Н., Шурганова Г.В., **Черепенников В.В.**, Кудрин И.А., Ильин М.Ю. Методы сравнительной оценки результатов кластерного анализа структуры гидробиоценозов (на примере зоопланктона реки Линда Нижегородской области) // Биология внутренних вод. – 2016. – №2. – С. 94–103.

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ



Воденеева Екатерина Леонидовна

e-mail: vodeneeva@mail.ru

Кандидат биологических наук, доцент. Доцент кафедры ботаники и зоологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VI. Методы изучения фитобентоса пресных водоемов



Большакова Анжела Дмитриевна

e-mail: anzhela.bolschakova@yandex.ru

Студентка кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава III. Методика оценки риска здоровью в мониторинге качества окружающей среды



Гаврилко Дмитрий Евгеньевич

e-mail: dima_gavrillo@mail.ru

Аспирант кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава IX. Использование функциональных признаков в методах кластерного анализа и ординации гидробиоценозов

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»



Гелашвили Давид Бежанович

e-mail: ecology@bio.unn.ru

Заведующий кафедрой экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава III. Методика оценки риска здоровью в мониторинге качества окружающей среды

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»

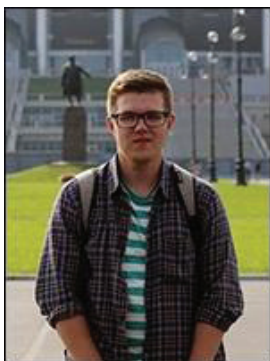


Демидова Татьяна Борисовна

e-mail: demidovatanya@mail.ru

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории мониторинга региона АЭС и биоиндикации Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Глава IV. Цитогенетические методы для оценки состояния окружающей среды



Жихарев Вячеслав Сергеевич

e-mail: slava.zhiharev@ro.ru

Аспирант кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава IX. Использование функциональных признаков в методах кластерного анализа и ординации гидробиоценозов

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»

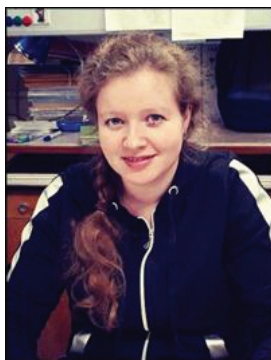


Ерофеева Елена Александровна

e-mail: ele77785674@yandex.ru

Доктор биологических наук, доцент кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава I. Методы оценки состояния антиоксидантной системы растений в условиях антропогенной нагрузки



Золотарева Татьяна Владимировна

e-mail: tanyakuklina.nn@yandex.ru

Аспирант кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»



Зазнобина Наталья Ивановна

e-mail: nzaznobina@mail.ru

Кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава III. Методика оценки риска здоровью в мониторинге качества окружающей среды



Ильин Максим Юрьевич

e-mail: maxim_ilin@list.ru

Кандидат биологических наук, научный сотрудник ООО «Научно-производственное объединение «Собский рыбоводный завод»

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»



Крысанов Евгений Юрьевич

e-mail: krysanov@sevin.ru

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцева

Глава IV. Цитогенетические методы для оценки состояния окружающей среды



Кудрин Иван Александрович

e-mail: kudriniv@mail.ru

Кандидат биологических наук, ст. преподаватель кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава IX. Использование функциональных признаков в методах кластерного анализа и ординации гидробиоценозов

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»

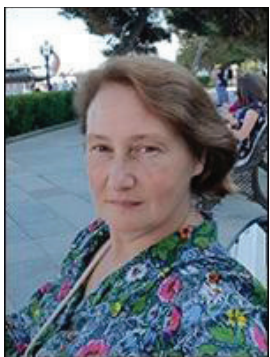


Макеев Игорь Серафимович

e-mail: igmakeyev@mail.ru

Кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»



Максимова Вероника Александровна

e-mail: maksimoveronika@yandex.ru

Заместитель начальника Центра по мониторингу загрязнения окружающей среды Верхне-Волжского УГМС

Глава VIII. Методы оценки загрязнения почв тяжелыми металлами



Орджоникидзе Кристина Георгиевна

e-mail: chiris.ordj@gmail.com

Научный сотрудник группы мутагенеза и репарации Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН и лаборатории экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцева

Глава IV. Цитогенетические методы для оценки состояния окружающей среды



Охапкин Александр Геннадьевич

e-mail: okhapkin@bio.unn.ru

Доктор биологических наук, профессор. Заведующий кафедрой ботаники и зоологии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VI. Методы изучения фитобентоса пресных водоемов



Романова Елена Борисовна

e-mail: romanova@ibbm.unn.ru

Доктор биологических наук, профессор кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава II. Количественные и качественные методы оценки лейкоцитарного состава крови рептилий (ядовитых и неядовитых змей) в экологических исследованиях



Савинов Александр Борисович

e-mail: sabcor@mail.ru

Кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава V. Мониторинг фитоценозов на основе методов оценки активности растений в рамках концепции фитогенного поля



Сидоренко Михаил Владимирович

e-mail: eco_smv@mail.ru

Кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VIII. Методы оценки загрязнения почв тяжелыми металлами



Симановский Сергей Анатольевич

e-mail: sergey.a.simanovsky@gmail.com

Кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Глава IV. Цитогенетические методы для оценки состояния окружающей среды

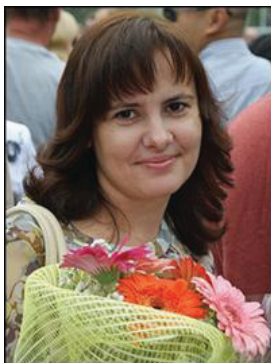


Соломайкин Евгений Игоревич

e-mail: e7v4gen5iy@yandex.ru

Аспирант кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава II. Количественные и качественные методы оценки лейкоцитарного состава крови рептилий (ядовитых и неядовитых змей) в экологических исследованиях



Старцева Наталья Александровна

e-mail: startseva@bio.unn.ru

Кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и зоологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VI. Методы изучения фитобентоса пресных водоемов



Томилина Ирина Ивановна

e-mail: i_tomilina@mail.ru

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Глава X. Биодиагностика в комплексной оценке экологического состояния водных экосистем



Федоткина Елена Антоновна

e-mail: tswetkova.len@yandex.ru

Студентка магистратуры кафедры экологии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VII. Методы измерения функционального разнообразия в биотических сообществах



Хедайриа Табет

e-mail: khedairiatabet1989@gmail.com

Аспирант кафедры ботаники и зоологии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VI. Методы изучения фитобентоса пресных водоемов



Холмогорова Надежда Владимировна

e-mail: nadjaholm@mail.ru

Кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии и природопользования института естественных наук Удмуртского государственного университета.

Глава X. Биодиагностика в комплексной оценке экологического состояния водных экосистем



Чуйко Григорий Михайлович

e-mail: gchuiko@mail.ru

Доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, профессор Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова.

Глава X. Биодиагностика в комплексной оценке экологического состояния водных экосистем



Шурганова Галина Васильевна

e-mail: galina.nngu@mail.ru

Доктор биологических наук, профессор кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Глава IX. Использование функциональных признаков в методах кластерного анализа и ординации гидробиоценозов

Раздел «Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника»

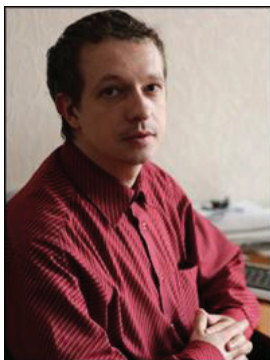


Юнина Валентина Петровна

e-mail: ecocenter_nngu@mail.ru

Старший преподаватель кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Глава VIII. Методы оценки загрязнения почв тяжелыми металлами



Якимов Василий Николаевич

e-mail: damselfly@yandex.ru

Доктор биологических наук, доцент кафедры экологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Глава VII. Методы измерения функционального разнообразия в биотических сообществах

Глава IX. Использование функциональных признаков в методах кластерного анализа и ординации гидробиоценозов

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава I. Методы оценки состояния антиоксидантной системы растений в условиях антропогенной нагрузки (Ерофеева Е.А.)	5
Глава II. Количественные и качественные методы оценки лейкоцитарного состава крови рептилий (ядовитых и неядовитых змей) в экологических исследованиях (Романова Е.Б., Соломайкин Е.И.)	21
Глава III. Методика оценки риска здоровью в мониторинге качества окружающей среды (Зазнобина Н.И., Большакова А.Д., Гелашвили Д.Б.)	36
Глава IV. Цитогенетические методы для оценки состояния окружающей среды (Орджоникидзе К.Г., Симановский С.А., Демидова Т.Б., Крысанов Е.Ю.)	53
Глава V. Мониторинг фитоценозов на основе методов оценки активности растений в рамках концепции фитогенного поля (Савинов А.Б.)	66
Глава VI. Методы изучения фитобентоса пресных водоемов (Охапкин А.Г., Воденеева Е.Л., Старцева Н.А., Хедаири Т.)	79
Глава VII. Методы измерения функционального разнообразия в биотических сообществах (Якимов В.Н., Федоткина Е.А.)	96
Глава VIII. Методы оценки загрязнения почв тяжелыми металлами (Сидоренко М.В., Юнина В.П., Максимова В.А.)	111
Глава IX. Использование функциональных признаков в методах кластерного анализа и ординации гидробиоценозов (Якимов В.Н., Шурганова Г.В., Кудрин И.А., Гаврилко Д.Е., Жихарев В.С.)	131
Глава X. Биодиагностика в комплексной оценке экологического состояния водных экосистем (Чуйко Г.М., Томилина И.И., Холмогорова Н.В.)	145
Памяти Владимира Васильевича Черепенникова – наставника, учителя, друга, единомышленника, соратника (Шурганова Г.В., Гелашвили Д.Б., Макеев И.С., Кудрин И.А., Ильин М.Ю.; Гаврилко Д.Е., Золотарева Т.В., Жихарев В.С.)	173
Авторский коллектив	178

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ

Часть X

Учебное пособие

Под редакцией
профессора Давида Бежановича Гелашвили

Печатается в авторской редакции

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Подписано в печать 10.07.2019. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 11,1. Уч.-изд. л. 14.
Заказ № 493. Тираж 300 экз.

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета
им. Н.И. Лобачевского
603000, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37