

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«РОССИЙСКИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ (РОСБИОТЕХ)»  
ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРИИ, ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И  
АГРОБЕЗОПАСНОСТИ

---

УТВЕРЖДАЮ



Директор ИВВСЭиАБ  
И.Г. Гламаздин

**ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ  
К РАБОЧЕЙ ПРОГРАММЕ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ**

**«Биотестирование и биоиндикация»**

<b>Направление подготовки:</b>	06.04.01 Биология
<b>Профиль:</b>	Биоресурсы и аквакультура
<b>Уровень программы:</b>	магистратура
<b>Форма обучения:</b>	Очная
<b>Учебный (-ые) план(-ы):</b>	2023 учебный год
<b>Кафедра (базовая):</b>	Биоэкологии и биологической безопасности
<b>Составители (разработчики) программы:</b>	Пашаев В.Ш., канд. биол. наук, доц.

**Москва, 2022**

## **1 ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Фонд оценочных средств является неотъемлемой частью рабочей программы учебной дисциплины и основной профессиональной образовательной программы.

Фонд оценочных средств представляет собой комплекс учебных заданий (совокупность контролирующих материалов), предназначенных для измерения уровня достижения обучающимся установленных результатов обучения и используется при проведении его текущего контроля успеваемости (включая рубежный контроль) и промежуточной аттестации (в период зачётно-экзаменационной сессии).

Цель ФОС - установление соответствия уровня подготовки обучающегося на данном этапе обучения требованиям рабочей программы учебной дисциплины.

Основными задачами ФОС по учебной дисциплине являются:

- контроль достижений целей реализации основной профессиональной образовательной программы – формирование компетенций;
- контроль процесса приобретения обучающимся (-ися) необходимых знаний, умений, навыков (владений/опыта деятельности) и уровня сформированности компетенций;
- оценка достижений обучающегося (-ихся) в процессе изучения дисциплины с выделением положительных/отрицательных результатов и планирование предупреждающих/корректирующих учебных мероприятий;
- обеспечение соответствия результатов обучения задачам будущей профессиональной деятельности через совершенствование традиционных и внедрение инновационных методов обучения в образовательный процесс.

Настоящий ФОС включает в себя: вопросы для самоконтроля (по всем разделам дисциплины), контрольные письменные работы, учебные задания по текущему контролю успеваемости (включая рубежный контроль) и промежуточной аттестации обучающегося (в период зачётно-экзаменационной сессии).

## 2 ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

### 2.1 Вопросы для самоконтроля

Вопросы для самоконтроля представлены по разделам и предназначены для контроля самостоятельной работы обучающегося, осуществляемого последним самостоятельно в период освоения дисциплины.

Форма обучения - все

№ и наименование раздела	Содержание раздела	Вопрос(-ы) для самоконтроля	Контролируемые компетенции (код)
Проблема оценки качества окружающей среды	Основные определения и понятия курса. Цели и задачи курса, его структура. Краткий исторический обзор о развитии направления. Понятие мониторинга, его цель и задачи. Организация и структура мониторинга. Мониторинг состояния окружающей среды на локальном, региональном, национальном и глобальном уровнях. Методология и научные основы биомониторинга. Система мониторинга, основные этапы работ при проведении биомониторинга	1. Мониторинг состояния окружающей среды на локальном, региональном, национальном и глобальном уровнях. 2. Методология и научные основы биомониторинга. 3. Система мониторинга, основные этапы работ при проведении биомониторинга	ОПК-4; ОПК-5
Основные понятия биоиндикации	Формы и виды биоиндикации. Индикаторы. Экологические основы биоиндикации. Критерии выбора индикаторов. Уровни биоиндикации. Стандарты для сравнения	1. Уровни биоиндикации. 2. Стандарты для сравнения	ОПК-4; ОПК-5
Основные понятия биотестирования	Задачи и приемы биотестирования. Биологические тест-системы. Основные принципы биотестирования. Биомаркеры. Тест-организмы и тест-процедуры	1. Основные принципы биотестирования. 2. Биомаркеры. 3. Тест-организмы и тест-процедуры	ОПК-4; ОПК-5
Критерии выбора показателей для биоиндикации и биотестирования	Биологические показатели, используемые при биоиндикации и биотестировании на разных уровнях организации живого. Биохимические, физиологические и генетические показатели (молекулярный уровень). Морфологические, биоритмические и поведенческие отклонения от нормы. Хронологические, популяционно-динамические изменения. Динамика биоценозов и антропогенные стрессоры. Особенности биоиндикации на ландшафтном уровне. Антропогенные стрессоры и их нарушающее действие на организм	1. Динамика биоценозов и антропогенные стрессоры. 2. Особенности биоиндикации на ландшафтном уровне. 3. Антропогенные стрессоры и их нарушающее действие на организм	ОПК-4; ОПК-5
Биоиндикация экологического состояния окружающей среды	Биоиндикация загрязнений воздуха. Источники загрязнения и основные загрязнители. Биоиндикация загрязнений почвы. Загрязнение агрохимикатами. Биоиндикация загрязнений воды. Основные	1. Лабораторное моделирование. 2. Биоиндикация канцерогенных, терратогенных и мутагенных соединений, радионуклидов	ОПК-4; ОПК-5

	принципы биотестирования сточных вод. Оценка качества вод природных водоемов. Лабораторное моделирование. Биоиндикация канцерогенных, терратогенных и мутагенных соединений, радионуклидов		
--	--	--	--

## 2.2 Контрольные работы по дисциплине

Контрольные работы по дисциплине не предусмотрены

## 2.3 Задания по видам работ: Лабораторная работа

Лабораторные работы по дисциплине включают: Теоретические основы биоиндикации. Классификация биоиндикаторов. Биоиндикация на организменном, популяционно-видовом и организменном уровнях. Биомаркеры. Тест-организмы (почвенные и водные микроорганизмы, простейшие, пиявки, рыбы, наземные позвоночные животные, водоросли, высшие растения) и тест-процедуры. Использование растений и животных в целях биоиндикации. Оценка экологического состояния природных систем. Фитоиндикация качества окружающей среды по показателям флуктуирующей асимметрии. Зооиндикация загрязнения почв по количественной оценке, популяции дождевых червей. Биоиндикация загрязнения атмосферного воздуха с помощью лишайников. Биоиндикация токсичности природных вод с помощью дафний

**Форма обучения - очная**

**Семестр 03**

***Типовые контрольные задания или иные материалы в рамках текущего контроля успеваемости***

**Примерные задания по лабораторному практикуму**

### **Лабораторная работа № 1**

#### **Теоретические основы биоиндикации. Классификация биоиндикаторов**

В связи с активным развитием методов экологических исследований, в частности мониторинга состояния окружающей среды, биоиндикационные исследования приобретают большую значимость при оценке абиотических, биотических и антропогенных факторов и биотопов.

В чем же причина широкого применения биоиндикации?

Во-первых, экологические системы – сложный феномен, знания о котором далеко не полные, в особенности о

взаимодействии между отдельными компонентами.

Во-вторых, экосистемы как системы открытого типа предполагают постоянное взаимодействие с окружающей их средой, и точно учитывать эту внешнюю составляющую достаточно тяжело.

В-третьих, иерархический характер структуры экосистем приводит к тому, что изменение масштабов исследования сопряжено с эмерджентной, качественной сменой свойств экосистемы, которые тяжело учитывать и прогнозировать.

В-четвертых, очень сложно учитывать скачкообразные изменения экосистем, выходящих за пределы динамического равновесия в результате воздействия факторов внешней среды.

9

При этом существующие методы исследования экосистем характеризуются рядом недостатков, таких как:

1. Прямые инструментальные методы исследования часто очень трудоемкие, дорогие и недостаточно обеспечены соответствующими приборами, которые могли бы давать возможность получать экспресс-данные непосредственно в полевых условиях.
2. Современные исследования не дают возможности быстро охватить достаточно большие территории и, в лучшем случае, ограничиваются отдельными мониторинговыми площадками.
3. Не всегда дают возможность получить единый временной срез или сравнимые временные данные.
4. Многие важные экологические показатели не имеют количественной оценки, а выражаются исключительно в качественных (номинальных) или ранговых шкалах, соответственно, не определяются инструментальными методами.

В результате чего возникла необходимость в поиске методов, которые могли бы оценивать экосистемы комплексно, достаточно оперативно и при этом работали на приемлемом уровне точности и использовали характеристики самих экосистем.

Биоиндикация – оценка состояния окружающей среды, экологических факторов и их динамики при помощи

признаков и свойств самих экосистем, их биоты. Биоиндикация изучает теоретические основы и практические способы использования организмов для оценки условий среды.

Также биоиндикацию можно определить как: раздел экологии, который занимается оценкой экологических факторов по биологическим признакам; науку, изучающую зависимость между биотическими признаками и состоянием экосистем в целом и их составляющих; науку, которая занимается диагностикой состояния экосистем по показателям биотических признаков и свойств.

В данном случае необходимо помнить, что биоиндикация, с одной стороны – это комплекс методов оценки,

включающий не только биосистемы, но и их свойства, структуру и взаимоотношения между ними, а с другой – наука, изучающая проблемы оценки экологических факторов, экосистем, их состояния и динамики по биотическим признакам.

Объектом биоиндикации являются экологические характеристики и биотические признаки, а предметом – закономерности взаимосвязей между ними.

В современной биоиндикации выделяются несколько направлений:

1. В зависимости от уровня исследуемых экосистем выделяют:

- ☐ аутбиоиндикацию – оценка выполняется по отдельным признакам или организмам;
- ☐ синбиоиндикацию – оценка выполняется по сообществам или комплексу видов.

2. В зависимости от используемых систематических групп организмов:

- ☐ альгоиндикацию (использование в качестве индикаторов признаков или сообществ водорослей);
- ☐ лишеноиндикацию (использование в качестве индикаторов признаков или сообществ лишайников);

- ☐ бриоиндикацию (использование в качестве индикаторов признаков или сообществ мохообразных);
- ☐ фитоиндикацию (использование в качестве индикаторов признаков или сообществ сосудистых растений);
- ☐ дендроиндикацию (использование в качестве индикаторов признаков или сообществ древесных растений);
- ☐ зооиндикацию (использование в качестве индикаторов признаков или сообществ животных).

3. В зависимости от направлений исследований:

- ☐ агроиндикацию (оценка природных угодий – пастбищ, сенокосов и т.д. с точки зрения сельскохозяйственного использования, а также природных условий земледелия, садоводства, виноградарства, кормопроизводства и т.п.);
- ☐ лесную индикацию (раздел лесоведения и лесной типологии, изучающий оценку лесорастительных условий и их классификацию по климатическим и почвенным факторам);
- ☐ гидроиндикацию (оценка глубины залегания и минерализованности грунтовых вод);
- ☐ геоиндикацию и биогеохимическую индикацию (оценка геологического состава и литологии залегающих близко к земной поверхности горных пород и геохимических особенностей территории и связанных с ними рудных и нерудных ископаемых);
- ☐ дендроиндикацию (оценка динамики природных условий по характеру образования годичных колец древесных пород) – данная группа методов вместе с палиноиндикацией (спорово-пыльцевым анализом) является одним из ведущих при биоиндикации и мониторинге метеорологических и климатических параметров;
- ☐ почвенную индикацию (оценка экологических режимов почв трофности, степени, характера и глубины засоления, кислотности, режима увлажнения, содержания органических и минеральных соединений);
- ☐ инженерную биоиндикацию (оценка характера и степени техногенных нарушений, в том числе уровня загрязнения окружающей среды).

Базовыми понятиями биоиндикации являются:

- 1) индикатор – биологическая характеристика или признак, которая дает представление о явлениях и процессах и используется при оценке интересующего параметра окружающей среды (что показывает);
- 2) индикат – параметр окружающей среды, который оценивается (что определяется).

Основными требованиями к индикатору и индикату являются: во-первых, уровень точности и отклика, то есть индикатор и индикат должны между собой значимо и однозначно коррелировать; во-вторых, индикатор должен характеризоваться критическим уровнем информации или пределами, в которых он работает и дает однозначную оценку индиката, а за пределами которых оценка некорректна. В этой связи теоретическим базисом биоиндикации является оценка кривых толерантности (экологических валентностей) индикаторов, а одной из важнейших задач – определение этих кривых для индикаторов и однозначная их привязка к оцениваемым параметрам (индикатам).

Любой процесс биоиндикации условно можно разбить на несколько этапов, которые, по сути, являются поиском ответов на следующие вопросы:

1. Что определять? Ответ обуславливает выбор объекта индикации (индиката).

2. Где определять? Ответ обуславливает выбор способа и масштаба индикации.

3. Чем определять? Ответ определяет выбор конкретного индикатора и включает поиск и доказательства однозначной связи индикатора и индиката.

4. Как определять? Ответ связан с разработкой индикационной шкалы, в которой показатели индикатора однозначно привязываются к исследуемым параметрам (показателям индиката).

5. Насколько точно определять? Ответ обуславливает определение вероятности ошибки и точности биоиндикации.

При этом исследователь в процессе ответов на вышеизложенные вопросы должен придерживаться следующих требований к методам биоиндикации:

1) во-первых, методы биоиндикации должны быть проще и доступнее соответствующих инструментальных методов исследования экосистем, выбор индикаторов и оценка могут сопровождаться сложными расчетами, но сами индикаторы должны быть максимально простыми и интуитивно понятными;

2) во-вторых, методы биоиндикации должны быть не менее информативными и наглядными, чем соответствующие инструментальные методы;

3) в-третьих, методы биоиндикации должны быть не менее оперативными, чем соответствующие инструментальные методы;

4) в-четвертых, методы биоиндикации должны использоваться на всех уровнях организации экосистем;

5) в-пятых, методика биоиндикации не должна иметь несколько толкований, должна быть достаточно стандартизованной, а также проверяемой, и при этом сопоставимой с требованиями экологического мониторинга;

6) в-шестых, результаты биоиндикации должны быть достаточно точными и достоверными (безусловно, инструментальные методы будут точнее, но простота и оперативность получения результатов методами биоиндикации должна нивелировать меньшую точность), при этом результаты биоиндикации должны быть научно обоснованными и обеспечивать возможность их экстраполяции и прогнозирования.

Существует несколько подходов к определению принципов биоиндикации. Так, на основе вышеизложенных требований Вайнерт с коллегами (1988) и Йоргенсен с коллегами (2005) предлагают использовать следующие принципы:

1. Высокая скорость оценки и легкость ее выполнения.

2. Чувствительность к колебаниям определяемых параметров и получение воспроизводимых точных результатов.

3. Достаточно высокая численность индикатора, его однородность и достаточно широкая распространенность в разных географических и экологических условиях. Т.е. индикатор не должен быть малочисленным, редко встречающимся и иметь высокую изменчивость.

4. Индикатор должен давать возможность количественной оценки исследуемого признака.

5. Диапазон ошибки биоиндикации по сравнению с другими методами не должен быть выше 20%.

При использовании зооиндикации предлагаются следующие принципы:

1. Индикатор должен иметь однозначное и хорошо изученное положение в современной биологической систематике и быть легко определяемым в полевых условиях.

2. Биология индикатора должна быть достаточно хорошо изучена (по крайней мере, по оцениваемым параметрам).

3. Индикатор должен быть численным для получения

достаточной выборки и достаточно легко обнаружимым в полевых условиях.

4. В качестве индикаторов рекомендуются оседлые виды.

5. Для оценки рекомендуется несколько индикаторов, которые могут быть достаточно легко взаимозаменяемыми.

16

6. Индикатор должен однозначно оценивать исследуемые параметры и иметь четкую реакцию на их изменения.

7. В качестве индикаторов рекомендуются виды, имеющие достаточно высокое функциональное значение в экосистемах.

При использовании ботанических объектов как биоиндикаторов (фитоиндикация, а также альго-, лишено- и бриоиндикация) предлагаются следующие принципы выбора методики и индикаторов:

1. Фитоиндикатор должен быть простым и интуитивно понятным.

2. Методика должна быть научно валидной, не занимать много времени в полевых условиях, легко повторяться и отталкиваться от принятых ботанических описаний растительности.

3. Методика должна характеризовать не только текущее состояние окружающей среды, но и быть прогностической.

4. Индикаторы должны быть достаточно гибкими, т.е. используемыми в различных экологических и географических условиях.

5. Индикаторы должны иметь однозначный уровень применения (пространственную обусловленность) – глобальный, региональный или локальный: интерпретация индикаторов не должны выходить за рамки определенного уровня

### Фитоиндикация антропогенной нагрузки на окружающую среду по показателям биоразнообразия и состоянию древесно-кустарниковой растительности

*Цель:* дать оценку антропогенной нагрузки на окружающую среду по состоянию и биоразнообразию древесно-кустарниковой растительности.

Оборудование: определители высших растений, мерная линейка, карандаши.

Одним из важных показателей состояния природной среды является видовой состав растительного сообщества, который может изменяться по мере увеличения антропогенного влияния на окружающую среду. Установлено закономерное увеличение показателей биоразнообразия по мере удаления от источника химического антропогенного загрязнения окружающей среды. Для оценки этого эффекта часто используют индекс Симпсона, который определяется по формуле (1):  $D = \sum ni (ni-1) N(N-1)$ , (1) где n – число особей каждого вида, N – общее число особей. 25 Часто используют обратный индекс Симпсона ( $1/D$ ), соответствующий возрастанию видового разнообразия.

Оценку состояния древостоя выполняют по коэффициентам состояния по следующей схеме:

1. Определяют состояние отдельных деревьев по внешним признакам по 5-балльной шкале (таблица 1).

2. Рассчитывают коэффициенты состояния древесных пород. Коэффициенты состояния определяют для каждого вида деревьев по формуле (2):  $K = \sum b N$ , (2) где K – коэффициент состояния вида, b – балл состояния дерева, N – число деревьев вида.

3. Рассчитывают коэффициент состояния древостоя в целом как среднее арифметическое коэффициентов состояния отдельных видов деревьев по формуле (3):  $Ko = \sum K R$ , (3) где Ko – коэффициент состояния древостоя, K – коэффициент состояния вида, R – число видов. 4. Для оценки состояния древостоев используют следующую градацию: Ko < 1,5 – здоровый



древостой;  $K_o = 1,6 - 2,5$  – ослабленный древостой;  $K_o = 2,6 - 3,5$  – сильно ослабленный лес;  $K_o = 3,6 - 4,5$  – усыхающий лес;  $K_o > 4,6$  – погибающий лес.

Таблица 1

**Шкала оценки состояния деревьев по внешним признакам**

Балл	Характеристика состояния дерева
1	Здоровые деревья без внешних признаков повреждения, величина прироста соответствует норме
2	Ослабленные деревья. Крона слабожурная, отдельные ветви усохли. Листья и хвоя часто с желтым оттенком. У хвойных деревьев на стволе сильное самотечение и отмирание коры на отдельных участках
3	Сильно ослабленные деревья. Крона изрежена, со значительным усыханием ветвей, вершина сухая. Листья светло-зеленые, хвоя с бурым оттенком и держится 1–2 года. Листья мелкие, но бывают и увеличены. Прирост уменьшен или отсутствует. Значительные участки коры отмерли
4	Усыхающие деревья. Усыхание ветвей по всей кроне. Листья мелкие, недоразвитые, бледно-зеленые с желтым оттенком; отмечается ранний листопад. Хвоя повреждена на 60% от общего количества. Прирост отсутствует. На стволах признаки заселения короедами и другими вредителями
5	Сухие деревья. Крона сухая, листьев нет, хвоя желтая или бурая (осыпается или осыпалась). Кора на стволах отслаивается или полностью опала. Стволы заселены ксилофагами (потребителями древесины)

**Ход работы**

1. Выберите два участка парка, леса или сквера в 1 га ( $100 \times 100$  м), подверженные разной степени антропогенного загрязнения (удаленность от источника токсических выбросов, от крупной транспортной магистрали и т.д.).
2. Провести флористические обследования на древесно-кустарниковую растительность, используемую для озеленения.
3. Составить список растений. Подсчитать количество деревьев и кустарников каждого вида. Результаты подсчета записать в таблице Таблица 2

**Результаты флористического обследования**

Название вида	Количество особей (экземпляров), n

4. Определить состояние отдельных деревьев, растущих на исследуемой площадке.
5. Определить коэффициенты состояния древесных пород ( $K_1, K_2, K_3 \dots$ )
6. Результаты определений и расчетов оформить в виде таблицы (таблица 3)

Таблица 3

**Оценка состояния древостоя**

Виды деревьев	Количество деревьев	Состояние деревьев, баллы	Коэффициент состояния вида

7. Определить коэффициент состояния древостоя в целом.
8. Оценить состояние древостоя.
9. Рассчитать индекс Симпсона для обоих участков.
10. Сделать выводы о степени загрязнения изучаемых участков по индексу Симпсона и оценке состояния древостоя.

## **Лабораторная работа № 2**

### **Биоиндикация на организменном, популяционно-видовом и организменном уровнях**

*Цель:* определить стадию рекреационной дигрессии участка.

*Материалы и оборудование:* измерительная лента, определитель высших растений, гербарный материал.

Рекреация – место отдыха человека, обычно это парки, леса, водоемы. Рекреационная нагрузка тем выше, чем: а) выше плотность населения и б) больше естественных привлекательных для отдыха ландшафтов. Особенно велика рекреационная нагрузка неорганизованного отдыха при использовании резко возросшего числа личного автотранспорта.

Основной вид учета рекреационной нагрузки – регистрация последовательных этапов разрушения растительности (аналог учета стадий пастбищной дигрессии): от совершенно здорового древостоя до полной гибели древесного яруса и отсутствия напочвенного покрова (в первую очередь исчезают эпифитные лишайники и мхи). Стадии дигрессии лучше и быстрее всего оцениваются на открытой местности, а также в лесных насаждениях путем определения процента деградированных участков или площади, занимаемой дорогами и тропами (дорожнотропиночная сеть – ДТС). В этом случае выделяют 5 основных стадий дигрессии (по Е.Н. Шелоуховой, 1994):

1 стадия. ДТС выражена слабо, значительных изменений растительности по сравнению с контрольным участком, не посещаемым людьми совсем или только случайно, не обнаруживается.

2 стадия. ДТС занимает 5–10%.

3 стадия. ДТС занимает 20–30%.

4 стадия. ДТС занимает около 50%; происходит исчезновение лесных травянистых видов – уменьшается их проективное покрытие, отмечается внедрение луговых и сорных видов.

5 стадия. ДТС занимает около 90%, преобладает луговая и сорная растительность. Важными признаками при оценке стадии рекреации являются также: 1) соотношение лесных, луговых и сорных видов; 2) общее снижение видового разнообразия при сильном и постоянном нарушении (на пограничных участках или в начальной стадии нарушений – наоборот, увеличение за счет встречи на одном участке разных ценологических групп видов); 3) общее состояние древесных растений – разреженность, суховершинность, плохое ветвление или облиствение, заломы, сбитости коры и т.п.

Ход работы 1. Выбрать опытные и контрольный участки в местах отдыха населения.

2. Выполнить геоботанические описания участков.

3. Вычислить площадь ДТС в %: • при небольшом участке можно определить глазомерно; • при большом участке выделить наиболее репрезентативную площадку и с помощью шагов или мерной ленты определить общую площадь участка и участков ДТС (тропинки, асфальтированные дорожки, вытопанные площадки и т.п.).

4. Определить индекс ДТС, разделив площадь ДТС на общую площадь участка, т.е. узнать соотношение площадей нарушенных участков и территории отдыха. Индекс ДТС обычно выражается в процентах. По значению индекса ДТС и дополнительным признакам определить стадию рекреационной дигрессии каждого участка.

5. Сделать вывод и возможный прогноз с рекомендациями. 6. Результаты исследования занести в тетрадь.

## **Лабораторная работа № 3**

## **Биомаркеры. Тест-организмы (почвенные и водные микроорганизмы, простейшие, пиявки, рыбы, наземные позвоночные животные, водоросли, высшие растения) и тест-процедуры**

### Цель работы

Научиться выбирать тест-объект в зависимости от задач биотестирования; познакомиться с основными методами биотестирования.

### Оборудование и материалы

Методики биотестирования, нормативные документы.

### Теоретическое введение

Биотестирование – оценка токсичности объекта внешней среды по его воздействию на биологическую тест-систему.

Тест-система – это пространственно ограниченная совокупность чувствительных элементов (тест-организмов) и среды, в которой они находятся. Тест-система может состоять из группы организмов одного вида сообщества нескольких биологических видов, целой экосистемы.

Тест-объект – организм, используемый при оценке токсичности химических веществ, природных и сточных вод, почв, донных отложений, кормов и др. Тест-объекты, по определению Л.П. Брагинского – «датчики» сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) водной среды («да» или «нет»), независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ, какой обычно представляют собой сточные воды. Тест-объекты с известной степенью приближения дают количественную оценку уровня токсичности загрязнения водной среды – сточных, сбросных, циркуляционных и природных вод.

Для биотестирования используются различные гидробионты – водоросли, микроорганизмы, беспозвоночные, рыбы. Наиболее популярные объекты – ювенальные формы планктонных ракообразных-фильтраторов *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*. Семидневный тест на суточной молоди цериодафнии *Ceriodaphnia affinis* позволяет за более короткий срок (7 суток), чем на *Daphnia magna* (21 сутки) дать заключение о хронической токсичности воды.

В результате воздействия токсического вещества тест-объект или вся тест-система претерпевает определенную деформацию, что проявляется в виде ряда реакций тест-системы на различных уровнях ее функционирования. Эти реакции различаются по чувствительности, скорости проявления, легкости наблюдения. Одну из этих реакций выбирают в качестве тест-реакции – закономерно возникающей ответной реакции тест-системы на воздействие комплекса внешних факторов, выбранных для анализа состояния этой системы. Степень проявления тест-реакции оценивается по тест-критерию. Это показатель, на основании которого производится оценка изменения тест-системы. По степени проявления тест-реакции судят о токсичности исследуемого образца.

Важное условие правильного проведения биотестирования – использование генетически однородных лабораторных культур, так как они проходят проверки чувствительности, содержатся в специальных, оговоренных стандартами лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую сходимость и воспроизводимость результатов исследований, а также максимальную чувствительность к токсическим веществам.

Токскиты – новое поколение биотестов, разработанных в лаборатории

экологической токсикологии и водной экологии Университета Гент (Бельгия) под руководством профессора Г. Персоне. Они предназначены для проведения исследований острой токсичности природных сред и содержат все необходимые материалы для выполнения биотестирования или экотоксикологических исследований (тест-организмы в анабиотическом состоянии, эфиппиумы дафний, покоящиеся яйца коловраток, яйца артемии, культуры водорослей).

Тест-функция – это жизненная функция или критерий токсичности, используемые в биотестировании для характеристики отклика тест-объекта на повреждающее действие среды. Тест-функции, используемые в качестве показателей биотестирования для различных объектов:

- для инфузорий, ракообразных, эмбриональных стадий моллюсков, рыб, насекомых – выживаемость (смертность) тест-организмов;
- для ракообразных, рыб, моллюсков – плодовитость, появление аномальных отклонений в раннем эмбриональном развитии организма, степень синхронности дробления яйцеклеток;
- для культур одноклеточных водорослей и инфузорий – гибель клеток, изменение (прирост или убыль) численности клеток в культуре, коэффициент деления клеток, средняя скорость роста, суточный прирост культуры;
- для растений – энергия прорастания семян, длина первичного корня и др.

Длительность биотестирования зависит от задачи, поставленной исследователем.

Острые биотесты, выполняемые на различных тест-объектах по показателям выживаемости, длятся от нескольких минут до 24–96 часов.

Краткосрочные хронические тесты длятся в течение 7 суток и заканчиваются, как правило, после получения первого поколения тест-объектов.

Хронические тесты на общую плодовитость ракообразных, охватывающие 3 поколения, длятся до рождения молоди в F3.

Токсический эффект – изменение любого показателя жизнедеятельности или функций организма под воздействием токсиканта. Зависит от особенностей яда, специфики метаболизма организма, факторов внешней среды (содержания кислорода, уровня pH, температуры и др.).

Токсичность – свойство химических веществ проявлять повреждающее или летальное действие на живые организмы. Вещество, оказывающее токсическое действие, называется токсикантом, а процесс воздействия токсиканта на организм – токсикацией (на экосистему – токсификацией). По Н.С. Строганову, количественно токсичность вещества для отдельного организма определяется как величина, обратная медианной летальной концентрации:  $T = 1/LC50$ .

Токсичность водной среды – токсичность воды и донных отложений для гидробионтов, возникающая вследствие появления в ней токсических веществ природного или антропогенного происхождения (ксенобиотиков), загрязнения сточными водами, токсическими атмосферными осадками и пр. При возникновении токсичности водной среды вода из среды, поддерживающей жизнь, становится средой, губительной для жизни.

Степень токсичности водной среды оценивается методами биотестирования, а также по превышению ПДК (предельно допустимых концентраций).

Острая токсичность выражается в гибели отравленного организма за короткий промежуток времени – от нескольких секунд до 48 часов.

Хроническая токсичность среды проявляется через некоторое время в виде нарушений жизненных функций организмов и возникновения патологических состояний (токсикозов). У водных организмов хроническая

токсичность выражается в гонадотропном и эмбриотропном действии токсиканта, что приводит к нарушению плодовитости (продуктивности), эмбриогенеза и постэмбрионального развития, возникновению уродств (мутаций) в потомстве, сокращению продолжительности жизни, появлению «карликовых» форм.

Интегральная токсичность, по определению Л.П. Брагинского, токсичность сложных смесей, сточных вод, многокомпонентных факторов для водных организмов.

Количественно интегральная токсичность определяется как величина, обратная максимальному разведению (1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 и т.д.), при котором не наблюдается каких-либо нарушений жизненно важных функций тест-организмов при 24–48 часовом биотестировании.

Выражается в баллах токсичности (Бти) целыми числами (2, 5, 10, 50, 100 и т.д.) соответственно величинам разведения.

Баллы токсичности могут быть четко ранжированы и позволяют выстраивать ряд исследуемых веществ или вод по снижению (повышению) уровня их токсичности.

Основные методы биотестирования

#### 1. Биохимический метод.

Стрессовое воздействие среды можно оценивать по эффективности биохимических реакций, уровню ферментативной активности и накоплению определенных продуктов обмена. Изменение содержания в организме определенных биохимических соединений, показателей базовых биохимических процессов и структуры ДНК в результате биохимических реакций могут обеспечить необходимую информацию о реакции организма в ответ на стрессовое воздействие.

Каждый физиологический процесс требует определенных затрат энергии, поэтому любое изменение физиологического состояния немедленно сказывается на энергетическом обмене. Биоэнергетические показатели живых систем позволяют выявлять последствия стрессового воздействия среды до наступления необратимых изменений в организме.

Количество энергии, необходимое организму в единицу времени для обеспечения всех физиологических процессов, характеризует интенсивность энергетического обмена. На реализацию одного и того же физиологического процесса в неблагоприятных условиях организму требуется больше энергии, чем в оптимальных, из-за необходимости компенсации неблагоприятных воздействий среды.

В процессе жизнедеятельности всех аэробных организмов в ходе нормальных реакций кислородного метаболизма образуются свободные радикалы. В норме уровень свободных радикалов регулируется системой антиоксидантной защиты клетки, так как эти радикалы и продукты их превращения представляют серьезную угрозу:

- подавляют активность ферментов;
- разрушают нуклеиновые кислоты;
- вызывают деградацию биополимеров;
- изменяют проницаемость мембран.

Тем не менее, свободные радикалы играют важную роль в окислительно-восстановительных биохимических реакциях. Таким образом,

стрессовая реакция биотестов может быть измерена по изменению в них уровня свободных радикалов по сравнению с контролем. Известно, что быстрые изменения интенсивности реакций с участием свободных радикалов в живых объектах типичны для начальных стадий разных патологических состояний, в том числе для первичных процессов лучевого поражения.

#### 2. Генетический подход.

Наличие и степень проявления генетических изменений характеризует мутагенную активность среды, а возможность сохранения генетических изменений в популяциях отражает эффективность функционирования иммунной системы организма.

В норме большинство генетических нарушений распознаются клеткой, например путем апоптоза за счет внутриклеточных систем или посредством иммунной системы. Достоверное превышение спонтанного уровня таких нарушений является индикатором стресса. Генетические изменения могут выявляться на генном, хромосомном и геномном уровнях.

Типы мутаций:

- генные (точковые) – замена оснований ДНК или вставка или выпадения нуклеотидов;
- хромосомные – нарушения структурных хромосом;
- геномные – изменение количества хромосом в ядре.

Для выявления канцерогенов и мутагенов применяются краткосрочные генетические тесты, где вместо цельного организма млекопитающего (опыты могут проходить 2–3 года) используют другие биологические системы.

Исследование генетических изменений как на генном, так и на хромосомном уровне можно проводить на растениях без использования сложного лабораторного оборудования, необходимого для постановки других тестов, что при некоторых обстоятельствах может оказаться большим преимуществом. Возможным недостатком этих тестов является существенное различие метаболизма растений и млекопитающих. Следовательно, в настоящее время, еще рано ставить вопрос о возможности достоверной экстраполяции на человека результатов, полученных в экспериментах на растениях.

### 3. Морфологический метод.

В условиях техногенного воздействия на природные экосистемы снижение численности популяций происходит в значительной мере за счет эмбриональной и личиночной смертности. Эмбрионы и личинки – наиболее чувствительны к повреждающим факторам фазы жизненного цикла гидробионтов. Воздействие на организм стрессирующих факторов приводит к отклонениям от нормального строения различных морфологических признаков.

В водоемах, в последнее время, катастрофически возрос процент уродливых личинок лягушек и жаб. Отмечено появление рыб с нарушениями эмбрионального морфогенеза, то есть с различными аномалиями (ассиметрия тела и т.д.).

Для диагностики воздействия загрязнений на морфологические характеристики применяются методы оценки флуктуирующей ассиметрии. Флуктуирующая ассиметрия является результатом неспособности организмов развиваться по точно определенному плану. Ассиметрия – это один из общих онтогенетических показателей, характеризующих стабильность индивидуального развития, дающий оценку состояния природных популяций и зависящий от состояния среды.

### 4. Физиологический подход.

Одна из наиболее важных характеристик, высокочувствительная к стрессовому воздействию среды, это энергетика физиологических процессов. Наиболее экономичный энергетический обмен имеет место лишь при строго определенных условиях среды, которые могут быть охарактеризованы как оптимальные. Интенсивность энергетического обмена аэробного организма может быть определена посредством измерения скорости потребления кислорода. При оптимальных условиях организм находится на самом низком энергетическом уровне, при любых негативных

изменениях среды обитания потребность в кислороде будет увеличена.

Для характеристик энергетического обмена две величины являются фундаментальными:

- основной обмен – отражает минимальный уровень потребления энергии, необходимый для обеспечения нормального функционирования организма при отсутствии каких-либо внешних воздействий;
- максимальный обмен – соответствует предельному количеству энергии, которое организм способен выработать в случае необходимости.

Разность между этими величинами – это энергетический ресурс адаптации конкретного вида.

Другая базовая характеристика, перспективная для оценки стрессовых воздействий – темп и ритмика ростовых процессов.

Важной характеристикой физиологических процессов является поведенческая активность живых организмов.

В качестве тест-функций применяются физиологические параметры пресноводных беспозвоночных гидробионтов разных уровней филогенеза.

#### 5. Биофизический подход.

Биофизические методы контроля качества среды всегда основаны на инструментальном определении нарушений биохимических и биофизических процессов тест-организмов. Одни из них регистрируют изменения функций мембранных структур клеток, другие оценивают показатели электропроводности тканей, третьи – способность генерировать электрические потенциалы и т.д.

Для контроля состояния важнейших функциональных систем организмов наибольшее распространение получили люминисцентные и флуориметрические методы. Они обладают высокой чувствительностью, позволяют проводить количественные измерения в режиме реального времени, а в ряде случаев и автоматизировать процесс измерения.

#### 6. Иммунологический метод.

В дополнении к цитогенетическому подходу, характеризующему эффективность иммунной системы организма в отношении элиминации клеток с генетическими нарушениями, возможны развернутая оценка изменений иммунореактивности животного, исследование параметров иммунитета, таких как состав крови и гемолимфы, определение наличия антител в жидкостях организма, концентрации белков плазмы, перивисцеральной жидкости и гемолимфы, оценки динамики клеточного состава.

Иммунологический подход при оценке состояния окружающей среды заключается в изучении изменений врожденного и приобретенного иммунитета у беспозвоночных и позвоночных животных.

Предлагается использовать параметры иммунитета животных как критерий состояния организмов, их популяций и сообществ экосистем в норме и при техногенном воздействии.

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.

2. Выделите из текстовой части основные термины. Выучить их.

3. Решите следующие задачи:

3.1. Укажите тест – объект, который необходимо использовать при оценке уровня загрязнения воздуха. Этот тест-объект представляет собой своеобразный симбиотический организм, слоевище которого образовано грибом и водорослью. Какие тест-функции организма, по вашему мнению используются при биотестировании атмосферного воздуха?

3.2. Сосна – это тест-объект для экспресс-оценки качества воздуха.

Какой показатель используется в качестве тест-функции? Какой метод биотестирования используется в данном случае?

3.3. Для оценки качества среды использовались рыбы и лягушки.

После отлова со всех рыб и лягушек сняли 5 признаков с левой и правой сторон, данные занесли в таблицу. После этого оценили сходство признаков и дали оценку качеству среды. Какой метод биотестирования при этом использовался? Ответ обоснуйте.

3.4. Назовите тест-объект, с помощью которого возможна оценка трофических свойств водоема. Этот тест-объект – наименее изученное звено среди организмов-индикаторов, хотя является весьма удобным для наблюдения, также дает возможность в первом приближении визуально оценить экологическое состояние водоема. Назовите методы биотестирования, которые могут быть применимы к этому тест-объекту. Ответы поясните.

3.5. Проба воды отобрана в понедельник. В среду утром необходимо дать оценку воде: токсична она или нет. Какой вид токсикологического эксперимента Вы предлагаете? Какой тест-объект можно использовать?

3.6. К какому методу биотестирования относится микробиологический метод оценки состояния водных биоценозов?

3.7. Какой метод биотестирования необходимо использовать при определении эмбриотоксичности воды, то есть при исследовании нарушений развития эмбрионов водных животных и применении при этом метаболического критерия?

3.8. Биотестирование проводилось в лаборатории, где рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение частот нарушений в волосках тычинок, потерю репродуктивной способности клеток. Какой тест-объект при этом использовался? Какой метод биотестирования применялся?

3.9. Биотестирование загрязнения воды проводится с помощью ряски. Какие тест-функции ряски могут использоваться? Какой метод биотестирования применяется?

3.10. Дайте название описанной ниже методике.

Биотестирование проводится на моллюсках, которые в процессе фильтрации извлекают из воды одноклеточные организмы, что ведет к снижению оптической плотности воды в сосуде с моллюсками.

3.11. Из приведенных ниже слов составьте название методики биотестирования:

1) активность – оценка – веществ – опасности – химических – потенциальной – их – по – снижать – гидробионтов – фильтрационную – снижать;

2) воздействие – исследование – врожденного – параметров – иммунитета – животных – в – ответ – беспозвоночных – неблагоприятное – на;

3) окружающей – транскация – использование – мутагенного – для – действия – токсического – и – факторов – среды – оценки.

4. Рассмотрите представленные на кафедре тест-объекты, определить какие тест-функции используются при биотестировании. Определить методы биотестирования, применяемые в лаборатории кафедры.

5. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.

2. Краткое описание тест – объекта и методики биотестирования.

3. Описание эксперимента.

4. Обработку результатов эксперимента.

5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение следующим понятиям: «биотестирование»,



- «тест-объект», «тест-функция», «токситы», «токсичность».
2. Перечислите основные методы и подходы биотестирования.
  3. Как выполняются острые биотесты?
  4. Как выполняются хронические биотесты?

## **Лабораторная работа № 4**

### **Использование растений и животных в целях биоиндикации Оценка экологического состояния природных систем**

Цель: оценка состояния окружающей среды по характеру повреждений деревьев и кустарников.

Оборудование и материалы: лупы, линейка, карандаш, определитель насекомых вредителей древесных растений, определитель высших растений.

Болезни растений изучает специальная наука – фитопатология. Болезнь определяется как патологический процесс, развивающийся в растении вследствие внедрения возбудителя болезни или воздействия вредных биотических и абиотических факторов.

Патологический процесс

выражается в нарушении физиологических функций, в морфологических отклонениях от нормального состояния тканей органов, в отмирании или усыхании всего растения.

Различают инфекционные и неинфекционные болезни древесных и кустарниковых пород.

Неинфекционные

болезни возникают под влиянием неблагоприятных условий внешней среды: нарушение питания, влажности, температуры, почвы, вредных примесей воздуха, механических повреждений и других факторов.

Инфекционные болезни растений возникают под

воздействием патогенных организмов: грибов, бактерий,

вирусов. Грибы являются основными возбудителями болезней деревьев и кустарников.

Грибные болезни составляют 97% от всех болезней лесных пород, 2% – бактериальные и 1% – вирусные. Основные способы распространения болезней лесных пород – перенос инфекций воздушным потоком, водой, насекомыми, птицами и человеком.

Для оценки значения болезней растений в лесном хозяйстве и определения причиняемого ими ущерба употребляются термины «вредоносность» или «вред». Вредоносность зависит от биологии возбудителя, а также от климатических условий местообитания растения-хозяина.

Обычно болезни поражают отдельные растения в популяциях. В этих случаях заболевание называют рассеянным. Массовые поражения древостоев опасными болезнями с одновременным образованием очагов усыхания

на больших территориях носят название эпифитотий.

Обычно эпифитотии возникают из отдельных очагов болезни при наличии комплекса благоприятных условий со стороны растения-хозяина, возбудителя болезни и условий окружающей среды.

Болезнь диагностируется по вызвавшим ее причинам, возбудителю и симптомам поражения, ослабления растения. По совокупности сходных внешних и внутренних

признаков проявления инфекционные и неинфекционные

болезни группируются по типам. Типом болезни называют группу заболеваний,

характеризующихся определенным комплексом сходных симптомов и объединяемых общим названием.

Ход работы

1. Выберите два участка парка, леса или сквера, подверженные разной степени антропогенному загрязнению

(удаленность от источника токсических выбросов, от крупной транспортной магистрали и т.д.).

2. Провести фитопатологические обследования деревьев и кустарников (выборочно) на площадках. Осмотр кроны дерева (кустарника) выполняется в пределах уровня доступности с 4-х сторон света.
3. Выборочно обследовать листья побегов деревьев и кустарников длиной 1 метр, начиная с верхушки побега, на наличие повреждений, заболеваний и следов деятельности беспозвоночных. Указать степень повреждения.
4. Дать фитопатологическую характеристику состояния деревьев и кустарников на учетных площадках в зависимости от рекреационной нагрузки. Выполнить сравнительную оценку выбранных участков.
5. Результаты исследования оформить в тетради.

## **Лабораторная работа № 5**

### **Фитоиндикация качества окружающей среды по показателям флуктуирующей асимметрии**

Цель: оценка состояния окружающей среды по изменению морфометрических показателей (площадь листовой пластинки).

Оборудование и материалы: лупа, линейка, карандаш, бумага миллиметровая, ножницы, весы, образцы листьев.

Ход работы

1. Выберите два участка парка, леса или сквера, подверженные разной степени антропогенному загрязнению (удаленность от источника токсических выбросов, от крупной транспортной магистрали и т.д.).
2. Взять на участках пробы 20–25 листьев выбранной древесной породы, кустарника, травянистого растения.
3. Определить переводные коэффициенты для выбранных растений.
4. Вычислить площади листьев выбранных растений.
5. Дать сравнительную оценку площади листьев выбранных растений для участков с разным уровнем загрязнения.
6. Результаты исследования занести в тетрадь.

## **Лабораторная работа № 6**

### **Зооиндикация загрязнения почвопо количественной оценке популяции дождевых червей**

Цель: индикация индустриального загрязнения почв по количественной оценке популяции дождевых червей.

Оборудование и материалы: лопаты, пакеты для отбора проб, блокнот, карандаш, кусок клеенки, перчатки хозяйственные, пинцет, весы с точностью до грамма.

Индустриальное загрязнение почв связано с выбросами промышленных предприятий и автотранспорта (тяжелые металлы, углеводороды, оксиды углерода, серы, азота и др.) и химических средств защиты растений и удобрений в сельском хозяйстве (пестициды, нитраты).

Дождевые черви являются очень чувствительными индикаторами первичной стадии загрязнения почвы, т.к. обитают в верхних слоях почвы, имеют тонкие и влажные покровы тела. Даже при незначительном загрязнении они чутко реагируют снижением численности и биомассы популяций.

Важным ограничивающим фактором численности

дождевых червей даже в условиях антропогенного воздействия является влажность почвы – наиболее благоприятна

такая влажность, при которой зажатая в кулак почва образует ком, не липнущий к руке и сохраняющий свою форму, но рассыпающийся от легкого удара.

Методика зооиндикации состояния почв по дождевым червям следующая:

1. Закладываются профили (как правило, по сторонам горизонта и с учетом господствующих ветров) в зависимости от удаленности от источника загрязнения.

2. На профилях выбираются участки отбора проб. Как правило, участки располагают на расстоянии 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и т.д. километров от источника загрязнения. Участки отбора проб должны быть сходными по составу почвы,

растительному покрову и уровню залегания грунтовых вод.

Фоновые участки (контроль) должны находиться вне зоны действия загрязнения.

3. На участках закладываются пробные площадки. На пробных площадках измеряется толщина подстилки и степень разложения органических остатков подстилки как

косвенного показателя антропогенного загрязнения почв.

4. С пробной площадки берутся почвенные монолиты размером 20×20 см с глубины 0–5 см и 5–10 см (не менее 3 на участок с каждой глубины, оптимально – по 10).

79

5. Разбор монолитов осуществляется либо на месте (на клеенке), либо в лаборатории (монолит помещается в пакет и транспортируется в лабораторию).

6. Монолит разбирается на небольшие порции, которые тонким слоем распределяются по поверхности лабораторного стола (клеенки). Из слоя почвы пинцетом осторожно выбираются обнаруженные дождевые черви.

7. Выбранные с монолита дождевые черви в течение часа пересчитываются и взвешиваются.

8. Рассчитываются усредненные показатели численности (экз./м<sup>2</sup>) и биомассы (г/м<sup>2</sup>) дождевых червей на

участках, по которым дается сравнительная оценка уровня загрязнения почв.

По окончании оценки рекомендуется вернуть извлеченных дождевых червей на места взятия монолитов.

Ход работы

1. Выбрать несколько участков, подверженных в разной степени антропогенному загрязнению (удаленность от источника токсических выбросов, от крупной транспортной магистрали и т.д.).

2. Заложить пробные площадки и выполнить отбор почвенных монолитов.

3. Провести учет дождевых червей из почвенных монолитов. Результаты учета занести в таблицу 17.

4. Сравнить полученные данные между собой и с контролем. Сделать выводы об уровне загрязнения почвы антропогенными выбросами. Установить критическую и нормальную численность и биомассу дождевых червей для разных уровней загрязнения и для чистых почв.

Таблица 17

Данные учета дождевых червей

№

участка

№

пробы

Число червей (экз./м<sup>2</sup>

)

Масса червей (г/м<sup>2</sup>

)

Примечания

Среднее для

участка

5. Построить графики количественного изменения

численности и биомассы дождевых червей в зависимости от глубины и уровня загрязнения почв (удаленности

от источника загрязнения).

6. Результаты исследования занести в тетрадь. Цель: оценка загрязнения атмосферы по характеру повреждений хвои сосны обыкновенной.

Оборудование: миллиметровая бумага, линейка, бюксы для сбора хвоинок, пинцет, бинокляр.

Ход работы

1. Выберите два участка парка, леса или сквера, подверженные разной степени антропогенному загрязнению (удаленность от источника токсических выбросов, от крупной транспортной магистрали и т.д.).

2. Заложить пробные площадки. Оценить их близость к транспортным магистралям и степень вытаптывания площадки.

3. Выбрать модельные деревья и отобрать побеги прошлого года. Сделать оценку числа хвоинок на побегах.

4. Результаты обследования занести в таблицу.

5. Отобрать с побегов хвоинки и распределить их по степени повреждения и усыхания. Результаты занести в таблицу

6. Дать сравнительную оценку загрязнения атмосферы на обследованных участках.

7. Результаты исследования оформить в тетради.

## **Лабораторная работа № 7**

### **Биоиндикация загрязнения атмосферного воздуха с помощью лишайников**

Цель: оценить экологическое состояние атмосферной

среды по проективному покрытию стволов деревьев лишайниками в определенном участке города.

Оборудование и материалы: атлас-определитель

лишайников, рулетка, лупа, нож, прозрачная палетка, емкости для сбора лишайников.

Лишайники относятся к наиболее чувствительным

видам, остро реагирующим на загрязнение атмосферы

токсичными выбросами, особенно содержащими сернистый газ. Эта специфика часто используется для биологической индикации загрязнения атмосферного воздуха промышленными выбросами.

Лишайники – своеобразные симбиотические организмы, слоевище которых образовано грибом (микобионтом) и водорослью (фитобионтом) с преобладанием в

большинстве случаев первого. Поскольку слоевище и плодовые тела лишайников грибные по своей природе, современная систематика рассматривает эту группу в общей

системе царства грибов в качестве лишенизированных грибов. Подавляющее большинство лишайниковых грибов относятся к классу Ascomycetes – сумчатых грибов, образующих в результате полового процесса споры (аскоспоры), развивающиеся в гимениальном слое плодовых тел. Фотосинтезирующие компоненты лишайников относятся преимущественно к отделам зеленых (Chlorophyta) или синезеленых (Cyanophyta) водорослей. Водоросль снабжает гриб созданными ею в процессе фотосинтеза органическими веществами, а получает от него воду с растворенными минеральными солями. Кроме того, гриб защищает водоросль от высыхания.

Комплексная природа лишайников позволяет им получать питание не только из почвы, но также из воздуха,

атмосферных осадков, влаги росы и туманов, частиц пыли, оседающей на слоевище. Лишайники относительно неприхотливы к субстрату, однако большинство видов обладает

избирательной способностью и поселяется на определенном субстрате (на известняках, кварцах, коре деревьев или

гниющей древесине, на неподвижно лежащих предметах из стекла, кожи, железа и пр.). Лишайники требовательны к свету, могут переносить засуху, но нуждаются хотя бы в периодическом увлажнении, так как процесс фотосинтеза и дыхания идет лишь во влажных слоевищах.

По типу слоевища лишайники делят на накипные (корковые), листоватые, кустистые.

Накипные – имеют слоевище в виде тонкой (гладкой или зернистой, бугорчатой) корочки и очень плотно срастаются с субстратом (корой, камнем, почвой), отделить их без повреждений субстрата нельзя.

Листоватые – имеют вид мелких чешуек или пластинок, прикрепляются пучками грибных гиф (ризоидами) и легко отделяются от субстрата.

Кустистые – имеют вид тонких нитей или более толстых ветвящихся кустиков, прикрепляющихся к субстрату своими основаниями.

Наиболее устойчивыми к загрязнителям являются накипные лишайники, среднеустойчивы листоватые, а слабоустойчивы кустистые лишайники.

Эпифитные лишайники предпочитают старые деревья, причем для них имеет значение поверхность коры. На крупнобугристой коре старых деревьев обычно селятся кустистые виды, реже встречаются листоватые и накипные.

На слабоморщинистой коре молодых деревьев растут листоватые и накипные виды, а на гладкой коре поселяются в основном накипные лишайники.

В ряде работ показано, что с помощью лишайников можно получать вполне достоверные данные об уровне загрязнения воздуха. При этом можно выделить группу химических соединений и элементов, к действию которых лишайники обладают сверхповышенной чувствительностью: оксиды серы и азота, фторо- и хлороводород, а также тяжелые металлы. Многие лишайники погибают при малейшем загрязнении атмосферы этими веществами.

Процедура определения качества воздуха с помощью лишайников носит название лишеноиндикации.

Ход работы

1. Выбрать два участка леса (парка) с примерно одинаковым количеством деревьев в непосредственной близости от автомагистрали (№1) и на расстоянии 200–300 м от нее (№2).
2. Отмерить участки площадью 10×10 м, подсчитать на них количество деревьев.
3. Изготовить прозрачную сетку из плотного полиэтилена в виде квадрата 20×20 см, разделенную на 10 частей с каждой стороны (100 квадратиков).
4. Приложить прозрачную сетку плотно к стволу дерева на высоте 0,3–1,3 м. Подсчитать количество квадратов с лишайниками.
5. Подсчитать количество всех видов лишайников под прозрачной сеткой.
6. Подсчитать количество лишайников доминирующего вида. Степень покрытия лишайниками стволов деревьев выражается в процентах.
7. Заполнить таблицу .
8. С помощью таблицы оценить качество воздуха, используя средние значения (10 деревьев) числа видов лишайников, степени покрытия и общего количества лишайников на каждом исследуемом дереве.

Таблица 18

Оценка качества воздуха по проективному покрытию ствола дерева

Порядковый номер дерева

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Степень покрытия лишайниками, %

Количество видов лишайников

Количество лишайников доминирующего вида

Таблица 19

Шкала качества воздуха по проективному покрытию лишайниками стволов деревьев

Степень  
покрытия

Число видов лишайников

Число лишайников доминантного вида

Степень загрязнения

> 50%

>5 > 5

6-я зона

Очень чистый воздух

3–5 > 5

5-я зона

Чистый воздух

2–5 < 5 4-я зона

Относительно чистый воздух

20–50%

> 5 >5

> 2 < 5

3-я зона

Умеренное загрязнение

<20%

3–5 < 5

2-я зона

Сильное загрязнение  
0–2 < 5  
1-я зона  
Очень сильное загрязнение

## **Лабораторная работа № 8**

### **Биоиндикация токсичности природных вод с помощью дафний**

Цель. Познакомиться с внешним, внутренним строением дафнии как тест-объекта. Изучить и освоить методику определения токсичности вод.

Теоретические положения. Дафнии относятся к ветвистоусым рачкам. Их можно встретить в самых разнообразных водоемах (лужи, пруды, канавы, озера). Питаются обитающими в пресных водах мельчайшими организмами: водорослями, инфузориями и др. Рачки часто используются в качестве тестобъекта для определения токсических загрязнителей воды. Дафния — удобный лабораторный объект, так как она прозрачна.

Дафнии позволяют определить токсичность как сточных, так и природных вод. Показателем острой токсичности является гибель 50 % и более дафний в анализируемой воде по сравнению с контролем в течение 24, 48 и 96 ч.

Оборудование: культура дафний, микроскопы и препаровальные наборы, токсичный раствор (дихромат калия), чашки Петри, химические стаканы (50 и 100 мл).

Методика постановки опыта.

Приготовление культуры дафний. Для биоиндикации токсичности вод необходимо иметь культуру дафний. Исходный материал можно приобрести в специальных учреждениях или использовать свою культуру, но в последнем случае результаты не считаются достоверными.

При культивировании дафний берут водопроводную воду, отстоянную не менее 7 суток и насыщенную кислородом (не менее 6,0 мг/л), с рН = 7,0–8,2; жесткость общая — 3–4 мг/л.

Кормом служат зеленые водоросли (хлорелла) и хлебопекарные дрожжи.

Дрожжи готовят так: берут 1 г свежих или 0,3 г воздушно-сухих дрожжей, заливают их 100 мл дистиллированной воды. После набухания дрожжи тщательно перемешивают, дают отстояться в течение 30 мин. Используют только жидкость, которую добавляют в сосуды с дафниями в количестве 3 мл на 1 л воды.

Кормят дафний 1–2 раза в неделю. Зеленые водоросли можно приобрести в лабораториях и хранить в холодильнике (срок хранения 14 суток).

В жидкость с дафниями вносят 1 мл суспензии водорослей на 1 л воды.

Для культивирования дафний используют стеклянные сосуды емкостью 3–5 л.

Начальная плотность дафний от 6 до 10 особей на 1 л. Через 5–7 суток в сосуды добавляют воду для дальнейшего культивирования. В помещении, где находится культура дафний, не должно быть вредных газов и паров, оптимальная температура 20 °С, освещение рассеянное 12–14 ч в сутки. Посуду моют водой с пищевой содой, другие моющие средства не рекомендуются.

Отбор пробы воды для анализа. Для анализа на токсичность берут воду объемом до 1 л. Время от начала забора до опыта не должно превышать 6 часов, а температура хранения 4 °С. Взятую воду фильтруют через фильтровальную бумагу и заливают в емкость для биотестирования.

Проведение опыта.

1. На предметном стекле рассмотреть и зарисовать строение пресноводного рачка — дафнии. Найти и подписать основные органы.

С помощью капельницы выберите одну или две особи дафнии из сосуда с культурой и положите их на предметное стекло. Удалите как можно больше воды с предметного стекла, оставив ровно столько, сколько нужно, чтобы дафнии оставались живыми.

Движение животных можно замедлить, положив несколько ватных волокон под покровное стекло. Положите предметное стекло под микроскоп с малым увеличением и с помощью рисунка определите основные части дафний.

2. Приготовить контрольную и опытную культуры дафний. Берут 3 сосуда для исследуемой воды и 3 сосуда для контрольной пробы, не содержащей токсических веществ. Наливают в них по 100 мл исследуемой и контрольной воды. В качестве контрольной можно использовать водопроводную воду с отстаиванием в течение 7 суток.

В каждый сосуд помещают по 10 дафний. Их переносят стеклянной трубкой диаметром 5-7 мм. Наблюдают за ходом эксперимента через 24, 48 или 96 ч. Дафний во время эксперимента не кормят. После окончания эксперимента производят подсчет дафний. Выжившими считаются дафнии, если они свободно плавают в воде или всплывают со дна сосуда не позднее 15 с после его легкого покачивания.

Проведение подсчета: Результаты после 3 повторений складывают, находят среднее арифметическое количество выживших дафний в контроле и опыте. Для расчета процента гибели дафний в опыте по отношению к контролю используют формулу:  $X - X_{\text{ф}} / X \times 100 \%$ , где  $X$  — среднее арифметическое количество выживших дафний в контроле,  $X_{\text{ф}}$  — среднее арифметическое количество выживших дафний в опыте.

Проба воды оценивается как токсичная, если за 24 ч опыта в ней гибнет  $> 50 \%$  дафний по сравнению с контролем.

Сделайте вывод о токсичности воды.

### **Примерные тестовые задания**

1. Определение термина «биоиндикация»:

- А. Использование животных для обнаружения загрязнителей или других агентов в окружающей среде
- В. Использование особо чувствительных организмов для обнаружения загрязнителей или других агентов в окружающей среде
- С. Использование растений для обнаружения загрязнителей или других агентов в окружающей среде
- Д. Использование лишайников для обнаружения загрязнителей или других агентов в окружающей среде
- Е. Обнаружение загрязнителей или других агентов в окружающей среде

2. Метод оценки абиотических и биотических факторов местообитания при помощи биологических систем:

- А. Биоиндикация
- В. Мониторинг
- С. Биотестирование
- Д. Биомоделирование
- Е. Наблюдение

3. Обнаружение и определение биологически и экологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ:

- А. Биоиндикация
- В. Мониторинг
- С. Биотестирование
- Д. Биомоделирование
- Е. Наблюдение

4. Метод обнаружения и оценки воздействия абиотических и биотических факторов на живые организмы при помощи биологических систем:

- А. Биоиндикация
- В. Мониторинг



- C. Биотестирование
- D. Биомоделирование
- E. Наблюдение

5. Система наблюдений, оценки и прогноза любых изменений в биоте, вызванных факторами антропогенного происхождения

- A. Биоиндикация
- B. Мониторинг
- C. Биотестирование
- D. Биологический мониторинг
- E. Наблюдение

6. Биологические объекты (от клеток и биологических макромолекул до экосистем и [биосферы](#)), используемые для оценки состояния среды:

- A. Эндемики
- B. Реликты
- C. Доминанты
- D. Биоиндикаторы
- E. Эдификаторы

7. Организмы или сообщества организмов, жизненные функции которых так тесно коррелируют с определенными факторами среды, что могут применяться для их оценки:

- A. Эндемики
- B. Реликты
- C. Доминанты
- D. Биоиндикаторы
- E. Эдификаторы

8. Биоиндикаторы, которых используют для оценки качества воздуха, воды или почвы в лабораторных опытах:

- A. Эндемики
- B. Реликты
- C. Доминанты
- D. Тест-организмы
- E. Эдификаторы

9. Это не является критерием выбора биоиндикатора:

- A. Мониторинговые возможности (постоянно присутствующий в природе объект)
- B. Надежность (ошибка <20%)
- C. Простота
- D. Быстрый ответ
- E. Медленный ответ

10. Степень реакции биоиндикатора на оказываемое на него воздействие со стороны какого-то вещества, физического или биологического фактора либо со стороны окружающей его среды в целом:

- A. Приспособленность
- B. Совместимость
- C. Чувствительность
- D. Выживаемость
- E. Раздражимость

11. Биоиндикатор обладает характерной для какого-либо определенного стрессора реакцией:

- A. Биоиндикатор комплексный

- В. Биоиндикатор косвенный
- С. Биоиндикатор неспецифический
- Д. Биоиндикатор прямой
- Е. Биоиндикатор специфический

12. У данного вида биоиндикатора реакция вызвана непосредственным воздействием внешнего фактора:

- А. Биоиндикатор комплексный
- В. Биоиндикатор косвенный
- С. Биоиндикатор неспецифический
- Д. Биоиндикатор прямой
- Е. Биоиндикатор специфический

13. Организм этого индикатора реагирует однотипно на действие одного или нескольких стрессоров, или их сочетаний:

- А. Биоиндикатор комплексный
- В. Биоиндикатор косвенный
- С. Биоиндикатор неспецифический
- Д. Биоиндикатор прямой
- Е. Биоиндикатор специфический

14. У данного вида биоиндикатора реакция на стрессовое воздействие возникает через систему опосредованных взаимосвязанных реакций и напрямую не связана с этим воздействием:

- А. Биоиндикатор комплексный
- В. Биоиндикатор косвенный
- С. Биоиндикатор неспецифический
- Д. Биоиндикатор прямой
- Е. Биоиндикатор специфический

15. Биоиндикатор обладает устойчивой связью с объектом индикации только на какой-то определенной территории:

- А. Биоиндикатор отрицательный
- В. Биоиндикатор положительный
- С. Биоиндикатор локальный
- Д. Биоиндикатор панареальный
- Е. Биоиндикатор региональный

16. Биоиндикатор сохраняет единообразную связь с объектом индикации на всей территории, в пределах которой он встречается, т. е. в пределах всего ареала:

- А. Биоиндикатор отрицательный
- В. Биоиндикатор положительный
- С. Биоиндикатор локальный
- Д. Биоиндикатор панареальный
- Е. Биоиндикатор региональный

17. Биоиндикатор сохраняет свое значение лишь в пределах одной или нескольких областей со сходными физико-химическими условиями:

- А. Биоиндикатор отрицательный
- В. Биоиндикатор положительный
- С. Биоиндикатор локальный
- Д. Биоиндикатор панареальный
- Е. Биоиндикатор региональный

18. Биоиндикатор характеризуется увеличением реакции (количественных характеристик) при нарастании стресса:

- A. Биоиндикатор отрицательный
- B. Биоиндикатор положительный
- C. Биоиндикатор локальный
- D. Биоиндикатор панареальный
- E. Биоиндикатор региональный

19. Биоиндикатор характеризуется уменьшением реакции (количественных характеристик) при нарастании стресса:

- A. Биоиндикатор отрицательный
- B. Биоиндикатор положительный
- C. Биоиндикатор локальный
- D. Биоиндикатор панареальный
- E. Биоиндикатор региональный

20. Перевод с латинского языка слова Indicator:

- A) указатель
- B) показатель
- C) наблюдение
- D) устройство по наблюдению
- E) переключатель

21. Что показывают индикаторы?

- A) в каком направлении движется система: совершенствуется, деградирует или же остается прежней
- B) как развивается экосистема
- C) как развивается социозекосистема
- D) систему устройства по наблюдению и прогнозированию
- E) как развиваться человечеству

22. Живые биоиндикаторы имеют ряд преимуществ перед химическими методами оценки состояния окружающей среды. Что не относится к данным преимуществам:

- A. Они суммируют все без исключения биологически важные данные об окружающей среде и отражают ее состояние в целом
- B. В условиях хронической антропогенной нагрузки биоиндикаторы могут реагировать только на сильные воздействия в силу аккумуляции дозы
- C. Исключают необходимость регистрации физических и химических параметров среды
- D. Указывают пути и места скоплений различного рода загрязнений в экологических системах и возможные пути попадания этих веществ в пищу человека
- E. Фиксируют скорость происходящих в окружающей среде изменений

23. Живые биоиндикаторы имеют ряд преимуществ перед химическими методами оценки состояния окружающей среды. Что не относится к данным преимуществам:

- A. Позволяют судить о степени вредности синтезированных человеком веществ для природы и человека и позволяют контролировать действие этих веществ
- B. Помогают нормировать допустимую нагрузку на экосистемы, различающиеся по своей устойчивости к антропогенному воздействию, так как одинаковый состав и объем загрязнений может привести к различным реакциям природных систем в разных географических зонах
- C. Делают необязательным применение дорогостоящих и трудоемких физических и химических методов для измерения биологических параметров
- D. Указывают пути и места скоплений различного рода загрязнений в экологических системах и возможные пути попадания этих веществ в пищу человека

Е. Фиксируют скорость происходящих в окружающей среде изменений

24. Что не является требованием, которому должен удовлетворять биоиндикатор:

А. низкая изменчивость при высокой индивидуальной изменчивости

В. генетическая однородность

С. экологическая пластичность

Д. легкость идентификации в природе

Е. оперативность получения информации

25. Что не является требованием, которому должен удовлетворять биоиндикатор:

А. высокая чувствительность при низкой индивидуальной изменчивости

В. генетическая однородность

С. экологическая пластичность

Д. сложность идентификации в природе

Е. оперативность получения информации

### **Примерные вопросы для промежуточной аттестации студентов:**

#### **в форме зачета:**

1. Цели и задачи биологического мониторинга.
2. Виды мониторинга.
3. Принципы организации биологического мониторинга.
4. Норма реакции, экологическая валентность, адаптации организмов к изменениям условий среды, толерантность и резистентность.
5. Биоиндикаторы, биомаркеры и тест-системы
6. Общие представления о биоиндикации и уровни биоиндикации
7. Основные подходы в биоиндикации
8. Принципы использования биоиндикаторов. Виды биоиндикаторов
9. Классификация индикаторных признаков.
10. Принципы выбора биоиндикатора. Требования к биоиндикатору.
11. Специфическая и неспецифическая индикация.
12. Возможности и практическое значение биоиндикации
13. Прямая и косвенная биоиндикация
14. Биотестирование и решаемые с его помощью задачи.
15. Принцип выбора тест-системы. Требования к тест-системе.
16. Биологические показатели, используемые при биоиндикации и биотестировании на молекулярно-генетическом и клеточном уровне.
17. Биологические показатели, используемые при биоиндикации на организменном уровне.
18. Биологические показатели, используемые при биоиндикации на популяционно-видовом и биоценотическом уровне
19. Виды антропогенных воздействий на биосферу
20. Диагностика почв. Способы определения состояния почв по живым организмам; индикаторные виды почвенных организмов.
21. Оценка качества воды.
22. Изменения водных экосистем при антропогенном загрязнении.
23. Оценка сапробности, токсобности и трофности вод
24. Биотические индексы в оценке экологического состояния водоемов и водотоков
25. Интегральная и комплексная оценка качества воды.
26. Нормирование качества природной среды. Предельно-допустимые концентрации и предельно-допустимые воздействия

### **2.4 Примерные темы к курсовым работам (проектам)**

Курсовые работы по дисциплине не предусмотрены

## 2.5 Оценка компетенций (в целом)

Оценивание обучающегося на промежуточной аттестации в форме зачета осуществляется в соответствии с критериями, представленными в таблице, и носит балльный характер.

Качество освоения ОПОП - рейтинговые баллы	Оценка зачета (нормативная)	Уровень достижений компетенций	Критерии оценки образовательных результатов
85-100	Зачтено	Высокий (продвинутый)	<p>ЗАЧТЕНО заслуживает обучающийся, обнаруживший всестороннее, систематическое и глубокое знание учебно-программного материала на занятиях и самостоятельной работе. При этом, рейтинговая оценка (средний балл) его текущей аттестации по дисциплине входит в диапазон 85-100.</p> <p>При этом, на занятиях обучающийся исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно излагал учебно-программный материал, умел тесно увязывать теорию с практикой, свободно справлялся с задачами, вопросами и другими видами применения знаний, предусмотренные программой. Причем обучающийся не затруднялся с ответом при видоизменении предложенных ему заданий, правильно обосновывал принятое решение, демонстрировал высокий уровень усвоения основной литературы и хорошо знакомство с дополнительной литературой, рекомендованной программой дисциплины. Как правило, оценку «отлично» выставляют обучающемуся, усвоившему взаимосвязь основных понятий дисциплины в их значение для приобретаемой профессии, проявившему творческие способности в понимании, изложении и использовании учебно-программного материала. Сформированность компетенций на высоком (продвинутом) уровне. Рейтинговые баллы назначаются обучающемуся с учетом баллов текущей (на занятиях) и (или) рубежной аттестации (контроле).</p>
70-84	Зачтено	Хороший (базовый)	<p>ЗАЧТЕНО заслуживает обучающийся, обнаруживший осознанное (твердое) знание учебно-программного материала на занятиях и самостоятельной работе. При этом, рейтинговая оценка (средний балл) его текущей аттестации по дисциплине входит в диапазон 70-84. На занятиях обучающийся грамотно и по существу излагал учебно-программный материал, не допускал существенных неточностей в ответе на вопрос, правильно применял теоретические положения при решении практических вопросов и задач, владел необходимыми навыками и приемами их выполнения, уверенно демонстрировал хороший уровень усвоения основной литературы и достаточное знакомство с дополнительной литературой, рекомендованной программой дисциплины. Как правило, оценку «хорошо» выставляют обучающемуся, показавшему систематический характер знаний по дисциплине и способным к их самостоятельному пополнению и обновлению в ходе дальнейшей учебной работы и профессиональной деятельности.</p> <p>Сформированность компетенций на хорошем (базовом) уровне. Рейтинговые баллы назначаются обучающемуся с учетом баллов текущей (на занятиях) и (или) рубежной аттестации (контроле).</p>
60-69	Зачтено	Достаточный (минимальный)	<p>ЗАЧТЕНО заслуживает обучающийся, обнаруживший минимальные (достаточные) знания учебно-программного материала на занятиях и самостоятельной работе. При этом, рейтинговая оценка (средний балл) его текущей аттестации по дисциплине входит в диапазон 60-69.</p> <p>На занятиях обучающийся демонстрирует знания только основного материала в объеме, необходимом для дальнейшей учебы и</p>

			<p>предстоящей профессиональной работы, слабое усвоение деталей, допускает неточности, в том числе в формулировках, нарушает логическую последовательность в изложении программного материала, испытывает затруднения при выполнении практических заданий и работ, знакомый с основной литературой, слабо (недостаточно) знаком с дополнительной литературой, рекомендованной программой.</p> <p>Как правило, оценку «удовлетворительно» выставляют обучающемуся, допускавшему погрешности в ответах на занятиях и при выполнении заданий, но обладающим необходимыми знаниями для их устранения под руководством преподавателя. Сформированность компетенций на достаточном (минимальном) уровне. Рейтинговые баллы назначаются обучающемуся с учётом баллов текущей (на занятиях) и (или) рубежной аттестации (контроле).</p>
Менее 60	Не зачтено	Недостаточный (ниже минимального)	<p>НЕ ЗАЧТЕНО выставляется обучающемуся, который не знает большей части учебно-программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с большими затруднениями выполняет практические работы на занятиях и самостоятельной работе. Как правило, оценка «неудовлетворительно» ставится обучающемуся продемонстрировавшего отсутствие целостного представления по дисциплине, предмете, его взаимосвязях и иных компонентов. При этом, обучающийся не может продолжить обучение или приступить к профессиональной деятельности по окончании вуза без дополнительных занятий по соответствующей дисциплине. Компетенции, закреплённые за дисциплиной, сформированы на недостаточном уровне или не сформированы. Рейтинговые баллы назначаются обучающемуся с учётом баллов текущей (на занятиях) и (или) рубежной аттестации (контроле).</p>