

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**  
*Кафедра прикладной экологии*

**П.А. КУРЫНЦЕВА и П.Ю. ГАЛИЦКАЯ**

**МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ,  
ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ  
ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

(Методические указания к специальному практикуму  
по прикладной экологии)

**Казань – 2018**

**УДК 504.064**  
**ББК 20.1**

*Принято на заседании кафедры прикладной экологии  
Протокол № 8 от 7 марта 2018 года*

**Рецензент:**

кандидат географических наук,  
профессор кафедры прикладной экологии КФУ **С.Ю. Селивановская**

**Курынцева П.А., Галицкая П.Ю.**

Методы биотестирования применяемые для оценки токсичности объектов окружающей среды (Методические указания к специальному практикуму по прикладной экологии) /

Курынцева П.А., Галицкая П.Ю.– Казань: Казан. ун-т, 2018. – 43с.

В пособии рассмотрены вопросы биотестирования объектов окружающей среды с использованием типичных представителей почвенной флоры, фауны и микроорганизмов, а также методы определения токсичности и показателей биологической активности почв и иных твердых сред. Предназначено для студентов, специализирующихся в области экологии и охраны окружающей среды. Может представлять интерес для преподавателей, аспирантов, специалистов соответствующих профилей.

© Курынцева П.А., Галицкая П.Ю., 2018  
© Казанский университет, 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
1. Определение эффектов загрязняющих веществ	7
1.1 Подготовка водного экстракта: Твердые отходы и осадки сточных вод	7
1.2 Подготовка водного экстракта: Шламы	8
1.3 Подготовка водного экстракта: Жидкие отходы	9
1.4 Приготовление разбавлений исследуемых проб для анализа	10
1.5 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования	11
2. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта <i>Paramecium caudatum</i>	11
2.1 Характеристика тест-объекта	12
2.2 Культивирование тест-объекта	13
2.3 Процедура биотестирования	15
2.4 Обработка и оценка результатов	16
3. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта <i>Daphnia magna</i> Straus	19
3.1 Характеристика тест-объекта	20
3.2 Культивирование тест-объекта	22
3.3 Процедура биотестирования	23
3.4 Обработка и оценка результатов	23
4. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer	26

4.1 Характеристика тест-объекта	27
4.2 Процедура биотестирования	28
4.3 Обработка и оценка результатов	30
5. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта бактерий <i>Pseudomonas putida</i>	32
5.1 Характеристика тест-объекта	33
5.2 Подготовка посуды, материалов и реактивов	33
5.3 Хранение и поддержание основной культуры	34
5.4 Приготовление предварительной культуры	34
5.6 Процедура биотестирования	34
5.6 Оценка и обработка результатов	35
6. Определение фитотоксичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта семян редиса <i>Raphanus sativus</i>	35
6.1 Характеристика тест-объекта	35
6.2 Подготовка посуды и материалов	36
6.3 Процедура биотестирования	36
6.4 Обработка и оценка результатов	37
7. Определение фитотоксичности почв (контактный метод)	39
7.1 Процедура биотестирования	40
7.2 Обработка и оценка результатов	40
Литература	41

## Введение

Ежегодно в мире синтезируется огромное количество новых соединений, порядка 2000 из которых потом поступают в промышленное производство. Для диагностики состояния окружающей среды уже недостаточно использовать только химические методы и систему нормирования содержания загрязняющих веществ в компонентах среды (Никаноров, Трунов, 1999). Альтернативным подходом включающим в себя контроль содержания отдельных химических соединений, может выступать биологический контроль окружающей среды, который осуществляется с использованием двух основных групп методов: биоиндикация и биотестирование. Биотестирование представляет собой классический экспериментальный методический прием, используемый в токсикометрии для разработки нормативов содержания химических веществ в окружающей среде. Биоиндикация – это определение биологически значимых нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ. Биотестирование – процедура установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих нарушением жизненно важных функций об изменениях в среде. Группа методов биотестирования активно развивалась в направлении поиска новых, отличающихся чувствительностью к загрязняющим веществам тест-организмов и выявления у них информативных тест-функций, а также автоматизации токсикологического анализа. В итоге научно-исследовательская практика предоставляет колоссальный спектр тест-организмов и их тест-функций (Олькова, 2014). К сожалению, большинство из них остаются в руках узких специалистов по ряду причин: трудоемкость содержания предложенного тест-организма, сложность оценки токсического эффекта, отсутствие разработанного метрологического обеспечения методики. С этих позиций перспективной оказывается стратегия расширения методических приемов, основанных на оценке ответной реакции тест-объекта. Тест-объекты – это организмы, используемые при оценке токсичности химических веществ и их

смесей, компонентов окружающей среды (природные воды, почвы, донные отложения), кормов, а также техногенных сред (сточных вод, отходов производства). По определению Л.П. Брагинского (2000), тест-организмы представляют собой “датчики” сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) среды, независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически неопределяемых веществ. На практике наиболее распространены методы биотестирования, фиксирующие, главным образом, интегральные параметры (выживаемость, рост, плодовитость) тест-организмов, надежность которых экспериментально подтверждена (Жмур, 1997). Важное условие проведения биотестирования – использование генетически однородных лабораторных культур, которые проходят проверку на чувствительность к токсическим веществам, содержатся в специальных, оговоренных стандартами лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую сходимость и воспроизводимость результатов исследований (Брагинский, 2000). Гарантия высокого качества токсикологических анализов и успешного решения комплекса современных задач теми или иными методами биотестирования достигается жесткими требованиями, предъявляемыми к ним:

- 1) способность оценить любые экологические изменения среды обитания живых организмов;
- 2) отражение наиболее общих и важных параметров жизнедеятельности биоты;
- 3) чувствительность даже к начальным обратимым экологическим изменениям;
- 4) адекватность для любого вида живых существ и любого типа воздействия;
- 5) возможность использования не только для лабораторного моделирования, но и для исследований в природе;
- 6) простота и экономичность (Терехова, 2003).

Согласно данным литературы, наиболее широкое распространение получили методы определения токсичности с использованием представителей микроорганизмов, простейших, низших ракообразных и высших растений.

При оценке токсичности индивидуальных соединений или их смесей в почве наиболее часто определяемыми показателями являются ЛД50 (ЛС50), ЛД10 (ЛС10). Это дозы или концентрации вещества, вызывающие 50%-ную либо 10%-ную гибель тест-объекта. В том случае, когда фиксируемой реакцией является не гибель организма, а какая-то другая тест-функция, определяют ЕС50, ЕС10. Это так называемые эффективные концентрации, вызывающие 50%- или 10%-ное изменение изучаемой функции организма или экосистемы соответственно. В ряде случаев определяют эффективную концентрацию вещества, вызывающего достоверное изменение тест-функции. В зарубежной литературе встречаются такие показатели, как LOEC (lowest observed effect concentration) – концентрация, при которой наблюдается минимальный эффект, и NOEC (no observed effect concentration) – концентрация, следующая сразу после концентрации, вызывающей минимальный эффект.

## **1. Определение эффектов загрязняющих веществ**

При определении эффектов загрязняющих веществ, входящих в состав почв, а также твердых или пастообразных проб (отходы, осадки сточных вод), проводят как непосредственное исследование образцов, так и анализ их водных экстрактов.

### **1.1 Подготовка водного экстракта: Твердые отходы и осадки сточных вод**

Пробу тщательно перемешивают перекачиванием на гладкой, гибкой и плотной подстилке, для этого пользуются совком. В случае обнаружения частиц более 10 мм, их осторожно измельчают с помощью металлического шпателя до размера менее 10 мм либо гомогенизируют в почвоизмельчителе. Затем пробу высушивают до воздушно-сухого состояния. При плохом высыхании отхода

экспозицию высушивания увеличивают до 24 часов. Влажность осадков и отходов определяют согласно ГОСТ 28268-89. Измеренную характеристику влажности используют для расчета массы воздушно-сухой пробы, предназначенной для приготовления водной вытяжки. Водная вытяжка из осадков сточных вод и отходов готовится из соотношения «твердая фаза : жидкость», равного 1:10. В качестве жидкости используется дистиллированная вода с рН 7,0-7,5. Полученную смесь перемешивают в течение 6 часов на ротаторе. После 24-часового отстаивания и сифонирования надосадочной жидкости полученный раствор фильтруется через бумажный фильтр (белая, красная ленты). Проба, подлежащая биотестированию, должна иметь рН 7,0-8,0. Если рН выходит за указанные пределы, подкисление осуществляют 10%-ным раствором HCl, подщелачивание - 10%-ным раствором NaOH. Соляная кислота - раствор в концентрации 0,5 моль /дм<sup>3</sup>: 40 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты (d=1,19) добавляют к 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и доводят до 1дм<sup>3</sup>. Гидроксид натрия, раствор в концентрации 0,5 моль/дм<sup>3</sup>: навеску 20г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 дм<sup>3</sup>.

## **1.2 Подготовка водного экстракта: Шламы**

Шламы с большим содержанием твердой фазы, не разделяющиеся самостоятельно, обрабатывают так же, как твердые отходы. Отдельно определяют содержание влаги. Массу шлама, эквивалентную (100±1) г абсолютно-сухой массы, используют для приготовления водной вытяжки. Шламы с большим содержанием жидкости (влажность более 70 %) обрабатывают следующим образом. Жидкость фильтруют через вакуумный фильтр (0,45 мкм) и собирают 300 г влажно-твердого материала. Если такого количества пробы недостаточно для получения 200 г абсолютно-сухого вещества, собирают столько пробы, сколько необходимо. Пробы высушивают до воздушно-сухого состояния. При плохом высушивании экспозицию



увеличивают до 24ч. Твердые шламы выщелачивают дистиллированной водой с рН 7,0-7,5 в пропорции 1:10.

### **1.3 Подготовка водного экстракта: Жидкие отходы**

Отходы и осадки сточных вод, жидкие и содержащие менее 1 % взвешенного материала, не подвергают выщелачиванию, а испытывают прямо на экотоксичность методами биотестирования после фильтрации через фильтр «белая лента» или центрифугирования.

Подготовка экстрактов к биотестированию производится согласно рекомендациям к каждой из методик. Однако, есть общие правила, касающиеся всех методик элюатного биотестирования. Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры  $20 \pm 2$  °С. При наличии в пробах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) их следует удалить отстаиванием в течение 30-120 мин, фильтрованием или центрифугированием. Взвешенные частицы в исследуемой на токсичность воде могут исказить результаты биотестирования, так как снижают интенсивность возбуждающего света и флуоресценции водорослей. Фильтрация пробы производится через наиболее пористые обеззоленные фильтры «белая лента» (недопустимо использовать «синюю ленту», так как она задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования). Природные воды фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 3.5 мкм (фильтр перед применением должен быть промыт и простерилизован кипячением в дистиллированной воде не менее 10 мин) или через обеззоленные фильтры «белая лента». Центрифугирование является предпочтительным методом удаления взвешенных частиц перед биотестированием. Воду, предназначенную для исследования на токсичность, центрифугируют 10 мин при скорости вращения от 4000 до 4500 обор/мин. Активный хлор, используемый для обеззараживания питьевых и сточных вод, является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием питьевых

вод, а также при необходимости анализа сточных вод после системы хлорирования хлор следует удалить из исследуемой воды отстаиванием пробы с открытой крышкой при температуре от +2 до +4°C не менее 24 часов. Проба воды, подлежащая биотестированию, должна иметь рН 7,0-8,5. Если рН пробы выходит за указанные пределы, то в отдельном эксперименте устанавливается токсичность, вызываемая водородным показателем. Затем определяется токсичность воды после нейтрализации пробы. Подкисление осуществляют 10%-ным раствором HCl, подщелачивание – 10 %-ным раствором NaOH. После нейтрализации пробы аэрируют 10-20 мин для стабилизации рН. Регулирование рН не должно вызывать химической реакции с веществами, присутствующими в пробе (выпадение осадка, комплексообразование) и не должно более чем на 5 % изменять концентрацию исследуемых вод.

В протоколе биотестирования указывают токсичность проб после нейтрализации и без нейтрализации. Заключение о токсичности вод дается по пробе без нейтрализации. Данные о токсичности проб после нейтрализации указываются в протоколе для принятия правильного природоохранного решения по снижению неблагоприятного воздействия вод на объекты окружающей среды с применением методов нейтрализации водородного показателя.

#### **1.4 Приготовление разбавлений исследуемых проб для анализа**

Для разбавления исследуемых водных вытяжек используется культивационная вода. Образцы с неизвестной степенью токсичности анализируются в 100%-, 50%-, 25%- и 10%-ной концентрациях. При заведомо ожидаемой высокой токсичности исследуемые образцы анализируются в 10%-, 3%-, 1%-, и 0,1%-ной концентрациях. Возможен произвольный выбор разведений. Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной пробы.

После получения предварительных или окончательных результатов биотестирования при необходимости готовятся дополнительные разбавления.

### **1.5 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования**

Для отбора проб, хранения, а также проведения биотестирования обычно используется посуда из пластика, а при наличии в почве нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов используются банки из темного стекла. Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2-3 часа посуда оставляется, затем она тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, - в сушильном шкафу при 160<sup>0</sup>С в течение 1 часа. Химически чистая посуда для биотестирования должна храниться с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п. Вся грязная посуда после проведения анализов должна подвергаться стерилизации кипячением в течение 1 часа.

## **2. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта**

### ***Paramecium caudatum***

Методика основана на определении смертности парameций (*Paramecium caudatum*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой пробе, по сравнению с контролем.

Острое токсическое действие исследуемой пробы на парameций определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более парameций за 1 час в исследуемой пробе, при условии, что в контроле гибель не превышает 10%.

При определении острой токсичности устанавливают:

- среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель 50% тест-объектов (время экспозиции - 1 час);

- безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель не более 10% при времени экспозиции - 1 час.

## **2.1 Характеристика тест-объекта**

В качестве тест-объекта используют лабораторную монокультуру *Paramecium caudatum* Ehrenberg. *Paramecium caudatum* – одноклеточные организмы размером 180-300 мкм. Тело сигарообразной или веретенообразной формы, покрытое плотной оболочкой (пелликулой). Передний конец закруглен, задний заострен. Реснички одинаковой длины, равномерно покрывают все тело парameции, лишь на заднем конце они несколько длиннее остальных. Питание осуществляется через рот, расположенный на дне околотротовой впадины (перистом). Перистом расположен близко к центру тела. Под оболочкой по всей поверхности тела имеются многочисленные трихоцисты, выполняющие защитную функцию. Ядерный аппарат представлен двумя видами ядер: макронуклеусом (имеет бобовидную форму, лежит в центре тела) и микронуклеусом (шаровидной формы). Две пульсирующие вакуоли, регулирующие водный баланс, расположены в разных концах тела. Количество пищеварительных вакуолей непостоянно и зависит от количества пищи.

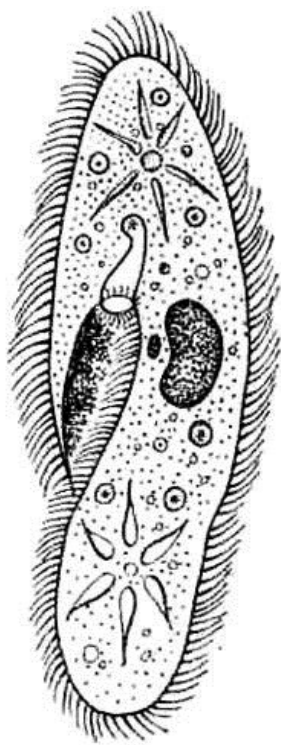


Рис. 1 Строение *Paramecium caudatum*

Бесполое размножение осуществляется поперечным делением на две дочерние особи. Половое размножение происходит по типу конъюгации, т.е. временного соединения двух особей для обмена частями ядерного аппарата. Питаются парамеции бактериями, мелкими жгутиконосцами, водорослями. Относятся к эвриоксибионтам, т.е. могут встречаться в среде с широким колебанием содержания растворенного в воде кислорода. Оптимальная температура 24-28<sup>0</sup>С, оптимальная концентрация солей во внешней среде составляет 600-1400 мг/л. Для парамеций характерно быстрое размножение при наступлении благоприятных условий (2-4 деления в сутки) и такое же быстрое исчезновение при обратном явлении.

*Paramecium caudatum* - массовый вид, обитающий в пресной воде с высоким содержанием органических веществ. В сточной воде является часто основным видом, поли-альфа-мезосапроб. Простейшие, в том числе ресничные инфузории, составляют основную часть микрофауны активного ила. Они участвуют в освобождении очищаемой воды от взвешенных бактериальных клеток и от рыхлых, плохо оседающих бактериальных агломератов, способствуя тем самым повышению эффективности очистки.

## 2.2 Культивирование тест-объекта

Культуру парамеций выращивают в термостате при температуре 28<sup>0</sup>С. В качестве культиваторов используют пробирки (объемом 20 мл), которые наполняют 10 мл дехлорированной водопроводной водой. Пересевают культуру инфузорий один раз в месяц (при необходимости один раз в три недели). Для

этого в пробирки наливают по 10 мл дехлорированной водопроводной воды, помещают в водяную баню и выдерживают в кипящей водяной бане 15-20 минут. Затем пробирки вынимают, охлаждают содержимое и добавляют в каждую пробирку пипеткой 0,02 мл (одна капля) разбавленного в 20 раз молока.

Пробирки помещают на сутки в термостат при температуре 27-28°C для развития бактерий, которыми питаются парамеции. Через сутки в каждую пробирку снова добавляют по одной капле разбавленного молока. Таким образом, содержимое пробирок становится питательной средой для выращивания парамеций.

Пересев клеток из старой культуры на свежую питательную среду производят следующим образом. На предметный столик бинокюляра помещают микроаквариум. Устанавливают такое увеличение, чтобы вся лунка микроаквариума была в поле зрения. Одну из лунок заполняют старой культурой. Четыре лунки (если культура заражена другими простейшими, то шесть лунок) заполняют на 1/3 объема дехлорированной водопроводной водой. Капиллярной пипеткой отбирают небольшое количество старой культуры и переносят в первую лунку с водопроводной водой. Пипетку тщательно промывают и, наблюдая в микроскоп, переносят клетки из первой лунки во вторую, затем из второй в третью и так далее, каждый раз тщательно промывая капиллярную пипетку. Таким образом, клетки парамеций отмывают от остатков старой среды и избавляют от других простейших в случае зараженной исходной культуры. Из последней лунки чистой капиллярной пипеткой инфузорий переносят в пробирки с подготовленной свежей питательной средой, помещая в каждую пробирку по одной особи. Пробирки с посевами ставят в термостат при температуре 28°C.

Каждый день инфузорий кормят молоком, разбавленным в 20 раз дехлорированной водопроводной водой, добавляя пипеткой на 1-3 мл в каждую

пробирку по 1 капле разбавленного в 20 раз молока. В день постановки опыта кормление культуры не производят.

Культивационная вода используется для культивирования парameций, в качестве контрольной при биотестировании и для разбавления исследуемых вод. Для подготовки культивационной воды водопроводную воду отстаивают в течение 3 суток (до полного дехлорирования) в бутылки из бесцветного стекла. При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускается использование поверхностной пресной воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм. Культивационная вода должна удовлетворять следующим требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ и антагонистических для парameций организмов (простейших, многоклеточных);

- рН - 7,0-8,0;

- жесткость общая от 60 до 200 мг/л (выраженная в CaCO<sub>3</sub>);

- концентрация растворенного кислорода - не менее 6 мгО<sub>2</sub>/л;

- температура +20 ± 2°С;

### **2.3 Процедура биотестирования**

Для определения токсичности проводится биотестирование исходной водной вытяжки (раствора индивидуальных соединений) и нескольких ее разбавлений. Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводится в трех параллельных сериях. В качестве контроля используется три параллельных серии с культивационной водой. Биотестирование проводится с соблюдением требований к температуре и качеству культивационной воды.

Для биотестирования используют микроаквариум с лунками, который помещают на предметный столик бинокюляра. Одну из лунок заполняют культурой инфузорий с помощью капиллярной пипетки. В свободные лунки

капиллярной пипеткой помещают по 10-12 особей в каждую лунку так, чтобы на одну тестируемую пробу приходилось не менее 30 инфузорий в трех лунках. При помещении тест-объекта количество культуральной жидкости в лунке не должно превышать 0,02мл. Три лунки используют в качестве контрольных. После помещения инфузорий наливают в контрольные лунки по 0,3мл культивационной воды, в опытные - по 0,3 мл тестируемой пробы. Отмечают время начала биотестирования и подсчитывают под биноклем количество особей в каждой лунке.

Микроаквариум с заполненными лунками помещают в чашку Петри, на дно которой кладут фильтровальную бумагу, смоченную водой, чтобы не испарялось содержимое лунок, и выдерживают в течение 1 часа при температуре 22-24°C. По истечении этого времени производят подсчет выживших и погибших особей под микроскопом. Выжившими считаются инфузории, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездвиженных особей относят к погибшим. Если гибель парамеций в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитывают и опыт должен быть повторен.

После того, как результаты эксперимента учтены, все парамеции выбрасываются, микроаквариумы промывают водой (температура не выше 40°C), протирают ваткой, смоченной в спирте, промывают дистиллированной водой.

## **2.4 Обработка и оценка результатов**

При определении острой токсичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель 50% тест-объектов за 1 часовую экспозицию - ЛКр<sub>50</sub> ;
- безвредное разбавление пробы, вызывающее гибель не более 10% за 1 часовую экспозицию БКр<sub>10</sub>.



Для оценки острой токсичности пробы рассчитывается процент погибших парameций (A,%) по формуле 1:

$$A = \frac{X_t}{X_i} \cdot 100 \quad (1),$$

где  $X_i$  - среднее арифметическое количество исходных особей;

$X_t$  - среднее арифметическое количество погибших особей в тестируемой воде через 1 час.

при  $A \leq 10\%$  тестируемая вода не оказывает острого токсического действия (безвредное разбавление);

при  $A \geq 50\%$  тестируемая вода оказывает острое токсическое действие (средняя летальная кратность разбавления).

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающего 50%-ную гибель парameций за 1 час экспозиции, то для получения точного значения ЛКр<sub>50</sub> без выполнения дополнительных экспериментов используется графический метод определения.

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используют пробит анализ. Результаты выполненных экспериментов по установлению токсического действия заносятся в табл.1.

*Таблица 1*

Концентрация экстракта и показатели токсичности (пример)

Концентрация экстракта C, %	lg C	Токсичность, %	Значения пробитов
3,12	0,494	0	-
6,25	0,796	6	3,45
12,50	1,097	28	4,42
25,0	1,398	58	5,2
50,00	1,699	86	6,08
100,00	2,000	100	-

Значения пробитов, соответствующие установленному проценту гибели парameций, находят по табл.2. Процентные концентрации исследуемых образцов

переводят в десятичные логарифмы. По значениям пробитов и десятичных логарифмов от экспериментально полученных данных строят график (рис.2).

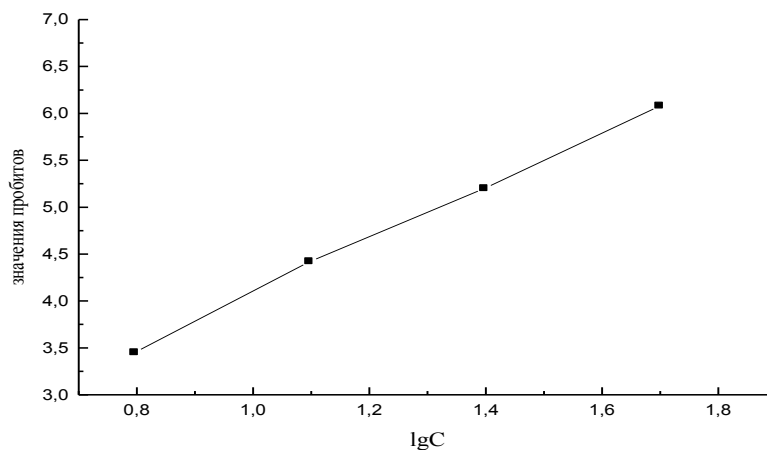


Рис.2. Зависимость пробитного значения гибели парameций от логарифма концентрации исследуемых вод

По оси абсцисс откладывают значения логарифмов процентных концентраций исследуемых образцов, по оси ординат - пробиты от значений процента гибели парameций. Экспериментально полученные значения вносят в систему координат и через точки проводят прямую. Пробитное значение 5 соответствует 50%-ной гибели парameций (табл. 2). Из точки пересечения координаты пробитного значения 5 и проведенной прямой опускают перпендикуляр на ось абсцисс, точка пересечения является логарифмом концентрации исследуемой пробы, вызвавшей гибель 50% парameций за 1 час экспозиции. Затем найденный логарифм концентрации исследуемого образца переводят в процентную концентрацию. Таким образом, устанавливают среднюю летальную кратность разбавления исследуемого образца, вызывающую гибель 50% тест-объектов за часовую экспозицию.

Значения пробитов, соответствующих экспериментально устанавливаемой  
ТОКСИЧНОСТИ

Токсичность, %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	4,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,74	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

**3. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта**

***Daphnia magna* Straus**

Метод описывает лабораторное биологическое тестирование для определения токсичности водных проб или водных вытяжек из твердых образцов с использованием пресноводных ракообразных *Daphnia magna* Straus в качестве тест-организма. Тест-функцией является выживаемость тест-организмов при тестировании в условиях переменного воздействия света и постоянной температуры. Острое токсическое действие исследуемой пробы на ракообразных определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более дафний за 96 часов в исследуемой пробе, при условии, что в контроле гибель не превышает 10%.

Данный метод применим для оценки токсичности природных пресных вод (поверхностных и подземных), питьевой воды (централизованных систем и нецентрализованного питьевого водоснабжения), сточных вод (в том числе очищенных) при минерализации не более 6,0 г/л, а также для определения токсичности растворимых в воде веществ, отработанных буровых растворов, водных вытяжек донных отложений, твердых промышленных отходов, грунтов и почв. Метод позволяет определять токсичность исследуемых объектов и следующие токсикологические показатели:

- среднюю эффективную кратность разбавления (ЭКР) пробы, вызывающую гибель 50% тест-организмов, а также безвредную кратность разбавления пробы (ЭКР), вызывающую отклонение тест-параметров - выживаемости - за 96 ч не более 10% относительно контрольной пробы;

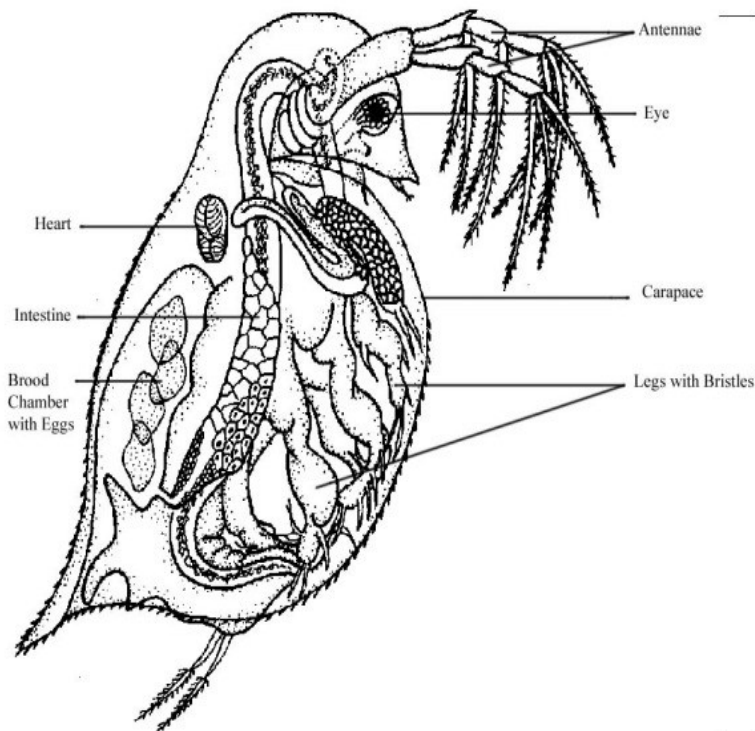
- среднюю эффективную концентрацию (ЭК) растворов веществ, вызывающую гибель 50% тест-организмов, и безвредную концентрацию (ЭК) растворов веществ, вызывающую отклонение тест-параметров - выживаемости - за 96 ч не более 10% относительно контрольной пробы.

### **3.1 Характеристика тест-объекта**

Ветвистоусые рачки невелики по размерам (длина тела у большинства до 1 мм) и очень разнообразны по внешнему виду (Определитель пресноводных..., 1977). *D. Magna* – один из наиболее крупных видов, взрослые особи достигают 6 мм. Тело дафний овальной формы, сжато с боков, заключено в прозрачный панцирь. Тело нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы. Голова покрыта щитом, передний край которого образует рострум. Под рострумом расположены две пары конечностей: антеннулы и антенны, последние сильно развиты, служат для скачкообразного перемещения в толще воды. Пять пар грудных конечностей сильно расчленены, снабжены щетинками, служат для фильтрации воды, питания, дыхания. Брюшной (абдоминальный) отдел туловища заканчивается постабдоменом, дорсальный край которого имеет

выемку, характерную для дафний данного вида. В головном отделе, не покрытом раковиной, расположена пара глаз: большой – сложный, маленький – простой. Под панцирем дафний легко различимы сердце, кишечник, выводковая камера, которая находится в спинной части туловища. В выводковой камере протекает эмбриональное развитие дафний. Особенно интенсивно дафния растет первые дни после рождения, при каждой линьке сбрасывая старый панцирь.

Тест-организм: Ветвистоусые рачки  
и Магна (*Daphnia magna*)



классификация:

царство: Animalia - животные;

тип: Arthropoda - членистоногие;

класс: Crustacea - ракообразные;

отряд: Phyllopoda - листоногие;

классификация: Cladocera - ветвистоусые;

род: Daphniida (ключ:

створка маленькая, неподвижная);

вид: Daphnia (ключ: створки с

большим килем и хвостовой

иллюстрация),

Вид: *Daphnia magna* Straus, 1826

Рис. 3 Строение *Daphnia magna* Straus

Оптимальное питание обеспечивает удвоение размеров рачков в промежутке между линьками. После наступления половой зрелости рост дафний замедляется, снижается и частота линек. В течение жизни дафния может линять до 24 раз. Выметанная молодь имеет длину 0.7–0.9 мм, половозрелые самки – от 2.2 до 2.4 мм, самцы – от 2.0 до 2.1 мм. Максимальные размеры самок – 6.0 мм при сыром весе 7–10 мг. В оптимальных условиях дафнии размножаются без

оплодотворения – партеногенетически (рождаются только самки), что обеспечивает в лабораторных условиях генетическую однородность культуры. По характеру питания дафнии относятся к фильтраторам и в природе питаются взвешенными в воде бактериями, одноклеточными водорослями, детритом, растворенными органическими веществами (Мануйлова, 1964).

Биологические особенности *D. magna* делают этих рачков ценными тест-организмами с явными преимуществами перед другими видами, а именно: удобные и относительно простые условия культивирования (содержание культуры в чистой природной воде, ежедневное отсаживание молоди от взрослых самок, кормление); молодь генетически однородна, что обеспечивается партеногенетическим размножением и поддержанием синхронизированной культуры, которой считается группа особей, находящихся на одной стадии развития; быстрое созревание рачков (5–8 сут. при оптимальной температуре  $+20\pm 2^\circ\text{C}$  и хорошем питании с длительностью эмбрионального развития 3–4 дня); регулярное (каждые 3–4 дня) и многочисленное появление молоди (у молодых самок 10–15, у зрелых – до 40 особей); достаточно высокий уровень организации (наличие кровеносной и нервной систем), позволяющий экстраполировать токсикологические результаты на других многоклеточных представителей экосистем и даже человека; крупные размеры, за счет чего возможно вести визуальные наблюдения за многими ответными реакциями без использования специализированных средств измерений; чувствительность к большинству загрязняющих веществ.

### **3.2 Культивирование тест-объекта**

Для культивирования тест-организмов *Daphnia magna* Straus используют водопроводную воду. Водопроводную воду отбирают из крана таким образом, чтобы избежать ее загрязнения. Для этого воду спускают 15 мин, затем отбирают в стеклянные емкости и отстаивают в течение 2 сут в открытых сосудах. Для подготовки культивационной воды используют стеклянные аквариумы

(объемом 20-30 л). После отстаивания воду аэрируют в течение 7 сут при помощи микрокомпрессоров, затем помещают в аквариумы емкостью 20-30 л и добавляют две-три веточки макроводорослей. Для культивирования *Daphnia magna* Straus допускается использовать также природную воду из незагрязненных водоемов (например, артезианских колодцев). Культивационная вода должна соответствовать следующим требованиям:

- pH - от 7,0 до 8,3;
- жесткость общая - 80-250 мг/л по CaCO<sub>3</sub> (от 1,6 до 5,0°Ж);
- концентрация растворенного кислорода - не менее 6 мг О/л;
- температура - (20±2)°С;
- минерализация - не выше 6,0 г/л.

### **3.3 Процедура биотестирования**

В каждую емкость вместимостью 150 мл, вносят по 100 мл анализируемой пробы, затем в каждую емкость помещают по 10 шт околосуточных тест-организмов. Для каждой анализируемой пробы (разбавлений, концентраций) подготавливают контрольную пробу следующим способом: в емкости вместимостью 150 мл вносят по 100 мл воды для разбавлений и помещают по 10 шт. одосуточных тест-организмов. Плотность посадки тест-организмов должна соответствовать 1 шт. на 10 мл. Емкости с подготовленными пробами помещают в климатостат. Тестирование проводят в течение 96 ч в климатостате при температуре (20±2)°С и попеременном воздействии света и темноты:

- 16 ч - при равномерном белом освещении в диапазоне от 500 до 1000 Лк на расстоянии 0,35 м от поверхности проб в емкостях,

- 8 ч - при отсутствии освещения.

Через каждые 24 ч тестирования подсчитывают количество выживших тест-организмов в каждой емкости (включая контрольную). После окончания тестирования:

- измеряют рН-метром рН в каждой емкости с анализируемой и контрольной пробами;

- измеряют оксиметром значение концентрации растворенного кислорода в каждой емкости с анализируемой и контрольной пробами;

- визуально осматривают в каждой емкости состояние тест-организмов. Любые обнаруженные отклонения регистрируют.

Результаты тестирования считают достоверными, если гибель тест-организмов в контрольной пробе в конце тестирования не превышает 10%.

Если данное условие не соблюдается, то находят причины несоответствия, устраняют их и тестирование повторяют с новой культурой тест-организмов.

### **3.4 Обработка и оценка результатов**

По результатам подсчета выживших дафний для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы по трем емкостям, в том числе и трем контрольным, рассчитывают среднеарифметическое значение выживших тест-организмов.

Токсичность анализируемых проб А, % определяют по гибели тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы относительно контрольной пробы после 96 ч тестирования и рассчитывают по формуле 2

$$A = \frac{\bar{x}_k - \bar{x}_{ан}}{\bar{x}_k} * 100 \quad (2)$$

где  $\bar{x}_k$  - среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов в контрольной пробе, шт.;

$\bar{x}_{ан}$  - среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы, шт.

По полученным результатам, в процентах для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы определяют конкретное



значение средней эффективной кратности разбавления (концентрации) пробы, вызывающее 50%-ную гибель тест-организмов 96 ч ЭКР (96 ч ЭКР ).

При необходимости определяют:

- минимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 100%-ной гибели тест-организмов;
- максимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 0%-ной гибели тест-организмов за 96 ч.

Если значение токсичности анализируемых проб, рассчитанное по формуле (2), составляет не более 10%, то эффективную кратность разбавления (эффективную концентрацию) анализируемой пробы, при которой выживаемость тест-организмов снизилась относительно контрольной пробы не более чем на 10% за 96 ч тестирования, относят к безвредной кратности разбавления (безвредной концентрации). Определение токсичности проб водных вытяжек в зависимости от значения токсичности осуществляют по таблице 3.

*Таблица 3*

Определение токсичности проб водных вытяжек в зависимости от значения токсичности

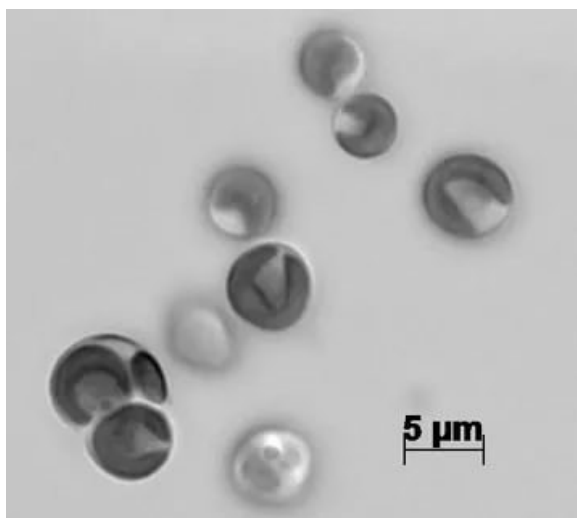
Степень токсичности проб водных вытяжек		Значение токсичности А, %
общая	детализированная	
Токсичность отсутствует	Нетоксичная	≤10 включ.
Не обладает острой токсичностью	Слаботоксичная	11 - 35
	Среднетоксичная	36 - 50
Обладает острой токсичностью	Высокотоксичная	51 - 100

#### **4. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта *Chlorella vulgaris* Beijer**

Данная методика позволяет определять острую токсичность проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов производства и потребления по изменению оптической плотности тест-культуры зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) в лабораторных условиях. Методика основана на регистрации различий в величине оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и тестируемых проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов производства и потребления (опыт), в которых эти вещества могут присутствовать. Измерение оптической плотности суспензии водоросли позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытном вариантах острого токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многокуветном культиваторе. Критерием токсичности воды является снижение на 20% и более (подавление роста) или увеличение на 30% и более (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов на тестируемой воде по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде. В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают токсичную концентрацию отдельных веществ или токсичную кратность разбавления вод и водных вытяжек, содержащих смеси веществ, вызывающие снижение на 20 % и более или увеличение на 30 % и более величины оптической плотности тест-культуры водоросли по сравнению с контролем за 22 часа световой экспозиции. Контроль качества культуры водоросли хлорелла проводится один раз в квартал. Он осуществляется

посредством определения ее чувствительности к «модельному» токсиканту – сульфату кадмия ( $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$ ). При хорошем состоянии культуры водоросли и правильно поставленном эксперименте после 22 часов культивирования 50% подавление прироста по сравнению с контролем должно наблюдаться в диапазоне концентраций сульфата кадмия 0,06-0,24 мг/л. При этом оптическая плотность культуры водоросли в контрольном варианте за этот период должна достигнуть величины  $0,15 \pm 0,03$  опт.ед. Пробы питьевых, природных, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов производства и потребления должны иметь оптическую плотность в диапазоне 0,005- 0,200 опт. ед.

#### 4.1 Характеристика тест-объекта



Вид *Chlorella vulgaris*

Род *Chlorella*

Группа автотрофных протококковых водорослей.

Рис. 4 Вид *Chlorella vulgaris* под микроскопом

Описание рода *CHLORELLA* было сделано Бейеринком (Beijerinck) в 1890 году. Современную классификацию рода *Chlorella* провела В.М. Андреева. В природе представители рода *Chlorella* имеют широкое распространение. Их можно обнаружить на поверхности почвы, в водоёмах и даже на коре деревьев.

Морфологические признаки вида *Chlorella vulgaris*: молодые клетки слабоэллипсоидные, размером от 1,5 до 2,0 мкм; взрослые – шаровидные, на жидкой питательной среде, диаметром 6–9 мкм. Хлоропласт

широкопоясковидный незамкнутый зеленого цвета. Клетки делятся на 2–8, очень редко на 16 автоспор. Штамм автотрофный, в производственных условиях растет на среде, содержащей минеральные, органические и растворенные газообразные вещества. В лабораторных условиях культивируется на среде Тамийя. Штамм не требует подачи в культуру углекислого газа с помощью специальных технических средств. Штамм обладает способностью свободного парения и равномерного распределения в культуральной среде. В процессе культивирования живые клетки практически не осаждаются. В состоянии покоя осаждение их начинается через 6–15 дней. Для культивирования штамма не требуется механическое перемешивание суспензии. Оптимальная температура культивирования составляет 28–30°C. Цикл развития штамма следующий: в светлый период суток идёт активный процесс фотосинтеза, в результате чего клетки интенсивно набирают биомассу. Клетки с 6 до 21 часа увеличиваются в размере с 1,5 до 9 мкм. Активное деление их наблюдается с 22 до 4 часов. К 5 часам утра молодые клетки готовы к фотосинтезу. Цикл развития клеток стойкий, нарушить его можно только путем искусственного изменения светового режима. Штамм устойчиво культивируется независимо от сезона года. Он выносит прямое солнечное освещение. При достижении плотности клеток 3 млн./мл проявляются хорошо выраженные антагонистические свойства к прочей альгофлоре, бактериям и инфузориям. Лизис альгофлоры в культуре штамма наступает через 4–8 часов, гибель бактерий и инфузорий через 6–10 часов культивирования. При выращивании штамм развивается в монокультуре и обладает невосприимчивостью к фагам. В лабораторных условиях штамм культивируется на среде Тамийя при постоянной температуре 36 °С и интенсивности освещения 30 тыс. Лк.

#### **4.2 Процедура биотестирования**

Перед биотестированием культура водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенная на 50% среде Тамия в культиваторе KB-05, профильтровывается

через 4 слоя марли или вату и разбавляется до оптической плотности  $0,125 \pm 0,005$  50% средой Тамия.

Регистрация оптической плотности культуры тест-объекта проводится с помощью измерителя плотности суспензии ИПС-03. Он позволяет проводить регистрацию оптической плотности в круглых 2-см кюветах («пенициллинках»), в которых выращивается тест-культура водоросли при биотестировании токсичности воды. Конструктивные особенности данного прибора позволяют значительно снизить светорассеивающую составляющую ослабления света, что позволяет надежно регистрировать оптическую плотность суспензионных (мутных) сред, какой является культура клеток водоросли хлорелла. Если накопительная культура, выращенная в культиваторе КВ-05 имеет большую плотность, то ее сначала следует разбавить 50% средой Тамия до указанного диапазона, а затем, разделив на величину 0,125, определить степень ее дальнейшего разбавления для получения культуры водоросли с требуемой для засева в тестируемую воду оптической плотностью ( $0,125 \pm 0,005$ ). Общий объем засеваемой суспензии водоросли данной плотности должен быть не менее 20 мл на каждый используемый в работе многокюветный культиватор КВМ-05. Если одновременно планируется проведение биотестирования нескольких проб воды, то количество культиваторов КВМ-05 должно соответствовать их числу, а объем тест-культуры водоросли необходимо увеличить кратно числу анализируемых проб воды.

Для биотестирования используют альгологически чистую культуру водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (через одни сутки после пересева в культиватор КВ-05). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляется ежедневно. Заранее приготовленная тест-культура водоросли вносится по 2 мл в 6 стаканов с 48 мл контрольной и тестируемых проб воды или вытяжки из отходов. При этом в результате 25-кратного разбавления засеваемой культуры содержание

элементов питания в тестируемой воде, необходимых для обеспечения роста клеток водоросли, будет соответствовать 2% среде Тамия, а исходная оптическая плотность тест-культуры водоросли будет равна 0,005. При работе с водными вытяжками из отходов производства и потребления в 6 стаканов с 45 мл экстрактов из отходов, разбавленных в ряд, кратный 10-ти, тест-культура водоросли вносится по 1,8 мл. Содержимое каждого стакана разливается по 6 мл во флаконы-реакторы (по 4 флакона на каждый вариант тестируемой пробы, включая контрольную пробу). При работе с автоматической пипеткой с рабочим объемом 1-5 мл допустимо вносить во флаконы по 5,5 мл тестируемой воды. Ростовые характеристики культуры водоросли хлорелла определяются в многокуветном культиваторе КВМ-05. Прибор позволяет в одинаковых и контролируемых условиях по температуре, интенсивности света, снабжению  $\text{CO}_2$  (0,03%) и перемешиванию одновременно выращивать 24 пробы культуры водорослей.

При оптимальном режиме ( $T=36\pm 0,50^\circ\text{C}$ , средней интенсивности света  $60 \text{ Вт/м}^2$ ) увеличение оптической плотности контрольной культуры водоросли и, следовательно, численности клеток за 22 часа составляет 25–35 раз ( $D_{\text{конечная}}=0,150\pm 0,03$ ). Таким образом, за это время действие загрязняющих веществ, содержащихся в пробах, проявится примерно в пяти поколениях клеток водоросли. Все 24 заправленных флакона закрываются чистыми полиэтиленовыми пробками, в которых для обеспечения оптимального газообмена со средой и предотвращения излишнего испарения культуральной жидкости сделаны отверстия диаметром 6 мм. Перед использованием пробки необходимо залить кипящей водой, выдержать в ней 10 минут, а затем, слив воду, просушить фильтровальной бумагой. После этого флаконы с пробками строго по вариантам устанавливаются в предварительно включенный в сеть культиватор КВМ-05. Флаконы загружаются в приостановленную кассету по ходу ее вращения, т.е. против часовой стрелки. В конце первого часа

эксперимента после стабилизации температуры во флаконах проверяется ее значение в контрольном варианте. Для этого термометр вводится через отверстие в пробке внутрь одного из контрольных флаконов. Чтобы точнее и быстрее произвести замер температуры необходимо сделать несколько помешивающих движений в измеряемой среде.

### 4.3 Обработка и оценка результатов

Эксперимент можно считать успешным, если величины оптической плотности в контрольных флаконах были не ниже 0,120. Если оптическая плотность тест-культуры в этих флаконах регулярно превышает величину 0,180, следует на 1-2 часа сократить время эксперимента. О степени острого токсического воздействия тестируемой воды на водоросли судят по разнице величины оптической плотности тест-культуры в контрольных и опытных вариантах после 22 часов выращивания в культиваторе КВМ-05. С этой целью для каждого разведения по результатам четырех параллельных определений вычисляют среднее значение оптической плотности по формуле 3:

$$X = \sum \frac{X_i}{n}, (3)$$

где X— среднее значение оптической плотности;

X<sub>i</sub>— значения оптической плотности в i-том параллельном определении;

n – количество параллельных определений.

Рассчитывают относительную (в %) разницу величины оптической плотности для каждого разведения по сравнению с контролем рассчитывают по формуле 4:

$$I = (X_k - X_o) * X_k * 100\%, (4)$$

где X<sub>k</sub> и X<sub>o</sub> – средние значения оптической плотности в контроле и в опыте, соответственно.

Критерием токсичности пробы воды является снижение средней величины оптической плотности по сравнению с контрольным вариантом на 20% и более в случае подавления роста тест-культуры или ее повышение на 30% и более при

стимуляции ростовых процессов. Качество пробы воды можно оценить с использованием критерия токсичности по таблице 4.

Таблица 4

Токсикологические характеристики качества испытуемой пробы

Величина разбавления тестируемой воды, при которой превышен критерий токсичности	Качество воды
1 (неразбавленная)	слаботоксичная
2-3	среднетоксичная
4-9	токсичная
10-27	сильнотоксичная
27-81	гипертоксичная

**5. Определение токсичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта бактерий *Pseudomonas putida***

Методика основана на измерении ингибиторного эффекта образцов на рост клеток микроорганизмов.

При определении токсичности устанавливают:

- среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую 50% ингибирование роста микроорганизмов за 16 часовую экспозицию;

- безвредную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую 10% ингибирование роста микроорганизмов за 16-часовую экспозицию.



## 5.1 Характеристика тест-объекта

*Pseudomonas putida* – грам-отрицательная аэробная бактерия. Подвижные палочки диаметром 0,7-1,1 мкм, длиной 2,0-4,0 мкм с полярным типом жгутикования. Обычно встречается в почве и поверхностных водах. Температурный оптимум – 25-30<sup>0</sup>С.

## 5.2 Подготовка посуды, материалов и реактивов

Раствор 1: растворить в воде и довести до 500 мл

10,0г NaNO<sub>3</sub>, 2,4г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 1,0г дрожжевого экстракта;

Раствор 2: растворить в воде и довести до 500 мл

10,0г NaNO<sub>3</sub>, 2,4г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, и 1,2г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

Раствор 3 (раствор глюкозы): растворить в воде и довести до 500мл 40,0г глюкозы (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O);

Раствор 4: растворить в воде и довести до 1000 мл

4,0г MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,01г цитрата железа (III).

Плотная питательная среда для поддержания культуры (скошенный агар):

Растворить 18 г агар-агара в воде при нагревании, добавить 50 мл раствора 1, 125 мл раствора 3, 100 мл раствора 4 и довести до 1000 мл водой. Разлить по пробиркам по 6 мл, закрыть ватными пробками и стерилизовать в автоклаве. После автоклавирования остудить в наклонном положении для приготовления скошенного агара.

Стерильная вода.

Растворы 1,2,4, скошенный агар и воду автоклавировать при 1,0 атм. 30 мин, раствор 3 при 0,5 атм. 30 мин. Хранить не более 2 недель при температуре 2-4<sup>0</sup>С.

Колбы на 250 мл с ватными пробками стерильные;

Пипетки на 1,5 и 10 мл стерильные;

Цилиндры на 100 мл стерильные;

Посуда стерилизуется 1 час при 180<sup>0</sup>С или 2 часа при 160<sup>0</sup>С в сухожировом шкафу.

### **5.3 Хранение и поддержание основной культуры**

Основную культуру *Pseudomonas putida* хранят в пробирках на скошенном агаре (плотная питательная среда). Пересев культуры осуществляют 1 раз в неделю. Культуру инкубируют 24 часа при температуре  $25^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Через 24 часа инкубации может появляться зеленый пигмент.

### **5.4 Приготовление предварительной культуры**

К 900 мл стерильной воды добавить по 25 мл растворов 1 и 3 и 50мл раствора 4. Разлить стерильно эту среду для предварительной культуры по 90 мл в колбы на 250 мл. Для приготовления предварительной культуры необходимо использовать основную культуру, выросшую на плотной среде возраст которой не более 7 суток. Смыть культуру со скошенного агара стерильной средой для предварительной культуры. Довести оптическую плотность предварительной культуры до 0,02 единиц оптической плотности (кювета 10мм,  $\lambda = 600$  нм). Инкубировать предварительную культуру в течение 5 часов при перемешивании при температуре  $25^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

### **5.6 Процедура биотестирования**

В стерильные колбы объемом 250 мл налить последовательно 80мл исследуемого образца, по 2,5 мл растворов 2 и 3, 5,0 мл раствора 4. В качестве контроля вместо исследуемого образца добавить 80 мл стерильной воды. Затем добавить 10 мл предварительной культуры. Оптическая плотность инокулята должна составлять примерно 0,1 опт. ед. (кювета 10 мм,  $\lambda = 600$  нм), для того чтобы начальная плотность при биотестировании составляла 0,01 опт. ед. Измерить реальную начальную оптическую плотность в контрольном варианте. Повторность опыта и контроля – трехкратная.

Инкубировать контрольные и опытные варианты при температуре  $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в темноте при перемешивании в течение 16 часов.

По истечении периода инкубации измерить конечную оптическую плотность культуры.

## 5.6 Обработка и оценка результатов

Процент ингибирования роста клеток микроорганизмов рассчитывают по формуле 5:

$$I = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_o} \times 100, (5)$$

где  $I$  – ингибирование роста клеток микроорганизмов, выраженное в процентах;  
 $B_n$  – конечная оптическая плотность микроорганизмов после 16-часовой инкубации в опытном образце;

$B_c$  - конечная оптическая плотность микроорганизмов после 16-часовой инкубации в контрольном образце;

$B_o$  - начальная оптическая плотность микроорганизмов в контрольном образце;

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающего 50%-ное ингибирование роста культуры микроорганизмов, то для получения точного значения ЛКр<sub>50</sub> без выполнения дополнительных экспериментов используется графический метод определения (см. выше).

## 6. Определение фитотоксичности водных экстрактов почв и индивидуальных соединений с использованием в качестве тест-объекта семян редиса *Raphanus sativus*

Принцип методики основан на оценке влияния водного экстракта или водных растворов индивидуальных соединений на интенсивность прорастания семян *Raphanus sativus* (редис сорт “Красный круглый с белым кончиком”).

### 6.1 Характеристика тест-объекта

Семейство	<i>Brassicaceae</i> Burnett	Крестоцветные
Род	<i>Raphanus</i> L.	Редька
Вид	<i>R. sativus</i> L.	Р. посевная, редис
П/вид	<i>R. sativus</i> var. <i>Radicula</i> Pers.	Редис
Сорт	“Редис красный с белым кончиком”	

Растения однолетние и двулетние. Круглый утолщенный, съедобный, однолетний (редис) или двулетний (редька), реже тонкий (масличная редька), красный, белый, фиолетовый, розовый, черный; нижние листья лировидно-перистонадрезанные с крупной верхней лопастью, число боковых лопастей от 2 до 6 пар, реже листья почти цельные. Лепестки белые, розовые или фиолетовые; стручки широкие, несколько вздутые, голые или жестко-волосистые, при созревании мягкие, внутри губчатые, с неясно намеченными полостями, где находятся семена, но не членистые – при разламывании распадаются на неправильные части, ломаясь чаще вдоль; носик большей частью толстый, обычно втрое короче стручка. Возделывается везде, где есть огородная культура. Тонкокорневая форма (масличная редька) сеется очень редко на западе Европейской части. В диком состоянии неизвестна. Общее распространение: культивируется по всей Европе, умеренной Азии и Северной Америке и Австралии. Родина – берега Средиземного моря.

## **6.2 Подготовка посуды и материалов**

Для тестирования готовятся: чашки Петри диаметром 10 см - по три штуки на каждый образец, диски фильтровальной бумаги диаметром 9 см - по одному на каждую чашку Петри, пипетки стеклянные вместимостью 5, 10 см<sup>3</sup> - по одной на каждый образец, груши резиновые (пипеточные луковицы); вода стерильная. Вся посуда стерилизуется перед использованием в автоклаве при 1 атм. в течение 20 минут или в сушильном шкафу 2 часа при 160<sup>0</sup>С.

## **6.3 Процедура биотестирования**

30 штук семян редиса красного круглого с белым кончиком укладывают равномерно на фильтровальную бумагу в чашку Петри диаметром 10 см. Предварительно в чашки Петри раскладывают диски фильтровальной бумаги диаметром 9 см по одному на каждую чашку Петри.

В каждую чашку Петри наливают по 5 мл исследуемых экстрактов или исследуемых растворов. В качестве контроля используется чистая вода. Уровень

жидкости в чашках должен быть ниже поверхности семян. Чашки покрывают и помещают в термостат при температуре 20<sup>0</sup>С.

Через 72 часа измеряют длину корней проростков. У непроросших семян длину корня принимают равной нулю.

Повторность опыта и контроля - трехкратная.

#### **6.4 Обработка и оценка результатов**

Для оценки уровня фитотоксичности рассчитывают:

-среднее арифметическое длины корней проростков в контрольном и опытном варианте;

-достоверное отклонение длины корней проростков опытного варианта по отношению к контролю, выраженное в процентах.

Для статистической обработки результатов необходимо провести расчеты для каждой серии определения длины корней проростков опытного варианта и контроля и сопоставить полученные результаты. Проводят следующие расчеты:

определение среднего арифметического ( $\bar{x}$ ) показателя длины проростков в контрольном и опытном вариантах по формуле 6:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (6)$$

где  $x_i$  - длина корня проростка;  $n$  - количество семян;

определение среднеквадратичного отклонения ( $\sigma$ ) по формуле 7:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}; \quad (7)$$

определение ошибки среднего арифметического показателя количества по формуле 8:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} ; (8)$$

определение показателя достоверности ( $t_g$ ) разности двух сравниваемых величин по формуле 9:

$$t_g = \frac{\bar{x}_k - \bar{x}_t}{\sqrt{m_k^2 - m_t^2}} ; (9)$$

где  $x_k$  и  $x_t$  среднее арифметическое показателя количества в контроле и опытном варианте;  
 $m_k^2$  и  $m_t^2$  квадраты ошибок среднего арифметического в контроле и опытном варианте.

Рассчитанный показатель достоверности сравнивается с критерием Стьюдента, для определения которого принимается уровень значимости  $P=0,05$  и определяется число степеней свободы  $f$  согласно формуле 10:

$$f = n_k + n_t - 2, (10)$$

где  $n_k$  и  $n_t$  - число наблюдений в контроле и опытном варианте.

Критерий достоверности Стьюдента определяется по стандартным таблицам. Если рассчитанное значение  $t_g \geq t_{st}$ , то различия в длине корней проростков достоверны, а не случайны. В этом случае принимают, что образец обладает фитотоксическим действием, и рассчитывают кратность подавления длины проростков семян. Если значение  $t_g \leq t_{st}$ , то выявленные различия в длине проростков в контроле и опытном варианте недостоверны, следовательно, образец не оказывает фитотоксического воздействия.

При определении фитотоксичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую ингибирование прорастания тест-объектов на 50% - ЛКр<sub>50</sub> ;

- безвредное разбавление пробы, вызывающее ингибирование прорастания тест-объекта не более 10% - БКР<sub>10</sub>.

Уровень фитотоксичности (Т, %): рассчитывается по формуле 11:

$$T, \% = \frac{\bar{x}_{\text{контр}} - \bar{x}_{\text{оп}}}{\bar{x}_{\text{контр}}} \cdot 100, (11)$$

где  $\bar{x}_{\text{контр}}$  - среднее арифметическое длины проростков в контроле;

$\bar{x}_{\text{оп}}$  - среднее арифметическое длины проростков в опыте.

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающего 50%-ное ингибирование прорастания, то для получения точного значения ЛКР<sub>50</sub> без выполнения дополнительных экспериментов используется графический метод определения (см. выше).

## 7. Определение фитотоксичности почв (контактный метод)

Принцип методики основан на оценке влияния токсичных компонентов на интенсивность прорастания семян и ранние стадии роста (общую биомассу, длину корней и наземной части) ряда растений. В качестве тест-объектов рекомендуется использовать семена следующих растений - рожь (*Secale cereale* L.), рейграсс (*Lolium perenne* L.), рис (*Oryza sativa* L.), овес (*Avena sativa* L.), мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.), зимний или весенний ячмень (*Hordeum vulgare* L.), сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), горчица (*Sinapis alba*), рапс (*Brassica napus* (L.)), редис (*Raphanus sativus* L.), китайская капуста (*Brassica campestris* L.), салат латук (*Lactuca sativa* L.), кресс салат (*Lepidium sativum* L.), томат (*Lycopersicon esculentum* Miller), бобы (*Phaseolus aureus* Roxb.).

### 7.1 Процедура биотестирования

Почву, используемую в модельных экспериментах, высушивают при 30°C в течение 16 часов и просеивают через сито с ячейками 4 мм.

Почву, отобранную в полевых условиях и анализируемую сразу после отбора, просеивают через сито с ячейками 4-5 мм.

Взвесить 100 г исследуемой почвы и поместить в инкубационный сосуд. В качестве контроля использовать чистую почву. Почву размещать так, чтобы избежать каких-либо уплотнений. Увлажнить почву до 60% влагоемкости и поддерживать такую влажность на протяжении всего периода инкубации. Засеять почву 5-10 семенами растений. Опытные и контрольные образцы закладывать в трех повторностях. Инкубирование осуществлять при одинаковой температуре и освещенности.

## 7.2 Обработка и оценка результатов

Оценку результатов производят не ранее, чем через 14 суток, и не позже, чем через 21 сутки инкубации. Для этого определяют количество проросших семян в опытном и контрольном варианте. Далее, для того, чтобы не повредить корни, каждый инкубационный сосуд помещают на бок в слой воды и вымывают почву. В каждой повторности измеряют длину корней и наземной части растений и их общую биомассу. Предпочтительно определять биомассу высушенных растений (70-80<sup>o</sup>C, 16 часов).

Для оценки уровня фитотоксичности рассчитывают:

-среднее арифметическое значений показателя в контрольном и опытном варианте;

-достоверное отклонение значений показателя опытного варианта по отношению к контролю (способ определения представлен в предыдущей методике).

В случае установления достоверности различий определяют уровень фитотоксичности (Т, %) по формуле 12:

$$T = \frac{\bar{x}_{\text{контр}} - \bar{x}_{\text{оп}}}{\bar{x}_{\text{контр}}} \cdot 100, (12)$$



где  $\bar{x}_{\text{контр}}$  - среднее арифметическое показателя проростков в контроле;

$\bar{x}_{\text{оп}}$  - среднее арифметическое показателя проростков в опыте.

При определении фитотоксичности исследуемых проб устанавливают:

- концентрацию (или разбавление чистой почвой), вызывающую наименьший эффект ингибирования параметров;
- концентрацию (или разбавление чистой почвой), не вызывающую какого-либо отрицательного эффекта на прорастание и развитие тест-объекта.

## ЛИТЕРАТУРА

- a. Bioassays for Soils / Ad-Hoc-Committee "Methods for Toxicological/ Ecotoxicological Assessment of Soils" ; DECHEMA, Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, chemische Technik und Biotechnologie e. V., Frankfurt am Main [Hrsg.: G.Kreysa und J. Wiesner].- Frankfurt am Main: DECHEMA, 1995 Print: Schon & Wetzel GmbH, 60599 ].- Frankfurt a. M
2. *Daphnia magna* Straus В биотестировании природных и техногенных сред 2015 г. А. С. Олькова, А. И. Фокина Успехи современной биологии, 2015, том 135, No 4, с. 380–389
  - a. ISO 10712 Water quality – *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication test). - 1995.-P.9.
  - b. ISO 11269-1 Soil quality –Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Methods for measurement of inhibition of root growth, 1993.-P.9.
  - c. ISO 11269-2 Soil quality –Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. -1995.-P.7.
3. Башкин Е.В., Евстафьева Е.В., Снакин В.В. и др. Биогеохимические основы экологического нормирования. - М.: Изд-во Наука, 1993.-С.128-141.
4. Брагинский Л.П.Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* St. и других ветвистоусых ракообразных // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36. No 5. С. 50–70.
5. ГОСТ 28268-89 Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений
6. Жмур Н.С.Государственный и производственный контроль токсичности методами биотестирования в России. М.: Межд. дом сотруд-ва, 1997. 114 с.

7. Мануйлова Е.Ф. Ветвистоусые рачки фауны СССР. М.: Наука, 1964. 233 с.
8. Никаноров А.М., Трунов Н.М. Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод / Под ред. А.И. Бедрицкого. СПб.: Гидрометеиздат, 1999. 150 с.
9. Олькова А.С. Изучение многообразия ответных реакций *Daphnia magna* в экспериментах по установлению хронической токсичности // Тр. Третьей Международной науч.-практич. конф. молодых ученых “Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование”. М.: Буки-Веди, 2014. С. 33–35.
10. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР / Определитель. Под ред. Л.А. Кутиковой, Я. И. Старобогатова / Гидрометеиздат, 1977. - 512 с.
11. Терехова В.А. Биотестирование как метод определения класса опасности отходов // Экология и промышленность России. 2003. No 12. С. 27–29