

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**

Кафедра прикладной экологии

**С.Ю. СЕЛИВАНОВСКАЯ, П.Ю. ГАЛИЦКАЯ,
Р.Х. ГУМЕРОВА**

**ТЕСТИРОВАНИЕ ОТХОДОВ, ПОЧВ,
МАТЕРИАЛОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИВЫХ СИСТЕМ**

Учебно-методическое пособие

Казань – 2014

УДК 57.084

ББК 20.1

*Принято на заседании кафедры прикладной экологии
Протокол № 5 от 26 декабря 2014 г.*

Научный редактор:

доктор химических наук
профессор кафедры прикладной экологии **В.З. Латыпова**

Рецензент:

доктор биологических наук
профессор кафедры прикладной экологии **Н.Ю. Степанова**

Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю., Гумерова Р.Х.

Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем: учеб.-метод. пособие / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская, Р.Х. Гумерова. – Казань: Казан. ун-т, 2014. – 57 с.

В учебно-методическом пособии приведены методы биотестирования материалов, отходов и почв. Подробно описаны методы микробиологического анализа почв, использование тест-объектов для оценки токсичности отходов, почв и материалов.

Для студентов направления экология и природопользование, профили подготовки – природопользование, прикладная экология, слушающих курс «Агроэкологический мониторинг. Методы оценки деградации и рекультивации почв» (модуль «Использование земельных ресурсов»), «Обращение с отходами производства и потребления», «Нормирование и снижение загрязнения окружающей среды».

© Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю.,

Гумерова Р.Х. 2014

© Казанский университет, 2014

СОДЕРЖАНИЕ

1. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
1.1. Приготовление сред для культивирования микроорганизмов	5
1.2. Культивирование микроорганизмов	7
1.3. Получение отдельных колоний при посеве «на чистоту»	9
1.4. Метод предельных разведений	10
1.5. Увлажнение почвы для биологического анализа	12
2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АКТИВНОСТИ АБОРИГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ	13
2.1. Определение респираторной активности почвы	13
2.2. Оценка микробной биомассы методом субстрат-индуцированного дыхания	15
2.3. Определение общей микробной биомассы экстракционно-фумигационным методом	16
2.4. Определение дегидрогеназной активности почв (ТТХ)	19
2.5. Определение уреазной активности микробного сообщества	20
2.6. Определение целлюлазной активности	24
2.7. Определение числа клеток гетеротрофных микроорганизмов	27
2.8. Учет углеводородокисляющих микроорганизмов методом предельных разведений	30
3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ	33
3.1. Определение токсичности почв и отходов с использованием дегидрогеназной активности интродуцированной культуры <i>Bacillus pumilus</i> (с использованием ТТХ)	33
3.2. Определение токсичности почв и отходов с использованием дегидрогеназной активности интродуцированной культуры	34

<i>Bacillus pumilus</i> (с использованием ресазурин)	
3.3. Определение фитотоксичности почв (контактный тест)	36
3.4. Биотестирование объектов с использованием семян редиса <i>Raphanus sativus L.</i>	37
3.5. Биотестирование с использованием дафний (<i>Daphnia magna</i>)	38
3.6. Биотестирование на инфузориях (<i>Paramecium caudatum</i>)	42
3.7. Биотестирование с использованием водорослей	45
4. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ	50
4.1 Установление средней эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки)	53
4.2 Построение калибровочной кривой и нахождение калибровочного коэффициента	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	56

1. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА

1.1 Приготовление сред для культивирования микроорганизмов

Питательные среды – искусственные субстраты, содержащие вещества, необходимые для роста микроорганизмов.

Для роста микроорганизмы должны получать из питательной среды необходимые для их жизнедеятельности вещества в количествах, соответствующих специфическим потребностям данного микроорганизма. Микроорганизмы нуждаются в водороде, кислороде, углероде, азоте, сере, фосфоре, калии, магнии, кальции, железе, а также в микроэлементах – марганце, кобальте, меди, молибдене, цинке, выполняющих роль катализаторов химических процессов и необходимых в ничтожно малых количествах. Для культивирования многих микроорганизмов требуется наличие так называемых бактериальных факторов роста – органических питательных веществ, которых микроорганизмы не могут синтезировать сами, например, аминокислот, витаминов. Другим важным требованием, предъявляемым к питательным средам, является поддержание определенной реакции среды, оптимальной для культивируемых микроорганизмов.

Глюкозо-пептонная среда (ГПС) (г/л дистиллированной воды):

пептон – 10,

глюкоза – 5,

NaCl – 3

L-бульон (г/л дистиллированной воды):

пептон – 10,

дрожжевой экстракт – 5,

NaCl – 10

Среда для УОМ (г/л водопроводной воды):

KH_2PO_4 – 3,0

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 4,5

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 1,0$

Мясо-пептонный агар (МПА):

42 г питательного агара размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 1–2 мин. до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные флаконы и стерилизуют автоклавированием.

Среда Чапека (г/л дистиллированной воды):

Сахароза или глюкоза – 20,0

$\text{NaNO}_3 - 2,0$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5$

$\text{KCl} - 0,5$

$\text{CaCO}_3 - 3,0$

Агар – 20,0

После стерилизации среды перед тем, как разлить ее в чашки Петри, к ней добавляют стерильную молочную кислоту из расчета 4 мл на литр среды.

Среда Эшби (г/л водопроводной воды):

Маннит – 20,0

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,2$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,2$

$\text{NaCl} - 0,2$

$\text{CaCO}_3 - 5,0$

$\text{K}_2\text{SO}_4 - 0,1$

Агар – 20,0

Среда Гетчинсона (г/л дистиллированной воды):

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$

$\text{CaCl}_2 - 0,1$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,3$

$\text{NaCl} - 0,1$

$\text{FeCl}_3 - 0,01$

$\text{NaNO}_3 - 2,5$

После стерилизации среды в колбу вносят стерильный складчатый фильтр.

Среда Омелянского (г/л водопроводной воды)

$\text{NH}_4\text{Cl} - 1,0$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$

После стерилизации среды в колбу вносят стерильный складчатый фильтр.

1.2. Культивирование микроорганизмов

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют культивированием.

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культур называют посевом. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называют пересевом, или пассированием.

Обычно микроорганизмы выращивают при определенной постоянной температуре в термостате. Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде – пробирках, колбах или чашках Петри. В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Жидкой средой для аэробных микроорганизмов заполняют обычно 1/3 пробирки, для анаэробных – 2/3. Если плотная среда в пробирках предназначена для последующего выращивания микроорганизмов, при подготовке к стерилизации ее наливают на 1/3–1/4 объема пробирок. После стерилизации пробирки еще с не застывшей средой раскладывают на поверхности стола в наклонном положении для получения скошенной поверхности агара. Это так называемые «косяки» –

косые, или скошенные среды. Плотную среду, застывшую при вертикальном положении, называют столбиком.

При культивировании микроорганизмов в колбах используют только жидкие среды. Для аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл).

В чашках Петри микроорганизмы культивируют только на твердых средах. Пробирки со средами и культурами во время работы устанавливают на штативы. Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические иглы, петли и шпатели (рис.1).

При посеве клеток микроорганизмов из пробирки в пробирку обе пробирки (одну с культурой, другую со стерильной питательной средой) берут в левую руку. Одну пробирку зажимают между указательным и средним пальцами (первая пробирка), нижний конец ее свободно лежит на большом пальце с левой стороны его сочленения с указательным. Другую пробирку зажимают между средним и безымянным пальцами (вторая пробирка). Она должна лежать параллельно первой, ее нижний конец располагается с правой стороны большого пальца.

Пробирки при взятии мазка необходимо удерживать наклонно, чтобы гарантировать стерильность культуры.

В пламени горелки тщательно обжигают бактериальную иглу (петлю), держа ее в правой руке отвесно. Мизинцем правой руки вынимают из второй пробирки ватную пробку и зажимают ее между мизинцем и ладонью, пробку первой пробирки зажимают между безымянным и средним пальцами правой руки. Снова слегка обжигают иглу и вводят ее в пробирку с культурой. Легким прикосновением ее к колонии микроорганизмов берут небольшое количество микробной биомассы и переносят во вторую пробирку.



Рис. 1. Оборудование для микробиологического анализа

Если высевают в плотную скошенную среду, иглой с культурой легким движением, не разрезая среды, проводят прямую или волнообразную черту по поверхности среды – посев штрихом. Если высевают в столбик, иглу вводят в центральную часть питательной среды, в толщу ее – посев уколом. Если посев делают в жидкую среду или из жидкой среды, наклонять пробирки следует слегка, чтобы не смочить пробку и края пробирки. Пробки, перед тем как закрыть ими пробирки, обжигают в пламени. Удобнее сначала закрывать первую пробку, потом вторую.

1.3. Получение отдельных колоний при посеве «на чистоту»

Прокаливают микробиологическую петлю, затем берут чашку Петри / косячок / колбу с жидкой средой, из которой проводится посев. Петлю остужают о стенку стеклянной чашки либо о «чистый» участок среды.

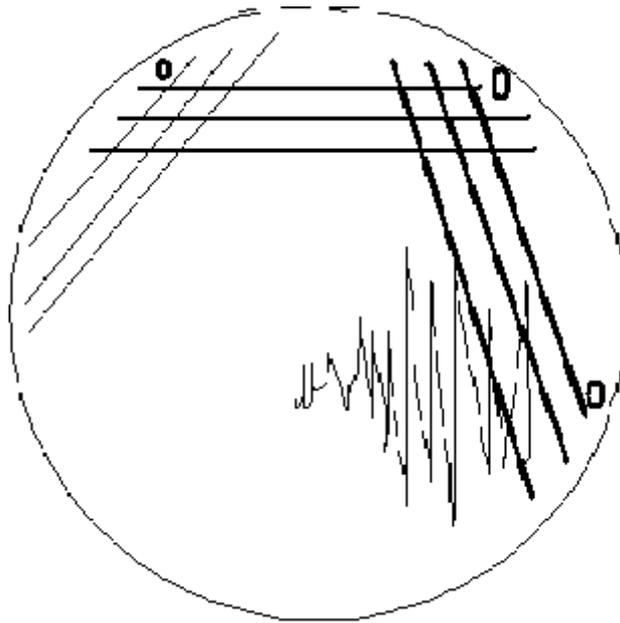


Рис. 2. Посев на чистоту колоний

Захватывают немного материала и осторожно над огнем открывают чашку Петри и проводят 3 параллельных штриха. Затем петлю снова прокалывают и остужают. Проводят 3 параллельных штриха, пересекающих 3 уже засеянных. Снова прокалывают и остужают петлю и проводят 3 параллельных штриха, пересекающих 3 уже засеянных, как показано на рис. 2.

1.4. Метод предельных разведений

Сущность метода предельных разведений состоит в приготовлении из исходного жидкого материала ряд десятикратных разведений до тех пор, пока в последней пробирке можно будет предположить наличие одной бактериальной клетки. Посев делают в жидкую селективную среду с последующим выделением микроорганизмов на твердой питательной среде и изучением их характеристики.

Для этого из колбы стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии, содержащей 0,1 г почвы, и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водородной воды. Пипетку неоднократно промывают в пробирке, чтобы максимально смыть клетки с ее стенок. Концентрация почвы в пробирке будет 10^{-2} г.

Другой стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии из первой пробирки и переносят ее во вторую пробирку, тщательно повторяя процедуру промывания пипетки (см. рис 3). Концентрация почвы во второй пробирке будет 10^{-3} г. Точно также новыми стерильными пипетками производят дальнейшие разведения почвенной суспензии до достижения разведения 10^{-5} и 10^{-6} г (при необходимости – до 10^{-8} г).

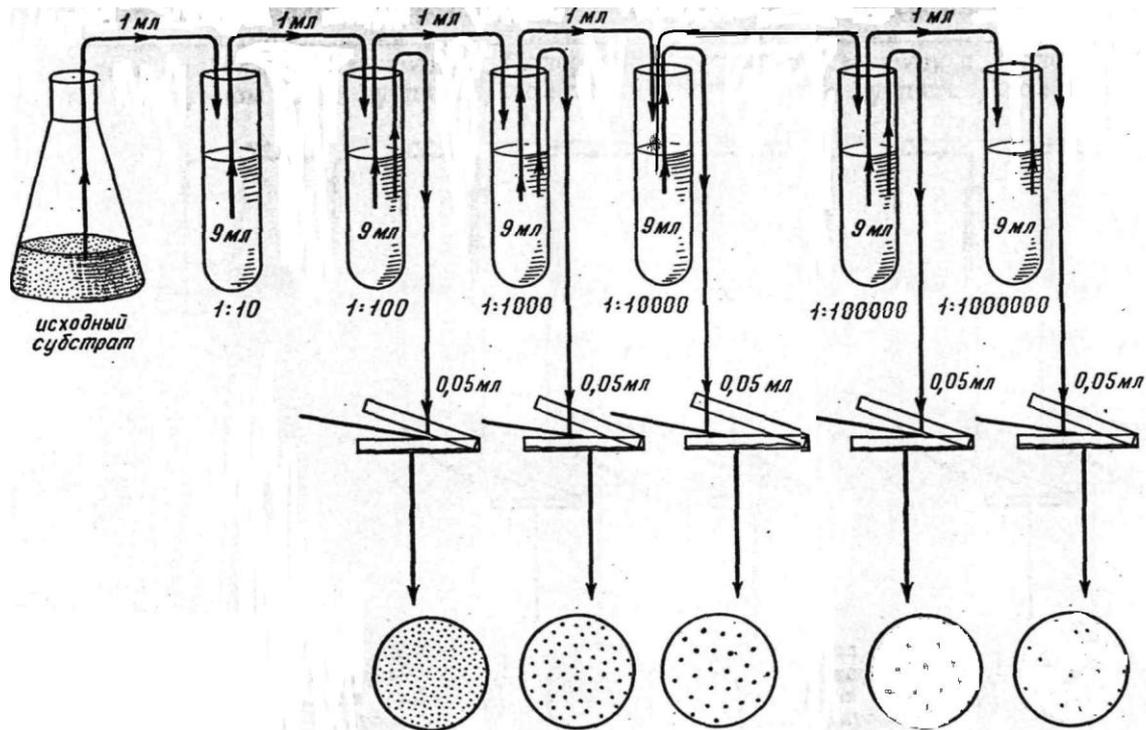


Рис. 3. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем методом предельных разведений

Заранее приготовленный МПА подогревают на водяной бане до 45 °С. Стерильные чашки Петри раскладывают на столе и подписывают на крышках номер пробы, дату посева и степень разведения. Из каждой пробы воды и ее разведений производят посев по 1,0 мл параллельно на две чашки с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний.

С флаконов, содержащих исследуемую воду, снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку. Эту операцию производят перед приготовлением разведений.

Стерильной пипеткой отбирают 1 мл воды (и ее разведений), вносят в стерильные чашки, слегка приоткрывая крышку. При этом для каждой пробы воды и для каждого разведения используется отдельная стерильная пипетка. Посевы из разведений можно делать одной пипеткой, но начинать следует обязательно из большего разведения.

Чашки с посевом помещают в термостат вверх дном. Посевы выращивают при температуре 27 °С в течение 5 суток.

Количество КОЕ в 1 г сырой почвы устанавливают, умножая число КОЕ в чашке на степень разведения – число, показывающее, во сколько раз в конкретном случае разбавили 1 г почвы.

1.5. Увлажнение почвы для биологического анализа

Пробы на анализ отбирают методом конверта, затем помещают в чашки Петри, добавляют воду из расчета 60% от полной влагоемкости. Пробы помещают в стеклянный аквариум и инкубируют при комнатной температуре в течение 24 часов.

2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АКТИВНОСТИ АБОРИГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

2.1. Определение респираторной активности почвы

(ISO 14240-1)

Методика основана на инкубировании почвенных образцов в закрытых сосудах. Выделяющийся при этом CO_2 адсорбируется щелочью и количественно определяется титрованием.

Приготовление растворов

1) раствор NaOH: растворяют 1 г NaOH в дистиллированной воде и доводят до 500 мл в мерной колбе.

2) раствор HCl (0,1M): стандарт-титр HCl растворяют в 1000 мл дистиллированной воды

3) раствор BaCl_2 : растворяют 10,4 г BaCl_2 в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл в мерной колбе

4) раствор индикатора фенолфталеин: растворяют 0,1 г фенолфталеина в 60% растворе этанола и доводят объем до 100 мл в мерной колбе.

Средства измерений, реактивы и материалы

Колбы с притертыми крышками, марлевые мешочки, 0,1 М раствор HCl; 0,05 М раствор NaOH; 0,5 М раствор BaCl_2 .

Методика определения

Пробы на анализ отбирают методом конверта, просеивают через сито, помещают в чашку Петри и добавляют воду из расчета 60% от массы почвы. Затем пробы помещаются в стеклянный аквариум и увлажняются в течение 24 часов.

В три мешочка из марли помещают по 7 – 10 г увлажненной почвы. Наливают пипеткой 20 мл раствора гидроксида натрия (0,05M) в лабораторную колбу с притертой крышкой объемом 250 мл и подвешивают мешочек внутрь колбы так, чтобы он не касался раствора (рис. 4).

Шлиф колбы смазывают герметиком, предотвращая поступление кислорода, и закрывают колбу притертой крышкой. Колбы инкубируют 24 часа при температуре 25°C. Через 24 часа аккуратно удаляют мешочек и добавляют 2 мл раствора хлорида бария (0,5 М) для осаждения адсорбированного CO₂ в виде карбоната бария. Добавляют 3 – 4 капли индикаторного раствора (фенолфталеин) и титруют остаточное содержание гидроксида натрия разбавленной соляной кислотой (0,1 М).



Рис. 4. Определение респираторной активности

Мешочки высушивают до постоянной массы и определяют массу (S_{dw}). Количество выделившегося углекислого газа (мкг CO₂ – С/г в час) рассчитывают по формуле:

$$BAS = \frac{M_c * (V_b - V_s) * 0,1 * 1000}{S_{dw} * t * 2}, \text{ где}$$

M_c – молярная масса углерода (12,01 г/моль);

V_b – количество раствора HCl, ушедшее на титрование контрольной пробы, мл;

V_s – количество HCl, ушедшее на титрование колбы с исследуемым образцом, мл;

S_{dw} – сухая масса почвы, г;

t – время инкубации, ч.

2.2. Оценка микробной биомассы методом субстрат-индуцированного дыхания

Данный метод позволяет измерить биомассу живых микроорганизмов (Microbial methods for assessing soil quality, 2006).

Оценка субстрат-индуцированного дыхания проводится так же, как и оценка респираторной активности. Единственное отличие состоит в том, что в пробы перед помещением образцов в мешочки добавляется D-глюкоза, в том количестве, при котором наблюдается наибольшая респираторная активность. Содержание глюкозы определяют по градуировочной кривой. В почву массой 20 г добавляют различное количество глюкозы.

Приготовление растворов

5) раствор NaOH: растворяют 1г NaOH в дистиллированной воде и доводят до 500 мл в мерной колбе.

6) раствор HCl (0,1M): стандарт-титр HCl растворяют в 1000 мл дистиллированной воды

7) раствор BaCl₂: растворяют 10,4 г BaCl₂ в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл в мерной колбе

8) раствор индикатора фенолфталеин: растворяют 0,1 г фенолфталеина в 60% растворе этанола и доводят объем до 100 мл в мерной колбе

Средства измерений, реактивы и материалы

Колбы с притертыми крышками, марлевые мешочки, 0,1 М раствор HCl; 0,05 М раствор NaOH; 0,5 М раствор BaCl₂.

Методика определения

Почву подготавливают для анализа. К 20 г почвы добавляют 0,02 г D-глюкозы (если иное количество не установлено), затем увлажненную почву помещают в три мешочка. Наливают пипеткой 20 мл раствора гидроксида натрия (0,05 М) в лабораторную колбу или бутылку и помещают мешочек внутрь колбы. Закрывают герметично колбу и инкубируют 24 часа при температуре 25°C.

Через 24 часа аккуратно удаляют мешочек и добавляют 2 мл раствора хлорида бария (0,5М) для осаждения адсорбированного CO₂ в виде карбоната бария. Добавляют 3 – 4 капли индикаторного раствора (фенолфталеин) и титруют остаточное содержание гидроксида натрия разбавленной соляной кислотой (0,1М).

Микробную биомассу (мг/кг почвы) рассчитывают по формуле:

$$C_{mic} = \frac{30 * (V_b - V_s) * k * 22 * 1000}{1,8295 * S_{dw} * 24}, \text{ где}$$

V_b – объем HCl, ушедший на титрование холостой пробы, мл;

V_s – объем HCl, ушедший на титрование образца почвы, мл;

k – концентрация раствора HCl;

22 – пересчетный коэффициент (1 мл 1М HCl соответствует 22 мг CO₂);

1000 – пересчетный коэффициент с г на кг почвы;

1,8295 – плотность CO₂ при 22 °C;

S_{dw} – масса сухой навески почвы, г.

2.3. Определение общей микробной биомассы экстракционно-фумигационным методом (ISO 14240-2)

Метод основан на определении различия в количестве растворимого органического углерода в почвенных образцах, подвергнутых фумигации и не фумигированных образцах. При фумигировании почвенных образцов живые клетки микроорганизмов погибают и минерализуются, увеличивая тем самым содержание растворимого органического углерода. Органический углерод экстрагируют раствором сульфата калия и определяют при окислении бихроматом калия.

Средства измерений, реактивы и материалы

Стеклообразная колонка (400 x 200мм), наполненная 50 г оксида алюминия, фильтровальная бумага, гранулы для предотвращения сильного кипения,

мерная колба на 1000 мл, пробирки для дигестора, мерные колбы на 25 мл, десикатор, серная кислота концентрированная.

Приготовление растворов

1) безэтанольный хлороформ: фильтруют 70 мл хлороформа через стеклянную колонку, заполненную 50 г оксида алюминия. Первую порцию в 25 мл фильтруют дважды. Безэтанольный хлороформ может храниться 14 суток в стеклянной посуде в темноте.

2) раствор сульфата калия (0,5 М): растворяют 87,1 г K_2SO_4 в дистиллированной воде и доводят до 1000 мл в мерной колбе.

3) раствор бихромата калия: в 1000 мл мерной колбе растворяют 80 г сухого $K_2Cr_2O_7$ в дистиллированной воде и доливают до нужного объема.

Методика определения

Взвешивают 150 – 200 г влажной почвы в четыре стеклянных стаканчика. Два стаканчика помещают в десикатор. Туда же помещают стеклянный стаканчик с 50 мл безэтанольного хлороформа и гранулами против сильного кипения. Удаляют из десикатора воздух с помощью масляного насоса до того момента, пока хлороформ не закипит и перекрывают кран десикатора. Через 24 часа фумигации при комнатной температуре в темноте удаляют хлороформ из десикатора и вынимают образцы.

С двумя остальными образцами осуществляют ту же процедуру, но без хлороформа.

Для получения почвенного экстракта смешивают 1 часть фумигированного (или нефумигированного) образца с 5 частями сульфата калия, перемешивают на ротаторе 30 мин. и отфильтровывают (каждый образец в трех повторностях). В почвенном экстракте определяют содержание органического углерода.

Для этого в пробирку для дигестора помещают 1 – 5 мл (в зависимости от ожидаемого содержания $C_{орг}$) почвенного экстракта, 5 мл раствора

бихромата калия и 7,5 мл серной кислоты (см. рис. 5). Пробирки помещают в дигестор, закрывают крышками и кипятят 30 мин. при температуре 135°C. Предусматривают холостую пробу, в которой вместо почвенного экстракта используют 5 мл сульфата калия.

Пробирки остужают до комнатной температуры, содержимое качественно переносят в мерные колбы объемом 25 мл, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Полученный раствор центрифугируют при 6 тыс. об./мин. (не менее) в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяют при 585 нм, в качестве раствора сравнения используют надосадочную жидкость из холостой пробы. С использованием полученных значений оптической плотности рассчитывают содержание Сор_г.



Рис. 5. Дигестор (термореактор) Velp DK-20

Расчет углерода микробной биомассы (мгС/г) производят по формуле:

$$C_{\text{микр}} = (C_{\text{оргфум}} - C_{\text{оргнефум}}) / 0,35, \text{ где}$$

$C_{\text{оргфум}}$ – среднее значение растворимого углерода в фумигированном образце, мг/г;

$C_{\text{оргнефум}}$ – среднее значение растворимого углерода в нефумигированном образце, мг/г;

0,35 пересчетный коэффициент (органического углерода к углероду микробной биомассы).

2.4. Определение дегидрогеназной активности почв (ТТХ)

Метод основан на колориметрическом измерении формазана (ТТФ), образующегося в результате восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) (Колешко, 1981).

Средства измерений, реактивы и материалы

Автоклав, холодильник для хранения образцов, термостат, центрифуга, ФЭК (с фильтром 600 и 480 нм), кюветы 10 мм, стеклянные пипетки до 10 мл, мерные колбы на 100 и 250 мл, пробирки на 12 мл, весы, шпатель.

Приготовление растворов

1) Раствор глюкозы: 19,8 г глюкозы растворяют в 1 л дистиллированной воды.

2) Раствор буфера: 62,4 мл раствора $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (растворяют 71,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл дистиллированной воды) + 37,6 мл раствора KH_2PO_4 (31,4 г KH_2PO_4 растворяют в 1000 мл дистиллированной воды).

3) Раствор ТТХ (2,3,5- трифенилтетразолийхлорида): 10 г ТТХ растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Методика определения

При проведении анализа в пробирку вносят 1 г исследуемой почвенной пробы, приливают 1 мл 0,1 М раствора глюкозы, 2 мл 0,1М фосфатного буфера, рН 7,2 и 1 мл 1% раствора ТТХ. Смесь встряхивают и инкубируют 24 часа при 28°C. После инкубирования в реакционную смесь добавляют 5 мл этанола и центрифугируют при 4 тыс. об. мин. (не менее) в течение 10 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость колориметрируют при 480 нм, кювета 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор этанола (5 мл

этанол, 1 мл 0,1 М раствора глюкозы, 2 мл 0,1М фосфатного буфера, рН 7,2 и 1 мл 1% раствора ТТХ). В качестве контроля осуществляют аналогичную процедуру без ТТХ. Повторность опыта и контроля – трехкратная.

Количество формазана находят по калибровочной кривой, построенной по чистому формазану.

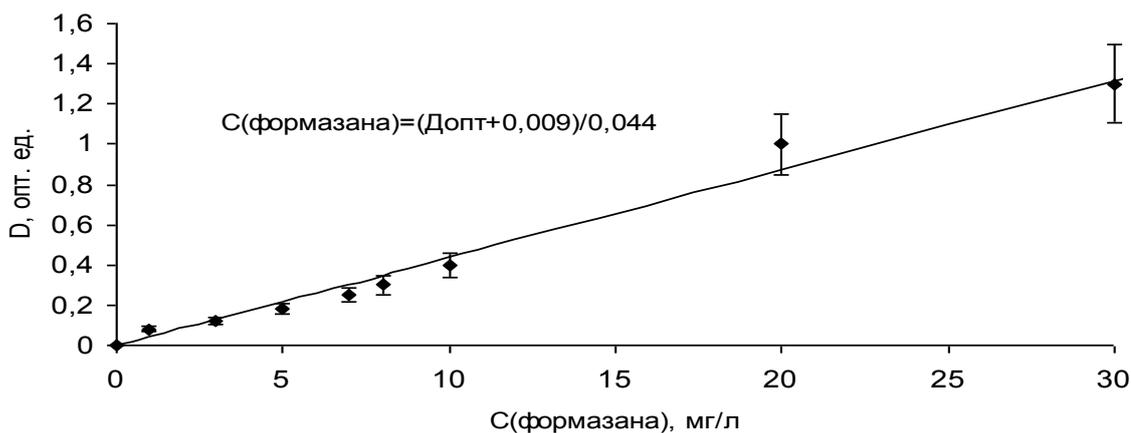


Рис. 6. Калибровочный график, построенный по чистому формазану

Активность (мг формазана/кг почвы) вычисляют по формуле:

$$DA=C*V/m, \text{ где}$$

C - количество формазана, найденное по калибровочной кривой, мг/л

V - объем реакционной смеси, мл

m - масса навески почвы, г.

2.5. Определение уреазной активности микробного сообщества

Уреазная активность определяется методом Галстяна, основанном на колориметрическом определении аммиака реактивом Несслера (по Хазиеву).

Средства измерений, реактивы и материалы

Колбы объемом 50 мл, весы лабораторные, реактив Несслера, толуол, К-На-виннокислый.

Приготовление растворов

1. Фосфатный буфер: в 500 мл воды растворяют 4,1 г KH_2PO_4 и 8,67 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

2. Раствор мочевины: 10% карбамида по массе разбавляют дистиллированной водой.

3. Раствор сегнетовой соли: растворяют 25 г К-На-виннокислого в 20-30 мл воды, нагревают до полного растворения, затем доливают водой до 50 мл, добавляют 0,1 мл реактива Несслера, после чего дают отстояться до выпадения осадка.

Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика необходимо (рис. 7):

– приготовить исходный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с концентрацией 36,7 г/л, для этого 3,67 г вещества необходимо поместить в мерную колбу на 100 мл и довести до метки дистиллированной безаммиачной водой. Содержание NH_4^+ в данном растворе составит 10 г/л.

– 10 мл исходного раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки, концентрация полученного раствора №1 - $1\text{г}(\text{NH}_4^+)/1\text{л}$.

– 10 мл раствора №1 переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки, концентрация полученного раствора №2 – $100\text{мг}(\text{NH}_4^+)/1\text{л}$.

– 10 мл раствора №2 переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки, концентрация полученного раствора №3 – $10\text{мг}(\text{NH}_4^+)/1\text{л}$.

– подготавливают 7 мерных колб на 50 мл, которые подписывают: 0 мг/л; 0,2 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л; 2 мг/л; 4 мг/л; 6 мг/л.

– в колбу «0 мг/л» приливают 30 мл дистиллированной безаммиачной воды, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки.

– в колбу «0,2 мг/л» переносят 1 мл раствора №3, разводят дистиллированной безаммиачной водой до 30 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки.

– в колбу «0,5 мг/л» переносят 2,5 мл раствора №3, разводят дистиллированной безаммиачной водой до 30 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки.

– в колбу «1 мг/л» переносят 5 мл раствора №3, разводят дистиллированной безаммиачной водой до 30 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки

– в колбу «2 мг/л» переносят 10 мл раствора №3, разводят дистиллированной безаммиачной водой до 30 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки.

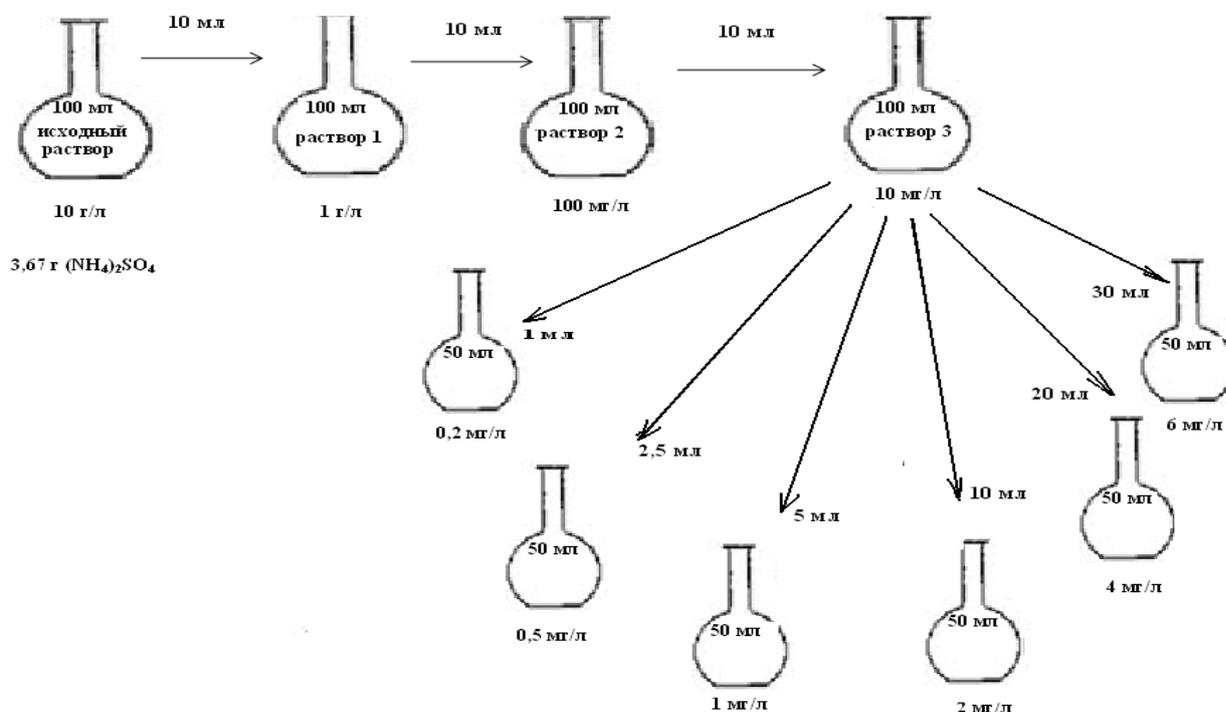


Рис. 7. Схема приготовления растворов

– в колбу «4 мг/л» переносят 20 мл раствора №3, разводят дистиллированной безаммиачной водой до 30 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки.

– в колбу «6 мг/л» переносят 30 мл раствора №3, разводят дистиллированной безаммиачной водой до 30 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят дистиллированной безаммиачной водой до метки.

Полученные растворы колориметрируют при 400 нм. В качестве раствора сравнения использую дистиллированную безаммиачную воду. Результаты вносят в табл. 1.

С использованием полученных данных строят уравнение линейной регрессии вида $y=kx+b$, где x – $C(NH_4^+)$, мг/л, y – оптическая плотность, ед. (при 400 нм), k и b – коэффициенты. Затем находят коэффициент K (см. п. 4.2).

Таблица 1

Таблица для внесения результатов анализа

$C(NH_4^+)$, мг/л	Оптическая плотность, ед. (при 400 нм)
x – переменная	y – зависимая величина

Методика определения

Навеску почвы 2 г помещают в колбу (или пробирку Falcon), добавляют 4 мл фосфатного буфера (рН=5,7), 0,2 мл толуола, через пять минут – 4 мл 10%

раствора мочевины. Колбу плотно закрывают пробкой, перемешивают и инкубируют 24 часа при 37°C.

После инкубации содержимое колбы доводят до 20 мл 1н раствором КС1 и тщательно взбалтывают в течение 10 минут. Суспензию центрифугируют (не менее 4 тыс. об/мин в течение 5 мин.), 0,1 – 1 мл (в зависимости от ожидаемой уреазной активности) надосадочной жидкости переносят в мерную колбу (или пробирку Falcon) на 50 мл, разводят дистиллированной водой до 25 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли и реактива Несслера.

Далее колориметрируют при 400 нм. Контролем выступает почва, стерилизованная сухим жаром при 180°C в течение 1 ч.

Уреазную активность (мг аммиака/кг почвы) вычисляют по формуле:

$$УА = \frac{D * K * 20 * 25}{V_{ал} * m}, \text{ где}$$

D - оптическая плотность пробы,

K - коэффициент пересчета, полученный при построении градуировочного графика

V_{ал} - объем надосадочной жидкости, взятый для анализа, мл,

m - масса навески почвы, г.

2.6. Определение целлюлазной активности

(Колешко, 1981; Нетрусов, 2005)

Средства измерений, реактивы и материалы

Пробирки, ФЭК-4А, термостат, карбоксиметилцеллюлоза, 3,5-динитросалициловая кислота, К-На-виннокислый

Приготовление растворов

1. ДНСК-реагент: 10 г 3,5 – динитросалициловой кислоты (ДНСК), 16 г NaOH и 300 г K-Na-виннокислого растворяют в 1 л дистиллированной воды.

2. 0,1 М фосфатного буфера (pH 6,8): растворяют 27,8 г NaH_2PO_4 в 1000 мл дистиллированной воды, растворяют 71,7 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл дистиллированной воды. Берем 51,0 мл раствора г NaH_2PO_4 и 49 мл раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

3. Ацетатный буфер (pH 5,5): 6,8 г CH_3COOH , объем доводят до 1 л.

4. 1% раствора карбоксиметилцеллюлозы: 1 г КМЦ растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Методика определения

К 1 г почвы добавляют 7,5 мл фосфатного (pH 6,8) или ацетатного буфера (pH 5,5), 5 мл 1% раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), 0,5 мл толуола. По окончании экспозиции в течение 24 часов при температуре 27 – 30⁰С реакцию смесь фильтруют. Затем к 4 мл фильтрата добавляют 2 мл ДНСК-реагента. Пробирки инкубируют в течение 10 мин на водяной бане при 95⁰С для развития характерной красно-коричневой окраски, охлаждают реакцию смесь и измеряют поглощение на ФЭК при $\lambda=540$ нм. В контрольном варианте 2 мл ДНСК-реагента добавляют к 4 мл дистиллированной воды.

Количество гидролизированных сахаров определяют по калибровочной кривой, построенной на основании поглощения эквимольного раствора глюкозы.

Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика необходимо:

– приготовить исходный раствор глюкозы с концентрацией 300 мг/л, для этого 75 мг вещества необходимо поместить в мерную колбу на 250 мл и довести до метки дистиллированной водой.

– 67 мл исходного раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки, концентрация полученного раствора №1 – 200 мг глюкозы/л.

– 50 мл исходного раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки, концентрация полученного раствора №2 – 150 мг глюкозы/л.

– 50 мл исходного раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки, концентрация полученного раствора №3 – 100 мг глюкозы/л

– 50 мл раствора №3 переносят в мерную колбу на 100 мл и доводя дистиллированной водой до метки, концентрация полученного раствора №4 – 50 мг глюкозы/л.

Подготавливают 5 пробирок, которые подписывают: 50 мг/л; 100 мг/л; 150 мг/л; 200 мг/л; 300 мг/л.

– в пробирку «50 мг/л» приливают 4 мл раствора №4, затем приливают 2 мл ДНСК-реагента.

– в пробирку «100 мг/л» приливают 4 мл раствора №3, затем приливают 2 мл ДНСК-реагента.

– в пробирку «150 мг/л» приливают 4 мл раствора №2, затем приливают 2 мл ДНСК-реагента.

– в пробирку «200 мг/л» приливают 4 мл раствора №1, затем приливают 2 мл ДНСК-рагента.

– в пробирку «300 мг/л» приливают 4 мл исходного раствора, затем приливают 2 мл ДНСК-рагента.

Пробирки инкубируют в течение 10 мин на водяной бане при 95⁰С для развития характерной красно-коричневой окраски, охлаждают реакционную смесь и измеряют поглощение на ФЭК при $\lambda=540$ нм.

С использованием полученных данных строят уравнение линейной регрессии вида $y=kx+b$, где x – С глюкозы, мг/л, y – оптическая плотность, ед.

(при 540 нм), k и b – коэффициенты. Затем находят коэффициент K (см. п. 4). Целлюлазная активность выражают в мг образующихся восстанавливающих сахаров в расчете на 1 кг почвы.

$$\text{ЦА} = \frac{6 * D * K * V}{4 * m}, \text{ где}$$

D - оптическая плотность пробы,

K - коэффициент пересчета, полученный при построении градуировочного графика

V - объем реакционной смеси, взятый для анализа, мл,

m – масса почвы, г.

2.7. Определение числа клеток гетеротрофных микроорганизмов

Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (чашечный метод Коха). Сущность его заключается в высеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на плотную среду в чашки Петри и подсчете выросших после инкубации колоний. Принято считать, что каждая колония – потомство одной клетки (Руководство..., 1983).

Средства измерений, реактивы и материалы

Пробирки, пробки, чашки Петри.

Методика определения

Численность популяции микроорганизмов обычно достаточно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в водопроводной воде или 0,34%-ном растворе NaCl, используя постоянный коэффициент разведения, чаще всего равный 10. В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, так как это уменьшает вероятность ошибки. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды – это 1-е разведение,

10^{-1} . Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3 – 5 раз, затем этой же пипеткой отбирают 1 мл полученной суспензии и переносят во 2-ю пробирку – получают 2-е разведение, 10^{-2} . Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов; соответственно она тем больше, чем больше плотность популяции.

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата.

Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом (рис. 8) разливают расплавленную, чаще всего агаризованную, питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15 – 20 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушивать для удаления конденсационной воды.

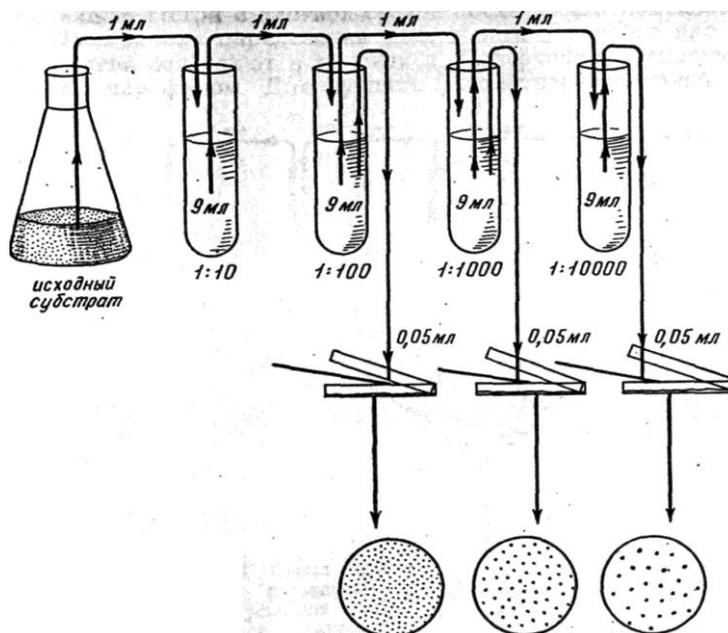


Рис. 8. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем

С этой целью чашки Петри открывают и застывшей средой вниз помещают на 20 – 30 мин. в термостат. После того как среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стерильным стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, Причем из каждого делают 2 – 4 параллельных высева. Посевы можно делать одной пипеткой, но при этом начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

Подсчет выросших колоний. Колонии бактерий подсчитывают обычно через 3 суток инкубации в термостате.

Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства чернилами или карандашом по стеклу отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, подсчитывают число колоний в каждом секторе и результаты суммируют. Лучшим разведением следует считать то, при высеве из которого на агаровой пластинке в чашке Петри вырастает от 30 – 50 до 100 – 150 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют. Результаты параллельных высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из данного разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле

$$M = \frac{a \cdot 10n}{V}, \text{ где}$$

M – количество клеток в 1 мл,

a – среднее число колоний при высеве данного разведения,

10 – коэффициент разведения,

n – порядковый номер разведения, из которого сделан высев,

V – объем суспензии, взятый для посева, мл.

2.8. Учет углеводородокисляющих микроорганизмов методом предельных разведений

Определение количества клеток высевом в жидкие среды (метод предельных разведений). Метод нашел широкое применение для подсчета микроорганизмов, которые плохо или совсем не развиваются на плотных питательных средах. Этим же методом пользуются при определении численности бактерий, относящихся к той или иной физиологической группе.

Средства измерений, реактивы и материалы

Пробирки, пробки, МПА.

Методика определения

Определение количества микроорганизмов методом предельных разведений включает приготовление разведений, посев в жидкую среду, регистрацию наличия или отсутствия роста после инкубации и расчет наиболее вероятного числа клеток в единице объема исходного субстрата.

Питательную среду, благоприятную для развития микроорганизмов, численность которых хотят определить, предварительно разливают в пробирки (колбы) и стерилизуют. В пробирки (колбы) следует наливать одинаковый объем среды. Посев проводят из каждого разведения или из четырех–пяти последних, причем каждое разведение высевают в 3 – 5 параллельных пробирок. Количество посевного материала везде одинаково и, как правило, составляет 1 мл. Засеянные пробирки помещают в термостат. Время инкубации колеблется от 3 до 10 суток и зависит от скорости роста микроорганизмов, численность которых определяют. После инкубации регистрируют рост микроорганизмов, используя различные показатели: помутнение среды, образование пленки, осадка, газа или накопление в среде определенных продуктов метаболизма.

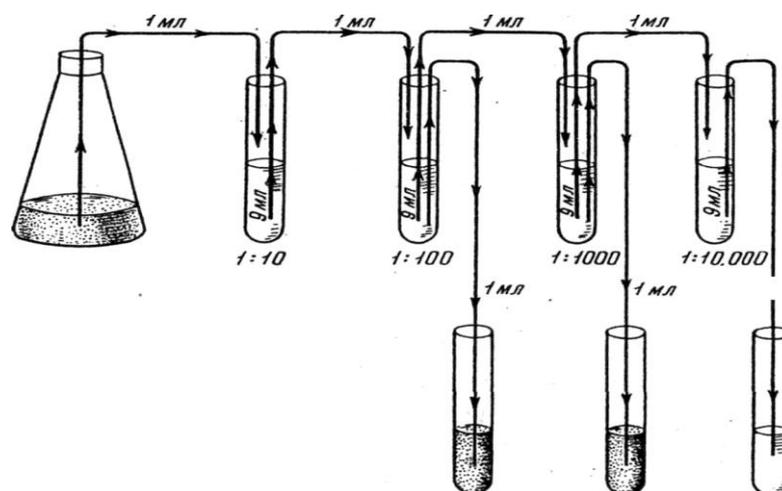


Рис. 9. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов в жидкую среду

Наиболее вероятное количество клеток в единице объема рассчитывают по таблице Мак-Креди, разработанной на основании методов вариационной статистики. Для этого первоначально составляют числовую характеристику, которая включает три цифры. Первая цифра слева показывает число пробирок в том последнем разведении, при высеве из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост. Две следующие цифры обозначают число пробирок, в которых отмечен рост микроорганизмов при засеве их из двух последующих разведений.

Таблица 2

Пример расчета количества клеток по таблице Мак-Креди

Разведения исследуемой воды	0	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Число засеянных пробирок	4	4	4	4	4
Число пробирок, в которых обнаружен рост	4	4	3	1	0
Числовая характеристика	4	3	1	-	-
Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов	16,5	-	-	-	-
Количество клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды	165	-	-	-	-

Затем по таблице находят наиболее вероятное число микроорганизмов, соответствующее данному значению числовой характеристики. Количество микроорганизмов в 1 мл (1 г) исходного субстрата соответствует 142 этому числу, умноженному на то разведение, которое было взято для получения первой цифры числовой характеристики.

Таблица 3

Таблица Мак-Креди

103	-		1,0	0,8	323	-	30,0			520	-	-	-	5,0
110	1,3		0,5	0,4	330	-	25,0		1,7	521	-	-	-	7,0
111	2,0	1,1	0,8	0,6	331	-	45,0	3,5	2,0	522	-	-	-	9,5
112	-	-	1,1	0,8	332	-	110,0	4,0	-	523	-	-	.	12,0
113	-	-	1,3	-	333	-	140,0	5,0	-	525	-	-	-	15,0
120	2,0	1,1	0,8	0,6	340	.	-	3,5	2,0	524	-	-	.	17,5
121	3,0	1,5	1,1	0,8	341	-	-	4,5	2,5	530	-	-	-	8,0
122	-	-	1,3	1,0	350	-	-	-	2,5	531	.	-	-	11,0
123	-	-	1,6	-	400	-	-	2,5	1,3	532		-	-	14,0
130	.	1,6		0,8	401	-	-	3,5	1,7	537	-	-	-	17,5
131	.	-	1,4	1,0	402	-	-	5,0	2,0	534		-	-	20,0
132	-	-	1,7	-	403	-	-	7,0	2,5	535		-	-	25,0
140	-	.	1,4	1,1	410	-	.	3,5	1,7	540		.	-	13,0
141	-	-	1,7	-	411	.	-	5,5	2,0	541			-	17,0
200	2,5	0,9	0,6	0,5	412	-	-	8,0	2,5	542			-	25,0
201	5,0	1,4	0,9	0,7	413	-	-	11,0	.	543				30,0
202		2,0	1,2	0,9	414	-	-	14,0	.	544			-	35,0
203	-	-	1,6	1,2	420	-	-	6,0	2,0	545				45,0
210	6,0	1,5	0,9	0,7	421	-	-	9,5	2,5	550				25,0
211	13,0	2,0	1,3	0,9	423	-	-	17,0		551				35,0
212	20,0	3,0	1,6	1,2	422	-	-	13,0	3,0	552		-	.	60,0
213	-	-	2,0	-	424	-	.	20,0	-	553		-	-	90,0
220	25,0	2,0	1,3	0,9	430	-	.	11,5	2,5	554				100
221	70,0	3,0	1,6	1,2	431	.	-	16,5	3,0	555		-	-	180
					432	-	-	20,0	4,0					

3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ

3.1. Определение токсичности почв и отходов с использованием дегидрогеназной активности интродуцированной культуры

***Vacillus pumilus* (с использованием ТТХ)**

Принцип методики основан на оценке влияния почв на интенсивность дегидрогеназной активности интродуцированной культуры бактерий.

Средства измерений, реактивы и материалы

Автоклав, холодильник для хранения культуры, термостат, центрифуга, ФЭК (с фильтром 600 и 480 нм), кюветы 10 мм, стеклянные пипетки до 10 мл, мерные колбы на 100 и 250 мл, пластиковые пробирки на 12 мл, весы, шпатель.

Приготовление растворов

1. Раствор глюкозы: 19,8 г глюкозы растворяют в 1 л дистиллированной воды.
2. Раствор буфера: 62,4 мл раствора $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (71,6 г/л) + 37,6 мл раствора KH_2PO_4 (31,4 г/л).
3. Раствор ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолийхлорида): 10 г ТТХ растворяют в 1 л дистиллированной воды.
4. Хранение культуры осуществляют в пробирках на мясо-пептонном агаре.

Подготовка культуры для биотестирования

Культивирование проводят в колбах на 250 мл при 27 – 28°C на L-бульоне. Для биотестирования культуру инкубируют до достижения оптической плотности 0,45 – 0,6 опт. ед. Оптическую плотность культуры определяют на ФЭК (600 нм, кювета 10 мм). В качестве раствора сравнения используют стерильную питательную среду.

Методика определения

При проведении биотестирования в пробирку вносят 1 г исследуемого объекта (почвы или отхода), приливают 1 мл 0,1 М раствора глюкозы, 2 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,2, и 1 мл 1% раствора ТТХ. В случае не слепой пробы к

смеси добавляют 1 мл бактериальной культуры, в случае слепой пробы – 1 мл питательной среды. Смесь встряхивают и инкубируют 24 часа при 28°C. После инкубирования в реакционную смесь добавляют 5 мл этанола и центрифугируют при 4 тыс. об. мин. После центрифугирования надосадочную жидкость колориметрируют при 480 нм, кювета 10 мм. Количество формазана находят по калибровочной кривой, построенной по чистому формазану (см. рис. б). Активность выражают в мг формазана/кг почвы.

Повторность опыта и контроля – трехкратная.

Для контроля активности культуры бактерий при каждом биотестировании предусматривают дополнительный контрольный вариант, в котором 1 г пробы заменяют на 1 мл дистиллированной воды.

Для оценки токсичности рассчитывают относительную активность ($A_{отн}$) и определяют EC_{50} .

$$A_{отн} = \frac{(\Phi_{пробы} - \Phi_{спробы})}{(\Phi_{Ka} - \Phi_{сKa})} \times 100,$$

где Φ_{Ka} – усредненная концентрация формазана в пробе при оценке активности культуры или в присутствии незагрязненной почвы (соответственно, расчет относительно водного или почвенного контроля);

$\Phi_{сKa}$ – усредненная концентрация формазана в слепой пробе при оценке активности культуры или в присутствии незагрязненной почвы (соответственно, расчет относительно водного или почвенного контроля);

$\Phi_{пробы}$ – усредненная концентрация формазана в пробе;

$\Phi_{спробы}$ – усредненная концентрация формазана в слепой пробе.

3.2. Определение токсичности почв и отходов с использованием дегидрогеназной активности интродуцированной культуры

***Bacillus pumilus* (с использованием ресазурина)**

Дегидрогеназную активность определяли с использованием в качестве индикатора ресазурина (7-окси-2-феноксазан-N-оксид-натриевая соль).

Этот метод основан на восстановлении резазурина, химическое строение которого представлено на рис.10.

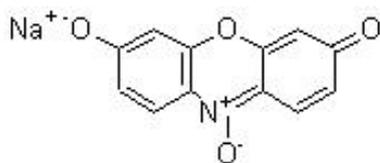


Рис. 10. Химическое строение резазурина

Восстановление резазурина происходит по следующей схеме:



Резазурин Оксазон Гидрорезазуфин

(синий цвет) (розовый цвет) (белый цвет)

Средства измерений, реактивы и материалы

Автоклав, холодильник для хранения культуры, термостат, центрифуга, ФЭК (с фильтром 600 нм), кюветы 10 мм, стеклянные пипетки до 10 мл, мерные колбы на 100 и 250 мл.

Приготовление растворов

1. Раствор резазурина: 0,021 г резазурина, 1 г CH_3OONa растворяют в 500 мл К-К буфера (рН 6,7).

2. К-К буфер (рН 6,7): 4,1 г KH_2PO_4 и 8,67 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ растворяют в 500 мл дистиллированной воды.

Методика определения

К 3 мл (или 3г) токсиканта приливают 3 мл дистиллированной воды, 4 мл раствора резазурина и 3 мл бактериальной культуры. Затем полученную смесь встряхивают и инкубируют 24 часа при 28⁰С. После инкубирования реакцию смесь центрифугируют при 4 тыс. об./мин. (не менее) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость колориметрируют при 600 нм. В качестве контроля используют дистиллированную воду.

Для оценки токсичности рассчитывают дегидрогеназную активность культуры (А, %) по формуле:

$$A = \frac{(D_{спробы} - D_{пробы})}{(D_{Ксп} - D_{Кп})} \times 100\% \text{ , где}$$

$D_{\text{спробы}}$ – усредненная оптическая плотность в слепой пробе;
 $D_{\text{пробы}}$ – усредненная оптическая плотность в неслепой пробе;
 $D_{\text{Ксп}}$ – усредненная оптическая плотность в слепом контроле;
 $D_{\text{Кп}}$ – усредненная оптическая плотность в неслепом контроле.

3.3. Определение фитотоксичности почв (контактный тест) (ISO 11269-2)

Принцип методики основан на оценке влияния токсичных компонентов на интенсивность прорастания семян и ранние стадии роста (общую биомассу и длину корней и наземной части) ряда растений. В качестве тест-объектов рекомендуется использовать семена следующих растений – рожь (*Secale cereal L.*), рейграсс (*Lolium perenne L.*), рис (*Oryza sativa L.*), овес (*Avena sativa*), мягкая пшеница (*Triticum aestivum L.*), зимний или весенний ячмень (*Hordeum vulgare L.*), сорго (*Sorghum bicolor L.*), горчица (*Sinapis alba L.*), 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 M.*), бобы (*Phaseolus aureus R.*).

Методика определения

Подготовленную для анализа почву взвешивают 100 г и помещают в инкубационный сосуд. В качестве контроля используют чистую почву. Почву размещают так, чтобы избежать каких-либо уплотнений. Увлажняют почву до 60% влагоемкости и поддерживают такую влажность на протяжении всего периода инкубации. Засеивают почву 5 – 10 семенами растений. Опытные и контрольные образцы закладывают в трех повторностях. Инкубирование осуществляют при одинаковой температуре и освещенности.

Оценку результатов производят не ранее чем через 14 суток и не позже чем через 21 сутки инкубации. Во-первых, отмечают количество проросших семян в опытном и контрольном варианте. Для того чтобы не повредить корни каждый инкубационный сосуд помещают на бок в слой воды и вымывают

почву. В каждой повторности измеряют длину корней, высоту побега, всхожесть и их общую биомассу растений.

Для каждого из определенных показателей рассчитывают ингибирование (I):

$$I = \frac{(100 - L_{op}) * 100}{L_k}, \text{ где}$$

L_{op} – значение показателя в опыте

L_k – значение показателя в контроле

В случае если показатель ингибирования превышает 50% и 10%, рассчитывают среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую ингибирование прорастания тест-объектов на 50% – ЛКР50 и безвредное разбавление пробы, вызывающее ингибирование прорастания тест-объекта не более 10% – БКР10, соответственно. Методика определения ЛКР50 и БКР10 представлена в п. 4.1.

3.4. Биотестирование объектов с использованием семян редиса *Raphanus sativus L* (ISO 11269-2)

Принцип методики основан на оценке влияния водного экстракта или водных растворов на интенсивность прорастания семян *Raphanus sativus L* (редис сорт «Красный круглый с белым кончиком»).

Средства измерений, реактивы и материалы

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 мл или дозаторы.

Вся посуда стерилизуют перед использованием в автоклаве при 1 атм в течение 20 минут или в сушильном шкафу 2 часа при 160°C.

Методика определения

В чашки Петри раскладывают диски фильтровальной бумаги диаметром 9 см. На каждый образец предусматривают по 3 чашки. В каждую чашку 10 семян редиса красного круглого с белым кончиком укладывают равномерно.

В каждую чашку Петри наливают по 5 мл исследуемых вытяжек или исследуемых растворов. В качестве контроля используют дистиллированную воду. Уровень жидкости в чашках должен быть ниже поверхности семян. Чашки покрывают и помещают в термостат при температуре 20 °С.

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

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

$$T=(X_{\text{контр}}-X_{\text{оп}})/X_{\text{контр}}*100, \text{ где}$$

$X_{\text{контр}}$ – длина корня в контроле, см,

$X_{\text{оп}}$ – длина корня в опыте, см.

При определении фитотоксичности исследуемых проб, а также их разбавлений, в случае если показатель ингибирования превышает 50% и 10%, рассчитывают среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую ингибирование прорастания тест-объектов на 50% – ЛКР₅₀ и безвредное разбавление пробы, вызывающее ингибирование прорастания тест-объекта не более 10% – БКР₁₀, соответственно. Методика определения ЛКР₅₀ и БКР₁₀ представлена в п. 4.1.

3.5. Биотестирование с использованием дафний

(*Daphnia magna*) (ПНД Ф 14.1:2:4.12-06 16.1:2.3.3.9-06)

Методика основана на определении смертности дафний при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой пробе, по сравнению с контролем. Культуру дафний выращивают в термостатируемом при 18 – 22°С климатостате (освещенность 400 – 600 люкс, продолжительность светового дня 12 – 14 часов). Опыты по биотестированию также проводят в климатостате. Для культивирования дафний используют «биологизированную» аквариумную воду

со следующими параметрами: рН 7-8 (граничные значения рН от 6 до 9), жесткость общая 3 – 4 мг-экв/л, соотношение Са/Мg 4:1, концентрация растворенного кислорода не менее 6 – 7 мг/л (граничное значение 2 мг/л). Культуру дафний содержат в стеклянных емкостях объемом 1 – 5 литров, оптимальная плотность взрослых рачков 100 – 150 особей на 1 литр.



Рис. 11. Климатостат с устройствами экспонирования рачков

Скорость созревания маточной культуры сильно зависит от ее исходной плотности. Наилучшие условия создаются при суточном вылове 20 – 30% народившейся молоди. Каждые 7 – 20 суток культуру дафний обновляют в обязательном порядке. Кормом для дафний служат зеленые водоросли (хлорелла или сценедесмус) и хлебопекарные дрожжи.

Средства измерений, реактивы и материалы

Стаканы для экспонирования рачков емкостью 50 мл (8 – 18 штук), колба для разбавляющей (контрольной) воды емкостью 3 л, мерные колбы на 100 мл,

мерный цилиндр или мерный стакан на 150 – 200 мл, от 40 до 80 рачков в возрасте 4 – 24 часа.

Методика определения

Готовят водную вытяжку из почвы (или других веществ).

Из полученной вытяжки готовят серию разбавлений.

Таблица 4

Таблица разбавлений

Номер стакана	Водная вытяжка, мл	Биологизирован ная среда	% разбавления
1	50	0	0
2	50	0	0
3	50	0	0
4	37,5	12,5	25
5	37,5	12,5	25
6	37,5	12,5	25
7	25	25	50
8	25	25	50
9	25	25	50
10	12,5	37,5	75
11	12,5	37,5	75
12	12,5	37,5	75
13	0	50	100
14	0	50	100
15	0	50	100

Биотестирование проводят в стеклянных сосудах, которые заполняют 50 мл исследуемой пробы. В каждый опытный и контрольный сосуд помещали по 5 дафний не более 24-часового возраста. Их быстро переносят стеклянной трубкой диаметром 5 - 7 мм, погрузив ее в воду. Стаканы с растворами

расставляют в термостатируемом при 18 - 22°C люминостане в устройство экспонирования рачков УЭР-03. Для обеспечения наиболее полного контакта исследуемой пробы и организма дафний стеклянные сосуды с тестируемой средой, помещенные в устройство УЭР-03, непрерывно вращаются. Продолжительность биотестирования составляет 48 ч. Во время биотестирования дафний не кормят.

В конце биотестирования визуально подсчитывают количество живых дафний. Живыми считают дафний, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже, чем через 15 сек. после его легкого встряхивания. Остальных дафний считают погибшими.



Рис. 12. Устройство экспонирования рачков – УЭР-03

Токсичность исследуемого образца (I, %) рассчитывают по формуле:

$$I = \frac{(X_n - X_k)}{X_n} * 100, \text{ где}$$

X_n – среднее арифметическое исходного количества особей;

X_k – среднее арифметическое количество выживших особей в тестируемой воде через 48 ч. Определяют ЛК50 и ЛР50, согласно п. 4.1.

3.6. Биотестирование на инфузориях (*Paramecium caudatum*) (ФР.1.39.2003.00923)

Методика определения острой летальной токсичности воды по выживаемости инфузорий основана на установлении количества погибших или обездвиженных особей после экспозиции в тестируемой воде или вытяжке. Критерием острой летальной токсичности является гибель или обездвиживание 50% и более особей в течение 1 часа в тестируемой воде по сравнению с их исходным количеством.

В качестве тест-объекта используют лабораторную монокультуру *Paramecium caudatum* Ehrenberg.

Paramecium caudatum – одноклеточные организмы размером 180 – 300 мкм. Питаются парамеции бактериями, мелкими жгутиконосцами, водорослями.

Культуру парамеций выращивают на дехлорированной водопроводной воде, которую добавляют разбавленное в 20 раз такой же водой пастеризованное молоко. Пересевают культуру инфузорий один раз в месяц (при необходимости один раз в три недели).

Каждый день инфузорий кормят молоком, разбавленным в 20 раз дехлорированной водопроводной водой, добавляя пипеткой на 1 – 2 мл в каждую пробирку по 1 капле разбавленного молока.

Оптимальная температура содержания культуры парамеций 24 – 28°C. Можно оставлять культуру при комнатной температуре. Культуру содержат в темноте, чтобы не развивались водоросли.

Средства измерений, реактивы и материалы

Бинокулярный микроскоп, обеспечивающий 8 – 24 кратное увеличение, микроаквариумы из прозрачного органического стекла (рис. 13), стандартные стеклянные пипетки, капилляры (рис. 14).

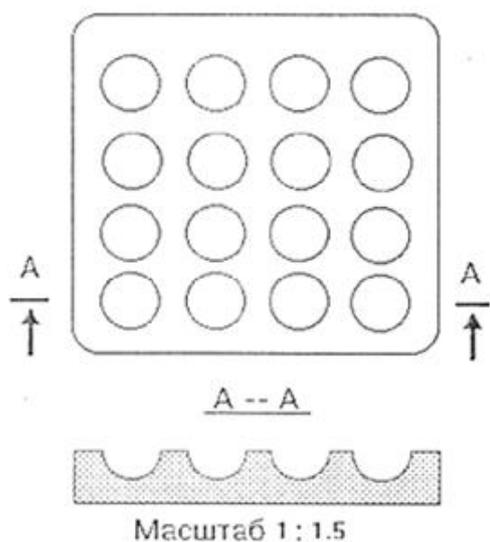


Рис. 13. Микроаквариум для размещения и подсчета инфузорий

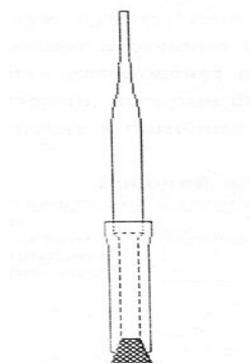


Рис. 14. Капилляр для отбора инфузорий

Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора, при невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают ($+4^{\circ}\text{C}$). Не допускается консервирование проб с помощью химических консервантов. В качестве контрольной используют водопроводную воду, которую дехлорируют путем отстаивания и аэрирования с помощью микрокомпрессора в течение 7 суток.

Для определения токсичности отдельных веществ или их смеси из них готовят растворы путем добавления определенных количеств маточного раствора исследуемого вещества в водопроводную дехлорированную воду. Маточные растворы готовят на дистиллированной воде.

При проведении биотестирования температура исследуемой пробы должна соответствовать температуре культуры.

При наличии в пробе крупнодисперсных взвесей необходима фильтрация.

При проведении биотестирования значения рН тестируемых растворов должно находиться в интервале от 6,5 до 7,6.

Биотестирование проводят в помещении, не содержащем вредных паров и газов, при рассеянном свете и температуре воздуха 18 – 28°C.

Методика определения

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

В свободные лунки капиллярной пипеткой рассаживают по 10 – 12 особей в каждую лунку, так чтобы на одну пробу тестируемой воды приходилось не менее 30 инфузорий в трех лунках (трехкратная повторность). При посадке тест-объекта количество культуральной жидкости в лунке не должно превышать 0,02 мл. Три лунки используют в качестве контрольных.

После посадки инфузорий наливают в контрольные лунки по 0,3 мл дехлорированной водопроводной воды, в опытные – по 0,3 мл пробы тестируемой воды. Отмечают время начала биотестирования и подсчитывают под микроскопом 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 особей под микроскопом. Выжившими считаются инфузории, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездвиженных особей относят к погибшим. Результаты подсчета записывают в рабочий журнал.

Результаты биотестирования считаются правильными и учитываются, если гибель инфузорий в контрольных лунках не превышала 10%.

Токсичность исследуемого образца (I, %) рассчитывают по формуле:

$$I = \frac{(X_n - X_k)}{X_n} * 100, \text{ где}$$

X_n – среднее арифметическое исходного количества особей;

X_k – среднее арифметическое количество выживших особей в тестируемой воде через 1 ч.

Определяют ЛК50 и ЛР50, согласно п. 4.1.

3.7. Биотестирование с использованием водорослей (ПНДФ 14.1:2:3:4.10-04, 16.1:2.3:3.7-04)

Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, 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 (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.



Рис. 15. Культиватор KBM-05

Перед использованием пробки и флаконы необходимо залить кипящей водой, выдержать в ней 10 мин., а затем, слив воду, просушить фильтровальной бумагой.

Засев водоросли в культиватор KB-05 производится с начальной оптической плотностью $0,020 \pm 0,002$. Для этого в (125 ± 10) мл 50% питательной

среды вносят (14 ± 1) мл суспензия водоросли с оптической плотностью $0,220 \pm 0,020$, профильтрованной через 3 – 4 слоя марли или вату. Культура выращивается в полустационарном режиме, который достигается ее ежедневным пересевом в свежую среду. Такой режим культивирования позволяет без соблюдения условий стерильности поддерживать альгологически чистую культуру водоросли.

Приготовление среды Тамия

Для культивирования водоросли используется питательная среда Тамия.

Компоненты среды (100% среда Тамия, в г/л):

KNO_3 – 5,0 г/л;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 г/л;

железо лимоннокислое – 0,003 г/л (растворяют при кипячении);

микроэлементы – по 1,0 мл растворов А и Б.

Растворы А и Б готовятся отдельно:

раствор А (H_3BO_3 – 2,86 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,222 г/л),

раствор Б (MoO_3 – 17,64 мг/л; NH_4VO_3 – 22,96 мг/л, растворять при нагревании).

Питательная среда и растворы всех солей готовятся на дистиллированной воде. Затем отдельно стерилизуют каждый раствор 30 мин. Кипячением, охлаждают и плотно закрывают притертой пробкой.



Рис. 16. Устройства для наращивания культуры водоросли в стандартных температурных и световых условиях KB-03

50% питательная среда Тамия готовят следующим образом: 500 мл 100% среды Тамия разбавляют 500 мл дистиллированной воды. Затем добавляют по 0,5 мл раствор А и 0,5 мл раствора Б. Растворы солей и микроэлементов, а также приготовленная питательная среда хранятся в холодильнике при температуре от 2 до 4⁰С не более трех месяцев.

Средства измерений, реактивы и материалы

Многоцветный культиватор водорослей КВМ-05 для проведения биотестирования, измеритель ИПС-03, культиватор КВ-05 для культивирования водорослей, весы лабораторные, стеклянные пипетки на 1, 5 и 10 мл, термометр лабораторный, мерный цилиндр на 100 мл, стаканы на 50 и 200 мл, дистиллированная вода, калий азотнокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный 3-водный, магний сернокислый 7-водный, цитрат железа; раствор микроэлементов; культура зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer.



Рис. 17. Измеритель оптической плотности и температуры суспензий водоросли ИПС-03

Методика определения

Готовят вытяжку из воздушно-сухой почвы. Из полученной вытяжки готовят ряд разбавлений (например, 1:1, 1:10, 1:100).

Таблица 5

Таблица разбавлений

Номер стакана	Водная вытяжка, мл	Дистиллированная вода, мл
1	48	0
2	4,8	43,2
3	0,48	47,52

Для биотестирования используют культуру водорослей, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (через одни сутки после посева в культиватор КВ-05). Перед биотестированием культура водоросли, выращенная на 50% среде Тамия, профильтровывают через 3 – 4 слоя марли или вату и разбавляют до оптической плотности $(0,125 \pm 0,005)$ 50% средой Тамия. Регистрацию оптической плотности культуры тест-объекта проводят с помощью специализированного измерителя плотности суспензии ИПС-03 при длине волны 560 нм.

Приготовление растворов, разбавлений, проведение биотестирования выполняются при комнатной температуре. Температура дистиллированной и исследуемой воды должна быть также доведена до комнатной температуры перед приготовлением разбавлений.

Подготовленная тест-культура водоросли вносится по 2 мл в 6 стаканов с 48 мл контрольной и тестируемых пробами воды.

Содержимое каждого стакана разливается по 6 мл во флаконы-реакторы (по 4 флакона на каждый вариант тестируемой воды, включая контрольную пробу). 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. Флаконы загружаются в приостановленную кассету по ходу ее вращения, т.е. против часовой стрелки.

Ростовые характеристики культуры водоросли определяются в многоцветном культиваторе КВМ-5.

Через 22 часа культивирования культиватор КВМ-05 выключается из сети и проводится измерение оптической плотности суспензии водоросли во всех флаконах в измерителе ИПС-03.

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.

Ингибирование роста водоросли (I) рассчитывают в %:

$$I = \frac{X_k - X_0}{X_k} * 100$$

где X_k , и X_0 – средние значения оптической плотности в контроле и в опыте, соответственно.

Определение ЛК50 и ЛР50 проводят согласно п .4.1.



Рис. 18. Оборудование для биотестирования с использованием водорослей

4. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

1. Вычисление среднего арифметического показателя:

$$\bar{x} = \frac{\sum X}{n}, \text{ где}$$

x – значение повторностей определения;

n – количество повторностей;

В Excel: =СРЗНАЧ(массив значений X).

2. Вычисление среднеквадратичного отклонения среднего:

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

В Excel: =СТАНДОТКЛОН(массив значений X).

3. Определение среднеквадратической ошибки:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

В Excel: =СТАНДОТКЛОН/КОРЕНЬ(n)

3. Вычисление показателя достоверности различия двух сравниваемых величин:

$$t_{\partial} = \frac{|\bar{x}_{\text{вариант1}} - \bar{x}_{\text{вариант2}}|}{\sqrt{m_{\text{вариант1}}^2 + m_{\text{вариант2}}^2}}$$

Где $\bar{x}_{\text{вариант1}}$, $\bar{x}_{\text{вариант2}}$ – средние значения двух сравниваемых величин

$m_{\text{вариант1}}$, $m_{\text{вариант2}}$ – соответствующие значения ошибок средних арифметических.

В Excel: =ABS(X1cp-X2cp)/КОРЕНЬ(m1^2+m2^2),

Рассчитанный показатель достоверности сравнивается с критическим значением, для нахождения которого принимается уровень значимости $p=0.05$ и

число степени свободы $f = n_{\text{вариант1}} + n_{\text{вариант2}} - 2$, где $n_{\text{вариант1}}$, $n_{\text{вариант2}}$ – число наблюдений в соответствующих вариантах.

Критическое значение определяется по стандартной табл. 6. По вертикали ищут число степеней свободы, по горизонтали – уровень значимости.

В Excel: =СТЮДРАСПОБР (0,05; степени_свободы),

где 0,05— вероятность, соответствующая двустороннему распределению Стьюдента,

степени_свободы - целое, указывающее число степеней свободы f .

Если рассчитанное значение $t_{\text{фактич}} > t_{\text{ст}}$, то различие между сравниваемыми величинами является достоверным, а не случайным.

Таблица значений критерия Стьюдента (t-критерия)

$\alpha/2$	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
α	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
$df (n-1)$	SixSigmaOnline.ru										
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.000	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.000	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.000	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.000	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.000	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
80	0.000	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
100	0.000	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
1000	0.000	0.675	0.842	1.037	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098	3.300

4.1. Установление средней эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки)

Среднюю эффективную (летальную) концентрацию ЛК50 или среднее эффективное (летальное) разбавление ЛР50 устанавливают графическим способом (рис. 19).

Определение ЛК 50 проводят следующим образом.

На оси абсцисс откладывают величины концентраций вещества, а на оси ординат – проценты изменения тест-реакции (гибели тест-объектов) по отношению к контролю. Через полученные точки проводят прямую. Потом из точки на оси ординат, которая соответствует 50%, проводят линию, параллельную оси абсцисс, до пересечения с линией графика. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точке пересечения перпендикуляра и оси абсцисс соответствует ЛК50. Находят значение ЛК50 в мг/кг или мг/л.

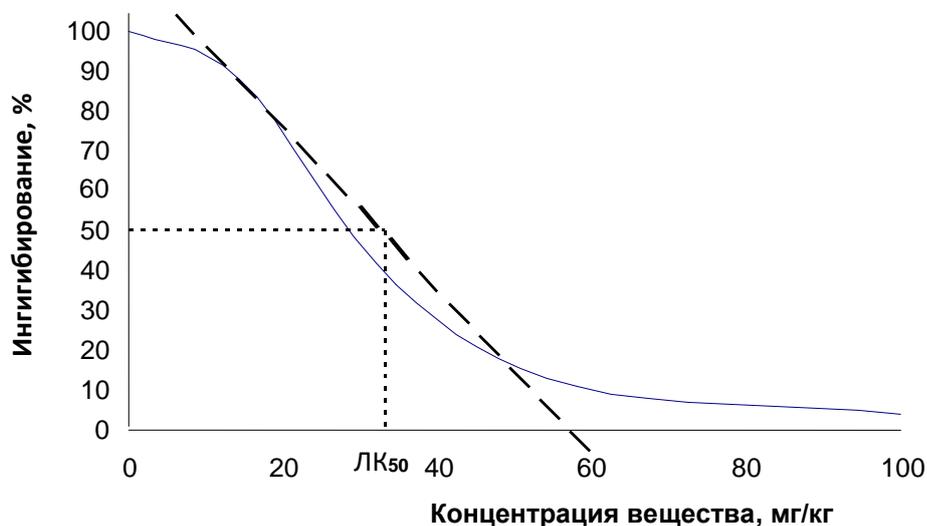


Рис. 19. Определение ЛК50

Определение ЛР50 проводят следующим образом.

На оси абсцисс откладывают величины разбавлений пробы воды или водной вытяжки, а на оси ординат – проценты изменения тест-реакции (гибели

тест-объектов) по отношению к контролю. Через полученные точки проводят прямую. Потом из точки на оси ординат, которая соответствует 50%, проводят линию, параллельную оси абсцисс, до пересечения с линией графика. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точке пересечения перпендикуляра и оси абсцисс соответствует ЛР50. По графику находят значение ЛР50 в процентах или безразмерных величинах (в кратности разбавления, долях и др.).

4.2. Построение калибровочной кривой и нахождение калибровочного коэффициента

С использованием данных строят уравнение линейной регрессии вида $y=kx+b$,

где x – C , мг/л,

y – оптическая плотность, ед.,

k и b – коэффициенты.

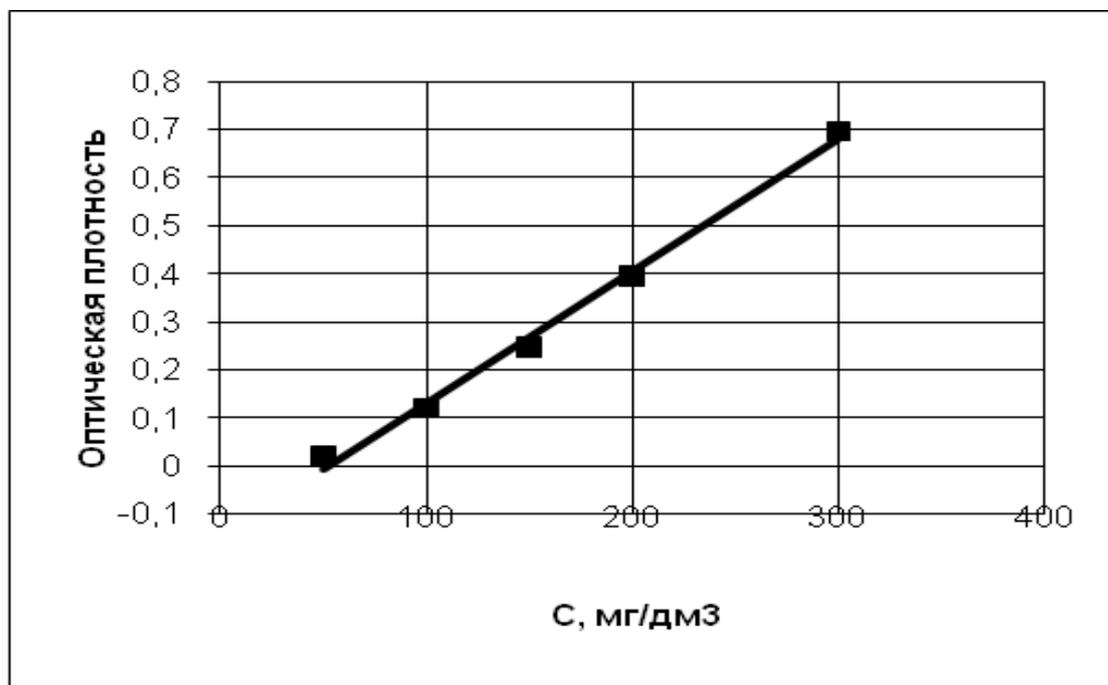


Рис.20 Калибровочная кривая

Затем находят K — калибровочный коэффициент, численно равный тангенсу угла наклона калибровочного графика.

Для этого:

1. находят коэффициент корреляции r по формуле:

$$r = \frac{\sum (x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sqrt{\sum (x_i - M_x)^2 \sum (y_i - M_y)^2}} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{(n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2)(n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2)}}$$

Значение коэффициента корреляции удовлетворяет соотношению $-1 \leq r \leq 1$.

1. Чем меньше отличается абсолютная величина r от единицы, тем ближе к линии регрессии располагаются экспериментальные точки. Если коэффициент корреляции равен нулю, то переменные x , y называются некоррелированными. Если $r = 0$, то это только означает, что между x , y не существует линейной связи, но между ними может существовать зависимость, отличная от линейной.

Для расчета коэффициента корреляции в Excel используется функция КОРРЕЛ, возвращающая значения коэффициента корреляции:

КОРРЕЛ(Массив1;Массив2)

Массив1 - массив значений x .

Массив2 - массив значений y .

Массив1 и Массив2 должны иметь одинаковое количество точек данных.

2. находят коэффициент k в Excel с помощью функции:

НАКЛОН(Массив1;Массив2)

3. вычисляют коэффициент b в Excel, используя функцию:

ОТРЕЗОК(Массив1;Массив2)

4. Калибровочный коэффициент K рассчитывают по формуле:

$$K = r/k, \text{ где}$$

r -коэффициент корреляции,

k -коэффициент линейной регрессии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ISO 11269-1. Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Method for measurement of inhibition of root growth. – 1993. – 9 p.
2. 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 [текст]. – 1995. – 7 p.
3. ISO 14240-1:1997 Soil quality - Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. – 1997.
4. ISO 14240-2. Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method. – 1997.
5. Microbiological methods for assessing soil quality / edited by Jaap Bloem, David W. Hopkins, and Anna Benedetti. – CABI, 2006 – p. 123 – 126.
6. ГОСТ 26423-85. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. – М., 1985. – 7 с.
7. Колешко О.И. Экология микроорганизмов в почве / О.И. Колешко. – Минск: Высш. шк., 1981. – 345 с.
8. Нетрусов А.И. Экология микроорганизмов: учеб. пособие / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко. – М: Академия, 2004. – 272 с.
9. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по измерению оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). – М., 2004 (издание 2007). – 37 с.
10. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99. Токсикологические методы контроля. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. – М., 1999. – 31 с.
11. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: практ. пособие / под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 2-е изд. – 215 с.

12. ФР.1.39.2003.00923. Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных вод, сточных и очищенных сточных, поверхностных, грунтовых и питьевых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum*. – Казань, 2003. – 20 с.

13. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев. – М.: Наука, 2005.

Учебное издание

Селивановская Светлана Юрьевна

Галицкая Полина Юрьевна

Гумерова Рушания Ханифовна

**ТЕСТИРОВАНИЕ ОТХОДОВ, ПОЧВ, МАТЕРИАЛОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИВЫХ СИСТЕМ**

Редактор А.А. Аксенова

Подписано в печать 04.10.2011.

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. .

Тираж экз. Заказ

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужи́на, 1/37

тел. (843) 233-73-59, 233-73-28