УДК 57.083.3:556.115

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЧУТЛИВОСТІ РІЗНИХ ТЕСТ-ОБ'ЄКТІВ ДО ДІЇ РОЗЧИНІВ $K_2Cr_2O_7$

Підкопайло С.Ф., ст. лаборант, Корж О.П., к.б.н., доцент

Запорізький національний університет

Для проведення біоіндикації якості питної води встановлювали ступінь чутливості різних видів тест-об'єктів до еталонного розчину ($K_2Cr_2O_7$). Результатом даної роботи є порівняльний аналіз чутливості тест-об'єктів, які займають різне систематичне положення: бактерії (*Escherichia coli K-12)*, ракоподібні (*Ceriodaphnia affinis L.)* та рослинні об'єкти (*Cucumis sativus*, *Raphanus sativus*). Встановлено, що найбільш високою чутливістю відрізняються ракоподібні *Ceriodaphnia affinis*; із рослинних тест-об'єктів *Raphanus sativus* виявився більш чутливим, ніж *Cucumis sativus*; найменшу чутливість мають мікроорганізми *Escherichia coli* (*K-12).*

Ключові слова: тест-об'єкт,еталонний розчин, чутливість, порівняльний аналіз, водне середовище.

Подкопайло С.Ф., Корж А.П. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ К ДЕЙСТВИЮ РАСТВОРОВ $K_2Cr_2O_7$ / Запорожский национальный университет, Украина.

При проведении биоиндикации качества питьевой воды определяли степень чувствительности различных видов тест-объектов к эталонному *раствору* ($K_2Cr_2O_2$). Результатом работы является сравнительный анализ чувствительности тест-объектов, которые занимают разное систематическое положение: бактерии (*Escherichia coli K-12)*, ракообразные (*Ceriodaphnia affinis L.)* и растительные объекты (*Cucumis sativus*, *Raphanus sativus*). Установили, что наибольшей чувствительностью обладают ракообразные *Ceriodaphnia affinis,* из растительных тест-объктов *Raphanus sativus* оказался более чувствительным чем *Cucumis sativus,* менее чувствительны микроорганизмы *Escherichia coli* (*K-12).*

Ключевые слова: тест-объект, эталонный раствор, чувствительность, сравнительный анализ, водная среда.

Podkopaylo S.F., Korzh A.P. COMPARATIVE ANALYSIS OF SENSITIVITY OF DIFFERENT TEST-OBJECTS TO ACTION SOLUTION $K_2Cr_2O_7$ / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

When conducting biological indication of the quality of drinking water determines the degree of sensitivity of different types of test objects to the reference solution ($K_2Cr_2O_7$). The work is a comparative analysis of the sensitivity of the test objects, which occupy different systematic position: bacteria (*Escherichia coli K-12*), crustaceans (*Ceriodaphnia affinis L.)* and vegetable items (*Cucumis sativus*, *Raphanus sativus*). Found that the highest sensitivity have crustaceans *Ceriodaphnia affinis*, from plant test objects *Raphanus sativus* was more sensitive than *Cucumis sativus*, less sensitive bacteria *Escherichia coli* (*K-12*).

Key words: test-object, a reference solution, the sensitivity, a comparative analysis, the aquatic environment.

ВСТУП

Вода є невід'ємною складовою життя на нашій планеті. У природних умовах вона не може зберігати хімічну чистоту: сучасний рівень антропогенного навантаження зумовлює додаткове підвищення у воді вмісту як біогенних елементів, так і екотоксикантів. За даними конференції "Довкілля для Європи" [1], близько 30 % європейського населення проживає в країнах, які використовують понад 20 % своїх річних водних ресурсів. Оскільки загальновизнаним є використання природних ресурсів обсягом до 10 %, наведені дані свідчать про суттєве навантаження на водні ресурси.

Якість води можна оцінити за її фізичними, хімічними й біологічними характеристиками. У зв'язку зі стрімким зростанням кількості потенційно небезпечних хімічних речовин, оцінка якості природних водойм із використанням методів біотестування в останні роки набула особливої актуальності. За даними науковців, у водах, які використовуються для водопостачання, наявні 146 органічних та 30

неорганічних компонентів. Також спостерігається різке збільшення кількості ксенобіотиків у Біосфері: до 2000 року було відомо близько 24 млн. хімічних речовин і близько 1,3 млн. нових речовин реєструється щороку [2].

Фізико-хімічні методи оцінки якості води не завжди надають адекватну інформацію про загальний стан водойм та придатність їх вод до практичного використання. Біологічні методи (біотестування та біоіндикація) є менш точними порівняно з хімічними (кількісними), але більш інформативними за відношенням до визначення загальної токсичності води та її негативного впливу на гідробіонти. На основі біологічних методів можна оцінювати стан природних угрупувань та складати прогнози щодо негативних змін,

які відбуваються в них, давати інтегральну оцінку токсичності водного середовища та аналізувати причини деградації та порушення сукцесійних процесів водних і навколоводних екосистем.

Міжнародним центром наукових досліджень (Канада) реалізована спеціальна програма «Water Tox», за якою критеріями добору та умовами виконання біологічного моніторингу існують вимоги: дослідження повинні бути економічні, високочутливі, мати короткий період розвитку, давати чисельне потомство, характеризуватися однорідністю, що дозволяє досягати максимальної варіативності між повторами, мати можливість вивчати якісні і кількісні зміни різних типів біологічної активності (токсичність, мутагенність, канцерогенність і тд.) [3].

Метою роботи була оцінка рівня чутливості тест-об'єктів (бактерії (*Escherichia coli K-12)*, ракоподібні (*Ceriodaphnia affinis L.)* та рослинні об'єкти (*Cucumis sativus*, *Raphanus sativus*)) до одного з рекомендованих еталонних у токсикологічних дослідженнях розчинів – біхромату калію.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводилися в лабораторії біоіндикації та біоекології регіонального науково-навчально-виробничого центру "Екологія" ЗНУ. У контрольному варіанті використовували відстояну водопровідну воду. У якості еталонного розчину використовували водний розчин $K_2Cr_2O_7$ різних концентрацій [4]. Дослідження проводили в трьох повторах.

Як об'єкти тваринного походження використовували представника ракоподібних *Ceriodaphnia affinis.* Культуру дафній для аналізу готували за загальноприйнятою методикою [5]. Проби еталонних розчинів з діапазоном концентрацій 0,5 – 4,0 мг/л з інтервалом 0,5 мг/л наливали по 15 $см^3$ у десять пробірок (дослід). Інші десять пробірок заповнювали таким самим об'ємом води (контроль). У кожну з дослідних і контрольних пробірок вміщували по 1 екземпляру церіодафній. Тривалість біотестування становила 48 годин. Наприкінці біотестування візуально підраховували кількість живих церіодафній. На підставі підрахунку кількості живих церіодафній у контролі та досліді визначали середні арифметичні, які використовували для розрахунку кількості загиблих церіодафній у досліді відносно контролю за формулою:

$$A = \frac{\overline{Xk} - \overline{Xd}}{\overline{Xk}} 100\ \%\ , \qquad (1)$$

де: А – кількість загиблих церіодафній у досліді відносно контролю;

$\overline{Xk}$ – середнє арифметичне кількості живих церіодафній у контролі, екземпляри;

$\overline{Xd}$ – середнє арифметичне кількості живих церіодафній у досліді, екземпляри.

Як рослинні тест-об'єкти ми використовували *Cucumis sativus* (сорт "Конкурент") та *Raphanus sativus* (сорт із білим кінчиком). Визначення впливу модельних розчинів на ріст клітин вивчали за кореневим тестом [6]. Модельні розчини, які тестували, концентрацією 0,5 – 4,0 мг/мл з інтервалом 0,5 мг/мл; 5,0 – 35,0 мг/мл з інтервалом 5 мг/мл; 50,0 – 300,0 мг/мл з інтервалом 50 мг/мл, додавали по 10 мл у чашки Петрі, у які закладали по 15 насінин. Чашки з насінням дослідних концентрацій та контролем (відстояна водопровідна вода) витримували при 28°С у темряві протягом 72 годин, після чого відмічали проростання насіння і заміряли довжину головного кореня. Показники оцінювали за зменшенням зазначених параметрів в експерименті порівняно з контролем.

Із мікроорганізмів було досліджено чутливість *Escherichia coli* (*К-12)* до еталонних розчинів $K_2Cr_2O_7$ [7] з досліджуваним діапазоном концентрацій 100,0 – 350,0 мг/мл та інтервалом 50,0 мг/мл. До поживного середовища (бульйон Мюллер-Хінтона) об'ємом 8 мл додавали по 1 мл досліджуваної концентрації $K_2Cr_2O_7$ та по 1мл мікробної суспензії культури *Escherichia coli* (*К-12)*; інкубацію проводили при 37°С. Показники результатів фіксували двічі – через 24 години та 48 годин. "Негативний контроль", потрібний для обліку результатів, зберігали протягом дослідження в холодильнику при +4°С. Визначення дії еталонного розчину на мікроорганізми здійснювали за оптичною густиною на фотоелектроколориметрі (ФЕК-2) з використанням кювети 10,0 см при довжині хвилі 625 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать, що достовірна чутливість *Escherichia coli* (*К-12)* до дії $K_2Cr_2O_7$ спостерігається, починаючи з концентрації 100 мг/мл (табл. 1). Але навіть на максимальній дослідженій концентрації (350 мг/мл) нами встановлено лише бактеріостатичну дію.

Таблиця 1 – Результати досліджень антимікробної активності модельного розчину на *Escherichia coli К-12*

Концентрація, $K_2Cr_2O_7$,мг/мл	Показник ФЕКа, оптична щільність	Коефіцієнт варіації, %
0	1,060 ± 0,07	11,94
100,0	0,084 ± 0,004***	9,21
150,0	0,078 ± 0,003***	8,27
200,0	0,067 ± 0,001***	3,2
250,0	0,043 ± 0,002***	10,13
300,0	0,040 ± 0,005***	22,17
350,0	0,023 ± 0,001***	7,53

Примітка. *** – $P < 0,001$

Результати проведеного аналізу визначення рівня чутливості еукаріотичних рослинних індикаторів *Raphanus sativus* до еталонного розчину $K_2Cr_2O_7$ представлені в табл. 2. Отримані результати свідчать, що модельні розчини на низьких концентраціях (3,0 мг/мл порівняно з контролем) не тільки не стримували, але навіть стимулювали розвиток кореневої системи *Raphanus sativus* на 10 – 40 %.

Починаючи з концентрації 5 мг/мл, спостерігалося достовірне зменшення кількості пророслих насінин редиски, а з концентрації 10 мг/мл достовірно зменшилася й довжина кореня. Максимальне інгібування розвитку тест-об'єкта було зафіксовано на концентрації 150 мг/мл і склало 22,4 % для проростання насіння та 22,2 % для розвитку кореня (при $P < 0,001$). Проведений аналіз показує, що культура *Raphanus sativus* за

показниками коефіцієнта варіації має діапазон від 26,66 % до 63,97 %, що свідчить про достатньо високу чутливість цього тест-об'єкта.

При дослідженні впливу модельного розчину $K_2Cr_2O_7$ на розвиток кореневої системи *Cucumis sativus* (табл. 3) відзначено, що низькі концентрації еталонного розчину стимулюють як відсоток проростання (на 5,3 – 6,7 %), так і ріст кореня (на 22 – 43 %) порівняно з контролем. Достовірне стимулювання довжини кореня спостерігалося лише до концентрацій 2 мг/мл, а відсотка проростання насіння – до 3 мг/мл.

Таблиця 2 – Результати біотестування модельних розчинів на проростках *Raphanus sativus*

Концентрація, $K_2Cr_2O_7$, мг/мл	Проростання, %	Середня довжина кореня, мм	Коефіцієнт варіації, %
0	81,4 ± 5,81	25,2 ± 1,24	36,87
0,5	83,6 ± 2,12	31,8 ± 3,99*	60,18
1,0	85,1 ± 1,54	30,7 ± 3,38*	51,55
1,5	84,9 ± 1,31	34,5 ± 3,04**	41,27
2,0	83,6 ± 2,12	31,3 ± 2,97*	44,67
2,5	84,7 ± 1,51	32,8 ± 4,04*	57,75
3,0	85,9 ± 0,99	37,7 ± 3,32***	41,25
3,5	83,4 ± 1,09	25,7 ± 3,51	63,97
4,0	82,6 ± 1,76	26,8 ± 3,38	59,17
5,0	55,6 ± 5,62**	20,7 ± 1,21	26,66
10,0	60,0 ± 8,33*	19,8 ± 1,35**	31,34
15,0	62,3 ± 2,01**	19,2 ± 1,12***	26,71
20,0	57,8 ± 4,63**	24,2 ± 1,53	28,89
25,0	48,9 ± 4,05***	15,5 ± 1,82***	51,65
30,0	51,2 ±1,74***	13,0 ± 0,77***	27,73
35,0	51,2 ± 1,25***	14,0 ± 1,04***	33,88
50,0	53,4 ± 3,11***	4,7 ± 0,64***	52,91
100,0	26,7 ± 2,69***	11,4 ± 2,19***	63,48
150,0	22,4 ± 2,21***	5,6 ± 0,89***	47,51
200,0	0	0	
250,0	0	0	
300,0	0	0	

Примітки: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$

З підвищенням концентрації (5,0 – 200,0 мг/мл) достовірно зростає інгібування ростових процесів (P < 0,001), що полягає як у зниженні проростання насіння на 2,3%, так і зменшенні довжини кореня на 2,9 %, вже починаючи з концентрації 5 мг/мл. За результатами досліджень індикаторна культура *Cucumis sativus*, є менш чутливим об'єктом порівняно з *Raphanus sativus*, що підтверджується широким діапазоном його коефіцієнта варіації, який коливався в межах 23,91% – 98,23%.

Таблиця 3 – Результати біотестування модельних розчинів на проростках *Cucumis sativus*

Концентрація, $K_2Cr_2O_7$, мг/мл	Проростання, %	Середня довжина кореня, мм	Коефіцієнт варіації, %
0	79,9 ± 2,37	36,3 ± 2,24	44,79
0,5	86,8 ± 1,72*	47,4 ± 4,05*	30,09
1,0	86,6 ± 0,73**	43,9 ± 4,28	44,67
1,5	87,4 ± 0,47**	51,6 ± 4,36***	38,72
2,0	87,5 ± 1,01**	51,9 ± 2,71***	23,91
2,5	86,8 ± 0,87**	44,3 ± 3,85	39,84
3,0	85,2 ± 0,34*	46,1 ± 4,57	45,33
3,5	84,6 ± 0,65	40,7 ± 4,62	52,06
4,0	82,9 ± 1,05	36,5 ± 3,36	42,16
5,0	72,3 ± 1,63**	26,4 ± 4,19*	60,52
10,0	62,3 ± 1,99***	17,4 ± 2,89***	72,75
15,0	61,2 ± 1,51***	15,1 ± 2,17***	67,54
20,0	61,2 ± 1,71***	21,0 ± 3,54***	79,17
25,0	57,3 ± 2,25***	20,0 ± 2,46***	61,59
30,0	44,5 ± 2,24***	11,8 ± 1,97***	66,71
35,0	41,7 ± 1,71***	21,0 ± 2,63***	57,50
50,0	41,0 ± 1,32***	5,25 ± 0,48***	47,90
100,0	20,0 ± 2,04***	3,1 ± 0,41***	61,21
150,0	11,2 ± 1,27***	3,29 ± 0,78***	50,3
200,0	2,3 ± 0,43***	1,04 ± 0,045***	98,23
250,0	0	0	0
300,0	0	0	0

Примітки:* – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001

Ceriodaphnia affinis – типовий мешканець водойм із високим рівнем органічного забруднення (близької до α-мезосапробної зони), добре адаптований до органічних забруднювачів, тобто і до органічних токсикантів. Цей вид визнаний стандартизованим тест-об'єктом для визначення рівня токсичності водних об'єктів [4].

Згідно з рисунком 1, діапазон концентраційного ряду тестової речовини є достатньо вузьким, максимальна концентрація розчину 3 мг/л, а діюча інгібуюча концентрація коливається в межах від 1,2 мг/л – 2,7 мг/л. Показники знаходяться в межах існуючих стандартів для чутливості *Ceriodaphnia affinis.*

Таким чином, найбільш високою чутливістю з досліджених тест-об'єктів до еталонного розчину ($K_2Cr_2O_7$) відрізняються ракоподібні *Ceriodaphnia affinis* – $ЛК_{50}$ – 24 діапазон мінімальної та максимальної концентрації коливається в межах від 1,2 мг/л – 2,7 мг/л.

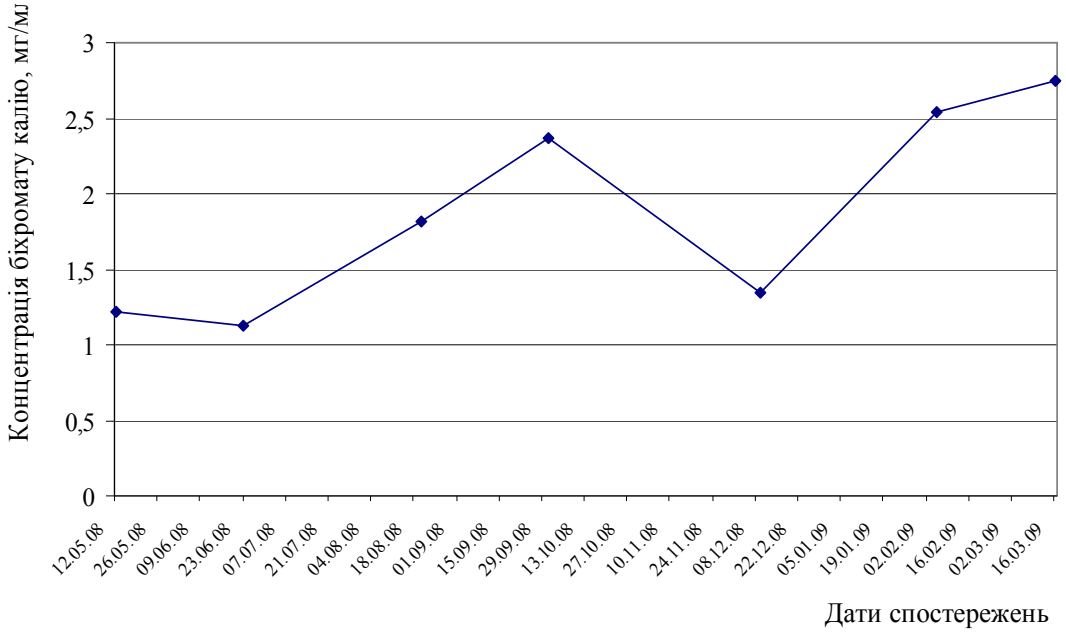

Рис. 1. Динаміка змін $ЛК_{50}$ – 24 для *Ceriodaphnia affinis* за період дослідження

ВИСНОВКИ

1. Найбільш високою чутливістю до еталонного розчину ($K_2Cr_2O_7$) відрізняються ракоподібні *Ceriodaphnia affinis* – $ЛК_{50}$ – 24 діапазон мінімальної та максимальної концентрації коливається в межах від 1,2 мг/л – 2,7 мг/л.
2. З рослинних тест-об'єктів *Raphanus sativus* виявився більш чутливим до еталонного розчину ніж *Cucumis sativus*. Повне інгібування розвитку тест-об'єкта *Raphanus sativus* зафіксовано на концентрації 150 мг/мл ($P < 0,001$), а тест-об'єкта *Cucumis sativus* на концентрації 200,0 мг/мл ($P < 0,001$).
3. Найнижча чутливість до дії водного розчину біхромату калію зафіксовано на *Escherichia coli K-12*, для якої концентрація 350 мг/мл $K_2Cr_2O_7$ виявила лише бактеріостатичну дію.

ЛІТЕРАТУРА

1. 5–а Пан – Європейська конференція міністрів Довкілля для Європи : [Матеріали конференції] – Київ, 2004. – 579 с.
2. Экологические аспекты современных технологий охраны водной среды / Под ред. НАН Украины В.В. Гончарука. – К.: Наукова думка, 2005. – 399 с.
3. Навчальне видання. Практикум з визначення якості об'єктів довкілля / Рідей Н. М., Копілевич В.А., Войтенко Л.В. Київ, видавничий центр НАУ, 2006. – Ч. 1: Вода. – 158 с.
4. Щербак В.І. Методичний посібник з визначення якості води / В. Щербак, Е. Арістархова – Київ, видавничий центр НАУ, 2002.– 51 с.

5. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna Straus* та *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg (Cladocera, Crustacea)* (ISO 6341:1996, MOD) ДСТУ 4173:2003. — [Чинний від 2004-01-01]. — К. : Держспоживстандарт України, 2004. – 13с. — (Національний стандарт України).

6. Семена. Правила отбора образцов и методы определения посевных качеств. ГОСТ 5055 – 56. – [Действует от 1956-01-01]. – Москва: Государственный стандарт СССР, 1956. – 107с. – (Государственный стандарт СССР).

7. Бригер Е.Б. Справочник по микробиологичеким и вирусологическим методам / Бригер Е.Б., Ведьмина Е.А., Володовец В.В. — М.: Медицина, 1982.- 452 с.

УДК [582.23:57.018.6]:546.4/7

ПІГМЕНТСИНТЕЗУЮЧА ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ – БІОІНДИКАТОР ЗАБРУДНЕННЯ НАВКОЛИШНЬОГО ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

Рильський О.Ф., к. б. н., доцент

Запорізький національний університет

У роботі представлені результати досліджень пігментсинтезуючої здатності бактерій в умовах дії стресових факторів. Основна увага приділена вивченню дії радіоактивних металів U (II) і Th (IV), а також Zn (II) та Fe (II) на пігментсинтезуючу здатність бактерій. Установлено концентраційну границю втрати пігментсинтезуючої здатності та росту бактерій для деяких металів.

Ключові слова: бактерії, пігменти, важкі метали.

Рыльский А.Ф. ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ – БИОИНДИКАТОР ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ / Запорожский национальный университет, Украина

В работе представлены результаты исследований пигментсинтезирующей способности бактерий в условиях действия стрессовых факторов. Основное внимание уделено изучению действия радиоактивных металлов U (II) и Th (IV), а также Zn (II) и Fe (II) на пигментсинтезирующую способность бактерий. Установлена концентрационная граница потери пигментсинтезирующей способности и роста бактерий для некоторых металлов.

Ключевые слова: бактерии, пигменты, тяжелые металлы.

Rylskiy A. F. PIGMENT-SYNTHESIZING CAPACITY OF BACTERIA – THE BIOINDICATOR OF POLLUTION OF THE SURROUNDING ENVIRONMENT / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

The results obtained during the investigation of the pigment-synthesizing capacity of bacteria in conditions of stressful factors action, are represented. The major attention was payed on the study of action of radioactive metals (U, Th) and Zn, Fe on the pigment-synthesizing capacity of bacteria. The concentration limit to the loss of the pigment-synthesizing capacity and bacteria growth for some metals, has been established.

Key words: bacteria, pigments, heavy metals.

ВСТУП

Сучасне загострення екологічної ситуації є однією з найважливіших проблем, що зумовлює необхідність вивчення механізмів адаптації та резистентності організмів до важких металів як найнебезпечніших забруднювачів. Особливе положення важких металів зумовлене їх високою токсичністю, а також з можливістю накопичення їх організмами та передачею по харчовим ланцюгам. Локальному збільшенню концентрації металів у гідросфері та літосфері сприяють різноманітні підприємства, що виробляють і перетворюють метали у виробничому процесі, що призводить до