



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76248

(13) C2

(51) МПК (2006)

G01N 33/18

C02F 3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТОКСИЧНОСТІ СТІЧНИХ ВОД НА ВОДНІ СОЛОНІ СЕРЕДОВИЩА

1

(21) 20040604487

(22) 09.06.2004

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Кузьміна Наталя Станіславівна

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРИВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-
МІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) RU, C1, 2 202 617, 20.04.2001

Унифицированные методы исследования качества
вод, Ч. III. Методы биологического анализа вод. - 4-
е изд. - М., 1983(57) 1. Спосіб визначення впливу токсичності стіч-
них вод на водні солоні середовища шляхом ви-
значення показників росту культури морської од-
ноклітинної водорості *Platymonas viridis* Rouch або
Dunaliella salina Teod., який включає культивуван-

2

ня водорості в контролі і в досліджуваному сере-
довищі, підрахунок чисельності клітин водорості,
який відрізняється тим, що культивування прово-
дять протягом 15 діб, а чисельність клітин підра-
ховують на 1, 3, 6, 9, 12 та 15 добу культивування і
по зміні чисельності клітин на 50 % і більше у дос-
ліді в порівнянні з контролем судять про модифі-
куючу дію стічних вод.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що мік-
роводорість *Platymonas viridis* Rouch. використо-
вують для оцінки впливу токсичності стоків на
морське середовище.

3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що мік-
роводорість *Dunaliella salina* Teod. використовую-
ють для оцінки впливу токсичності стоків на гіпер-
солоні водойми.

Передбачуваний винахід відноситься до вод-
ної токсикології і призначений для оцінки рівня
токсичності морського середовища, що містить
стічні води.

На цей час проблема аварійних і запланова-
них скидань стічних вод різного походження у во-
дойми України дуже актуальна. У зв'язку з цим,
виникає проблема оцінки токсичності стічних вод,
як для водних екосистем, так і для здоров'я люди-
ни, що використовує водні ресурси. Стічні води
населених пунктів, що представлені стоками до-
мових каналізацій і скотних дворів, зливами від
садово-городницьких господарств, окремих ліка-
рняних споруджень і різних підприємств легкої і
важкої промисловості, здебільшого, через свій
хімічний склад є прісноводними. Потрапляючи в
прісноводні водойми, такі відходи, безумовно,
спричинюють зміни хімічного складу води. Для
оцінки токсичності середовища, що містить стічні
води, використовуються способи, засновані на
визначенні впливу гострих (короткочасних) токсич-
них концентрацій стоків на прісноводних гідробіон-
тів. У той же час, способи визначення впливу ток-
сичності стоків на морських гідробіонтів і
гідробіонтів, що живуть у водоймах з високою со-

лоністю, дуже обмежені. Саме тому, співробітники
очисних споруджень і працівники СЕС продовжу-
ють керуватися методиками, розробленими для
прісноводної біоти, навіть якщо скидання стічних
вод населеними пунктами здійснюються в море чи
солоні озера.

Відомий [див. СЕ. Дятлов. А.Г. Петросян
Phaeodactylum tricornutum Boil. (Chrysophyta) как
тест-объект. Общие положения // Альгология.-
2001. - Т.11, №1. - С.145-154] спосіб оцінки токсич-
ності морського середовища, що покладений в
основу нормативного документа «Біотестування
морської води та стічної, яка відводиться в море.
Методика», затвердженого Мінекобезпеки України
№46 від 30.05.1995р. (КНД. 1995). У відомому спо-
собі біотестування морських вод проводять з за-
стосуванням морської одноклітинної водорості
Phaeodactylum tricornutum. Спосіб заснований на
визначенні показників росту культури морської
одноклітинної водорості *Phaeodactylum tricornutum*
у тестованій воді. Критерієм токсичності є достові-
рна зміна чисельності клітин водорості, експону-
ваної в тестованому середовищі, у порівнянні з
контролем, протягом 72 годин. Спосіб включає
культивування культури морської одноклітинної

(13) C2

(11) 76248

(19) UA

водорості *Phaeodactylum tricornutum*, процедуру біотестування й обробку результатів. Процедура біотестування складається з відбору проб води, внесення в контроль і в тестоване середовище інокуляту культивованої водорості, підрахунку чисельності клітин водорості *Phaeodactylum tricornutum* на 24, 48 і 72 години експозиції. Авторами запропоновано шкалу токсичності тестованого середовища по показниках росту водорості. Основним підсумком таких робіт є визначення мінімальної кратності розведення ($K_r \min$) - відношення тестованої води до контрольної. Крім цього, автори посиляються на роботи з визначення мінімально припустимої і медіанальної ефективної (летальної) концентрацій.

Відомий спосіб визначення впливу токсичності стічних вод на лабораторну культуру водоростей *Phaeodactylum tricornutum* має низку недоліків:

- є короткочасним експрес-тестом і не дозволяє оцінити різні фази росту культури, а саме: періоди індивідуальності, початкового порушення функцій клітин, період нормалізації чи навіть стимуляції росту. Саме при хронічному (довгочасному) експерименті дослідник може одержати повну інформацію про токсичність тестованого середовища;

- не дає повної і достовірної інформації при оцінці небезпеки скидань стічних вод різного походження для гіперсолоних водойм.

В основу винаходу «Спосіб визначення рівня токсичності стічних вод» поставлена задача шляхом проведення дослідження впливу токсичності стічних вод на одноклітинні мікроводорості *Platymonas viridis* Rouch і *Dunaliella salina* Teod. у довгочасному експерименті забезпечити дослідників більш повною і достовірною інформацією про рівень токсичності різних концентрацій стічних вод.

Поставлена мета досягається тим, що в Способі визначення рівня токсичності стічних вод шляхом визначення показників росту культури морської одноклітинної водорості в тестованій воді, який включає культивування культури морської одноклітинної водорості, процедуру біотестування, що складається з відбору проб води, внесення в контроль і в тестоване середовище інокуляту культивованої водорості, підрахунку чисельності клітин водорості, як тест-об'єкти використовують культури одноклітинних морських мікроводоростей *Platymonas viridis* Rouch і *Dunaliella salina* Teod. і проводять довгочасний експеримент. Мікроводорість *Platymonas viridis* Rouch. використовують для оцінки впливу токсичності стоків на морське середовище. Мікроводорість *Dunaliella salina* Teod. використовують для оцінки небезпеки від скидань стічних вод різного походження для гіперсолоних водойм.

Відмінність пропонованого способу від відомого полягає в тому, що автор пропонує проводити дослідження впливу токсичності стічних вод на одноклітинних мікроводоростях у довгочасному (15-добовому) експерименті. Крім цього, відмінністю пропонованого способу від відомого, є використання як тест-об'єктів культури *Platymonas viridis* Rouch - для оцінки впливу токсичності стоків на морське середовище і *Dunaliella salina* Teod. - для оцінки рівня небезпеки скидань стічних вод різного

походження для гіперсолоних водойм. Зазначені види мікроводоростей були обрані в зв'язку з наступним:

- простота культивування й утримування в лабораторних умовах;
- можливість швидкого одержання біомаси культур за короткий термін;
- висока чутливість до дії токсикантів;
- широке застосування як тест-об'єктів в екотоксикології;

- відносна стійкість *P. viridis* і *D. salina* до дії деяких токсикантів, зокрема стічних вод різного походження;

- доступність: водорість *P. viridis* широко поширена в морських акваторіях, а *D. salina* - типовий представник водойм з високим рівнем солоності.

Спосіб реалізується таким чином. Для біотестування використовують альгологічно чисті культури з музею культур мікроводоростей Інституту біології південних морів НАН України, м. Севастополь: *Platymonas viridis* (Rouch, 1970) - зелена водорість род. *Chlamydomonadae* (*Chlorophyta*, *Volvociphyceae*) - і зелена одноклітинна джгутикова галофільна водорість *Dunaliella salina* (Teod., 1905) із род. *Chlamydomonadae*, (*Chlorophyta*, *Volvociphyceae*). Для періодичного біотестування морської і гіперсолонної води, які містять стічні води, мікроводорості культивують у лабораторних умовах з використанням живильного середовища Гольдберга (для водоростей *Platymonas viridis* і *Dunaliella salina*). середовища Erd-Schreiber (Butcher, 1952) - для культивування *Platymonas viridis* і середовища Артарі №1, №2 (1916) і Милько (1962) - для культивування *Dunaliella salina*.

Умови культивування

Культури водоростей вирощують у конічних колбах місткістю 500мл при температурі 18-25°C і природному освітленні. Як живильне середовище використовують середовище Гольдберга. Морську воду відбирають в умовно чистій зоні моря, фільтрують її через подвійний паперовий фільтр №6. Стерилізують морську воду шляхом трьохразового нагрівання на водяній бані до температури 80°C.

Процедура біотестування:

1. Проведення експерименту:

- Послідовно вносять у морське середовище інгредієнти середовища Гольдберга, різні концентрації стічних вод, а також рівну кількість культури мікроводоростей.

- Відбирають клітинний інокулят на початку досліду, потім на 1-у, 3-ю, 6-у, 9-у, 12-у і 15-у добу 15-добового експерименту і підраховують кількість клітин для кожного варіанта. Кількість клітин підраховують у всьому об'ємі камери Горяєва, для чого рух мікроводоростей фіксують розчином Люголя з гліцериним.

Експерименти проводять в трьох повторностях. В кожній колбі кількість клітин визначали також у трьох повторностях.

2. Статистична обробка результатів експерименту. Результати дослідів опрацьовують статистично, використовуючи t - критерій Ст'юдента при порівнянні параметра чисельності при рівні значущості $p \leq 0,05$ (Лакин, 1973).

3. Визначення наявності чи відсутності токсичного ефекту різних концентрацій стічної води на культуру водоростей.

Показники біотестування

Основним показником, за допомогою якого оцінюють рівень токсичності доданих у середовище стічних вод, є чисельність клітин водоростей. За результатами експериментів складають таблицю чисельності клітин у всіх варіантах експерименту в абсолютних одиницях, а також значень чисельності клітин водоростей, виражених у відносних одиницях (% відносно контролю). Додатковими показниками дослідження впливу токсичності середовища на мікрководоростях, можуть слугувати відсоток інгібування чисельності клітин, коефіцієнт відносного приросту культур, середня швидкість росту, відсоток зниження середньої швидкості росту, приріст і відсоток зниження приросту культури.

На підставі отриманих результатів експериментів роблять висновок про мінімальну кратність розведення стічних вод морською водою або во-

дою з високою концентрацією солоності, тобто встановлюють таку кількість природної води, при якій не буде спостерігатися токсичний ефект нечистот. Для виявлення токсичності різних концентрацій стічних вод автор також пропонує керуватися «Шкалою токсичності тестованого середовища по показниках росту водоростей *Phaeodactylum tricornutum* Bohl.» (Дятлов, Петросян, 2001), за допомогою якої по відсотку чисельності клітин у розчинах визначає рівень токсичності і характеристику середовища, а також кратність розведення. Ряд дослідників визначає також максимально припустиму (недіючу) концентрацію і летальну концентрацію (LC_{50} , LC_{100}), які, в основному, використовують під час перевірки культур відносно дії стандартного токсиканта.

Приклади реалізації способу.

Приклад 1. Оцінювали рівень токсичності міських господарсько-побутових стічних вод (ГБСВ) на морську мікрководорість *Platymonas viridis* Rouch. Результати експерименту наведені в Табл.1, а також на Фіг.1-Фіг.6.

Таблиця 1

Зміна чисельності клітин *Platymonas viridis* Rouch.
під впливом різних концентрацій господарсько-побутових стічних вод

Термін. Доба	Концентрація стічних вод, мл/л			
	0 (контроль)	1	10	100
0	$7,78 \pm 1,35$ $100 \pm 17,35$	$7,28 \pm 0,69$ $93,57 \pm 8,87$	$6,67 \pm 0,90$ $85,73 \pm 11,57$	$8,15 \pm 0,72$ $104,76 \pm 9,25$
1	$9,01 \pm 0,84$ $100 \pm 9,32$	$11,48 \pm 1,76$ $127,41 \pm 19,53$	$7,65 \pm 0,70$ $84,90 \pm 7,77$	$5,43 \pm 0,47^*$ $60,27 \pm 5,22$
3	$15,68 \pm 3,43$ $100 \pm 21,87$	$9,26 \pm 0,87^*$ $59,06 \pm 5,55$	$7,65 \pm 0,95^*$ $48,79 \pm 6,06$	$6,30 \pm 0,61^*$ $40,18 \pm 3,89$
6	$22,10 \pm 4,47$ $100 \pm 20,23$	$18,89 \pm 4,13$ $85,47 \pm 18,69$	$19,01 \pm 1,82$ $86,02 \pm 8,23$	$18,76 \pm 3,14$ $84,89 \pm 14,21$
9	$51,60 \pm 14,27$ $100 \pm 27,65$	$22,22 \pm 3,98$ $43,06 \pm 7,71$	$20,74 \pm 2,04^*$ $40,19 \pm 3,95$	$24,20 \pm 9,45$ $46,90 \pm 18,31$
12	$141,60 \pm 31,93$ $100 \pm 22,55$	$48,64 \pm 7,95^*$ $34,35 \pm 5,61$	$71,97 \pm 12,12$ $50,83 \pm 8,56$	$58,15 \pm 11,75^*$ $41,07 \pm 8,30$
15	$150,49 \pm 46,11$ $100 \pm 30,64$	$85,92 \pm 25,99$ $57,09 \pm 17,27$	$90,86 \pm 14,74$ $60,38 \pm 9,79$	$91,73 \pm 27,11$ $60,95 \pm 18,01$

Примітка. У чисельнику - кількість клітин (X на 10^3) в мл. у знаменнику - те саме відносно чисельності в контролі, прийнятому за 100%. Зірочкою позначені значення чисельності клітин, які вірогідно відрізняються від аналогічних значень у контрольних культурах ($p \leq 0,05$).

На підставі отриманих результатів можна дійти висновку про те, що в довгочасному експерименті ГБСВ у концентраціях 1, 10 і 100мл/л не викликали токсичності в морської флагелляти *Platymonas viridis* Rouch. Достовірне зниження понад 50% порівняно з контролем чисельності клітин на 9-12 добу під впливом стічних вод можна пояснити зниженням середньої швидкості росту культури (див. Фіг.3). причому, відсоток зниження середньої швидкості росту чисельності мікрководоростей вищий під дією стічних вод в концентрації 1 і 100мл/л (див. Фіг.4). В абсолютних значеннях кількість клітин *P. viridis* зростала у всіх варіантах

протягом всього експерименту. Однак, на табл.1, Фіг.1 і Фіг.2 показано, що цей показник був вищий в контролі, ніж у дослідях. Слід зазначити, що відсоток інгібування чисельності був вищий при найменшій концентрації, а коефіцієнт відносного приросту, відповідно, був нижчий в цьому випадку, а також при впливі 100мл/л стічних вод. Добовий приріст культури *P. viridis* був вищий у випадку впливу ГБСВ у концентрації 1мл/л (див. Фіг.5). Зниження приросту посилювалося зі збільшенням концентрації стічних вод (див. Фіг.6), що, безумовно, узгоджується з даними Табл.1 і свідчить про те, що найбільше зростання кількості клітин відбу-

вається при збільшенні вмісту біогенів, наявних у стоках.

З прикладу 1 випливає, що під час експонціального періоду росту культури *P. viridis* стічні води міського колектора в концентраціях 1, 10 і 100 мл/л не викликали необоротних порушень у рості чисельності клітин дослідженої культури, хоча, майже протягом всього експерименту досліджений показ-

ник був нижчий ніж контрольний, що, імовірно, свідчить про надлишкову кількість живильних і токсичних компонентів стоків.

Приклад 2. Оцінювали рівень токсичності міських господарсько-побутових стічних вод (ГБСВ) на галофільну мікроводорість *Dunaliella salina* Teod. Результати експерименту наведені в Табл.2, а також на Фіг.7-Фіг.12.

Таблиця 2

Зміна чисельності клітин *Dunaliella salina* Teod. під впливом різних концентрацій господарсько-побутових стічних вод

Термін, доба	Концентрація ГБСВ, мл/л			
	0(контроль)	0,1	10	100
0	$\frac{53086 \pm 6268}{100 \pm 11,81}$	$\frac{43827 \pm 3170}{82,56 \pm 5,97}$	$\frac{33457 \pm 3788}{63,02 \pm 7,13^*}$	$\frac{29136 \pm 1253}{54,88 \pm 2,36}$
1	$\frac{7,27 \pm 0,78}{100 \pm 10,7}$	$\frac{4,55 \pm 0,52^*}{62,6 \pm 7,1}$	$\frac{4,63 \pm 0,49^*}{63,7 \pm 6,7}$	$\frac{3,53 \pm 0,51^*}{48,5 \pm 7,0}$
3	$\frac{3,67 \pm 0,33}{100 \pm 8,99}$	$\frac{9,37 \pm 1,24^*}{255,3 \pm 33,8}$	$\frac{14,34 \pm 1,54^*}{390 \pm 41,9}$	$\frac{8,65 \pm 1,12^*}{235,7 \pm 30,5}$
6	$\frac{15,68 \pm 2,74}{100 \pm 17,5}$	$\frac{25,41 \pm 3,44^*}{162,0 \pm 21,9}$	$\frac{17,75 \pm 2,24}{113,2 \pm 14,3}$	$\frac{22,71 \pm 2,66}{144,8 \pm 17,0}$
9	$\frac{22,65 \pm 1,86}{100 \pm 8,2}$	$\frac{55,0 \pm 5,68^*}{242,8 \pm 25,1}$	$\frac{43,09 \pm 5,31^*}{190,2 \pm 23,4}$	$\frac{47,28 \pm 7,84^*}{208,7 \pm 34,6}$
12	$\frac{68,58 \pm 7,76}{100 \pm 11,3}$	$\frac{115,7 \pm 16,2^*}{168,8 \pm 23,6}$	$\frac{86,86 \pm 14,58}{126,6 \pm 21,2}$	$\frac{65,12 \pm 9,4}{94,9 \pm 13,7}$
15	$\frac{226,3 \pm 13,37}{100 \pm 5,9}$	$\frac{171,7 \pm 14,01^*}{75,9 \pm 6,2}$	$\frac{117,3 \pm 16,72^*}{51,7 \pm 7,4}$	$\frac{165,1 \pm 23,0^*}{72,9 \pm 10,1}$

Примітка. У чисельнику - кількість клітин (X на 10^3) в мл. у знаменнику - те саме відносно чисельності в контролі, прийнятому за 100%. Зірочкою позначені значення чисельності клітин, які вірогідно відрізняються від аналогічних значень у контрольних культурах ($p \leq 0,05$).

Виходячи з отриманих даних експерименту щодо вивчення впливу стічних вод на мікроводорість *Dunaliella salina* Teod. (см. Табл.2), можна зробити висновок про нешкідливість тестованих стічних вод у концентрації 1, 10 і 100 мл/л. Відсоток інгібування чисельності клітин *D. salina* зростає зі збільшенням концентрації ГБСВ (Фіг.7). Починаючи з 6-ої доби, коефіцієнт відносного приросту культури був найбільшим при дії концентрації 1 і 10 мл/л стічних вод, у той час як у контролі, особливо, під впливом стічних вод у концентрації 100 мл/л цей показник був нижчий. Такі самі результати показав розрахунок середньої швидкості росту культури: при 1 і 10 мл/л швидкість росту була максимальною, а при найбільшій концентрації - мінімальною (Фіг.9). У порівнянні з контролем відсоток зниження середньої швидкості росту числа клітин *D. salina* був найменшим під впливом 10 мл/л стічних вод (Фіг.10). Добовий приріст культури дослідженої мікроводорості був тим вищий, чим нижча концентрація тестованих ГБСВ (Фіг.11) і, відповідно, відсоток зниження приросту культури був тим нижчий, чим вища доза токсиканта (Фіг.12).

Таким чином, ГБСВ у концентраціях 1 і 10 мл/л викликали, в середньому, більшу стимуляцію росту числа клітин *D. salina*, ніж при 100 мл/л. Стиму-

ляція спостерігалася також протягом всього експерименту, а максимальне, порівняно з контролем, зростання числа клітин припадало на 3-12 добу. У той самий час, вивчення дії стічних вод у концентрації 100 мл/л показало, що аналогічний період у культури відбувався з 3-ї по 9-у добу. В усіх варіантах збільшення числа клітин в абсолютних одиницях відбувалося поступово в ході всього експерименту (табл.2).

З наведених прикладів випливає, що розведення стічних вод міського колектора морською водою в співвідношеннях 1:1000 (1 мл/л), 1:100 (10 мл/л) і 1:10 (100 мл/л) не викликає необоротних змін у рості числа клітин морської мікроводорості *Platymonas viridis* Rouch. і галофільної мікроводорості *Dunaliella salina* Teod.

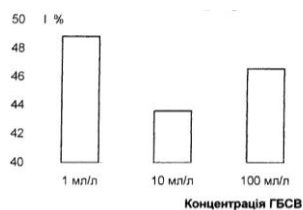
Переваги заявленого способу, у порівнянні з відомим, полягають у наступному:

- уперше робить оцінку безпеки скидань стічних вод різного походження для гіперсолоних водойм;

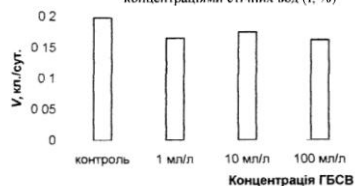
- забезпечує повною і достовірною оцінкою про рівень токсичності досліджуваного середовища, оскільки дозволяє оцінити різні фази росту культури: періоди індеферентності, початкового порушення функцій клітин, період нормалізації, або, навіть, стимуляції росту, який викликаний

утворенням у середовищі сприятливих умов або адаптаційними властивостями мікро водоростей на відгук на дію токсиканта,

- завдяки проведенню довгочасного експерименту, з'являється можливість установлення часу найбільш негативної прояви впливу нечистот.



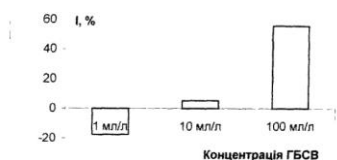
Фіг. 1. Відсоток інгібування чисельності клітин *Platymonas viridis* Rouch в розчинах з різними концентраціями стічних вод (I, %)



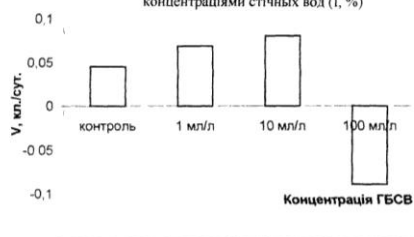
Фіг. 3. Середня швидкість росту культури *Platymonas viridis* Rouch під впливом різних концентрацій стічних вод (V, кл./доб.)



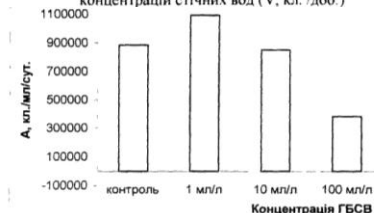
Фіг. 5. Добовий приріст культури *Platymonas viridis* Rouch під впливом стічних вод різної концентрації (A, кл./мл/доб.)



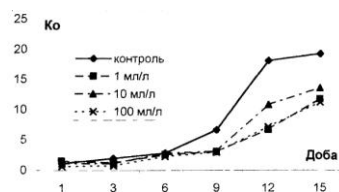
Фіг. 7. Відсоток інгібування чисельності клітин *Dunaliella salina* Teod. в розчинах з різними концентраціями стічних вод (I, %)



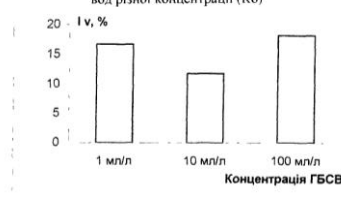
Фіг. 9. Середня швидкість росту культури *Dunaliella salina* Teod. під впливом різних концентрацій стічних вод (V, кл./доб.)



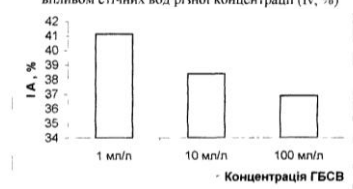
Фіг. 11. Добовий приріст культури *Dunaliella salina* Teod. під впливом стічних вод різної концентрації (A, кл./мл/доб.)



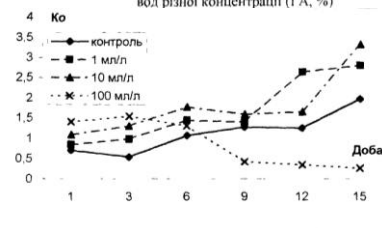
Фіг. 2. Коефіцієнт відносного приросту культур *Platymonas viridis* Rouch під впливом стічних вод різної концентрації (Ko)



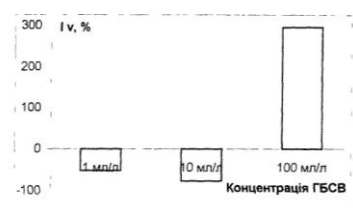
Фіг. 4. Відсоток зниження середньої швидкості росту культури *Platymonas viridis* Rouch під впливом стічних вод різної концентрації (Iv, %)



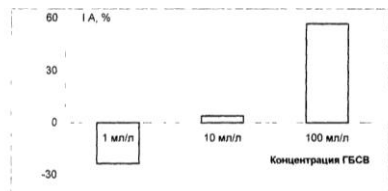
Фіг. 6. Відсоток зниження приросту культури *Platymonas viridis* Rouch під впливом стічних вод різної концентрації (IA, %)



Фіг. 8. Коефіцієнт відносного приросту культур *Dunaliella salina* Teod. під впливом стічних вод різної концентрації (Ko)



Фіг. 10. Відсоток зниження середньої швидкості росту культури *Dunaliella salina* Teod. під впливом стічних вод різної концентрації (Iv, %)



Фіг. 12. Відсоток зниження приросту культури *Dunaliella salina* Teod. під впливом стічних вод різної концентрації (IA, %)

