

УДК 674.048

**БИОТЕСТИРОВАНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АНТИСЕПТИКОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДОРΟΣЛЕЙ**

Ю. А. ВАРФОЛОМЕЕВ, Н. А. КУРБАТОВА, Н. С. РОСТОВЦЕВА

ЦНИИМОД

Токсичность сточных вод, содержащих антисептические препараты, влияющие на естественные процессы самоочищения и фотосинтеза водоемов, можно контролировать экспресс-методом. Метод экономичен, за короткое время с его помощью можно исследовать большое число проб сточной воды на малом объеме суспензии водорослей (10...20 мл). Он основан на определении изменения интенсивности размножения (изменение численности) клеток водорослей под воздействием сточной воды в сравнении с дистиллированной водой.

Для тестирования использовали альгологически чистые, выращенные в стерильных условиях культуры зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb., которые повсеместно распространены в водоемах умеренной зоны России. Данный вид водорослей относится к ценобиальным организмам. Ценобии 2-, 4- и реже 8-клеточные имеют строение плоских пластинок. Клетки, удлиненно-овальные с закругленными концами, краевые — с двумя отогнутыми наружу шипами. Размеры клеток  $7,0 \times 43,0 \times 2,5 \dots 16,0$  мкм. Оболочка гладкая, трехслойная. На сколах видны три типа поверхностей клеточной стенки: сетчатая, глобулярная и фибриллярная. Средний слой толщиной около 10 нм образован спорополенином, обеспечивающим достаточно высокую устойчивость оболочки к химическому воздействию. Внешний (толщина около 15 нм) и внутренний целлюлозный (20...200 нм) слои придают оболочке механическую прочность. Клеточная стенка покрывает протопласт, где располагается пластинчатый хроматофор, пиреноид, одно ядро и вакуоли. Перед делением клетки увеличиваются. Размножаются они автоспорами. Автоспоры в материнской оболочке располагаются пучком, после освобождения они разворачиваются в пластинки. Иногда вместо ценобиев образуются отдельные клетки.

Водоросли выращивали на искусственной питательной среде Успенского. В ее состав входили, г:  $\text{KNO}_3$  — 2,50;  $\text{MgSO}_4$  — 7,00;  $\text{H}_2\text{O}$  — 2,50;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 10,00;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 2,50;  $\text{K}_2\text{CO}_3$  — 3,45. Навеску каждого вещества растворяли в 100 мл дистиллированной воды, приготовленные растворы стерилизовали кипячением в течение 20...30 мин. Перед посевом водорослей колбы обрабатывали сухим жаром (температура  $180^\circ\text{C}$ ) в течение 1 ч. На 1 л питательной среды вносили по 1 мл каждого раствора солей в строго определенном, указанном выше, порядке, чтобы избежать образования осадка, и добавляли 1—2 капли 1%-го раствора  $\text{FeCl}_3$ . Альгологически чистую культуру водорослей для посева вносили в количестве, достаточном для образования светло-зеленого окрашивания. После посева колбу закрывали стерильной ватно-марлевой пробкой. Водоросли культивировали при освещении лампами дневного света мощностью 20...40 Вт, размещенными на расстоянии 30...40 см от поверхности культуры. Оптимальная температура для выращивания водорослей ( $20 \pm 2$ )  $^\circ\text{C}$ . Через 7 сут культуру водорослей, нахо-

дядущуюся в стадии экспоненциального роста, отделяли от питательной среды путем отстаивания. Плотность культуры определяли перед постановкой эксперимента путем подсчета численности клеток водорослей под микроскопом «Биолам-Р17» при 300-кратном увеличении в камере Горяева. Численность клеток должна составлять 5... 10 млн кл./мл.

Для испытаний на острую токсичность использовали водные растворы антисептиков ЭОК и Катан с концентрацией 2,0 %, а также К-12 — 1,5 %.

При кратковременном биотестировании в течение 96 ч использовали по 100 мл содержащей антисептические препараты сточной воды и дистиллированной воды (контроль). Повторность испытаний — трехкратная. В каждую колбу добавляли такое количество сгущенной культуры водорослей, чтобы исходное содержание клеток составляло 250... 300 тыс. кл./мл. Содержимое колб тщательно перемешивали. Испытания проводили при одинаковой температуре и освещенности. Через определенные промежутки времени (1, 3, 4 сут) из колб отбирали по 2 мл проб и проводили подсчет числа живых водорослевых клеток.

Под действием антисептиков зеленая масса водорослей меняла окраску до полного обесцвечивания. В некоторых случаях изменения окраски водорослей не происходило, но они становились более вялыми и легко повреждались. Наблюдая клетки водорослей под микроскопом, можно было обнаружить сравнительно ранний признак поражения — плазмолиз. В клеточной вакуоли содержатся довольно высокие концентрации различных органических и неорганических веществ. Толща протопласта, отделяющая вакуоль от окружения, в нормальном состоянии очень слабо проницаема для этих веществ и сравнительно хорошо — для воды. При этом в клетке создается сильное давление, так как растворенные в вакуоли вещества можно рассматривать как газ, концентрация которого намного выше, чем снаружи. Окружающий вакуоль протопласт удерживает молекулы веществ, оказывая давление на клеточную стенку. Химическое поражение клетки вызывает резкое увеличение проницаемости протопласта, что приводит к потере его упругости и отслаиванию от клеточной стенки. Живые клетки сильно ограничивают проницаемость внутрь органических веществ.

Важнейшим показателем, характеризующим действие антисептика на водоросли, является нарушение процесса их размножения. Цикл деления у многих одноклеточных длится всего лишь несколько часов. Токсический эффект не обязательно проявляется в снижении абсолютной численности живых клеток, так как за время наблюдения осуществляется несколько циклов клеточного деления. Поэтому параллельно с культурой водорослей, выращиваемой на тестируемой пробе воды, в аналогичных условиях закладывается контрольная культура в среде, не содержащей антисептиков. Сравнивая численность обеих культур, можно судить о наличии или отсутствии токсического эффекта. Острое токсическое действие антисептиков на водоросли определяли по формуле

$$A = \frac{(\bar{X}_k - \bar{X}_t) 100}{\bar{X}_k},$$

где  $A$  — отклонение численности водорослевых клеток, %;  
 $\bar{X}_k$  и  $\bar{X}_t$  — среднее арифметическое значение численности живых водорослевых клеток соответственно в дистиллированной воде и тестируемой воде, содержащей антисептик.

Если отклонение за 1 сут составляет 50 % и более, то тестируемая вода токсична, если 70 % и более — гипертоксична. Если отклонение за

4 сут составляет 50 % и более, то тестируемая вода токсична, если 50 % — то она средней токсичности, если от 25 до 35 % — малой токсичности.

Результаты наблюдений при определении острого токсического действия водных растворов антисептиков обработаны статистически (табл. 1).

Таблица 1

Результаты биотестирования воды с антисептиками  
на острую токсичность водорослей

| Антисептик,<br>концентрация $C$ ,<br>кратность разбавления<br>(КР) | Продол-<br>житель-<br>ность<br>наблю-<br>дения,<br>сут | Среднее<br>арифме-<br>тическое<br>$\bar{X}^*$ | Среднее<br>квадра-<br>тическое<br>откло-<br>нение<br>$\pm \sigma$ | Ошибка<br>среднего<br>арифме-<br>тиче-<br>ского<br>$\pm m$ | Крите-<br>рий до-<br>стовер-<br>ности<br>$t_d$ | Откло-<br>нение<br>от кон-<br>троля,<br>%<br>$t_i$ |
|--|--|---|---|--|--|--|
| Контроль**   | 1  | 528   | 118,05  | 48,19  | —  | —  |
|  | 2  | 525   | 113,80  | 46,45  | —  | —  |
|  | 3  | 668   | 89,31   | 36,45  | —  | —  |
| Катан, $C = 2\%$ (20 г/л)  | 1  | 427   | 10,33   | 4,22   | 2,09   | 19,1   |
|  | 2  | 298   | 52,70   | 21,51  | 4,43   | 43,2   |
|  | 3  | 236   | 94,80   | 38,69  | 8,13   | 64,7   |
| Контроль   | 1  | 360   | 116,80  | 47,80  | —  | —  |
|  | 3  | 527   | 75,28   | 30,72  | —  | —  |
|  | 4  | 728   | 106,29  | 43,38  | —  | —  |
| Катан, $C = 0,0001\%$<br>(1 мг/л), КР = $20 \cdot 10^3$            | 1  | 337   | 22,30   | 9,10   | 0,47   | 6,4  |
|  | 3  | 397   | 90,70   | 37,02  | 2,70   | 24,7   |
|  | 4  | 550   | 8,94  | 3,65   | 4,09   | 24,4   |
| Контроль   | 1  | 312   | 26,40   | 10,77  | —  | —  |
|  | 2  | 423   | 13,67   | 5,58   | —  | —  |
|  | 3  | 513   | 155,13  | 63,32  | —  | —  |
| ЭОК, $C = 1\%$ (10 г/л)  | 1  | 337   | 52,79   | 21,55  | -2,70  | 21,0   |
|  | 2  | 350   | 143,67  | 58,64  | 1,24   | 17,0   |
|  | 3  | 227   | 90,70   | 37,02  | 3,90   | 56,0   |
| Контроль   | 1  | 403   | 25,03   | 10,22  | —  | —  |
|  | 4  | 913   | 152,50  | 62,26  | —  | —  |
|  | 1  | 353   | 43,67   | 17,82  | 2,43   | 12,4   |
| ЭОК, $C = 0,004\%$ (0,04 г/л),<br>КР = 250                         | 4  | 643   | 53,54   | 21,85  | 4,09   | 29,6   |
|  | 1  | 528   | 118,05  | 48,18  | —  | —  |
| Контроль   | 2  | 525   | 113,80  | 46,45  | —  | —  |
|  | 3  | 668   | 89,30   | 36,45  | —  | —  |
|  | 1  | 288   | 17,23   | 7,03   | 4,93   | 45,0   |
| К = 12, $C = 1,5\%$ (15 г/л)                                       | 2  | 433   | 48,44   | 19,77  | 1,82   | 18,0   |
|  | 3  | 322   | 84,48   | 34,48  | 6,90   | 52,0   |
|  | 1  | 305   | 16,43   | 6,71   | —  | —  |
| Контроль   | 4  | 650   | 42,40   | 17,30  | —  | —  |
|  | 1  | 297   | 29,40   | 12,00  | 0,58   | 2,6  |
| К = 12, $C = 0,0001875\%$<br>(1,9 мг/л), КР = 8000                 | 4  | 485   | 16,43   | 6,71   | 8,89   | 25,4   |

\* Здесь и далее, в табл. 2, численность водорослей в тыс. кл./мл для шести сеток камеры Горяева.

\*\* Контроль — дистиллированная вода.

О наличии острого токсического действия можно судить по критерию достоверности  $t_d$ . Достоверное снижение прироста численности клеток в тестируемой воде по сравнению с контролем ( $t_d > t_{st}$ ) в течение 4 сут свидетельствует о наличии острого токсического действия антисептиков на водоросли. Критерий Стьюдента  $t_{st} = 2,23$  при уровне значимости 0,05 и степени свободы  $n_k + n_m - 2$ .

Испытания на острую токсичность водных растворов антисептиков позволили определить их минимальные концентрации, при которых они

оказывают токсическое действие на водоросли *Scenedesmus* в течение 4 сут. Для Катана, ЭОК и К-12 они составили соответственно 1,0; 40,0 и 1,9 мг/л. Вода, содержащая антисептические препараты в таких количествах обладала малой токсичностью. Отклонение от контроля не превышало 30 %.

Для установления хронического токсического действия тестируемой воды на водоросли проводили испытания в течение 14 сут. Их целью является нахождение кратности разбавления тестируемой воды, при которой токсическое действие на водоросли не проявляется. Эксперимент осуществляли как в опыте по острой токсичности. Учет численности водорослевых клеток производили через 1, 4, 7, 14 сут. На седьмые сутки от начала биотестирования контрольную и тестируемую воду меняли на свежую. Для этого отбирали по 75 мл свежих проб воды, вносили все необходимые соли для создания питательной среды, затем добавляли по 25 мл хорошо перемешанного содержимого колб после биотестирования в течение первых 7 сут. Проверяли численность водорослевых клеток и продолжали эксперимент еще в течение 7 сут. Через 14 сут тестируемую воду оценивали на хроническое токсическое действие. Результаты наблюдений обрабатывали статистически (табл. 2). Степень токсичности тестируемой воды оценивали по 5-балльной шкале. Результаты биотестирования и степень токсичности приведены в табл. 3:

Статистически недостоверное снижение прироста численности водорослевых клеток в тестируемой воде по сравнению с контролем ( $t_d < t_{st}$ ) в течение 14 сут свидетельствует об отсутствии токсического

Таблица 2

Результаты биотестирования воды с антисептиками на хроническую токсичность водорослей

| Антисептик, концентрация $C$ , кратность разбавления (КР)     | Продолжительность наблюдения, сут | Среднее арифметическое, $\bar{X}$ | Среднее квадратичное отклонение $\pm \sigma$ | Ошибка среднего арифметического $\pm m$ | Критерий достоверности $t_d$ | Отклонение от контроля, % |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|--|---|------------------------------|---------------------------|
| Контроль  | 1                                 | 360                               | 116,80                                       | 47,80                                   | —                            | —                         |
|   | 4                                 | 728                               | 106,29                                       | 43,38                                   | —                            | —                         |
|   | 7                                 | 158                               | 42,62  | 17,40                                   | —                            | —                         |
|   | 14                                | 927                               | 163,79                                       | 66,85                                   | —                            | —                         |
| Катан, $C = 0,00005$ %<br>(0,5 мг/л), КР = $40 \cdot 10^3$    | 1                                 | 373                               | 21,61  | 8,82                                    | -0,27                        | 3,6                       |
|   | 4                                 | 625                               | 77,90  | 31,79                                   | 1,92                         | 14,6                      |
|   | 7                                 | 177                               | 33,75  | 13,80                                   | -0,86                        | 12,0                      |
|   | 14                                | 883                               | 78,40  | 32,00                                   | 0,59                         | 4,7                       |
| Контроль  | 1                                 | 343                               | 20,66  | 8,43                                    | —                            | —                         |
|   | 4                                 | 500                               | 97,36  | 39,74                                   | —                            | —                         |
|   | 7                                 | 263                               | 45,02  | 18,38                                   | —                            | —                         |
|   | 14                                | 750                               | 116,02                                       | 47,35                                   | —                            | —                         |
| ЭОК, $C = 0,002$ %<br>(20 мг/л), КР = 1000                    | 1                                 | 333                               | 93,52  | 38,17                                   | 0,26                         | 2,9                       |
|   | 4                                 | 540                               | 93,81  | 38,29                                   | -0,72                        | 8,0                       |
|   | 7                                 | 243                               | 67,13  | 27,40                                   | 0,61                         | 7,6                       |
|   | 14                                | 617                               | 149,89                                       | 61,18                                   | 1,72                         | 17,7                      |
| Контроль  | 1                                 | 343                               | 36,70  | 14,98                                   | —                            | —                         |
|   | 4                                 | 500                               | 109,54                                       | 44,71                                   | —                            | —                         |
|   | 7                                 | 263                               | 124,85                                       | 50,96                                   | —                            | —                         |
|   | 14                                | 750                               | 144,64                                       | 59,03                                   | —                            | —                         |
| К = 12, $C = 0,000094$ %<br>(0,94 мг/л), КР = $16 \cdot 10^3$ | 1                                 | 353                               | 123,88                                       | 50,56                                   | 0,19                         | 2,9                       |
|   | 4                                 | 463                               | 131,10                                       | 53,51                                   | 0,53                         | 7,4                       |
|   | 7                                 | 170                               | 65,42  | 26,70                                   | 1,62                         | 35,4                      |
|   | 14                                | 747                               | 150,55                                       | 61,42                                   | 0,03                         | 0,4                       |

Таблица 3

## Шкала оценки токсичности тестируемой воды с использованием водорослей

| Баллы | Отклонение численности водорослевых клеток в тестируемой воде по сравнению с контролем | Продолжительность наблюдений, сут | Степень токсичности тестируемой воды   |
|-------|--|-----------------------------------|--|
| 1     | Недостаточно ( $t_d < t_{st}$ )<br>или 10...15 %                                       | 14                                | Не оказывает токсического действия     |
| 2     | Достаточно ( $t_d > t_{st}$ )<br>или 15...30 %   | < 14                              | Обладает слабо выраженной токсичностью |
| 3     | Достаточно ( $t_d > t_{st}$ )<br>или 15...30 %   | 7                                 | Слаботоксична                          |
| 4     | То же или 30...50 %<br>Достаточно ( $t_d > t_{st}$ )<br>или 50...70 %                  | < 7<br>< 4                        | Высокотоксична                         |
| 5     | Достаточно ( $t_d > t_{st}$ )<br>или 50...80 %<br>и более                              | 1                                 | Гипертоксична                          |

действия воды, содержащей антисептики, на водоросли. Критерий Стьюдента  $t_{st} = 2,23$  при уровне значимости 0,05 и степени свободы  $n_k + n_m - 2$ .

Испытания водных растворов антисептических препаратов позволили определить концентрации, при которых они не оказывают токсического действия на водоросли *Scenedesmus* в течение 14 сут. Для Катана, ЭОК и К-12 они составили соответственно 0,50; 20,00 и 0,94 мг/л.

Полученные данные можно использовать при составлении экологического паспорта антисептиков, санитарно-гигиенической оценки технологических процессов антисептирования, а также для определения уровня опасного загрязнения водоемов в аварийных ситуациях на участках химической защитной обработки древесины.

Поступила 10 марта 1993 г.