

МЕТОДЫ И ПРИБОРЫ КОНТРОЛЯ И ДИАГНОСТИКИ МАТЕРИАЛОВ, ИЗДЕЛИЙ, ВЕЩЕСТВ И ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ



УДК 504.064.38

DOI:10.30724/1998-9903-2024-26-1-38-50

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА В СРЕДЕ НА ИНДЕКСЫ ТОКСИЧНОСТИ, ПОЛУЧАЕМЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Манахова П.В.¹, Смирнов А.В.¹, Семенова М.И.¹, Ковалевская А.С.¹

¹Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»
им. В.И. Ульянова (Ленина), г. Санкт-Петербург, Россия
caterpillar921@gmail.com

Резюме: АКТУАЛЬНОСТЬ исследования исходит из понимания необходимости постоянного развития токсикологического анализа. Так как в токсикологическом анализе используются простейшие организмы в качестве биотестов, реакции которых на присутствие тех или иных загрязнителей всегда будут различаться, то единственным способом оценки полезности биотеста, как инструмента, является изучение его поведения в условиях конкретных задач. Биотесты различаются по своим метаболическим свойствам, в частности по способам получения энергии от наличия молекулярного кислорода в среде. Однако, предполагается, что наличие разных концентраций кислорода оказывает влияние на поведение простейших, что, в свою очередь, может влиять на результаты токсикологического анализа. Ранее такое влияние не было изучено. **ЦЕЛЬ.** Изучение влияния растворенного кислорода на индексы токсичности, получаемые при использовании биотестов бактерий *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers и инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg, **МЕТОДЫ.** Получение индексов токсичности по биолюминесцентной реакции бактерий и хемотаксической реакции инфузорий при условии различных концентраций растворенного кислорода в исследуемых средах, в качестве которых используется дистиллированная вода и вода марки Водаqua. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** При увеличении концентрации растворенного кислорода в среде увеличивается биолюминесценция бактерий, следовательно, уменьшается индекс токсичности. Влияние на инфузории не наблюдается. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Можно сделать вывод, что растворенный кислород не влияет на биотестовый анализ с применением инфузорий. При использовании в качестве тест-организма бактерий возникает погрешность в индексе токсичности.

Ключевые слова: растворенный кислород; токсичность; биотестирование; *Escherichia coli*; *Paramecium caudatum*.

Для цитирования: Манахова П.В., Смирнов А.В., Семенова М.И., Ковалевская А.С. Влияние растворенного кислорода в среде на индексы токсичности, получаемые различными методами биотестирования // Известия высших учебных заведений. ПРОБЛЕМЫ ЭНЕРГЕТИКИ. 2024. Т.26. № 1. С. 38-50. doi:10.30724/1998-9903-2024-26-1-38-50.

INFLUENCE OF DISSOLVED OXYGEN IN THE ENVIRONMENT ON TOXICITY INDICES OBTAINED BY VARIOUS BIO-TESTING METHODS

Manakhova¹ PM., Smirnov¹ AV., Semenova¹ MI., Kovalevskaya¹ AS.

¹Saint-Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint-Petersburg, Russia

caterpillar921@gmail.com

Abstract: *RELEVANCE* of the study comes from the understanding of the necessity of continuous development of toxicological analysis. Since The simplest organisms are used in toxicological analysis as bioindicators, the reactions of which to the presence of certain pollutants will always differ, the only way to assess the usefulness of a bioindicators as a tool is to study its behavior under specific tasks. Bioindicators differ in their metabolic properties, in particular, in the ways of obtaining energy from the presence of molecular oxygen in the environment. However, it is assumed that the presence of different concentrations of oxygen in the environment affects the behavior of the simplest organisms, which, in its turn, can affect the results of toxicological analysis. Previously, this effect has not been studied. *THE PURPOSE.* The research of the effect of dissolved oxygen on toxicity indices obtained using of bacteria *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers and ciliates *Paramecium caudatum* Ehrenberg, *METHODS.* Obtaining indices of toxicity is given with different concentrations of dissolved oxygen in the environment, which are distilled water and Bonaqua brand water, by the bioluminescent reaction of bacteria and chemotactic reaction of ciliates. *RESULTS.* With an increase in the concentration of dissolved oxygen in the environment, the bioluminescence of bacteria increases, therefore, the toxicity index decreases. No effect on ciliates is observed. *CONCLUSION.* It can be concluded that dissolved oxygen does not affect the biotest analysis using ciliates. When using bacteria as a test organism, an error occurs in the toxicity index.

Keywords: dissolved oxygen; toxicity; bioassay; *Escherichia coli*; *Paramecium caudatum*.

For citation: Manakhova PM., Smirnov AV., Semenova MI., Kovalevskaya AS. Influence of dissolved oxygen in the environment on toxicity indices obtained by various bio-testing methods. Power engineering: research, equipment, technology. 2024; 26 (1): 38-50. doi:10.30724/1998-9903-2024-26-1-38-50.

Введение (Introduction)

Развития промышленности, на данный момент, просто невозможно без появления новых загрязнителей и образования отходов, которые могут быть потенциально опасны не только с точки зрения деградации природных систем, но и с точки зрения здоровья и жизни человека.

Достаточно остро вопрос негативного влияния стоит для энергетической сферы, что неоднократно отмечалось в разных работах [1-2]. Помимо появления новых загрязнителей, формирование отходов также является объектом существенной озабоченности. Стоит понимать, что, говоря об отходах производства и потребления, задача их минимизации касается не только сфер экологии и качества жизни человека, но и сфер экономики и энергетики, так как подавляющее большинство отходов в том или ином виде способны быть источниками полезного для производства сырья-так называемым вторичным сырьем [3].

Появление новых видов загрязнителей и их потенциальное вторичное использование невозможно без качественной оценки потенциальной опасности выбранных веществ. На данный момент существует целое множество различных методов и приборов контроля и определения количества вещества, что безусловно важно с точки зрения формирования нормативов и определения предельно допустимых концентраций, превышение которых способно вызывать негативные последствия для природных систем и человека. Однако, количественные методы не способны давать полной картины влияния нескольких веществ вместе и даже конкретного соединения. Для подобной оценки необходимо устанавливать интегральную характеристику загрязненности той или иной среды, что, на данный момент, возможно только за счет применения различных методов биоиндикации (или биотестирования) - использования живых тест-организмов и изучения их реакций в условиях присутствия загрязнителя или группы загрязнителей в конкретной среде.

Разработка аппаратных методов фиксации поведения живых тест-организмов является процессом динамичным, требующим постоянного развития, так как свойства разных тест-организмов позволяют получать разные картины опасности одного и того же вещества. Биоиндикация просто не может существовать без постоянного поиска новых тест-организмов, изучения их реакций и попыток нахождения новых методов регистрации

таких реакций. Поэтому, с точки зрения развития данного направления, единственным способом оценки полезности тест-организма, как инструмента, является изучение его поведения в условиях конкретных задач [4].

Литературный обзор (Literature Review)

В целях повышения эффективности, как с точки зрения финансовых затрат, так и со стороны получения данных максимально быстрым способом, методы биотестирования, в большинстве своем, основываются на регистрации различных ответных реакций у простейших. На данный момент в роли тест-организмов для получения картины токсичности среды используют различные представители простейших: инфузории, бактерии, рачки, микроводоросли и др.

Реакции тест-организмов на присутствие в среде потенциально опасных соединений имеют ситуативный характер, который, во многом, зависит от свойств самих простейших.

Говоря о свойствах тест-организмов, также называемых тест-объектами, стоит отметить, что одним из основных является свойство получать и производить энергию в условия наличия кислорода в среде обитания. Интерес к данному свойству основывается на понимании зависимости количества кислорода в среде от степени загрязненности среды.

Живые организмы делятся на аэробов, которые нуждаются в свободном молекулярном кислороде для синтеза энергии, анаэробов, получающих энергию при отсутствии доступа кислорода, и факультативных анаэробов, чьи энергетические циклы при отсутствии кислорода проходят по анаэробному пути. К последним в том числе относятся некоторые бактерии и простейшие, например, *Escherichia coli* (Migula) *Castellani and Chalmers* и *Paramecium caudatum* *Ehrenberg*, используемые в качестве тест-организмов при оценке токсичности широкого спектра химических веществ, природных и сточных вод, донных отложений, полимерных материалов и т.д. Поскольку данные тест-организмы, как и большинство организмов используемых в биотестовом анализе, являются обитателями водных сред, то, говоря о использовании ими молекулярного кислорода, подразумевается использование растворенного кислорода в среде [4-5].

Бактерии *E.coli* могут быть использованы в качестве тест-организма для определения токсичности большого ряда сред, материалов и соединений [6]. Тест-реакцией *E.coli* является биолюминесценция бактерий, обусловленная наличием в организме определенных ферментов и других белков [7]. При чем изменение биолюминесценции бактерий может быть вызвано наличием химических соединений. Вредные для жизни бактерий соединения будут подавлять показатели их биолюминесценции. Фиксирование данных изменений и легло в основу технического метода определения токсичности с помощью бактерий.

Однако в результате нестабильности показаний люминесценции, следовательно, и токсичности исследуемых проб многие лаборатории отказываются от использования *E.coli*. Вероятно, причиной этому может служить растворенный в воде кислород. Ряд исследований [8-9] показывает, что сокращение количества растворенного кислорода в среде приводит к подавлению экспрессии белков, ответственных за биолюминесценцию организмов, что в свою очередь снижает интенсивность биолюминесценции бактерий. Предположительно, это может повлиять на результаты токсикологических исследований. Таким образом, в зависимости от количества растворенного кислорода в пробе, может наблюдаться искажение получаемой картины токсичности. Однако прямых исследований зависимости индекса токсичности анализируемых проб от количества содержащегося в них растворенного кислорода ранее проведено не было.

Инфузории *P.caudatum* дышат растворенным в воде кислородом всей поверхностью тела. Согласно литературным источникам [10], в условиях пониженной температуры окружающей среды или снижении концентрации растворенного кислорода в воде клетки *P.caudatum* способны переходить на дыхание за счет гликолиза. Кроме того, простейшие выработали ряд механизмов, обеспечивающих выживание в анаэробных условиях [11]. Исходя из выше изложенного, пониженная концентрация растворенного кислорода, предположительно, не должна оказывать на клетки инфузорий негативного влияния. Однако до сегодняшнего дня зависимость индекса токсичности, рассчитанного в результате биотестового анализа с использованием *P.caudatum* в качестве тест-организма, от концентрации растворенного кислорода в водной среде не была изучена.

Таким образом, токсикологических исследований влияния количества растворенного кислорода в водной среде на тест-реакции *E.coli* и *P.caudatum* ранее проведено не было. Изучение данной зависимости стало целью работы. Результаты позволят оценить вклад растворенного кислорода в погрешность определения индекса токсичности методом биотестирования.

Материалы и методы (Materials and methods)

Объектом исследований стали тест-реакции бактерий *E.coli* и инфузорий *P.caudatum*.

На основании данных литературных источников, приведенных выше, были сформулированы следующие гипотезы:

- 1) Изменение концентрации растворенного кислорода в водной среде оказывает влияние на интенсивность биолюминесценции бактерий *E.coli*;
- 2) Изменение концентрации растворенного кислорода в водной среде не оказывает влияние на реакцию инфузорий *P.caudatum*.

Эксперимент включает в себя 3 основных этапа: аэрацию воды с последующим измерением концентрации в ней растворенного кислорода и регистрацией изменения тест-реакции тест-организмов.

Концентрация растворенного кислорода изменялась путем аэрации воды в течение 30 минут с отбором проб каждые 10 минут. Измерение массовой концентрации растворенного кислорода в воде осуществлялось амперометрическим методом, согласно РД 52.24.419-2019, по силе тока, протекающего в цепи электродной системы сенсора кислорода.

Известно, что концентрация растворенного кислорода напрямую зависит от давления и обратно зависит от температуры окружающей среды и минерализации воды [12]. Дистиллированная вода содержит максимально возможное количество растворенного кислорода, поэтому ее аэрация не приводит к изменению концентрации растворенного кислорода. Учитывая вышеизложенную информацию, в качестве исследуемой среды была использована минеральная вода марки *Bonaqua*. Выбор марки обусловлен несколькими причинами. Качественный и количественный состав воды строго ограничен, он приведен в таблице 1.

Таблица 1

Table 1

Состав минеральной воды Bonaqua
Composition of Bonaqua mineral water

Основной химический состав, мг/л			
Катионы:		Анионы:	
Натрий (Na^+)	100-200	Гидрокарбонаты (HCO_3^-)	250-400
Кальций (Ca^{2+})	25-70	Хлориды (Cl^-)	150-250
Магний (Mg^{2+})	10-50	Сульфаты (SO_4^{2-})	<30
Калий (K^+)	<5		
Общая минерализация: 500-1000 мг/л			
Общая жесткость 2-6 мг-экв/л			

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Химический состав *Bonaqua* практически идентичен составу раствора Лозина-Лозинского, который является оптимальной средой для культивирования *P.caudatum*. Состав раствора Лозина-Лозинского приведен в таблице 2.

Таблица 2

Table 2

Состав раствора Лозина-Лозинского
Composition of Lozin-Lozinsky solution

Основной химический состав, мг/л			
Катионы:		Анионы:	
Натрий (Na^+)	446	Гидрокарбонаты (HCO_3^-)	145
Кальций (Ca^{2+})	36	Хлориды (Cl^-)	715
Магний (Mg^{2+})	18	Сульфаты (SO_4^{2-})	71
Калий (K^+)	51		

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Для культивации *E.coli* используются различные среды [13], главные компоненты которых также содержатся в минеральной воде Bonaqua.

Кроме того, ранние исследования [14-15] показали, что *Bonaqua* не оказывает резко негативного воздействия на *P.caudatum*, что делает использование минеральной воды в биотестовом анализе приемлемым. Результаты исследования влияния *Bonaqua* на бактерий *E.coli* приведены в данной работе.

Регистрация изменения тест-реакций *E.coli* и *P.caudatum* проводилась с помощью биотестового анализа, согласно ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96 16.2:2.2.1-96 и РД 52.24.419-2019 для бактерий, ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 для инфузорий.

Метод биотестирования с использованием Escherichia coli. Метод биотестирования - метод интегральной оценки суммарной токсичности среды на основании биологической реакции живых организмов.

Бактерии *E.coli* являются представителем типичных непатогенных бактерий. Средой обитания является желудочно-кишечный тракт людей и высших животных. Размером $0,40,8 \times 1-3$ мкм, объём клетки составляет около $0,6-0,7$ мкм³. Простейшие склонны к передвижению, перемещение осуществляют посредством жгутиков [16]. В рамках данного исследования был использован биосенсор «Эколюм», в состав которого входит генно-инженерный люминесцентный штамм *E.coli* [17].

Метод биотестирования с использованием биосенсора «Эколюм» основан на способности бактерий свягиваться. По уменьшению интенсивности биолюминесценции определяется показатель токсичности. Более того, согласно [17], отмечается наличие хемотаксиса. Некоторые химические соединения будут являться аттрактантами-веществами заведомо привлекательными для простейших. Наилучшими аттрактантами являются органические вещества – сахар, аминокислоты.

Интенсивность биолюминесценции регистрировалась прибором экологического контроля «Биотокс-10М» в соответствии с методическими рекомендациями МР № 01.018-07. Прибор автоматически высчитывает токсичность Т пробы по формуле (1):

$$T = \frac{(X_{K1} - X_{П1})}{X_{K1}} \cdot 100\% \quad (1)$$

где X_{K1} – уровень свечения в контрольной пробе; $X_{П1}$ - уровень свечения в опытной пробе.

На основании значения индекса токсичности все пробы можно разделить на 3 группы:

- 1) Допустимая степень токсичности образца ($T < 20$)
- 2) Образец токсичен ($20 \leq T < 50$)
- 3) Высокая токсичность образца ($T \geq 50$)

Метод биотестирования с использованием Paramecium caudatum. Для оценки реакции *P.caudatum* на изменение концентрации растворенного кислорода в воде был применен метод биотестирования с применением прибора серии «Биотестер». Метод основан на способности инфузорий двигаться по направлению к аттрактантам и от репеллентов (реакция хемотаксиса). Кроме того, *P.caudatum* – эукариотические организмы, как большинство организмов на планете, поэтому их реакции могут быть сопоставимы с цитологическим ответами более сложно организованных животных.

Хемотаксическая реакция реализуется при условии наличия стабильного во времени градиента концентраций химических веществ. Такой градиент создается путем насаивания исследуемой жидкости на суспензию тест-организмов, смешанную с загустителем (поливиниловым спиртом). Таким образом, в кювете образуется две зоны, разделенные границей раздела. По истечении 30 минут в зависимости от токсичности исследуемой пробы возможно 3 варианта распределения тест-организмов в кювете. Если исследуемая проба не содержит токсические вещества, клетки мигрируют в верхние слои жидкости. Если исследуемая проба умеренной степени токсичности, клетки равномерно распределяются по кювете. В случае если исследуемая проба сильно токсичная, клетки остаются в нижних слоях кюветы.

Согласно методике ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98, индекс токсичности пробы рассчитывается, как отношение числа клеток в контрольной и исследуемой пробах (2):

$$T = \frac{|I_{ср.к.} - I_{ср.а.}|}{I_{ср.к.}} \cdot K \quad (2)$$

где $I_{ср.к.}$, $I_{ср.а.}$ – средние показания прибора для контрольных и анализируемых проб соответственно, K - коэффициент разбавления пробы.

На основании значения индекса токсичности все пробы можно разделить на 3 группы:

- 1) Допустимая степень токсичности ($0,00 < T \leq 0,40$)
- 2) Умеренная степень токсичности ($0,40 < T \leq 0,70$)
- 3) Высокая степень токсичности ($T > 0,70$)

Обсуждение результатов (Discussing the results)

Результаты исследования индекса токсичности неаэрированной минеральной воды Bonaqua в пробах с бактериями *Escherichia coli*. Чтобы оценить влияние минеральной воды Bonaqua на бактерии *E.coli* и нивелировать связанную с этим влиянием погрешность, был проведен ряд экспериментов, где в качестве контрольной среды была использована дистиллированная вода, а в качестве анализируемой среды – неаэрированная Bonaqua.

Концентрация растворенного кислорода в контрольной пробе составила $9,03 \pm 0,1$ мг/л, а в Bonaqua – $8,56 \pm 0,1$ мг/л. Среднее значение токсичности составила $-64,4 \pm 1,0$. Результаты исследования приведены на рис.1. Здесь и далее погрешность индекса токсичности рассчитывалась методом переноса погрешностей.

Из диаграммы видно, что токсичность Bonaqua отрицательная, что можно интерпретировать, как факт о том, что исследуемая среда заведомо более благоприятная, чем сравниваемый с ней дистиллят.

Таким образом, можно сделать вывод, что Bonaqua не оказывает негативного влияния на бактерий.

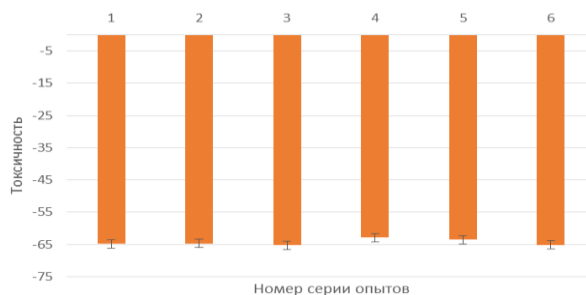


Рис. 1. Усредненные значения токсичности Bonaqua (биосенсор «Эколюм») Fig. 1. Average toxicity of Bonaqua (“Ecolum” biosensor)

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author

Результаты исследования индекса токсичности аэрированной минеральной воды Bonaqua в пробах с бактериями *Escherichia coli*. На этом этапе измерялась токсичность проб, где в качестве исследуемой среды была взята аэрированная Bonaqua, а в качестве контрольной пробы – неаэрированная Bonaqua.

На рисунке 2 представлены результаты исследования токсичности проб с анализируемой средой на основе Bonaqua, проаэрированной в течение 10 минут. Концентрация кислорода в контрольной пробе составила $7,82 \pm 0,1$ мг/л, в опытной пробе – $8,01 \pm 0,1$ мг/л. Среднее значение токсичности составило $-22,7 \pm 1,1$.

На рисунке 3 представлены результаты исследования токсичности проб с анализируемой средой Bonaqua, проаэрированной в течение 20 минут. Концентрация кислорода в контрольной пробе составила $7,82 \pm 0,1$ мг/л, в опытной пробе – $8,56 \pm 0,1$ мг/л. Среднее значение токсичности составило $-55,1 \pm 1,6$.

На рисунке 4 представлены результаты исследования токсичности проб с анализируемой средой Bonaqua, проаэрированной в течение 30 минут. Концентрация кислорода в контрольной пробе составила $7,82 \pm 0,1$ мг/л, в опытной пробе – $9,24 \pm 0,1$ мг/л. Среднее значение токсичности составило $-88,1 \pm 2,0$.

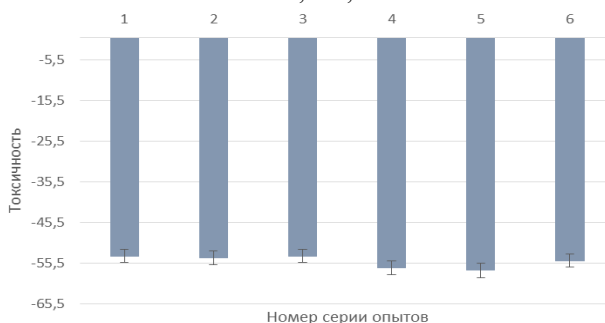


Рис. 2. Усредненные значения токсичности растворенного кислорода при времени аэрирования Bonaqua 10 минут (биосенсор «Эколюм») Fig. 2. Average toxicity of dissolved oxygen with Bonaqua aeration time of 10 minutes (“Ecolum” biosensor)

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

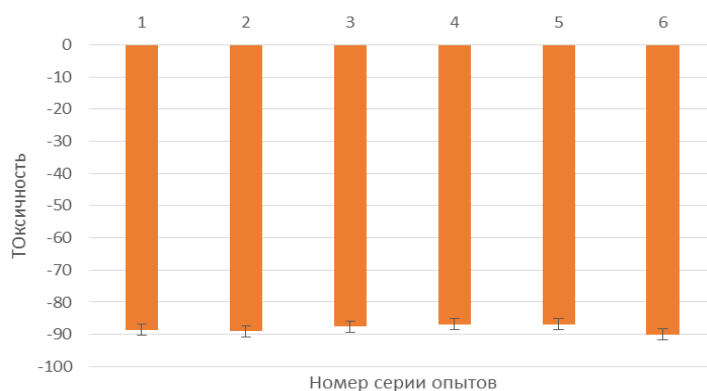


Рис. 3. Усредненные значения токсичности растворенного кислорода при времени аэрирования Bonaqua 20 минут (биосенсор «Эколюм»)

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

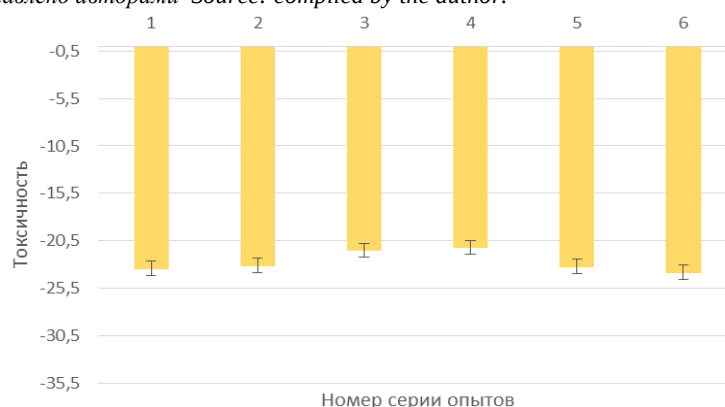


Рис. 4. Усредненные значения токсичности растворенного кислорода при времени аэрирования Bonaqua 30 минут (биосенсор «Эколюм»)

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Полученные в результате исследования средние значения индексов токсичности сведены в таблицу 3.

Таблица 3

Table 3

Результаты исследования индекса токсичности аэрированной минеральной воды Bonaqua (тест-организм - *E.coli*)

Toxicity index results of aerated mineral water Bonaqua (test organism - *E.coli*)

Время аэрации, мин	Концентрация растворенного кислорода, мг/л	Среднее значение индекса токсичности
10	8,01±0,1	-22,7±1,1
20	8,56±0,1	-55,1±1,6
30	9,24±0,1	-88,1±2,0

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Как видно, при увеличении концентрации растворенного кислорода в водной среде уменьшается индекс токсичности проб, следовательно, увеличивается биолуминесценция биосенсора «Эколюм».

На основании экспериментальных данных был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Все расчеты были произведены с помощью программы Microsoft Excel.

Согласно нулевой гипотезе, концентрация растворенного кислорода в водной среде не влияет на биолуминесценцию бактерий *E.coli*. Альтернативная гипотеза, напротив, гласит, что концентрация растворенного кислорода в водной среде влияет на биолуминесценцию бактерий. В таблице 4 приведены результаты расчета F-критерия, Р-значения и критического значения F-критерия, соответствующее уровню значимости $\alpha=0,05$.

Таблица 4

Table 4

Результаты расчета F-критерия, P-значения и критического значения F-критерия
Results of calculation of F-criterion, P-value and critical value of F-criterion

F-критерий	310,38
P-значение	$1,26 \cdot 10^{-55}$
F критическое	3,05

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Поскольку P-значение гораздо меньше α , и F-критерий больше критического значения, нулевая гипотеза статистически ненадежна. С вероятностью 95% концентрация растворенного кислорода является значимым фактором, оказывающим влияние на биолюминесценцию бактерий *E.coli*.

Результаты исследования индекса токсичности аэрированной минеральной воды Bonaqua в пробах с инфузориями *Paramecium caudatum*. Сперва был проведен ряд экспериментов, где в качестве контрольной среды была использована неаэрированная Bonaqua, а в качестве анализируемой среды – аэрированная Bonaqua. Полученные средние значения индексов токсичности приведены в таблице 5.

Таблица 5

Table 5

Результаты исследования влияния концентрации растворенного кислорода на индекс токсичности относительно контроля на основе неаэрированной Bonaqua (тест-организм - *P.caudatum*)
Results of the study of the effect of dissolved oxygen concentration on the toxicity index relative to the control based on unaerated Bonaqua (test organism - *P.caudatum*)

Время аэрации, мин	Концентрация растворенного кислорода, мг/л	Среднее значение индекса токсичности
10	$8,82 \pm 0,10$	$0,0072 \pm 0,0001$
20	$9,52 \pm 0,10$	$0,0073 \pm 0,0001$
30	$10,27 \pm 0,20$	$0,0071 \pm 0,0001$

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Как видно из экспериментальных данных, изменение концентрации растворенного кислорода в водной среде не приводит к изменению индекса токсичности. Однако, согласно методике [3], нормы измерений индекса токсичности установлены с точностью до 2 знаков после запятой. В связи с этим был проведен ряд опытов, где в качестве контрольной среды использовался раствор Лозина-Лозинского. Результаты исследований сведены в таблицу 6.

Таблица 6

Table 6

Результаты исследования влияния концентрации растворенного кислорода на индекс токсичности относительно контроля на основе раствора Лозина-Лозинского (тест-организм - *P.caudatum*)
Results of the study of the effect of dissolved oxygen concentration on the toxicity index relative to the control based on Lozin-Lozinsky solution (test organism - *P.caudatum*)

Время аэрации, мин	Концентрация растворенного кислорода, мг/л	Среднее значение индекса токсичности
10	$8,82 \pm 0,10$	$0,07 \pm 0,01$
20	$9,52 \pm 0,10$	$0,06 \pm 0,01$
30	$10,27 \pm 0,20$	$0,08 \pm 0,01$

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Необходимо отметить, что независимо от времени аэрации индекс токсичности не превышает граничное значение 0,40.

Чтобы оценить влияние концентрации растворенного кислорода на реакцию инфузорий *P.caudatum* был рассчитан критерий Стьюдента.

Согласно нулевой гипотезе, количество растворенного кислорода в водной среде не оказывает влияния на реакцию *P.caudatum*. Тогда альтернативная гипотеза предполагает обратное: количество растворенного кислорода в водной среде влияет на реакцию *P.caudatum*.

Средние значения каждой выборки находятся по формуле (3):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (3)$$

где N – количество испытаний; x_i – значения физической величины (концентрации растворенного кислорода в неаэрированных и аэрированных пробах).

Среднеквадратическое отклонение оценивается по формуле (4):

$$\sigma^2\{x\} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (4)$$

Критерий Стьюдента рассчитывается по формуле (5):

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{(N_x - 1)\sigma^2\{x\} + (N_y - 1)\sigma^2\{y\}}} \cdot \sqrt{\frac{N_x N_y (N_x + N_y - 2)}{N_x + N_y}} \quad (5)$$

Число степеней свободы находится по формуле (6):

$$m = N_x + N_y - 2 \quad (6)$$

Результаты решения формул (3)-(6) сведены в таблицу 7.

Таблица 7
Table 7

Результаты расчета среднего значения, СКО и критерия оценки
Results of calculation of mean, RMS and evaluation criterion

	$\bar{x}$	σ^2	t	m
Неаэрированная Вода	0,073	0,00003	0,58	22
Аэрированная Вода	0,075	0,00006		

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

При уровне значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы $m=22$ критерий Стьюдента равен $t_{0,005; 22} = 2,07$.

$t_{0,005; 22} > t$, следовательно, нулевая гипотеза о том, что количество растворенного кислорода в водной среде не оказывает влияния на реакцию *P. caudatum*, подтверждается.

Результаты исследования связи между временем аэрации и концентрацией растворенного кислорода в водной среде. Коэффициент Пирсона показывает меру связи между временем аэрации и концентрацией растворенного кислорода в водной среде и рассчитывается по формуле (7):

$$r_{xy} = \frac{\overline{xy} - \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sigma_x \cdot \sigma_y} \quad (7)$$

где σ_x и σ_y – стандартное отклонение выборок x и y (время аэрации и концентрация растворенного кислорода, соответственно).

Результаты промежуточных расчетов, необходимых для вычисления коэффициента Пирсона, сведены в таблицу 8.

Таблица 8
Table 8

Результаты промежуточных расчетов для вычисления коэффициента Пирсона
Results of intermediate calculations for calculating the Pearson coefficient

$\bar{x}$	20,00
$\bar{y}$	9,54
$\bar{x} \cdot \bar{y}$	190,73
$\overline{xy}$	195,57
σ_x	10,00
σ_y	0,73

*Источник: Составлено авторами Source: compiled by the author.

Связи между признаками могут быть слабыми и сильными (тесными). Их критерии оцениваются по шкале Чеддока:

- $0.1 < r_{xy} < 0.3$: слабая;
- $0.3 < r_{xy} < 0.5$: умеренная;
- $0.5 < r_{xy} < 0.7$: заметная;
- $0.7 < r_{xy} < 0.9$: высокая;
- $0.9 < r_{xy} < 1$: весьма высокая;

Таким образом, коэффициент Пирсона равен $r_{xy}=0,67$, следовательно, мера связи между временем аэрации и количеством растворенного кислорода в водной среде сильная.

Исходя из полученных данных в ходе экспериментов можно сделать следующие выводы:

- Количество растворенного кислорода в водной среде влияет на тест-реакцию бактерий *E.coli*. При увеличении концентрации растворенного кислорода в воде увеличивается биолуминесценция бактерий, следовательно, уменьшается индекс токсичности.

- Растворенный кислород не оказывает влияния на инфузорий *P.caudatum*: индекс токсичности остается неизменным независимо от времени аэрации.

Таким образом, можно сделать заключение, что растворенный кислород не вносит ошибку в биотестовый анализ с применением инфузорий. При использовании в качестве тест-организма бактерий *E.coli* возникает погрешность, связанная с влиянием растворенного кислорода

Заключение (Conclusions)

Биотестирование, на данный момент, является единственным способом получения информации о потенциальной опасности среды целиком. Условной единицей, отображающей опасность среды, является индекс токсичности, получение которого возможно за счет регистрации различных реакций тест-организмов на присутствие тех или иных загрязнителей в исследуемой среде. В качестве тест-организмов, в основном, выступают простейшие, чьи реакции могут носить ситуативный характер, зависящий от взаимодействия организма с конкретным веществом. Таким образом для получения максимально эффективной картины токсичности среды необходимо находить факторы, которые могут эту картину исказить.

В ходе исследовательской работы была выдвинута гипотеза о влиянии растворенного кислорода на получаемую картину токсичности, посредством анализа реакций бактерий *E.coli* и инфузорий *P.caudatum*.

Метод биотестирования с применением *E.coli* в качестве тест-организма основан на измерении биолуминесценции бактерий. Следовательно, любые колебания показаний биолуминесценции приводят к изменению результата расчета индекса токсичности исследуемой пробы. По этой причине важно исключить из эксперимента все внешние факторы, влияющие на биолуминесценцию *E.coli* и способные исказить результаты биотестового анализа. На сегодняшний день биотестирование с использованием бактерий *E.coli* почти не применяется лабораториями из-за нерелевантности получаемых результатов.

Проведенное исследование выявило один из факторов, влияющих на стабильность показаний биолуминесценции – концентрация растворенного кислорода в водной среде, которая в свою очередь зависит от температуры окружающей среды, минерализации воды и давления. Необходимо отметить, что концентрация растворенного кислорода может быть не единственной причиной нестабильности значений биолуминесценции бактерий *E.coli*. Дальнейшие исследования помогут установить полный перечень факторов, определяющих адекватность результатов биотестового анализа.

Полученные в рамках проведенного исследования результаты свидетельствуют о том, что существующая методика биотестирования с применением *E.coli* требует модернизации. Фиксация концентрации растворенного кислорода на время проведения биотестового анализа позволит лабораториям эффективно применять данный метод на практике. Разработка методов фиксации концентрации растворенного кислорода в водной среде на время проведения биотестирования требует проведения ряда отдельных экспериментов.

Для инфузорий *P.caudatum* аналогичной зависимости выявлено не было.

Литература

1. Агишев, Р.Р., Гильфанов К.Х. Возможности экологического мониторинга атмосферного воздуха вокруг предприятий теплоэнергетики методами лазерного зондирования// «Известия высших учебных заведений. Проблемы энергетики». 2016. № 3-4. С. 95-96.
2. Липантьев Р.Е., Тутубалина В.П. Влияние сжигания сернистых мазутов на окружающую

- среду // Известия высших учебных заведений. Проблемы энергетики. 2017. №19(5-6). С. 144-148.
3. Зверева Э.Р., Макарова А.О., Бахтиярова Ю.В., Королев В.И., Ильин Н.П., Туранов А.Н., Зуева О.С. Вторичное использование малосернистых нефтяных остатков в качестве основы для котельного и судового топлива // Известия высших учебных заведений. Проблемы энергетики. 2022. №24(1)ю С.16-28.
4. Олькова А.С. Процедура выбора метода биотестирования в условиях разных видов загрязнения//Трансформация экосистем. 2022. №5(3). С. 63-75.
5. Олькова А.С. Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов: дис. док. био. наук. – Киров.: 2020. – 359 с.
6. E.V. Bulychева, E.I. Korotkova, O.A. Voronova, A.A. Kustova, E.V. Petrova. Fluorescence Analysis of E.coli Bacteria in Water// Procedia Chemistry. 2014. №10, P. 179-183.
7. Bioluminescent nanopaper for rapid screening of toxic substances / J. Liu, E. Morales-Narváez, J. Orozco [et al.] // Nano Research. 2018. № 11(1). P. 114-125.
8. Alvaro R. Lara, Karim E. Jaén, Olusegun Folarin and others. Effect of the oxygen transfer rate on oxygen-limited production of plasmid DNA by Escherichia coli // Biochemical Engineering Journal. 2019. doi: 10.1016/j.bej.2019.107303
9. Baez, A., Majdalani, N. & Shiloach, J. Production of recombinant protein by a novel oxygen-induced system in Escherichia coli. // Microbial Cell Factories. 2014. №13. doi: 10.1186/1475-2859-13-50
10. Бызова Ю.Б. Дыхание почвенных беспозвоночных. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007, 328 с.
11. Черемных Е.Г., Е.И. Симбирева. Инфузории пробуют пищу// Химия и жизнь, 2009, №1. С. 28-34.
12. Толстой М.Ю., Шишелова Т.И., Шестов Р.А. Исследования растворимости кислорода // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. №1(12). С. 86-90.
13. Юшин Ю.В., Подкопайло Р.В., Петрова Д.А., и др. Обзор питательных сред, используемых для культивации рекомбинантной Escherichia coli. // Медицина экстремальных ситуаций. 2019. №3, С. 444-453.
14. Манахова П.В., Кустов Т.В., Семенова М.И., Максимишина Ю.С. Особенности этапов пробоподготовки для исследования полимерных компонентов отработанных солнечных панелей методом биотестирования // Сборник материалов X Научно-практической конференции с международным участием «Наука настоящего и будущего» для студентов, аспирантов и молодых ученых. СПб, том 2, 2022, С. 90-94
15. Семенова М.И., Смирнов А.В., Веженкова И.В., Кустов Т.В., Ковалевская А.С. Особенности пробоподготовки водных вытяжек компонентов солнечных панелей в целях биотестирования// Известия высших учебных заведений. Проблемы энергетики. 2022. №24(3). С. 211-220.
16. Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Скольжение бактерий: способ пассивного распространения без использования жгутиков и пилей(обзор) // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2018. №4. С. 263-274. doi:10.17072/1994-9952-2021-4-263-274
17. H.N. Mattingly, K. Kamino, B.B. Machta, T. Emonet. E. coli chemotaxis is information-limited// Nature physics. 2021. № 17. P. 1426–1431.

Авторы публикации

Манахова Полина Васильевна – студентка, Санкт-Петербургского электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия. ORCID*: <http://orcid.org/0000-0001-7773-5943>. caterpillar921@gmail.com.

Смирнов Андрей Владимирович – аспирант, Санкт-Петербургского электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина). ORCID*: <https://orcid.org/0000-0001-6515-3460>. andreismirnov5000@gmail.com

Семенова Маргарита Игоревна – ассистент кафедры Инженерной защиты окружающей среды Санкт-Петербургского электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия.. ORCID*: <http://orcid.org/0000-0001-6644-7663>. Smi-2409@yandex.ru.

Ковалевская Алла Станиславовна – канд. техн. наук, доцент кафедры Инженерной защиты окружающей среды Санкт-Петербургского электротехнического университета

«ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия. ORCID*: <http://orcid.org/0000-0001-9943-3508>. lelikat@yandex.ru.

References

1. R.R. Agishev, K.Kh. Gil'fanov. Vozmozhnosti ekologicheskogo monitoringa atmosfernogo vozdukhа vokrug predpriyatii teploenergetiki metodami lazernogo zondirovaniya// «Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Problemy energetiki». 2016. № 3-4. S. 95-96.
2. Lipant'ev R.E., Tutubalina V.P. Vliyanie szhiganiya sernistykh mazutov na okruzhayushchuyu sredu// «Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Problemy energetiki». 2017. № 19(5-6). S. 144-148.
3. Zvereva E.R., Makarova A.O., Bakhtiyarova Yu.V., Korolev V.I., Il'in N.P., Turanov A.N., Zueva O.S. Vtorichnoe ispol'zovanie malosernistykh neftnykh ostatkov v kachestve osnovy dlya kotel'nogo i sudovogo topliva// «Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Problemy energetiki». 2022. № 24(1). S. 16-28.
4. Ol'kova A.S.. Procedura vibora metoda biotestirovaniya v usloviyakh raznih vidov zagryazneniya// Transformaciya ecosystem. 2022. №5(3). S. 63-75.
5. Ol'kova A.S. Razrabotka strategii biotestirovaniya vodnykh sred s uchetom mnogofaktornosti otvetnykh reaktsii test-organizmov: dis. dok. bio. nauk. – Kirov.: 2020. – 359 s.
6. E.V. Bulycheva, E.I. Korotkova, O.A. Voronova, A.A. Kustova, E.V. Petrova. Fluorescence Analysis of E.coli Bacteria in Water// Procedia Chemistry. 2014. №10, P. 179-183.
7. Bioluminescent nanopaper for rapid screening of toxic substances / J. Liu, E. Morales-Narváez, J. Orozco [et al.] // Nano Research. 2018. № 11(1). P. 114-125.
8. Alvaro R. Lara, Karim E. Jaén, Olusegun Folarin and others. Effect of the oxygen transfer rate on oxygen-limited production of plasmid DNA by Escherichia coli // Biochemical Engineering Journal. 2019. doi: 10.1016/j.bej.2019.107303
9. Baez, A., Majdalani, N. & Shiloach, J. Production of recombinant protein by a novel oxygen-induced system in Escherichia coli. // Microbial Cell Factories. 2014. №13. doi: 10.1186/1475-2859-13-50
10. Byzova Yu.B. Dykhanie pochvennykh bespozvonochnykh. M.: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2007, 328 s.
11. Cheremnih E.G., Simbireva E.I. Infuzorii probyut pischu// Hiimiya I schin'. 2009. №1(12). S. 28-34.
12. Tolstoi M.U., Shishelova T.I., Shestov R.A. Isledovaniya- rastvorimosti kisloroda// «Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Prikladnaya himiya I biotekhnologiya». 2022. № 1(12). S. 86-90.
13. Yushin Yu.V., Podkopailo R.V., Petrova D.A., i dr. Obzor pitatel'nykh sred, ispol'zuemykh dlya kul'tivatsii rekombinantnoi Escherichia coli// Meditsina ekstremal'nykh situatsii. 2019. №3, S. 444-453.
14. Manakhova P.V., Kustov T.V., Semenova M.I., Maksimishina Yu.S. Osobennosti etapov probopodgotovki dlya issledovaniya polimernykh komponentov otrabotannykh solnechnykh panelei metodom biotestirovaniya// Sbornik materialov Kh Nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Nauka nastoyashchego i budushchego» dlya studentov, aspirantov i molodykh uchenykh. SPb, tom 2, 2022, S. 90-94
15. Semenova M.I., Smirnov A.V., Vezhenkova I.V., Kustov T.V., Kovalevskaya A.S. Osobennosti probopodgotovki vodnykh vytyazhek komponentov solnechnykh panelei v tselyakh biotestirovaniya// «Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Problemy energetiki». 2022. №24(3). S. 211-220.
16. Ciganov I.V., Nestirova L.Yu., Tkachenko A.G. Skolschenie bakterii: sposob passivnogo rasprostraneniya bez ispol'zovaniya zhguticov I pilei(obzor) // Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologiya. 2018. №4. S 263-274. doi:10.17072/1994-9952-2021-4-263-274
17. H.H. Mattingly, K. Kamino, B.B. Machta, T. Emonet. E. coli chemotaxis is information-limited// Nature physics. 2021. № 17. P. 1426–1431.

Authors of the publication

Polina V. Manakhova – Saint-Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint-Petersburg, Russia. ORCID*: <http://orcid.org/0000-0001-7773-5943>. caterpillar921@gmail.com.

Andrey V. Smirnov - Saint-Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint-Petersburg, Russia. ORCID*: <https://orcid.org/0000-0001-6515-3460>. andreismirnov5000@gmail.com

Margarita I. Semenova – Saint-Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint-

© Манахова П.В., Смирнов А.В., Семенова М.И., Ковалевская А.С.

Petersburg, Russia. ORCID*: <http://orcid.org/0000-0001-6644-7663>. Smi-2409@yandex.ru.

Alla S. Kovalevskaya – Saint-Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint-Petersburg, Russia. ORCID*: <http://orcid.org/0000-0001-9943-3508>. lellikat@yandex.ru.

Шифр научной специальности: 2.2.8. Методы и приборы контроля и диагностики материалов, изделий, веществ и природной среды.

Получено

08.11.2023 г.

Отредактировано

10.01.2024 г.

Принято

01.02.2024 г.