

Совершенствование тетразольно-топографического метода биотестирования с использованием цианобактерий

© 2017. А. И. Фокина¹, к. б. н., доцент, Л. И. Домрачева^{2,3}, д. б. н., профессор, Ю. Н. Зыкова², к. б. н., доцент, С. Г. Скугорева^{1,2,3}, к. б. н., доцент, магистрант, н. с., Е. И. Лялина¹, ассистент, Л. В. Трефилова², к. б. н., доцент,

¹ Вятский государственный университет, 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36,

² Вятская государственная сельскохозяйственная академия, 610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, 133,

³ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28, e-mail: annushka-fokina@mail.ru, dli-alga@mail.ru

Тетразольно-топографический метод определения дегидрогеназной активности почвенных цианобактерий (ЦБ) сравнительно недавно используется в качестве метода исследования токсичности объектов окружающей среды, загрязнённых различными поллютантами. Методика заключается в том, что гомогенизированную культуру ЦБ вносят в исследуемый раствор или почвенную вытяжку на 19–20 часов, затем культуру отделяют от раствора центрифугированием и заливают 0,075% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) на 3 часа (освещённость 1500–2000 лк, температура 25–30 °С), а при необходимости и на более длительное время. Используя прямое микроскопирование, подсчитывают количество клеток микроорганизмов, в которых образовались кристаллы формазана карминово-красного цвета, и те клетки, в которых кристаллы не образовались. Для оценки степени токсичности исследуемой среды высчитывают долю клеток с кристаллами формазана. Токсичными считают варианты, в которых доля клеток с кристаллами не превышает 50%.

Тетразольно-топографический метод зарекомендовал себя как чувствительный, экономичный и адекватный метод биотестирования. Однако в его первоначальном варианте страдал такой показатель, как экспрессность. Продолжительность биотестирования достигала иногда двух суток. Поэтому целью работы было совершенствование имеющейся методики в направлении сокращения времени биотестирования и уточнения её параметров (вид, титр и возраст культур ЦБ, степень фрагментации нитей, физические факторы), установка метрологических характеристик методики и апробация. В усовершенствованном варианте методики экспозицию культуры с исследуемым раствором и раствором ТТХ проводят при температуре 27 °С и освещённости 4500 лк, при этом возраст культуры должен составлять 2–4 месяца, а степень фрагментации нитей микроорганизмов такая, чтобы не менее 75% клеток находилась в цепочках менее чем 10 клеток, а титр культуры соответствовал $2 \cdot 10^7$ кл./см³. Усовершенствованная методика апробирована как на модельных растворах токсикантов (сульфат меди (II) и фосфорорганические соединения), так и в ходе комплексного геоэкологического исследования антропогенно нарушенных территорий. В качестве тест-культуры использовали ЦБ *Nostoc paludosum* 18, выделенную из почв Кировской области.

Ключевые слова: цианобактерии, биотестирование, дегидрогеназная активность, трифенилтетразолий хлорид, формазан, жизнеспособность клеток, фрагментация нитей.

Improving tetrazol-topographic method of biotesting using cyanobacteria

A. I. Fokina¹, L. I. Domracheva^{2,3}, Yu. N. Zykova², S. G. Skugoreva^{1,2,3}, E. I. Lyalina¹, L.V. Trefilova²,

¹ Vyatka State University,

36 Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

² Vyatka State Agricultural Academy,

133 Oktyabrskiy Prospect, Kirov, Russia, 610017,

³ Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS,

28 Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

e-mail: annushka-fokina@mail.ru, dli-alga@mail.ru

Tetrazole-topographical method of determining dehydrogenase activity of soil cyanobacteria (CB) has been recently used as for assessing toxicity of environmental objects contaminated with various pollutants. The method consists in introduction of a homogenized culture of CB into a test solution or soil extract for 19–20 hours, then the culture

is separated from the solution by centrifugation and is filled with a 0.075% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) for 3 hours or, if necessary, for a longer time (illumination is 1500–2000 lux, temperature is 25–30 °C). Using direct microscopy, they count the number of microbial cells, those with the crystals of carmine red formazan, as well as cells those in which crystals were not formed. To assess toxicity of the medium under research they count the proportion of cells with formazan crystals. The options in which less than 50% cells contain formazan crystals are considered toxic.

Tetrazole-topographical method has proven itself as a sensitive, economical, and adequate bioassay method. However, in its initial version the indicator of rapidity was faulty. Duration of bioassay sometimes lasted two days. Therefore, the aim of the work was to improve the existing method, that is to reduce the time of biological testing and refinement of its parameters (type, titer, and age of CB cultures, the degree of fragmentation of threads, physical factors), installation of metrological performance and testing methods. In the improved variant of the method the exposure of culture with the test solution and a solution of TTX is conducted at 27 °C and illumination of 4500 lux, the age of the culture should be 2–4 months, and the degree of fragmentation of microorganisms threads should be that way that at least 75% cells were parts of chains consisting of less than 10 cells, and culture titer were $2 \cdot 10^7$ cells/cm³. The improved methodology was tested both in model solutions of toxicants (copper sulfate (II) and organophosphorus compounds), and in complex geo-environmental research of anthropogenic ally disturbed areas. The CB *Nostoc paludosum* 18 from soil of Kirov region was used as a test culture.

Keywords: cyanobacteria, bioassay, dehydrogenase activity, triphenyltetrazolium chloride, formazan, cell viability.

Биотестирование – обязательный приём в экологических исследованиях при определении степени загрязнения окружающей среды и уровня токсичности тех или иных соединений. В качестве тест-объектов используются макро- и микроорганизмы различной систематической принадлежности. В последние годы было установлено, что многие задачи биомониторинга можно решить, опираясь на такую уникальную группу почвенных микрофототрофов, как цианобактерии (ЦБ) [1, 2]. На действие токсикантов в моделируемых или природных условиях популяции ЦБ отвечают реакциями, которые легко отслеживаются по показателям видового разнообразия, количественного обилия, активности ферментов, интенсивности фотосинтеза и биохемилюминесценции, концентрации хлорофилла и феофитина, накоплению малонового диальдегида при перекисном окислении липидов. Среди этих показателей одним из наиболее убедительных является жизнеспособность клеток ЦБ, определяемая по дегидрогеназной активности с использованием 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ). Это так называемый тетразолюльно-топографический метод [3]. Первоисточником метода является его использование в растениеводстве для определения жизнеспособности семян [4]. Сущность метода состоит в том, что в живых клетках ТТХ, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в кристаллы 2,3,5-трифенилформазана, имеющего красную или малиновую окраску. Результат указанной реакции в популяциях ЦБ можно наблюдать под микроскопом, дифференцируя клетки с кристаллами формазана, учитывая их как жизнеспособные и без формазана, считая их погибшими (рис. 1 на цветной вкладке).

Установлено, что эффект от действия токсикантов зависит от титра клеток ЦБ и целостности цианобактериальной популяции (плёночное или гомогенизированное состояние) [3, 5]. Итогом исследований стала методика, заключающаяся в том, что гомогенизированную культуру ЦБ вносят в исследуемый раствор или почвенную вытяжку на 19–20 часов, затем культуру центрифугируют, отмывают дистиллированной водой и заливают 0,075% раствором ТТХ на 3 часа [6]. В указанном виде методика была апробирована в следующих исследованиях.

– Исследовано влияние метилфосфоновой кислоты и глифосата на дегидрогеназную активность почвенных ЦБ [6, 7].

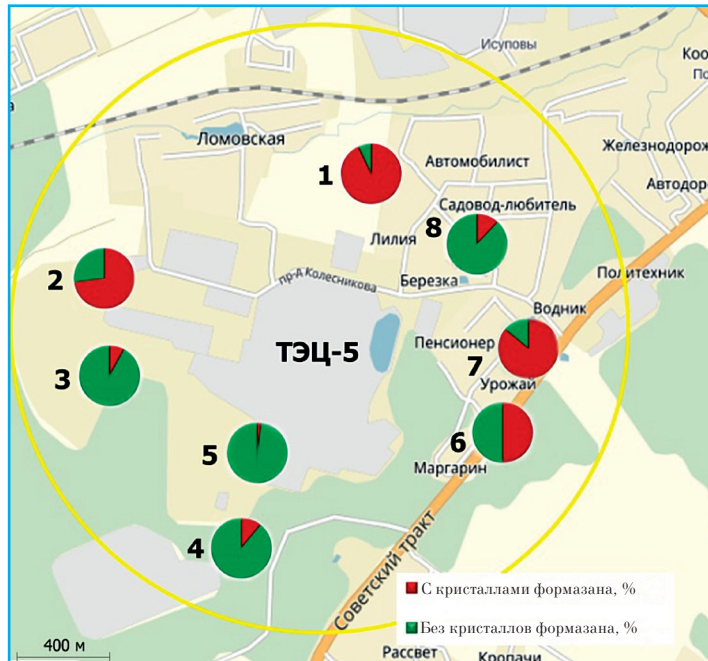
– При воздействии возрастающих концентраций фторкаучуков марки СКФ-26 на клетки *Nostoc paludosum* было установлено, что все они в той или иной степени являются токсичными [8].

– В серии опытов впервые была определена токсичность трёх марок автошампуней (Концентрат, Felix и Uni) в концентрациях, рекомендуемых для мытья автомобилей при использовании двух видов ЦБ в качестве тест-культур. Было установлено, что все три испытуемых автошампуня резко снижают численность живых клеток. При этом репрессивная активность автошампуней Felix и Uni достигает 98,5 и 99,2% соответственно у *Fischerella muscicola*. Устойчивость *N. paludosum* существенно выше, чем у фишереллы, при действии любого автошампуня. В контроле число нежизнеспособных клеток всего 1,0% для *F. muscicola* и 2,9% для *N. paludosum*. Результаты проведённых исследований с использованием ЦБ показывают, что применение СПАВ

**А. И. ФОКИНА, Л. И. ДОМРАЧЕВА, Ю. Н. ЗЫКОВА,
С. Г. СКУГОРЕВА, Е. И. ЛЯЛИНА, Л. В. ТРЕФИЛОВА**
**«СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕТРАЗОЛЬНО-ТОПОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА
БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИАНОБАКТЕРИЙ» (С. 31)**



Рис. 1. Вид клеток цианобактерий с кристаллами формазана под микроскопом (увеличение в 1320 раз)



Б

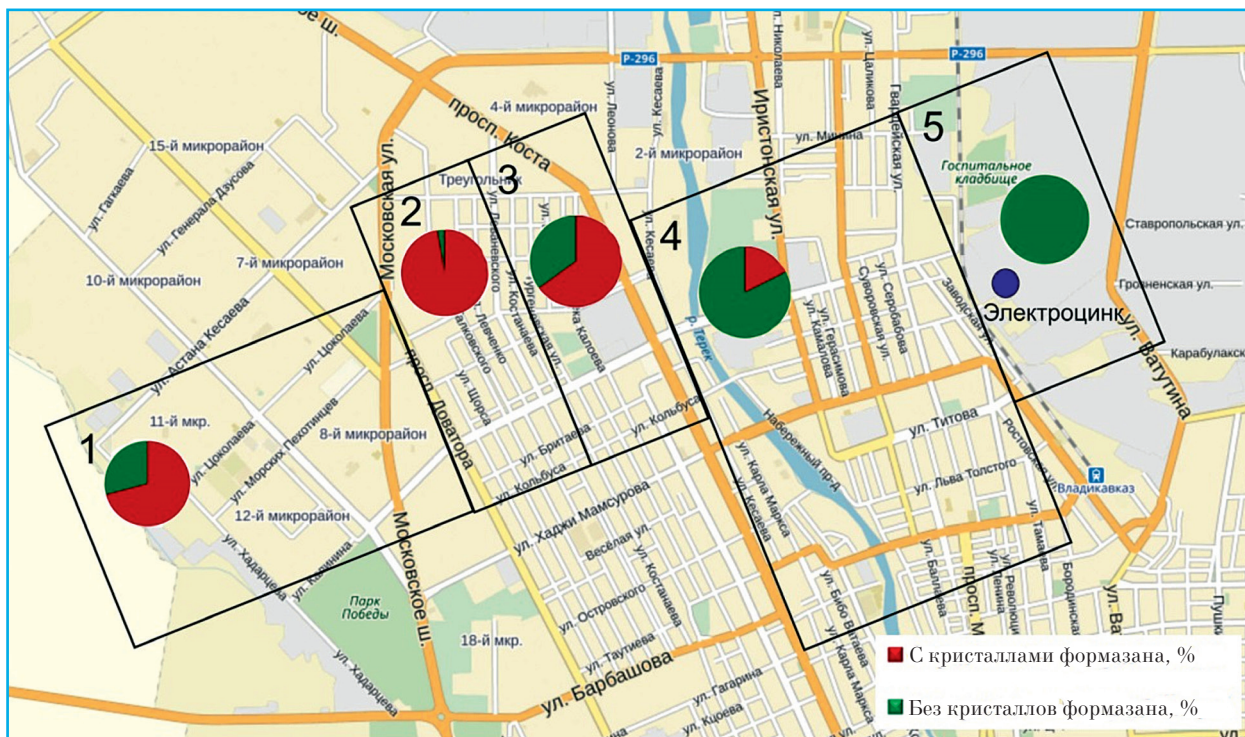


Рис. 2. Влияние веществ, содержащихся в водных вытяжках из образцов почв, на активность дегидрогеназы в клетках почвенных цианобактерий (учёт доли клеток, в которых под действием дегидрогеназы образовались кристаллы формазана):

А – территория вблизи ТЭЦ-5 г. Кирова, Б – г. Владикавказ

в виде автошампуней для мойки автомобилей может представлять весьма существенную опасность для водной и почвенной биоты [9].

– Исследовано действие ацетата свинца, сульфата меди; хлорида натрия; бензина 92-й марки и гербицида трефлан. Концентрации поллютантов соответствовали 5 ПДК для тяжёлых металлов (ТМ), для бензина и хлорида натрия – 5% от объёма культуральной среды, для трефлана была выбрана производственная доза – 0,2%. Показано, что эффект действия отдельных токсикантов проявился, в первую очередь, в существенной гибели клеток [10].

– Цианобактерии использованы для тестирования почвенных вытяжек. Для сравнения исследовали почвенную вытяжку серии модельных опытов, в которых в течение трёх месяцев изучали действие пестицидов старого и нового поколений на почвенную микрофлору. В качестве тест-организма использовали ЦБ *N. muscorum*. Определение жизнеспособности клеток ЦБ в почвенной вытяжке в модельном опыте показало, что испытываемые пестициды обладают различной степенью токсичности по отношению к *N. muscorum* и располагаются в ряд: ДДТ > Гексохлорбензол = Круйзер > Симазин = Дивиденд стар > Гербитокс = Пивот [11].

Кроме того, методика широко апробирована на образцах почв, отобранных в зоне действия Кирово-Чепецкого химического комбината, захоронения пестицидов и т. п. [12].

Таким образом, в ходе этих экспериментов было установлено, что по мере увеличения концентрации токсиканта происходит уменьшение доли жизнеспособных клеток с одновременным ростом процента мёртвых [13].

Предпринимались попытки модификации методики в сторону её совершенствования со спектрофотометрическим определением содержания формазана [14]. Однако такой способ реализации методики не всегда успешен. Например, количество формазана может быть больше в том варианте, где кристаллы образовались в 10% клеток, чем в варианте, где кристаллы образовались в 80% клеток за счёт того, что кристаллы в варианте с их меньшим количеством значительно крупнее тех, что в варианте с большим количеством формазан-содержащих клеток.

При использовании тетразольно-топографического метода страдает такой показатель, как экспрессность: исследование токсичности одной пробы занимает более суток. Кроме того, дальнейшей детализации требуют исследования по выявлению наиболее чувствительных видов ЦБ к определённым токсикантам.

Поэтому целью работы было совершенствование стандартной методики в направлении сокращения времени биотестирования и уточнения её параметров (вид, титр и возраст культур ЦБ, степень фрагментации нитей, физические факторы, установка метрологических характеристик методики) и апробация.

Объекты и методы исследования

Совершенствование тетразольно-топографической методики определения токсичности

Ранее было показано, что наиболее чувствительными являются следующие виды ЦБ, выделенных из почв Кировской области: *N. linckia*, *N. paludosum* и *N. muscorum* [14], а также *Fischerella muscicola* [9]. Поэтому на первом этапе данной работы у всех вышеуказанных культур, кроме *N. muscorum*, исследован отклик на действие сульфата меди с концентрацией ионов меди Cu^{2+} , равной 1 мг/дм³ (согласно ПДК в питьевой воде), фосфорорганических соединений (концентрации соответствуют сублетальному уровню): глифосат – 0,17 мг/дм³, метилфосфоновая кислота – 0,96 мг/дм³. Культуры ЦБ выдерживали в растворах в течение суток, отмывали дистиллированной водой и оставляли в 0,075%-ном растворе ТТХ до образования кристаллов формазана, отчётливо регистрируемых в клетках ЦБ в контрольном варианте при микроскопировании с иммерсией. Титр культур составлял $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^7$ и $2 \cdot 10^8$ кл./см³.

Исследована возможность использования освещённости 4500 лк и температуры 27 °С для сокращения продолжительности экспозиции культуры в растворе ТТХ: культуру после контакта с раствором сульфата меди (II) и дистиллированной водой (контроль) помещали в 0,075%-ный водный раствор ТТХ, каждые 20 минут делали мазок и прямым микроскопированием устанавливали момент, когда в клетках микроорганизмов образуются хорошо просматриваемые кристаллы формазана.

Для установления оптимальной степени фрагментации нитей ЦБ суспензию культуры гомогенизировали 0,5; 1; 3 минуты на гомогенизаторе марки Homogenizer type 302 при 9000 об./мин. После гомогенизации подсчитывали долю клеток, входящих в цепочки различной длины. Далее суспензии с различной степенью фрагментации нитей помещали в растворы сульфата меди (II) с концентрацией ионов

меди Cu^{2+} , равной 1 мг/дм^3 , на сутки. Затем культуру отмывали дистиллированной водой и оставляли на 60 минут при освещённости 4500 лк в 0,075%-ном растворе ТТХ до образования кристаллов формазана.

Для установления оптимального для биотестирования возраста культуры её отбирали из одной и той же ёмкости через 1, 2, 3, 4 и 6 месяцев выращивания в среде Громова № 6 без азота. Вносили в раствор сульфата меди (II) с концентрацией ионов меди (II), равной 1 мг/дм^3 , и без внесения соли металла и выявляли уровень дегидрогеназной активности.

Использование методики биотестирования в комплексном геоэкологическом мониторинге антропогенно-трансформированных территорий

Разработанная методика была применена в рамках комплексного исследования двух территорий: вблизи ТЭЦ-5 (Кировская область, г. Киров) и вблизи металлоперерабатывающего предприятия «Электроцинк», расположенного в г. Владикавказе (Республика Северная Осетия – Алания).

ТЭЦ-5 является одной из самых мощных ТЭЦ в г. Кирове. В непосредственной близости к ней располагается множество садово-огородных участков. Поэтому знание того, насколько велико влияние ТЭЦ на экологическую обстановку вблизи предприятия, является актуальным.

Выбор территории г. Владикавказ как объекта комплексной геоэкологической оценки основан на том, что на территории города имеются источники значительного антропогенного загрязнения, способные существенно изменить экологическую обстановку в указанном населённом пункте.

В отобранных образцах урбанозёмов содержание органического вещества определяли фотометрически по методу Тюрина в модификации ЦИНАО: по количеству образовавшегося иона хрома Cr^{3+} [15], кислотность – потенциометрически в водной и солевой вытяжках [16], содержание бенз[а]пирена – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [17], нефтепродукты – флуориметрическим методом [18], тяжёлые металлы (Zn, Pb, Cu) – атомно-абсорбционным методом [19]. Определение токсичности вели по усовершенствованной нами тетразолюно-топографической методике.

Результаты и их обсуждение

Исследование чувствительности различных культур к действию токсикантов

Установлено, что самой чувствительной культурой является *N. paludosum* с титром $2 \cdot 10^6$ и $2 \cdot 10^7$ кл./см³, однако удобнее работать с культурой с титром $2 \cdot 10^7$ кл./см³. (табл. 1).

Далее культуру *N. paludosum* с титром $2 \cdot 10^7$ кл./см³ использовали для исследования токсичности растворов сульфата меди (II) и гербицида Базагран (гербицид из класса триазинов) с концентрацией действующего вещества 0,1; 1 и 2 ПДК (ПДК для меди составляет 1 мг/дм^3 , гербицида – $0,01 \text{ мг/дм}^3$) в виде растворов индивидуальных веществ и аналогичных растворов, но с добавлением сильного биопротектора – восстановленного глутатиона (GSH) в концентрациях $2 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-2}$; $0,04 \text{ мг/дм}^3$ соответственно. Культуру выдерживали сутки в растворах токсикантов, отмывали дистиллированной водой и заливали 0,075%-ным раствором ТТХ. Суспензию ЦБ, залитую раствором ТТХ, помещали в камеру, где поддерживали постоянную температуру, равную $27 \text{ }^\circ\text{C}$ при освещённости 4500 лк. Каждые 20 минут с начала экспозиции методом микроскопирования в мазках контрольного варианта устанавливали степень образования кристаллов формазана, которые начинали появляться уже через 20 минут, однако представляли собой едва заметные вкрапления в клетках культуры. Хорошо фиксируемые визуально кристаллы образуются к 40-й минуте. Формирование крупных кристаллов происходит к 60-й минуте. Более продолжительное выдерживание в ТТХ не влияет на результат анализа. Освещённость в камере играла важную роль в протекании реакции, так как при освещении 1500–2000 лк реакция проходила не менее трёх часов, а зачастую нужный эффект достигался через сутки, что значительно снижало экспрессность методики.

Кроме того, выявлено, что повышение температуры до $27 \text{ }^\circ\text{C}$ и освещённости до 4500 лк позволяет существенно снизить продолжительность экспозиции микроорганизмов не только с ТТХ, но и с исследуемым раствором (достаточно 3-часовой экспозиции). Таким образом, общая продолжительность токсикологического исследования тетразолюно-топографическим методом составляет около 5–6 часов, что вполне приемлемо для реализации в течение одного рабочего дня.

Удалось установить то, что раствор соли меди значительно токсичнее гербицида Базагран. Однако не следует забывать, что ПДК гербицида в 100 раз меньше, чем у ионов меди (II) и по абсолютному значению концентрации можно предположить, что Базагран окажет влияние сильнее ионов меди.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. МОДЕЛИ И ПРОГНОЗЫ

При увеличении концентрации обоих токсикантов уменьшается жизнеспособность культуры (табл. 2). Применённая методика позволяет фиксировать токсичность растворов, в которых концентрация более значения ПДК, а для ионов меди и при 0,1 ПДК. Присутствие глутатиона GSH положительно сказывается на жизнеспособности в случае с медью, а в вариантах с гербицидом, наоборот, она снижается.

Если сравнивать результаты, полученные методом прямого счёта под микроскопом и спектрофотометрическим определением количества образующегося формазана, то следует отметить наличие зависимости между значениями жизнеспособности и количеством образующегося в клетках формазана в вариантах с медью. С гербицидом такая зависимость существует только в вариантах без GSH. Следует отметить

Таблица 1

Влияние токсикантов на жизнеспособность различных штаммов цианобактерий

Титр, кл./см ³	Контроль		
	<i>N. linckia</i>	<i>N. paludosum</i>	<i>Fischerella muscicola</i>
2 · 10 ⁸	98,3±0,3	92,4±2,5	95,3±1,7
2 · 10 ⁷	98,2±0,8	95,4±1,5	93,7±0,3
2 · 10 ⁶	95,4±0,6	92,6±1,9	94,5±1,4
ПАВ			
2 · 10 ⁸	98,1±0,3	76,8±8,3	72,4±2,7
2 · 10 ⁷	93,7±2,2	94,7±3,2	95,6±0,5
2 · 10 ⁶	94,6±2,2	48,6±4,4	80,1±6,5
МФК			
2 · 10 ⁸	0	61,3±0,2	27±0,0
2 · 10 ⁷	0	51,3±2,0	0,3±0,0
2 · 10 ⁶	1,7±0,0	0,8±0,0	0
Глифосат			
2 · 10 ⁸	89,2±7,3	44,3±1,3	0
2 · 10 ⁷	96,1±0,9	50,3±5,3	93,5±1,8
2 · 10 ⁶	47,6±6,6	4,4	37,3±0,3
CuSO ₄			
2 · 10 ⁸	98,3±0,4	98,6±0,2	94,0±0,7
2 · 10 ⁷	97,5±1,0	76,5±7,5	97,0±0,3
2 · 10 ⁶	57,9±1,0	10,3±0,0	18,5±4,0

Таблица 2

Влияние состава раствора на жизнеспособность культуры почвенных цианобактерий *Nostoc paludosum*

Вариант	Жизнеспособность, %	Формазан, мкг/0,1 мг ЦБ
Контроль (вода)	91,00±3,5	26,26
Cu		
0,1 ПДК Cu	43,8±2,2	30,64
1 ПДК Cu	28,5±1,4	22,07
2 ПДК Cu	11,2±0,6	20,93
0,1 ПДК Cu+ GSH	53,9±2,7	39,20
1 ПДК Cu+ GSH	45,3±2,3	38,63
2 ПДК Cu+ GSH	40,8±2,1	23,59
Базагран		
0,1 ПДК базагран	71,2±3,6	12,08
1 ПДК базагран	67,3±3,4	11,61
2 ПДК базагран	33,8±1,7	10,94
0,1 ПДК базагран+ GSH	67,1±3,4	10,75
1 ПДК базагран + GSH	56,0±2,8	14,84
2 ПДК базагран + GSH	34,3±22,6	12,08

Таблица 3

Влияние степени фрагментации и ионов меди(II) на жизнеспособность ЦБ *N. paludosum*

Продолжительность гомогенизации, мин.	Степень фрагментации	Жизнеспособность, %	
		Контроль	2,7 мг Cu ²⁺ /дм ³
0	Цепочки из 1–10 клеток – 37%; цепочки из более чем 10 клеток – 63%	66,7±6,5	24,0±2,2
0,5	Цепочки из 1–10 клеток – 75%; цепочки из более чем 10 клеток – 25%	64±15	32,5±0,6
1	Цепочки из 1–10 клеток – 94%; цепочки из более чем 10 клеток – 6%	88,3±5,5	42,12±6,6
3	Цепочки из 1–10 клеток – 98%; цепочки из более чем 10 клеток – 2%	74,7±5,2	42,3±6,3

Таблица 4

Влияние возраста культуры ЦБ *Nostoc paludosum* ионов меди (II) на жизнеспособность клеток

Возраст культуры, месяцы	Жизнеспособность, %	
	Контроль	2 мг Cu ²⁺ /дм ³
1	96,7±6,5	44,0±2,2
2	93,4±1,5	42,5±0,6
4	92,0±3,5	42,12±6,6
6	80,7±3,2	29,3±6,3

одну очень важную для методики биотестирования особенность – по результатам спектрофотометрического определения для вариантов с солями меди не удаётся выявить токсичность ни в одном из вариантов. Для вариантов с Базаграном, наряду с отсутствием данных по жизнеспособности, не показывающих токсичность, все варианты оказываются токсичными.

Исследование влияния степени фрагментации на результат биотестирования

Выявлено, что степень фрагментации нитей ЦБ оказывает большое влияние на результаты опыта (табл. 3).

До гомогенизации культуры в суспензии около 63% клеток ЦБ находились в составе нитей длиной более 10 клеток, при этом кристаллы формазана после контакта культуры с раствором ТТХ обнаружены у 67% клеток. При гомогенизации культуры до состояния, когда почти все клетки находятся в цепочках из 10 клеток и менее – около 75%. Разница может быть обусловлена увеличением площади контакта ионов меди (II) с клетками. При менее фрагментированном состоянии культуры доля клеток с формазаном меньше, чем в культуре с большей степенью фрагментации, из-за невозможности контакта ТТХ с клетками, окружёнными цепочками из других клеток. Степень фрагментации оказывает существенное влияние на результат биотестирования. Так, доля клеток негомогенизированной культуры после контакта с ионами меди (II), в которых образовались кристаллы формазана, составляет всего 23–24%, в то время

как увеличение фрагментации приводит к росту этого показателя до 43–45%.

Исследование влияния возраста культуры на результат биотестирования

Возраст культуры в значительной степени влияет на результат биотестирования (табл. 4). Между результатами, полученными с 1, 2 и 4-месячными культурами при исследовании раствора сульфата меди (II) с концентрацией ионов меди (II), равной 2 мг Cu²⁺/дм³, достоверных различий нет. Жизнеспособность одномесечной культуры оказалась достаточно высокой, в отдельных повторностях её значение достигало 98–99%. Отличаются от остальных результаты, полученные в опытах с шестимесечной культурой, как в её контрольном, так и опытном (с ионами меди) вариантах, жизнеспособность существенно ниже, чем в остальных вариантах. Кроме того, замечено, что гомогенат шестимесечной культуры, по сравнению с другими, менее чем через сутки приобретает бурю окраску.

Таким образом, старение культуры приводит к существенному снижению жизнеспособности клеток ЦБ в присутствии токсиканта.

Апробация методики при исследовании реальных объектов

Территория вблизи ТЭЦ-5 (г. Киров, Кировская область)

Значения pH водных вытяжек из образцов урбанозёмов лежат в пределах от 5,65 до 7,28,

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. МОДЕЛИ И ПРОГНОЗЫ

величины рН солевых вытяжек, соответственно от 4,75 до 6,45 (табл. 5). Таким образом, почвы на участке 6 относятся к сильнокислым, 7 – к среднекислым, 2 и 5 – к слабокислым, 1 и 4 – к близким к нейтральным, 3 и 8 – к нейтральным. Такое разнообразие почв даже по одному показателю – степени кислотности – отражает их генетическую неоднородность, осложнённую антропогенным и техногенным воздействием.

Содержание органического вещества в целом по территории достаточно низкое, варьирует от 1,04±0,21% до 5,8±0,6% (табл. 5). В образце первого участка содержание органики, по сравнению с другими образцами, самое высокое, что может быть обусловлено особенностями участка – на нём присутствуют залежи органического субстрата с высокой долей древесных опилок. По величине значения содержания органического вещества

Таблица 5

Свойства почв в окрестностях ТЭЦ-5, содержание в них нефтепродуктов и бенз[а]пирена

Номера участков	рН _{H₂O}	рН _{KCl}	Содержание орг. вещества, %	Содержание бенз[а]пирена, мкг/кг	Содержание нефтепродукты, мг/кг
1	6,93	5,95	5,8±0,6	0,97±0,27	5,8±2,3
2	6,60	5,31	1,34±0,27	1,00±0,28	5,0±2,0
3	7,13	6,01	1,14±0,23	0,94±0,26	4,9±1,9
4	6,82	5,78	3,8±0,6	0,51±0,14	5,1±2,1
5	6,73	5,43	1,50±0,30	н.п.	5,3±2,1
6	5,65	4,26	2,5±0,5	н.п.	5,1±2,0
7	5,73	4,78	1,8±0,3	н.п.	4,8±1,9
8	7,28	6,45	3,3±0,5	9,0±3,3	8,3±3,3

Примечание: н.п. – ниже предела обнаружения метода.

Таблица 6

Содержание ТМ в образцах почв, отобранных на территории вблизи ТЭЦ-5, мг/кг

Участок	Pb	Zn	Cu	$\frac{Z_{c(подв.)}}{Z_{c(вал.)}}$
1	<u>0,498±0,011</u>	<u>7,60±0,06</u>	<u>0,13±0,012</u>	<u>5,1</u>
	8,12±0,05	57,2±0,7	6,23±1,18	2,1
2	<u>0,30±0,09</u>	<u>1,52±0,07</u>	<u>0,05±0,002</u>	–
	4,59±0,12	21,20±0,04	6,24±0,40	1,2
3	<u>0,42±0,06</u>	<u>1,14±0,06</u>	<u>0,12±0,018</u>	<u>2,0</u>
	4,48±0,26	30,60±0,07	6,58±0,12	1,3
4	<u>0,61±0,09</u>	<u>3,25±0,04</u>	<u>0,060±0,005</u>	<u>1,7</u>
	13,80±0,27	55,65±0,07	10,2±2,8	3,2
5	<u>0,970±0,016</u>	<u>1,33±0,012</u>	<u>0,0400±0,0012</u>	<u>1,4</u>
	8,04±0,23	50,1±0,6	10,25±1,23	2,6
6	<u>1,26±0,13</u>	<u>3,73±0,021</u>	<u>0,160±0,018</u>	<u>2,4</u>
	12,5±0,6	68,23±0,30	10,8±2,3	3,5
7	<u>0,40±0,06</u>	<u>6,60±0,07</u>	<u>0,080±0,005</u>	<u>3,7</u>
	7,3±0,3	39,2±4,3	6,4±0,4	1,5
8	<u>1,24±0,17</u>	<u>18,54±0,04</u>	<u>0,54±0,11</u>	<u>18,3</u>
	16,40±0,27	117,9±0,4	14,5±1,6	6,7
Фон-луг	<u>0,720±0,021</u> 7,5±0,5	<u>1,94±0,021</u> 32,50±1,30	<u>0,0600±0,0022</u> 5,11±1,21	–
Фон-лес	<u>1,223±0,011</u> 7,14±0,30	<u>1,92±0,011</u> 32,20±0,80	<u>0,110±0,012</u> 6,45±0,43	–
ПДК (ОДК)	<u>6</u> 65*–130**	<u>23</u> 110*–220**	<u>3</u> 66*–132**	–

Примечание.* – значения ОДК для участков №№ 2, 5–7, ** – для участков №№ 1, 3, 4, 8. Здесь и далее в таблице 5: Над чертой приведены данные по содержанию подвижных форм, под чертой – валовых форм ТМ в почве. Прочерк обозначает, что данные отсутствуют или не могут быть определены. $Z_{c(подв.)}$, $Z_{c(вал.)}$ – суммарный коэффициент загрязнения почвы подвижными, валовыми формами ТМ.

после участка № 1 следуют участки №№ 3 и 4, которые характеризуются наличием лесных подстилок, перегнивание которых вносит вклад в содержание органики, а участок № 8 – садово-огородный массив и внесение органики может быть обусловлено хозяйственной деятельностью человека.

Содержание бенз[а]пирена не превышает норму (20 мкг/кг) и встречается только на участках №№ 1–4 в небольших количествах. Относительно высокое количество указанного поллютанта ($9,0 \pm 3,3$ мкг/кг) обнаружено в образце, отобранном на восьмом участке, однако это количество тоже не превышает ПДК. Содержание нефтепродуктов (табл. 5) в образцах всех участков, кроме № 8 (8 мг/кг), колеблется около 5–6 мг/кг. Все эти значения лежат в пределах ОДК (2000 мг/кг) и условно фоновых величин для регионов, не ведущих добычу нефти (40 мг/кг) [20].

В связи с использованием в качестве топлива на ТЭЦ угля особый интерес, кроме бенз[а]пирена и нефтепродуктов, представляют ТМ (табл. 6).

В изученных почвах содержание валовых и подвижных форм ТМ не превышало ОДК и ПДК. Однако при сопоставлении полученных концентраций ТМ с фоновыми значениями в основном отмечено превышение хотя бы по одному металлу. При расчёте суммарного показателя загрязнения Z_c установлено, что практически на всех участках он выше 1, т. е. превышает фон. Тем не менее лишь один участок № 8 обладает умеренно опасной степенью загрязнения по содержанию подвижных форм ТМ ($Z_{c(подв.)} = 18,3 > 16$), остальные участки характеризуются допустимой степенью загрязнения ($Z_{c(подв.)} = 16$).

Исследование токсичности отобранных образцов показало, что более всего дегидрогеназная активность клеток ЦБ подавлялась при экспозиции культуры с вытяжками из образцов № 3–6 и № 8 (рис. 2 А, см. цвет. вкладку), что согласуется с данными по содержанию токсиантов в образцах [21].

*Результаты комплексного
геоэкологического исследования
территории г. Владикавказа*

Исследуемые образцы урбаноэмов характеризуются значениями рН, близкими к нейтральному уровню (табл. 7). Содержание органического вещества колеблется в пределах от 2,2 до 11,5%. Основной особенностью проб является их высокое загрязнение соединениями ТМ. В большинстве образцов установлено

сверхнормативное содержание свинца: кратность превышения ОДК варьировала от 3,2 на участке № 3 до 28 на участке № 5. Содержание подвижных форм свинца во всех пробах превышало ПДК и фон (6 и 5 мг/кг). Максимальные значения показателя определены в пробах с участков №№ 4 и 5: ПДК превышен в 102 и 310 раз соответственно.

Высокие концентрации соединений меди установлены в почве участка № 5: содержание валовых и подвижных форм элемента было выше норматива в 4,7 и 51 раз соответственно. В большинстве отобранных проб установлены высокие концентрации соединений цинка. Норматив содержания цинка превышен в 6–60 раз по валовым формам и в 18–256 раз по подвижным формам во всех пробах, кроме участка № 2.

Отличительной особенностью большинства проанализированных почвенных образцов является высокое содержание подвижных форм ТМ (до 310 ПДК), а также их высокая доля в валовом содержании элемента (до 50%). Относительно невысоким было содержание ТМ на участке № 2.

Суммарный показатель загрязнения проб почв валовыми формами ТМ сильно различается: от незагрязнённой почвы участка № 2 ($Z_{c(вал.)} < 1$) до чрезвычайно опасно загрязнённого участка № 5 ($Z_{c(вал.)} = 163$) (табл. 7, 8). Суммарный показатель загрязнения почв по подвижным формам ТМ гораздо выше, чем по валовым формам. Согласно рассчитанным значениям Z_c для подвижных форм ТМ пробы с участков №№ 5 и 4 имеют чрезвычайно опасную степень загрязнения ($Z_{c(подв.)} = 1173$ и 173), что вполне закономерно, так как участки их пробоотбора расположены ближе всех остальных к предприятию-загрязнителю.

Исследование токсичности по реакции почвенных ЦБ рода *Nostoc* показало, что вещества, содержащиеся в водных вытяжках из проб, отобранных на близлежащих к ОАО «Электроцинк» участках (№№ 4, 5), значительно угнетают дегидрогеназную активность микроорганизмов (на 81 и 100% соответственно), данные пробы признаны токсичными (рис. 2 Б, см. цвет. вкладку).

Реакция ЦБ коррелирует с валовым содержанием ТМ ($r=0,93$). Однако, как и при использовании аттестованных методик биотестирования, для некоторых участков высокие суммарные показатели загрязнения не вызывают критического ответного угнетения дегидрогеназной активности ЦБ. Например, образцы с участков № 1 и 3 угнетают ЦБ на $23,5 \pm 1,4$

Таблица 7

Характеристика проб урбаноэмов г. Владикавказ

№ пробы	рН _{Н₂О}	рН _{КСl}	Содержание органического вещества, %	Содержание ТМ, мг/кг			$\frac{Z_{c(подв.)}}{Z_{c(вал.)}}$
				Pb	Cu	Zn	
1	7,02	5,93	2,7±0,5	<u>149±31</u> 480±100	<u>2,0±0,5</u> 96±22	<u>490±160</u> 1400±500	<u>78</u> 18
2	6,55	5,53	7,3±0,7	<u>7,3±1,5</u> 43±9	<u>0,53±0,12</u> 26±6	<u>13±4</u> 102±34	<u>1,7</u> –
3	7,31	6,46	11,5±1,1	<u>162±34</u> 410±90	<u>2,1±0,5</u> 63±14	<u>420±140</u> 1500±500	<u>76</u> 19
4	7,60	6,93	11,0±1,1	<u>610±130</u> 1240±260	<u>5,3±1,2</u> 101±23	<u>470±150</u> 2000±700	<u>173</u> 29
5	6,60	6,06	5,0±0,7	<u>1860±390</u> 3700±800	<u>152±35</u> 620±140	<u>5900±1900</u> 13000±4000	<u>1173</u> 163
Фон	–	–	–	<u>5,0±0,9</u> 116±20	<u>0,66±0,11</u> 25±6	<u>10,3±2,9</u> 120±40	–
ПДК [22]/ ОДК [23]	–	–	–	<u>6</u> 130	<u>3</u> 132	<u>23</u> 220	–

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения, превышающие норматив. Прочерк – определение или расчёт не проводили.

Таблица 8

Степень загрязнения проб урбаноэмов г. Владикавказ

Степень загрязнения	Z _c	№ проб	
		Z _{c(подв.)}	Z _{c(вал.)}
Допустимая	< 16	2	2
Умеренно опасная	16–32	–	1, 3, 4
Опасная	32–128	1, 3	–
Чрезвычайно опасная	> 128	4, 5	5

Примечание: Z_c – суммарный показатель загрязнения.

и 29,3±1,2% по сравнению с контролем, тогда как соответствующие Z_c равны 26,5 и 21,1, что характеризуется как умеренно опасная степень загрязнения.

Из разработанных методик биотестирования в целом следует отметить преимущества тетразолюно-топографического метода, с помощью которого удаётся обнаружить разницу в токсичности образцов, уровень загрязнений которых даже не превышает нормативного.

Заключение

Таким образом, в ходе проведённого исследования выявлено, что у культуры ЦБ *N. radiosum*, по сравнению с другими культурами, дегидрогеназная активность наиболее чувствительна к действию солей ТМ и фосфорорганических соединений. Оптимальным титром для регистрации уровня токсичности исследуемых растворов является $2 \cdot 10^7$ кл/см³.

Экспозиция культуры с исследуемым раствором и раствором ТТХ при температуре 27 °С

и освещённости 4500 лк позволяет повысить экспрессность методики, проведение биотестирования возможно в течение пяти часов.

Методика апробирована как на модельных растворах токсикантов (сульфат меди (II) и фосфорорганические соединения), так и в ходе комплексного геоэкологического исследования антропогенно нарушенных территорий.

Работа выполнена в рамках государственного задания Вятского государственного университета по теме «Механизмы адаптации и устойчивости почвенной микробиоты к техногенному загрязнению» №5.4962.2017/БЧ.

Литература

1. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Фокина А.И., Огородникова С.Ю., Кантор Г.Я. Биомониторинг и биотестирование почв // Биоиндикаторы и биотестсистемы в оценке окружающей среды техногенных территорий. Киров: О-Краткое, 2008. С. 68–105.

2. Fokina A.I., Ogorodnikova S.Yu., Domracheva L.I., Gornostaeva E.A., Ashikhmina T.Ya., Kondakova L.V., Lyalina E.I. Cyanobacteria as test organisms and biosorbents // Eurasian Soil Science. 2017. V. 50. № 1. P. 70–77.

3. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразолюно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 2. С. 23–28.

4. ГОСТ 12039-82. Семена сельскохозяйственных культур. Тетразолюно-топографический метод определения жизнеспособности семян. С. 102–115.

5. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Фокина А.И., Огородникова С.Ю., Олькова А.С. Дуализм цианобактерий как тест-организмов, зависимый от их титра // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Киров, 2007. С. 133–135.

6. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразолюно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Биологический мониторинг природно-техногенных систем. Сыктывкар, 2011. С. 113–120.

7. Фокина А.И., Огородникова С.Ю., Зыкова Ю.Н., Домрачева Л.И., Кудряшов Н.А., Коткина Т.Н., Лялина Е.И. Корректировка условий применения микрорекристаллоскопической реакции на дегидрогеназную активность для её использования в биотестировании // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Киров, 2016. С. 139–142.

8. Елькина Т.С., Домрачева Л.И., Хитрин С.В., Фукс С.Л., Девятиркова С. В. Определение степени токсичности отходов производства фторполимеров по реакции почвенной микрофлоры и цианобактерии *Nostoc paludosum* Kütz // Принципы экологии. 2014. Т. 3. № 1. С. 43–52.

9. Симакова В.С., Домрачевы Л.И., Огородникова С.Ю., Фокина А.И., Ашихмина Т.Я. Влияние фосфорсодержащих автошампуней на развитие почвенных цианобактерий // Теоретическая и прикладная экология. 2016. № 3. С. 89–94.

10. Огородникова С.Ю., Зыкова Ю.Н., Березин Г.И., Домрачева Л.И., Калинин А.А. Комплексная оценка состояния цианобактерий *Nostoc paludosum* при воздействии различных поллютантов // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 3. С. 47–51.

11. Березин Г.И. Комплексная оценка микробиологического состояния почвы при хроническом и остром действии пестицидов. Автореф. ... канд. биол. наук. Сыктывкар, 2013. 19 с.

12. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Фокина А.И., Кантор Г.Я. Биомониторинг и биотестирование почв // Биоиндикаторы и биотестсистемы

в оценке окружающей среды техногенных территорий. Киров: О-Краткое, 2008. С. 68–105.

13. Домрачева Л.И., Елькина Т.С., Березин Г.И., Злобин С.С., Гайфутдинова А.Р. Использование цианобактерий для биотестирования почв при их химическом загрязнении // Найновите научни постижения. Материали за VIII научна практична конференция. Т. 28. Биологии. Химия и химически технологии. София. «Бял ГРАД БГ» ООД, 2012. С. 31–35.

14. Огородникова С.Ю., Домрачева Л.И., Горностаева Е.А., Фокина А.И. Методические подходы к количественному определению формазана в клетках цианобактерий // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Матер. XI Всерос. науч.-практ. конф. Киров, 2013. С. 48–51.

15. ГОСТ 26213-91. Почвы. Методы определения органического вещества. М.: Государственный комитет стандартизации и метрологии СССР, 1991. 8 с.

16. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: МГУ, 1970. 488 с.

17. МУК 4.1.1274-03. Измерение массовой доли бенз(а)пирена в пробах почв, грунтов, донных отложений и твёрдых отходов методом ВЭЖХ с использованием флуориметрического детектора.

18. ПНД Ф 16.1:2.21-98. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв и грунтов флуориметрическим методом с использованием анализатора жидкости «Флюорат-02». 26 с.

19. ФР.1.31.2012.13573. Методика выполнения измерений массовых долей токсичных металлов в пробах почв атомно-абсорбционным методом. М., 2012. 16 с.

20. Мотузова Г.В., Безуглова О.С. Экологический мониторинг почв. М.: Академический проект, 2007. 237 с.

21. Фокина А.И., Олькова А.С., Скугорева С.Г., Лялина Е.И., Домрачева Л.И., Березин Г.И., Даровских Л.В. Исследование токсичности проб урбанозёмов, загрязнённых тяжёлыми металлами // Известия Самарского научного центра РАН. 2016а. Т. 18. № 2(2). С. 544–550.

22. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. Гигиенические нормативы. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. 15 с.

23. ГН 2.1.7.2042-06. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве. Гигиенические нормативы. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. 11 с.

References

1. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Fokina A.I., Ogorodnikova S.Yu., Kantor G.Ya. Biomonitoring and bioassay of soil bioindicators and biotestsystems // Bioindicators and biotestsystems in the environmental assessment of technogenic territories. Kirov: O-Kratkoye, 2008. P. 68–105 (in Russian).

2. Fokina A.I., Ogorodnikova S.Yu., Domracheva L.I., Gornostaeva E.A., Ashikhmina T.Ya., Kondakova L.V., Lyalina E.I. Cyanobacteria as test organisms and biosorbents // Eurasian Soil Science. 2017. V. 50. № 1. P. 70–77.
3. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ashikhmina T.Ya., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. Application of tetrazole-topographic method for determining dehydrogenase activity of cyanobacteria in polluted environments // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2008. № 2. P. 23–28 (in Russian).
4. GOST 12039-82. Agricultural seeds. Tetrazole-topographical method of determining the viability of seeds. P. 102–115 (in Russian).
5. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ashikhmina T.Ya., Fokina A.I., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S. Dualism of cyanobacteria as test-organisms, depending on the titer // Problemy regionalnoy ekologii v usloviyakh ustoichivogo razvitiya: Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem. Kirov. 2007. P. 133–135 (in Russian).
6. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. Application of tetrazole-topographic method for determining dehydrogenase activity of cyanobacteria in contaminated environment // Biological monitoring of natural and manmade systems. Syktyvkar, 2011. P. 113–120 (in Russian).
7. Fokina A.I., Ogorodnikova S.Yu., Zykova Yu.N., Domracheva L.I., Kudryashov N.A., Kotkina T.N., Lyalina E.I. Adjusting the conditions of applying microcrystalloscopic reaction to dehydrogenase activity for its use in bioassay // Ecology of the native land: problems and solutions: Sbornik materialov Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem: Kirov. 2016. P. 139–142 (in Russian).
8. Elkina T.S., Domracheva L.I., Khitrin S.V., Fuks S.L., Devyaterikova S. V. Determining the degree of toxicity of the wastes of luoropolymers production according to reaction of soil microflora and the cyanobacteria *Nostoc paludosum* Kütz // Printsipy ekologii. 2014. V. 3. № 1. P. 43–52 (in Russian).
9. Simakova V.S., Domracheva L.I., Ogorodnikova S.Yu., Fokina A.I., Ashikhmina T.Ya. Effect of phosphorus-containing autoshampoos on development soil cyanobacteria // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2016. № 3. P. 89–94 (in Russian).
10. Ogorodnikova S.Yu., Zykova Yu.N., Berezin G.I., Domracheva L.I., Kalinin A.A. Integrated assessment of cyanobacteria *Nostoc paludosum* affected by various pollutants // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2010. № 3. P. 47–51 (in Russian).
11. Berezin G.I. Comprehensive assessment of microbiological condition of soil chronically and acutely effected by pesticides: Avtoref. ... kand. biol. nauk. Syktyvkar, 2013. 19 p. (in Russian).
12. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ogorodnikova S.Yu., Fokina A.I., Kantor G.Ya. Biomonitoring and bioassay of soil bioindicators and biotestsystems // Bioindicators and biotestsystems in environmental assessment of technogenic territories / Eds. T.Ya. Ashikhmina, N.M. Alalykina. Kirov, 2008. P. 68–105 (in Russian).
13. Domracheva L.I., Elkina T.S., Berezin G.I., Zlobin S.S., Gayfutdinova A.R. The use of cyanobacteria for biotesting chemically polluted soils // Biologii. Khimiya i khimicheski tekhnologii: Naynovite nauchni postizheniya. Materiali za VIII nauchna praktichna konferentsiya. V. 28. Sofiya, 2012. P. 31–35 (in Russian).
14. Ogorodnikova S.Yu., Domracheva L.I., Gornostayeva E.A., Fokina A.I. Methodological approaches to quantitative determination of formazan in cyanobacterial cells // Current regional ecology and biodiagnostics living systems problems: Materialy XI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Kirov, 2013. P. 48–51 (in Russian).
15. GOST 26213-91. Soils. Methods of determining organic substance. M.: Gosudarstvennyy komitet standartizatsii i metrologii SSSR, 1991. 8 p. (in Russian).
16. Arinushkina E.V. Guidance on chemical analysis of soil. M.: MGU, 1970. 488 p. (in Russian).
17. MUK 4.1.1274-03. Measurement of the mass fraction of benzo(a)pyrene in samples of soil, ground, bottom sediment and solid waste with HPLC method using fluorometric detector (in Russian).
18. PND F 16.1:2.21-98. Methods of measuring mass fraction of petroleum products in soil and soil samples with fluorometric method using liquid analyzer «Fluorat-02». 26 p. (in Russian).
19. FR.1.31.2012.13573. Methods of measurement of mass fraction of toxic metals in soil samples by atomic absorption spectrometry. M., 2012. 16 p. (in Russian).
20. Motuzova G.V., Bezuglova O.S. Environmental monitoring of soil. M.: Akademicheskii proyekt, 2007. 237 p. (in Russian).
21. Fokina A.I., Olkova A.S., Skugoreva S.G., Lyalina E.I., Domracheva L.I., Berezin G.I., Darovskikh L.V. Studying toxicity of urbanozem samples contaminated with heavy metals // Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. 2016. V. 18. № 2(2). P. 544–550 (in Russian).
22. Maximum permissible concentration (MPC) of chemicals in soil. Hygienic standards. M.: Federalnyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2006. 15 p. (in Russian).
23. GN 2.1.7.2042-06. Roughly permissible concentration (RPC) of chemicals in soil. Hygienic standards. M.: Federalnyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2006. 11 p. (in Russian).