

На правах рукописи



Май Тху Лан

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКЦИИ И ПОЧВЫ
РИСОВЫХ ПОЛЕЙ ВЬЕТНАМА**

Специальность 03.02.08 – экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владимир – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств».

Научные руководители:

кандидат технических наук
доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник.

Черемных Елена Григорьевна
Воронина Людмила Петровна

Официальные оппоненты:

доктор сельскохозяйственных наук,
профессор, ГНУ Владимирский НИИСХ
Россельхозакадемии, заведующий отделом
агрофизики почвы

Зинченко Сергей Иванович

доктор ветеринарных наук, профессор, ГНУ
ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии Российской академии
сельскохозяйственных наук, заведующий
лабораторией ветеринарно-санитарной
экспертизы мяса, рыбы и других пищевых
продуктов

Долгов Виктор Андреевич

Ведущая организация: Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева

Защита состоится «13» июня 2013 г. в «11» часов на заседании диссертационного совета Д 212.025.07 во Владимирском государственном университете имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, корп. 1, ауд. 335.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых».

Автореферат разослан «09» мая 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



О.Н. Саخنo

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Рис для Вьетнама является основным продуктом питания, также он экспортируется во многие другие страны, в том числе и Россию. Поэтому очень важно иметь объективную оценку степени безопасности этого продукта, которая может быть получена из химических, биологических исследований и анализа современной экологической ситуации во Вьетнаме.

На фоне загрязнения диоксинами и разнообразными продуктами их трансформации во Вьетнаме используют разнообразные пестициды и регуляторы роста растений, которые могут модифицироваться и вступать в различные физико-химические взаимодействия. При среднегодовых температурах до +22 – +25°C и около 200 солнечных дней в году эти процессы проходят очень интенсивно. Еще больший вклад в преобразование таких компонентов вносят метаболические процессы почвенной биоты.

С одной стороны эти процессы приводят к детоксикации и очищению почв, но в некоторых случаях в результате метаболических процессов чужеродных соединений в микроорганизмах могут синтезироваться еще более опасные соединения, нежели исходные.

В связи с возможными разнообразными метаболитами, как диоксинов, так и используемых пестицидов на рисовых полях не представляется возможным оценить реальную картину загрязнений почв и опасности выращиваемой продукции с помощью лишь химико-аналитических методов. Поэтому для получения объективной оценки экологической ситуации во Вьетнаме необходимо использовать комплекс методов с использованием биотестирования, позволяющего экспрессно оценить всю совокупность токсических соединений как гидрофильных, так и гидрофобных.

Цель работы

Комплексная оценка безопасности продукции и почвы рисовых полей Вьетнама методами биотестирования и хроматомасс-спектрометрией.

Основные задачи исследования:

- модификация метода биотестирования, состоящая в оптимизации культивирования простейших для получения рабочей культуры со стабильной чувствительностью, а также разработка способа оптимальной подготовки проб почвы и риса;
- определение чувствительности тест-организмов к некоторым пестицидам и их комбинациям;
- сравнение образцов почвы со слабой средней и высокой токсичностью с результатами хроматомасс-спектрометрии для оценки адекватности биотестирования;
- проведение экологической оценки образцов почвы на трех биотестах;
- анализ качества продукции рисовых агроценозов автоматизированным методом

(БиоЛаТ) на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*;

– создание проекта рабочей методики биотестирования для оценки безопасности продукции рисовых агроценозов.

Научная новизна работы

Впервые на территории Вьетнама ранжированы агроценозы с учетом химической нагрузки пестицидами и проведен анализ токсичности почвы и продукции рисовых полей с помощью автоматизированного биотестирования на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*.

Для получения объективной оценки степени безопасности продукции агроценозов установлен и теоретически обоснован комплекс методов, состоящий из трех биотестов – на *Tetrahymena pyriformis*, *Daphnia magna Straus*, *Raphanus sativus*, и хроматомасс-спектрометрии.

Разработаны научные основы для методических работ по биотестированию, позволяющие увеличить стабильность и чувствительность культуры *Tetrahymena pyriformis*.

Выявлена специфика оценки токсичности с учетом совокупного действия на тест-организмы *Tetrahymena pyriformis* гидрофильных и гидрофобных ксенобиотиков.

Практическая значимость работы

Разработанный комплексный метод позволяет быстро и воспроизводимо определять степень безопасности растительного сырья и уровень загрязнения почв сельскохозяйственных полей. Биологическая оценка с использованием трех биотестов - на инфузориях, дафниях и семенах редиса представляется экспрессной, достоверной и не требует дорогих расходных материалов. Разработан новый способ экстракции из почв жирорастворимых соединений с помощью комплексного экстрагента, состоящего из ацетона и раствора желчи в этаноле, позволяющий повысить достоверность исследований.

Личный вклад автора

Все этапы работы были проведены лично автором или при его непосредственном участии: отбор и биотестирование на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* образцов риса и почв, а также обработка полученных результатов.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационного исследования докладывались и прошли апробацию на конференциях «Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации» (Киров, 2010), «Физическая химия – Теория, эксперимент, практика» (Коломна, 2011), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования» (Москва, 2011), «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 4 статьей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Благодарности

Я глубоко признательна научным руководителям к.т.н., Е.Г. Черемных и д.б.н. Л.П. Ворониной за неоценимую помощь в проведении работы, поддержку и советы. Особую благодарность выражаю д.х.н. Е.С. Бродскому, к.х.н. А.С. Баранову и к.б.н. Т.О. Попутниковой за помощь в выполнении аналитических исследований и биотестировании.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 110 страницах, содержит 22 таблицы и 56 рисунков. Список литературы включает 148 наименований, из них 80 зарубежных.

Защищаемые положения:

1. Комплексная оценка объективно отражает загрязнение агроценозов поллютантами.
2. Модификация способа культивирования простейших позволяет повысить их чувствительность.
3. Применение разработанного способа пробоподготовки почвенных образцов для биотеста на инфузориях повышает информативность результатов биотестирования и позволяет оценивать не только водорастворимые поллютанты, но и гидрофобные соединения, к которым принадлежит большинство используемых во Вьетнаме пестицидов.
4. Автоматизированное биотестирование на инфузориях может быть основой экологического мониторинга состояния почв и продукции рисовых агроценозов, т.к. характеризуется экспрессностью, объективностью и технологичностью.
5. Результаты комплексного биологического исследования на трех тест-организмах, принадлежащих к разным таксонам, объективно отражают загрязнение агроценозов пестицидами и другими антропогенными поллютантами (ПАУ, алканы).

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

1. Район, материалы, объекты и методы исследования

Район исследования. Пробы были отобраны на полях 11 районов Вьетнама в период 2010-2012гг. В таблице 1 и на рисунке 1 указаны районы отбора проб на сельскохозяйственных полях, а также используемые пестициды на этих полях.

Пестициды, используемые на полях отбора проб почвы и риса

№ пробы	Район отбора проб	Коммерческие названия используемых пестицидов	Активные вещества используемых пестицидов
1	Бинь Динь – Тйи фыок – Винь Тхань	Mullai 100WG	Bensulfuron methyl 100г/кг
2	Куанг Нам - Куе Шон - Куе Фу	Vitrako 40WG	Chlorantraniliprole 200г/кг и Thiamethoxam 200г/кг
3	Тхань Хоа - Ха Чунг - Ха Лонг	Trione 750WDG Kamsu 2SL Dantac 500SP Sachray 200wp Afumin 400WP	Tricyclazole: 750 г/кг Kasugamycin 2%, Cartap(97%), Acetamiprid 70г/кг + Imidacloprid 130г/кг, Iprobenfos 10г/кг+ Isoprothiolane 390 г/кг
4	Тхань Хоа - Ха Чунг - Ха Занг	Prevathon 5SC Annongaplau 100WP Abatimec 1.8	Chlorantraniliprole (min 93%) Buprofezin (min 98 %) Abamectin 1.8%
5	Бинь Зыонг - Тан Хйеп - Там Ной	Apphe 66EC	Alpha-cypermethrin 1.6% + Chlorpyrifos Ethyl 65 %
6	Нинь Тхуан - Нинь Шон - Лыонг Шон	Daphavil 50SC Motox 5 EC Viben-C 50BTN Victory 585EC Kisaigon 50DN	Carbendazim (min 98%), Alpha Cypermethrin 5%, Chlorpyrifos ethyl ,Benomyl 25%+Copper oxychlorid 25%, Chlorpyrifos ethyl 530g/l+cypermethrin 55g/l, Iprobenfos 50%
7	Куанг Бинь –Донг Хой-Дык Нинь –Тан Шон	Sutin 5ec Validan 3dd	Acetaminprid 3%(г/л)+Imidacloprid 2% (г/л), Validamycin A: 3%
8	Бак Лйеу - Фылк Лонг - Фонг Тхак - Тай А	Annong Manco 300SC Viben-C 50BTN, Hinosan 30EC	Mancozeb(min 85%) Benomyl 25%+Copper oxychlorid 25% Edifenphos 30%
9	Бинь Фыок – Хон Куанг –Ан Хыонг	Nativo 750WG Bassa 50EC	Trifloxystrobin 250г/л+Tebuconazole 500г/л Penobucarb 50%
10	Хо Ши Минь - Кы Чи - Фу Чунг - Фук Лой	Lorsban 30EC, Wavesuper 15SC	Chlorpyrifos ethyl 30% Indoxacarb 150 г/л
11	Куан Чи –Винь Линь – Хо Са	Ammate 150 SC	Indoxacarb 150г/л

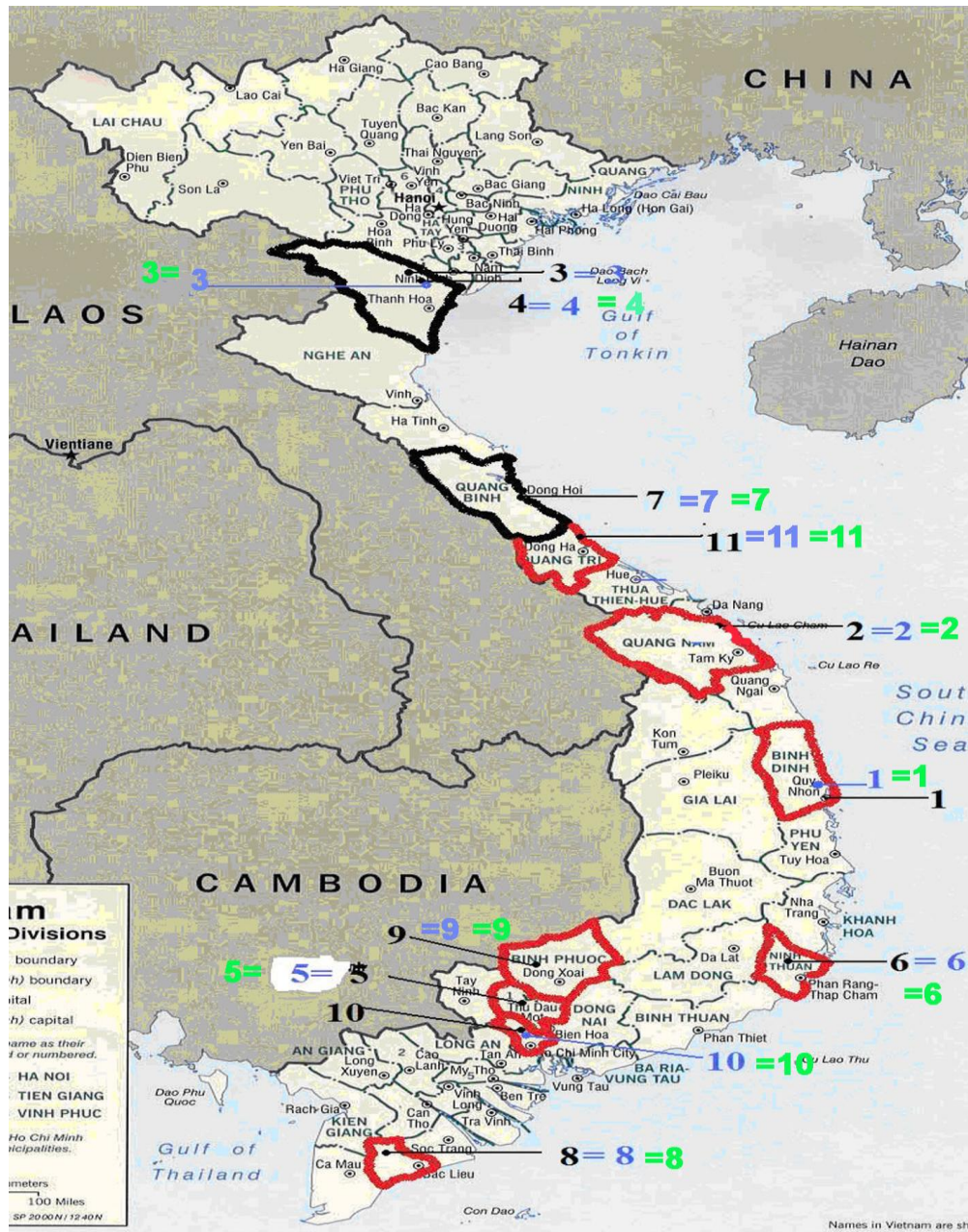


Рис. 1. Районы отбора проб продукции и почв рисовых полей

Объекты исследования – пробы почвы и риса с участков частных фермеров 11 районов Вьетнама.

Предмет исследования – особенность экологического состояния почв в контексте безопасности продукции сельскохозяйственных полей при регулярной неконтролируемой пестицидной нагрузке.

Методы исследования. В диссертации использовали следующие методы:

– Метод биотестирования на инфузориях с помощью прибора «БиоЛаТ 3». Принцип работы этого прибора состоит в программной обработке изображения лунок с инфузориями и пробами, для подсчета живых тест-организмов (Методические рекомендации «Автоматизированный метод оценки токсичности продовольственного сырья и кормов, объектов окружающей среды на инфузориях *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis*»

утв. РАСХН. 2009г).

– Метод биотестирования на дафниях. Исследование на дафниях проводили по методике биотестирования по гибели ракообразных *Daphnia magna Straus* (ПНД ФТ14.1:2:4.12-06). В соответствии с этой методикой устанавливается различие между количеством погибших дафний в пробе и контроле (культивационной воде).

– Метод фитотестирования. Использование этого метода для определения суммарной токсичности. Фитотест основан на высокой отзывчивости семян редиса и ячменя на токсические вещества. Расчет ведется путем учета снижения длины корней проростков семян в растворах препаратов вытяжек из анализируемых образцов почвы по сравнению с контролем, выраженное в процентах (Практикум по агрохимии. Уч. пособие -2изд, под ред. Ак.РАСХН В.Г. Минеева из-во МГУ, 2001).

– Хромато-масс-спектрометрия. Анализ экстрактов проводили на хромато-масс-спектрометрической системы Polaris Q (ThermoFinnigan) в режиме деления потока 1:20. Условия анализа: кварцевая капиллярная колонка 30 м x 0,25 мм с неподвижной фазой SGE ВРХ-5 (слой 0,25 мкм), программирование температуры от 60°C (выдержка 2 мин) до 300°C со скоростью 10°C/мин (выдержка 6 мин), температура инжектора 240°C, интерфейса – 240°C, ионизация электронным ударом при энергии электронов 70 эВ, в режиме сканирования полного масс-спектра в интервале 41-550 а.е.м. Газ-носитель He 0,8 мл/мин. Идентификацию производили по характеристическим ионам и временам удерживания, оценку содержания компонентов – по методу внутреннего стандарта.

– Для обработки результатов биотестирования использованы статистические методы в соответствии с «Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов» РЭФИА, НИИ-Природа Москва-2002.

2. Результаты исследования и обсуждение

2.1 Оптимизация культивирования инфузорий *Tetrahymena pyriformis*

Стабильная чувствительность тест-организмов для биотестирования имеет важнейшее значение, кроме того, технология получения тест-организмов должна быть простой и воспроизводимой в широкой практике. Основные факторы, влияющие на метаболизм простейших и их чувствительность к поллютантам это – температурные условия, фаза развития культуры и пищевой рацион.

Выбраны следующие условия культивирования:

- Температурные условия: 25°C;
- Фаза развития культуры: фаза роста культуры;

– Пищевой рацион: 4-х компонентная среда, в которой на 100мл дистиллированной воды вносят пептона (от 0,1 до 4г), глюкозы (0,5г), дрожжевого экстракта (0,1г) и NaCl (0,1г).

Вместо пептона мы использовали панкреатический гидролизат казеина (триптон), его оптимальную концентрацию находили опытным путем, культивируя инфузорий на среде с 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 и 4% этого компонента среды. Кривые роста культуры в течение 8 суток на средах с разной концентрацией гидролизата казеина показаны на рис.2.

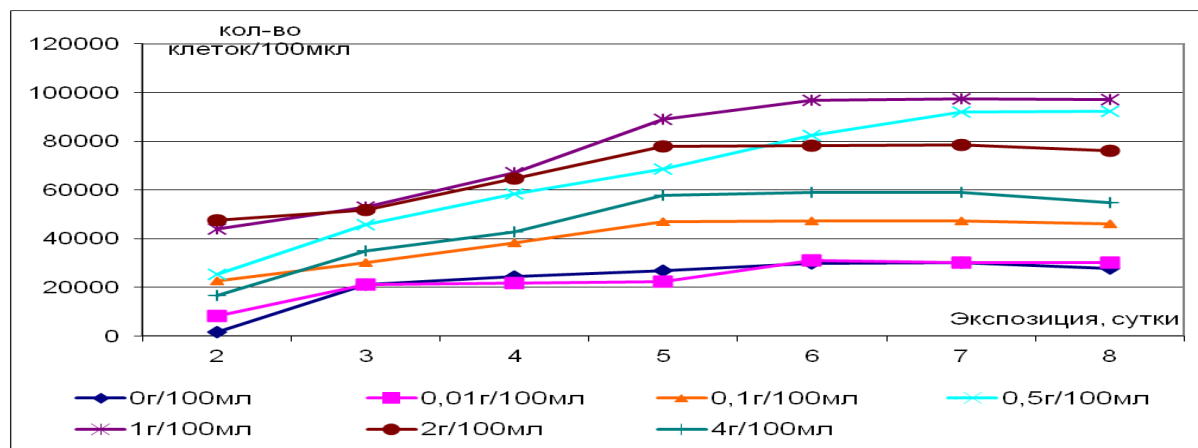


Рис. 2. Изменение количества клеток *Tetrahymena pyriformis* при культивировании в среде с разными концентрациями триптона

Для регулярного обеспечения исследований тест-организмами со стабильной чувствительностью хранили маточную культуру в холодильнике при температуре +10°C. Рабочую культуру получали на 3-5 сутки после пересева из маточной культуры и культивирования в термостате при температуре +25°C.

Чувствительность инфузорий, культивированных в среде с разной концентрацией пептона, оценивали по их реакции на растворы сульфата меди после культивирования в термостате через 3, 4 и 5 суток. После отмывания водой инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, выращенных на средах с разной концентрацией триптона помещали их в лунки планшета прибора БиоЛаТ (около 100 клеток в лунку), добавляли 300мкл раствора сульфата меди в концентрации 0,0001 и 0,00005 мг/мл. Через 24 часа оценивали суточные относительные коэффициенты роста по сравнению с коэффициентом роста в дистиллированной воде:

$$K_{\text{отн}} = K_{\text{пробы}} / K_{\text{воды}}, \quad \text{где: } K_{\text{воды}} = 2,42$$

Таблица 2

Коэффициенты суточного роста инфузорий в растворах сульфата меди, при культивировании их в средах с разными концентрациями пептона

Концентрация CuSO_4 0,0001мг/мл				
Концентрация триптона, %	Возраст культуры, сутки			ср.кв.откл., $\delta K_{\text{отн}}$
	3	4	5	
0	0	0,22	0	0,127017

0,1	0	0,27	0	0,155885
0,5	0,43	0,47	0,44	0,020817
1	0,48	0,55	0,64	0,080208
2	0,55	0,56	0,68	0,072342
4	0	0,12	0	0,069282
Концентрация CuSO₄ 0,00005мг/мл				
Концентрация триптона, %	Возраст культуры, сутки			ср.кв.откл., $\delta K_{отн}$
	3	4	5	
0	0,39	0,18	0,18	0,121244
0,1	0,51	0,37	0,37	0,080829
0,5	0,78	0,76	0,76	0,011547
1	0,8	0,86	0,86	0,034641
2	0,84	0,80	0,85	0,057741
4	0,23	0,35	0,35	0,069282

Очевидно, что в среде с концентрацией триптона 0,5% чувствительность 3, 4, и 5 суточных инфузорий наиболее близкая, т.к. относительные коэффициенты роста в растворах сульфата меди в этих разновозрастных тест-организмов имеют наименьшее среднее квадратичное отклонение.

Прием пересадки культуры из маточной, хранимой в холодильнике, стабильная температура культивирования (+25°C) рабочей культуры, искусственная среда с концентрацией триптона 0,5% позволяют иметь культуру со стабильной чувствительностью каждый день.

2.2 Чувствительность инфузорий к некоторым пестицидам и их комбинациям

Для оценки чувствительности *Tetrahymena pyriformis* к пестицидам были исследованы следующие пестициды: циперметрин(1) (ПДК 0,02мг/кг), диметоат(2) (ПДК 0,1мг/кг), диазинон(3) (ПДК 0,1мг/кг), γ -ГХЦГ(4) (ПДК 0,1мг/кг), имидаклоприд(5) (ПДК 0,1мг/кг), 4,4 ДДТ(6) (ПДК 0,1мг/кг), и глифосат(7) (ПДК 0,5мг/кг). Пестициды 1-6 являются гидрофобными соединениями, растворимыми в ацетоне, а глифосат хорошо растворим в воде. Пестициды 1-6 были отдельно растворены в ацетоне с концентрацией по пестициду 2% в каждом растворе. 5мл каждого раствора разбавлены 5мл раствора желчи в этаноле (комплексный растворитель). Затем 0,2мл каждого раствора введены в 10мл дистиллированной воды, эти растворы, их разведения, кратные 10 и комбинации пестицидов в растворах оценивали в опыте на инфузориях. При этом в каждой комбинации пестицидов начальная суммарная их концентрация составляла 1%, а в кратные разведения водой добавляли комплексный растворитель до 2%. Глифосат растворяли в воде в разных концентрациях. Коэффициенты суточного роста показаны в таблице 3. Контроль для водно-ацетоновых растворов пестицидов – 2% раствор комплексного растворителя в дистиллированной воде и коэффициент суточного роста инфузорий в этом растворе: $K_{раств} =$

2,28±0,105, а для глифосата контроль – дистиллированная вода ($K_{\text{вода}}=2,43\pm0,064$).

Растворы отдельных пестицидов 1, 2, 4, 6 в концентрации пестицида 0,2мг/л вызывают рост клеток выше, чем в контроле. А пестицид 6 (4,4-ДДТ) оказывает такое же действие и в концентрации 0,02мг/л. Такая стимуляция метаболизма клеток малыми дозами токсикантов является закономерной и характеризует индуцированный синтез ферментов, участвующих в метаболизме гидрофобных соединений. Для большинства комбинаций из двух пестицидов коэффициент роста культуры при концентрации токсикантов 0,2мг/л меньше, чем в контроле, эффект стимуляции метаболизм наблюдается только для сочетаний: диметоат – γ -ГХЦГ и γ -ГХЦГ–имidakлоприд. Комбинация из шести гидрофобных пестицидов является гораздо более токсичной, чем комбинации пар и отдельных пестицидов. Скорее всего, имеет место синергическое действие этих токсикантов. Глифосат в концентрации 0,2мг/л вызывает снижение роста культуры (68% от контроля), а в концентрации 0,02мг/л снижение незначительное - 89% от контроля.

Таблица 3

Коэффициенты суточного роста инфузорий в растворах пестицидов

Растворы пестицидов	Разведения проб			
	1:10	1:100	1:1000	1:10000
	Концентрация пестицида в пробе			
	20мг/л	2мг/л	0,2мг/л	0,02мг/л
циперметрин (1)	1,25±0,074	2,06±0,01	3,5±0,088	2,23±0,024
диметоат (2)	0,83±0,091	2,18±0,009	3,65±0,031	2,34±0,09
диазинон (3)	0,63±0,039	1,7±0,024	2,23±0,048	2,33±0,043
γ -ГХЦГ (4)	1,27±0,011	2,29±0,053	2,48±0,11	2,24±0,047
имidakлоприд (5)	0,95±0,08	2,17±0,081	2,37±0,072	2,28±0,065
4,4 ДДТ (6)	0,83±0,076	2,35±0,045	2,9±0,034	2,84±0,081
(1)+(2)	0,24±0,003	1,03±0,08	1,75±0,006	2,23±0,005
(1)+(3)	0	0	0,98±0,011	2,14±0,073
(1)+(4)	0,46±0,012	1,08±0,03	1,62±0,033	2,31±0,055
(1)+(5)	0,67±0,008	1,54±0,062	1,94±0,09	2,29±0,012
(1)+(6)	0,68±0,073	1,02±0,09	1,86±0,024	2,44±0,04
(2)+(3)	0,11±0,01	0	1,37±0,07	1,78±0,061
(2)+(4)	0	2,01±0,093	2,38±0,082	2,29±0,033
(2)+(5)	0	1,84±0,044	2,15±0,061	2,19±0,018
(2)+(6)	0,13±0,009	0,19±0,74	1,62±0,09	2,41±0,06
(3)+(4)	0	0	1,74±0,035	2,09±0,017
(3)+(5)	0	0	1,68±0,061	2±0,01
(3)+(6)	0	0	1,42±0,07	2,11±0,043
(4)+(5)	0,77±0,018	1,21±0,095	2,36±0,042	2,45±0,022
(4)+(6)	0,69±0,025	1,93±0,042	2,12±0,081	2,28±0,08
(5)+(6)	0,25±0,007	1,17±0,052	1,59±0,084	2,46±0,035
(1)+(2)+(3)+(4)+(5)+(6)	0	0	0,83±0,007	2,07±0,092
глифосат (7)	0	0	1,57±0,023	2,03±0,095

2.3 Оценка водорастворимых и гидрофобных поллютантов почвы рисовых полей по реакции тест-организмов *Tetrahymena pyriformis*

2.3.1 Подготовка проб почвы

Из анализа растворимости активных веществ пестицидов разрешенных во Вьетнаме пестицидов следует что, хорошо растворимых соединений в ацетоне – 78,5%, растворимых в воде – 16,1%, растворимых в других растворителях – 5,4%. Кроме того, в почве и поверхностных водах этой страны обнаруживаются такие гидрофобные пестициды, как ДДТ, γ -ГХЦГ и алдрин, разрешенные до 1998 года. Поэтому для получения объективной картины загрязнения использовали 2 способа подготовки проб почвы – водная экстракция и экстракция комплексным экстрагентом, состоящим из равных количеств ацетона, раствора желчи крупного рогатого скота (КРС) в этаноле и 20% воды (8мл ацетона + 8мл раствора желчи в этаноле + 4мл дист.воды). Получали водные экстракты почвы при соотношении 1:10 (измельченная почва/дистиллированная вода), а экстракты с комплексным экстрагентом при соотношении 10г измельченной почвы на 20мл экстрагента.

Эффективность экстракции из почвы гидрофобных соединений комплексным экстрагентом оценили с помощью хромато-масс-спектрометрической системы Polaris Q, на которой исследовали модельные пробы, содержащие ДДТ и γ -ГХЦГ. Модельные пробы готовили на основе образца почвы №1, в которую добавляли по 1мкг указанных пестицидов на 5г измельченной почвы (табл.4). Экстракция предложенным экстрагентом гидрофобных соединений из почвы по отношению к стандартному экстрагенту – дихлорметану составляет для γ -ГХЦГ и ДДТ 88,3% и 71,5%, соответственно.

Таблица 4

Результат аналитического определения пестицидов в модельных пробах

№ модельной пробы	Экстрагент	γ -ГХЦГ		ДДТ	
		Внесено пестицида, мкг/5г почвы	Количественная оценка, отн.ед.	Внесено пестицид, мкг/5г почвы	Количественная оценка, отн.ед.
1м	Дихлорметан	1	0,883±0,004	1	0,283±0,002
2м	Комплексный (ацетон + р-р желчи в этаноле)	1	0,685±0,051	1	0,215±0,018
3м	Комплексный (ацетон + р-р желчи в этаноле)	1	0,875±0,064	–	–
4м	Комплексный (ацетон + р-р желчи в этаноле)	–	–	1	0,19±0,024
Среднее при экстракции комплексным экстрагентом			0,78		0,203
Эффективность по отношению к пробе с экстрагентом - дихлорметаном (1м)			88,3%		71,5%

Таким образом, эффективность экстракции комплексным экстрагентом на основе ацетона и раствора желчи в этаноле для гидрофобных пестицидов составляет 88,3% для γ -ГХЦГ и 71,5% для ДДТ. Поэтому эти гидрофобные соединения целесообразно оценивать с помощью биотестов, используя в качестве проб растворы в воде экстрактов почв с предлагаемым комплексным экстрагентом.

2.3.2 Биотестирование на инфузориях модельных образцов

Модельные образцы почвы 2м, 3м, 4м были оценены с помощью биотеста на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* с экспозицией 24 часа. Первым контролем служил образец почвы №1 (контроль 1) без дополнительного внесения пестицидов, на основе которого получены модельные образцы, а вторым контролем служил комплексный экстрагент (контроль 2). Все образцы почвы экстрагировали в течение 2х часов на шейкере, полученный экстракт разбавляли дистиллированной водой до 1% по растворителю. Результаты показаны на диаграмме рис.3.

Во всех модельных пробах с пестицидами суточный рост клеток меньше, чем в первой и второй контрольных пробах. Разница между пробами и контролем незначительная, но и содержание пестицидов в 1% водном растворе экстрактов также невелико – около 8×10^{-4} мг/мл.

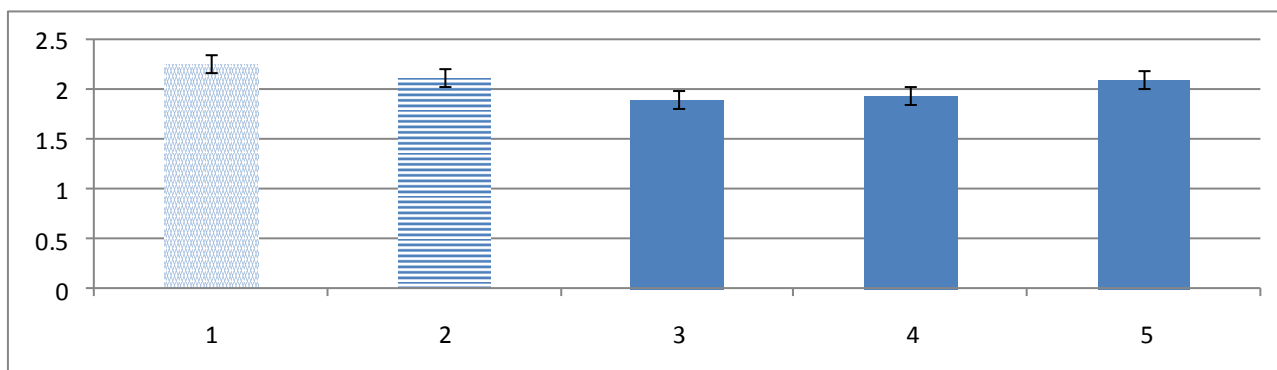


Рис. 3. Рост культуры клеток *Tetrahymena pyriformis* в модельных пробах

Биологическая оценка на инфузориях проб почвы при подготовке проб с помощью комплексного экстрагента позволяет выявить поллютанты нерастворимые в воде. Эти соединения, как правило, не доступны растениям и, соответственно, не могут загрязнять сельскохозяйственную продукцию, но почвенная биота постепенно метаболизирует и такие стойкие поллютанты, превращая их в доступные для растений соединения. Поэтому, оценивая на инфузориях не только водорастворимые, но и гидрофобные соединения, получаем общую картину загрязнения, доступными и потенциально доступными для растений и человека поллютантами, которые могут аккумулироваться в зерне в последующие вегетационные периоды.

2.3.3 Оценка токсичности 11 образцов почвы на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*

Пробы для оценки образцов почвы, отобранной в 2010г с 11 полей в разных районах Вьетнама (табл. 1) готовили в 2х вариантах – в виде водного экстракта (10г почвы на 100мл воды) и в виде 2% водного раствора комплексного экстракта (8мл ацетона+8мл раствора желчи в этаноле+4мл воды). Экстрагировали 2 часа на шейкере.

Величина коэффициента роста культуры в водном растворе комплексного экстрагента служит контрольной при оценке растворов экстрактов образцов почвы. Контролем для водных экстрактов является коэффициент роста культуры в дистиллированной воде - $K_{кв}$.

Показатель токсичности исследуемых образцов определяли по формулам:

$$T_{\text{водн}} = ((K_{кв} - K_{ов}) / K_{ов}) 100\% \quad (1)$$

$$T_{\text{экстр}} = ((K_{кэ} - K_{оэ}) / K_{кэ}) 100\% \quad (2)$$

Где: $T_{\text{водн}}$ – показатель токсичности образцов почвы при подготовке проб для биотеста с помощью водной экстракции; $T_{\text{экстр}}$ – показатель токсичности образцов почвы при подготовке проб для биотеста с помощью комплексного экстрагента; $K_{кв}$ – коэффициент роста в дистиллированной воде (контроль 1); $K_{кэ}$ – коэффициент роста в водном растворе комплексного экстрагента (контроль 2); $K_{ов}$ – коэффициент роста в пробе почвы при экстракции водой; $K_{оэ}$ – коэффициент роста в пробе почвы при экстракции комплексным экстрагентом.

Коэффициенты роста в водных пробах 11 образцов почвы и водных растворах комплексных экстрактов представлены на диаграммах рис.4, 5. Горизонтальная линия обозначает уровень коэффициента роста в контроле, для водных экстрактов контролем является суточная экспозиция тест-организмов в воде, а для водных растворов экстрактов комплексным экстрагентом образцов почвы – в водном растворе комплексного экстрагента.

Показатели токсичности, соответствующие водным и комплексным экстрактам, и вычисленные по формулам 1, 2, показаны на диаграммах рис.6, 7.

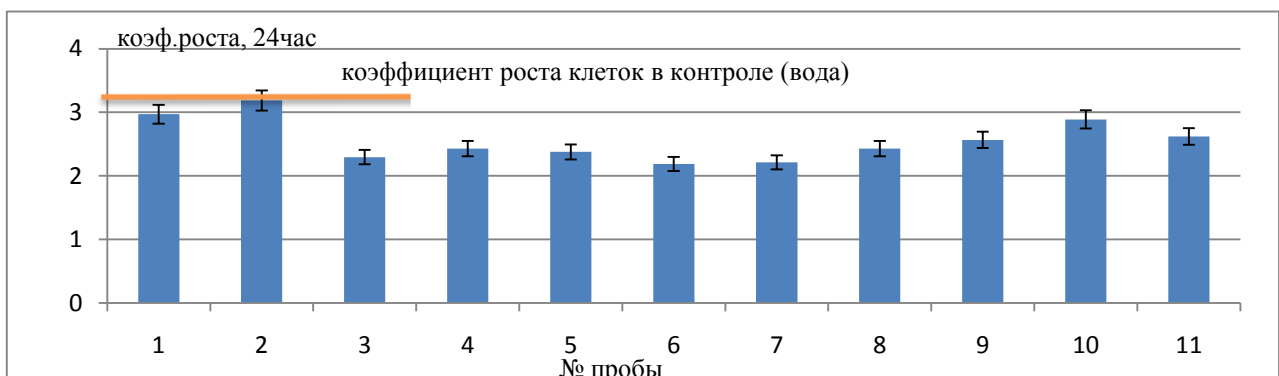


Рис. 4. Коэффициент роста культуры *Tetrahymena pyriformis* в водных экстрактах проб почвы рисовых полей Вьетнама

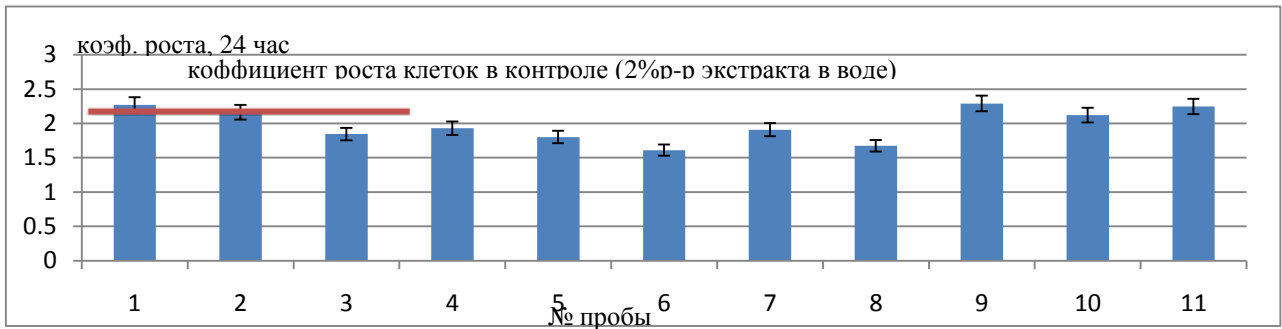


Рис. 5. Коэффициент роста культуры *Tetrahymena pyriformis* в водных растворах комплексных экстрактов почвы рисовых полей Вьетнама

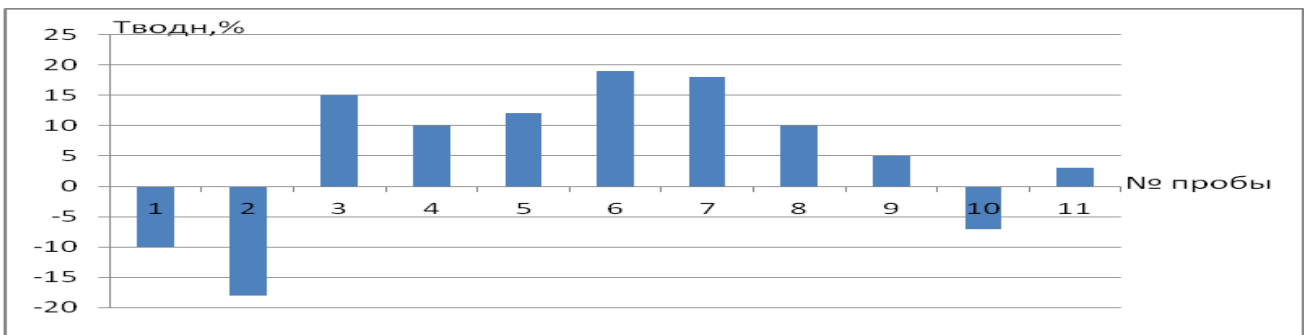


Рис. 6. Показатель токсичности водных экстрактов образцов почвы

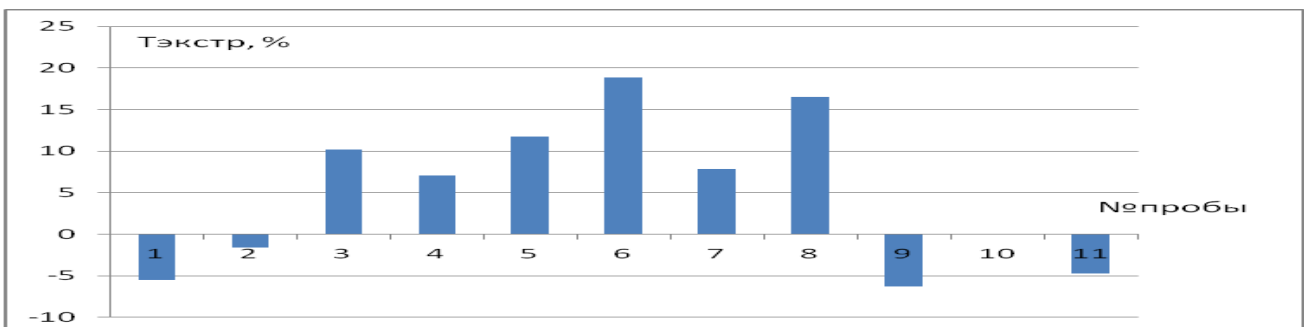


Рис. 7. Показатель токсичности водных растворов комплексных экстрактов образцов почвы

Критерием токсичности в соответствии с методом на дафниях (ПНД ФТ14.1:2:4.12-06), считается, что при отношении результатов биотеста «проба/контроль» больше или равным 10% исследуемая проба токсична.

Отрицательная токсичность отражает более высокий рост культуры в образцах почвы по сравнению с контролем, для водных экстрактов контроль – дистиллированная вода, для водных растворов комплексных экстрактов контроль – 2% водный раствор комплексного экстрагента.

При сравнении диаграмм рис. 6, 7 водных и растворов комплексных экстрактов обнаружена разница между уровнями токсичности проб 7, 8, 9. Разные уровни токсичности говорят о разных соотношениях гидрофильных и гидрофобных токсикантов, присутствующих в пробах.

2.3.4 Биотестирование на дафниях

Для подтверждения полученных результатов токсичности на инфузориях образцы почвы оценивали с помощью биотестирования на дафниях. Результаты показаны на рис.8.

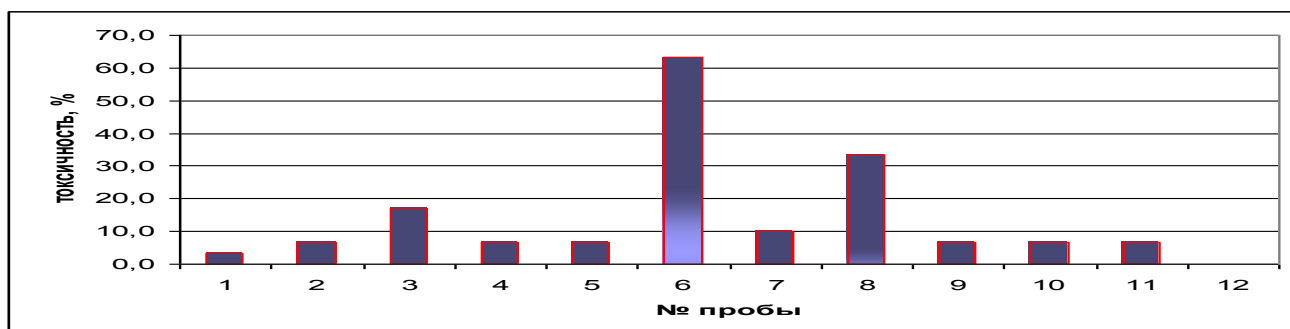


Рис. 8. Токсичность образцов почвы для дафний

По этому биотесту самым токсичным является образец 6, далее по убыванию токсичности – 8 и 3. Остальные образцы нетоксичны. Поскольку экстракцию почвенных образцов осуществляли только водную, то сравнение с результатами на инфузориях можно проводить по результатам биотеста на инфузориях также на водных пробах. Эти образцы (№6, 8, и 3) оказались самыми токсичными и для инфузорий.

2.3.5 Определение агрохимической характеристики почв и фитотестирование образцов почвы

Результаты фитотестирования зависят не только от токсичных соединений, но и от количества питательных элементов (углерода, фосфора, калия) и pH образцов почвы. Поэтому для учета влияния этих факторов определяли агрохимическую характеристику всех образцов (таблица 5). Анализ результатов почвенной кислотности колеблется в пределах от 4 до 5, т.е. почвы слабо-кислые, причем самое низкое значение pH имеет образец №6 – 3,79, а самое высокое образец №3 – 5,12. Процентное содержание органического углерода самое низкое в образцах №6 и 10 (менее 1,0), а самое высокое в образце №4 – 3,35%, в других значение колеблется от 1,35 до 1,92%. Все образцы с №1 по 7 очень слабо обеспечены подвижным фосфором (менее 5,0мг/100г почвы), слабо обеспечены этим элементом образцы 10 и 11 (с 5 – до 10), и очень высокая обеспеченность установлена в образцах 8 (146мг/кг) и 9 (201мг/кг). Результаты суммарной фитотоксичность по длине корней тест-культуры редиса представлены в таблице 6.

Таблица 5

Агрохимическая характеристика

№ на карте	Агрохимическая характеристика			
	pH (солев.)	C, %	P ₂ O ₅ , мг/100г	K ₂ O, мг/100г
1	3,86	1,92	0,97	48,2
2	4,07	1,58	1,74	29,0

3	5,12	1,71	0,17	30,5
4	4,98	3,35	5,24	49,4
5	4,27	1,37	2,90	32,5
6	3,79	0,76	0,88	15,3
7	3,9	1,35	0,35	41,2
8	4,01	1,62	14,60	34,1
9	4,21	1,45	20,10	113,7
10	3,97	0,73	7,90	76,5
11	4,14	1,68	8,19	64,3

Таблица 6

Интегральная оценка фитотоксичности (% по отношению к контролю) образцов почвы

№	Корень (редис)	Корень (ячмень)	Колеоптиль (ячмень)	Интегральный коэффициент
1	87	100	78	88
2	85	49	86	73
3	68	61	37	56
4	93			93
5	88	100	85	91
6	100	83	100	94
7	82			82
8	85	59	100	81
9	87			87
10	76	67	92	78
11	86	71	73	77

Анализ результатов по фитотестированию с использованием семян редиса свидетельствует, что изменения в агрохимических показателях не отразились на результатах токсичности, проявляющейся в водных вытяжках анализируемых почвенных образцов. Согласно представленным в таблице результатам образцы по фитотоксичности можно ранжировать следующим образом: 3>2>10-11>8.

Результаты 3-х биотестов почвы оценили с помощью корреляционного анализа. Результаты биотеста на инфузориях (водные экстракты) и дафниях достаточно хорошо коррелируют (табл.7), а биотест на проростках с биотестом на дафниях и инфузориях имеют отрицательную корреляцию (табл. 7). Наиболее загрязненными почвенными образцами, характеризующимися выраженной фитотоксичностью явились образцы №3, 2 и №10. Эта оценка степени токсичности существенно отличается от результатов биотестирования на дафниях и инфузориях. Это связано с особенностями растительных тест-организмов, для которых некоторые органические поллютанты (в частности, диоксины) присутствующие в пробах почв, могут обладать гормоноподобным стимулирующим действием.

Комплексная оценка почвы с помощью 3х биотестов дифференцированно выявляет образцы токсичные для животных организмов и растительных. Это может служить для дальнейшего выбора растений при ремедитации загрязненных почв.

Корреляционный анализ результатов 3х биотестов

№ пробы	Биотест на инфузориях, коэф. суточного роста (И)	Биотест на дафниях, кол-во выживших дафний (Д)	Фитотест, длина корня редиса по сравнению с контролем, % (Ф)
1	2,9	9,7	87
2	2,6	9,3	85
3	1,8	7	68
4	2,4	9	93
5	2,3	8	88
6	1,7	3,7	100
7	2,1	9	82
8	1,8	6,7	85
9	2,5	9,3	87
10	2,7	9,3	76
11	2,5	9,3	86
Коэффициент корреляции	$r(И:Д) = 0,8485$	$r(Д:Ф) = -0,3177$	$r(И:Ф) = -0,0376$

2.3.6 Оценка образцов почвы хромато-масс-спектрометрическим методом и анализ результатов биотестирования на разных тест-организмах

Результат хроматомасс-спектрометрии показан в таблице 8.

Таблица 8

Относительное содержание токсических соединений в 3х образцах исследуемых почв

Компонент (мкг/г)	Образцы		
	1	3	4
Фенол	0,02	0,14	<0,01
Фенол-ацетат		0,26	0,12
Бензофенон	0,12	0,62	0,19
Диметилфталат	0,004	0,08	0,01
Диэтилфталат	0,01	0,1	0,04
Диизобутилфталат	0,28	1,45	1,06
Дибутилфталат	0,67	1,91	1,24
Ди (2-этилгексил) фталат	2,85	2,6	0,64
2,6-дитретбутилфенол	0,02	0,53	0,04
Толуол	0,13	0,09	0,06
Этилбензол	0,002	0,01	0,01
М- и п-ксилолы	0,02	0,05	0,04
О-ксилол	0,03	0,02	0,02
Ди- и полиметилбензолы	0,08	0,12	0,13
Стирол	<0,002	<0,002	0,004

Нафталин	0,02	0,09	0,03
Метилнафталины	0,1	0,05	0,01
Ди- и пролиметилнафталины	0,003	0,03	0,01
Фенантрен	0,08	0,28	0,07
Антрацен	0,003	0,01	0
Метилфенантрены	0,09	0,2	0,13
Аценафтен	0,03	0,06	0,01
Аценафтилен	<0,001	0,58	0,001
Флуорен	0,01	0,13	0,004
Флуорантен	0,05	0,07	0,02
Пирен	0,03	0,05	0,01
Хризен	0,01	0,02	<0,01
Сумма ПАУ, фталатов и фенолов	4,662	9,55	3,899
Пестициды и их метаболиты			
γ-гексахлорциклогексан	<0,01	0,06	0,21
Гексахлорбензол	0,04	0,16	0,08
Тетрахлорфенол	0,02	0,28	0,03
Трихлорфенол	0,001	0,03	0,01
Дихлорфенол	<0,01	0,01	0,01
ДДТ	<0,01	0,01	<0,01
ДДД	<0,01	0,03	0,01
ДДЕ	0,01	0,02	0,02
Сумма пестицидов	0,071	0,6	0,37
Н-алканы			
Н-алканы < C20			
C10		0,03	0,03
C11		0,04	0,01
C12		0,03	0,01
C13	0,02	0,07	0,02
C14	0,03	0,53	0,1
C15	0,03	0,61	0,07
C16	0,09	1,46	0,22
C17	0,37	0,45	0,16
C18	0,07	0,69	0,13
C19	0,02	0,09	0,05
C20	0,07	0,41	0,06
Сумма алканов <C20	0,7	4,41	0,86
Н-алканы > C20			
C21	0,05	0,28	0,1
C22	0,07	0,23	0,05
C23	0,26	0,31	0,11
C24	0,09	0,15	0,04
C25	0,54	0,48	0,1
C26	0,12	0,2	0,04

C27	0,55	0,81	0,14
C28	0,12	0,17	0,04
C29	0,61	1,16	0,25
C30	0,09	0,14	0,03
C31	0,49	0,58	0,25
C32	0,05	0,04	0,04
C33	0,21	0,28	0,18
C34	0,01		0,01
C35	0,05		0,05
Сумма алканов >C20	3,31	4,83	1,43

Частичные суммы токсических соединений четырех групп использованы для обобщенного анализа результатов биотестирования. В таблице 9 показаны обобщенные результаты биотестирования и аналитических результатов по 3 образцам почв.

Таблица 9

Результаты биотестирования и аналитического определения токсических соединений в 3х образцах почв рисовых полей Вьетнама

№ образца	Биотестирование				Хромато-масс-спектрометрия			
	Инфузории Токсичность, %		Дафнии Токсичность, %	Фитотест Длина корня, %	Сумма ПАУ, относ. ед.	Сумма пестицидов, относ. ед	Сумма алканов в <C20, относ. ед	Сумма алканов в >C20, относ. ед
	Водные экстракты	Водные растворы комплекс. экстрактов	Водные экстракты	Водные экстракты				
1	-10	-5	3	87	4,660	0,071	0,70	3,31
3	15	10	17	68	9,550	0,610	4,41	4,83
4	10	7	7	93	3,899	0,370	0,86	1,43

По результатам биотестирования на инфузориях и дафниях шкала безопасности образцов почвы от нетоксичного к токсичному: 1 – 4 – 3. Эта шкала коррелирует с содержанием пестицидов. Аналогичная шкала по фитотесту: 4 – 1 – 3 коррелирует с содержанием ПАУ и алканов.

Таким образом, используя комплекс биотестов на инфузориях и фитотест можно определять суммарную токсичность выделять причины, обуславливающие ингибирующее действие разных групп токсикантов на тест-организмы. Для более детального исследования и понимания причин токсичности выявленных загрязненных участков после биотестирования целесообразно использовать аналитические методы. Таким образом, повышается эффективность оценки токсичности почв и уменьшается себестоимость исследований.

2.4 Биотестирование образцов риса на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*

Для зерновых объектов, таких как рис, содержащих большое количество крахмала и мало липидов, оценить совокупное биологическое действие логично с помощью водных

экстрактов образцов. При подготовке проб концентрация размолотого риса в воде составляет 3%. Для нивелирования разного содержания белка в образцах (0,4-2%) в пробы добавлен триптон в концентрации 0,1%. Результат показан на диаграмме рис.9. Номера проб риса соответствуют номерам проб почвы.

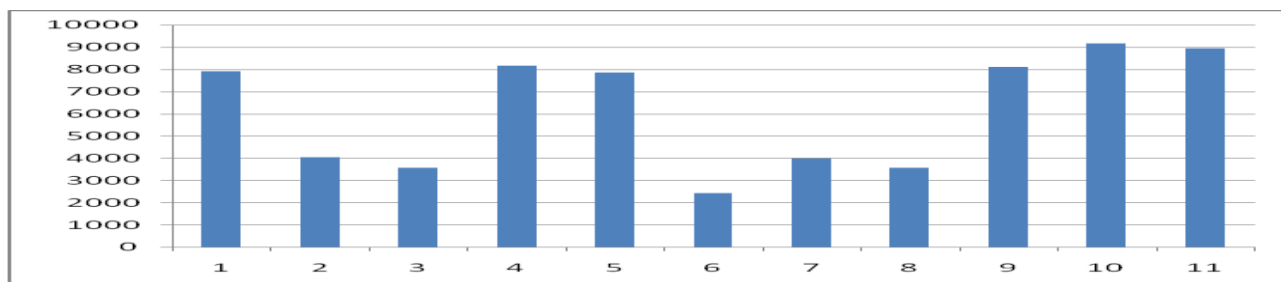


Рис. 9. Количество клеток в 100мкл проб после 8 суток культивирования с добавлением триптона

По результатам опыта (рис. 10) составить шкалу «Степень безопасности» образцов риса:



Рис. 10. Шкала токсичности образцов водных экстрактов риса

Максимальный рост культуры инфузорий наблюдается в пробах 1, 4, 5, 9, 10 и 11 (подмножество 1). Минимальный – в образцах 2, 3, 6, 7, 8 (подмножество 2). Таким образом, все образцы зерна можно разбить на 2 группы: с положительным и ингибирующим действием на клеточный метаболизм. Поскольку кроме токсичных элементов пищевые компоненты зерна являются еще одним фактором, воздействующим на рост культуры, необходимо результаты биотестирования продукции анализировать вместе с результатами биотестирования почв, на которых данная продукция выращена. Тем самым повышается достоверность биотестирования.

Анализ результатов биотестирования образцов риса и почв, на которых рис выращен, показывает, что почвы полей, с которых отобраны образцы 3, 6 и 8 являются наиболее загрязненными, а продукция этих полей может содержать токсические соединения.

2.5 Алгоритмы подготовки проб почвы и риса при комплексном биотестировании на инфузориях

Способы подготовки проб, изложенные в предыдущих разделах, сформулированы в алгоритмах подготовки проб (рис.11, 12 и 13) и служат основой для создания методики мониторинга агроценозов с помощью биотестирования на инфузориях, а прибор БиоЛаТ позволяет реализовать разработанную технологию исследования.

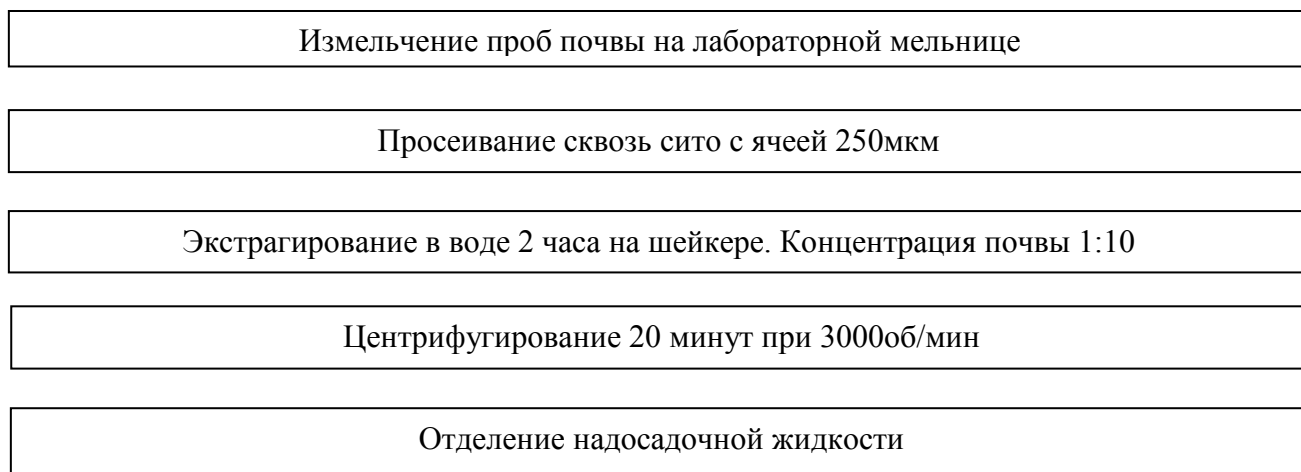


Рис. 11. Алгоритм подготовки водных проб почвы рисовых полей Вьетнама.

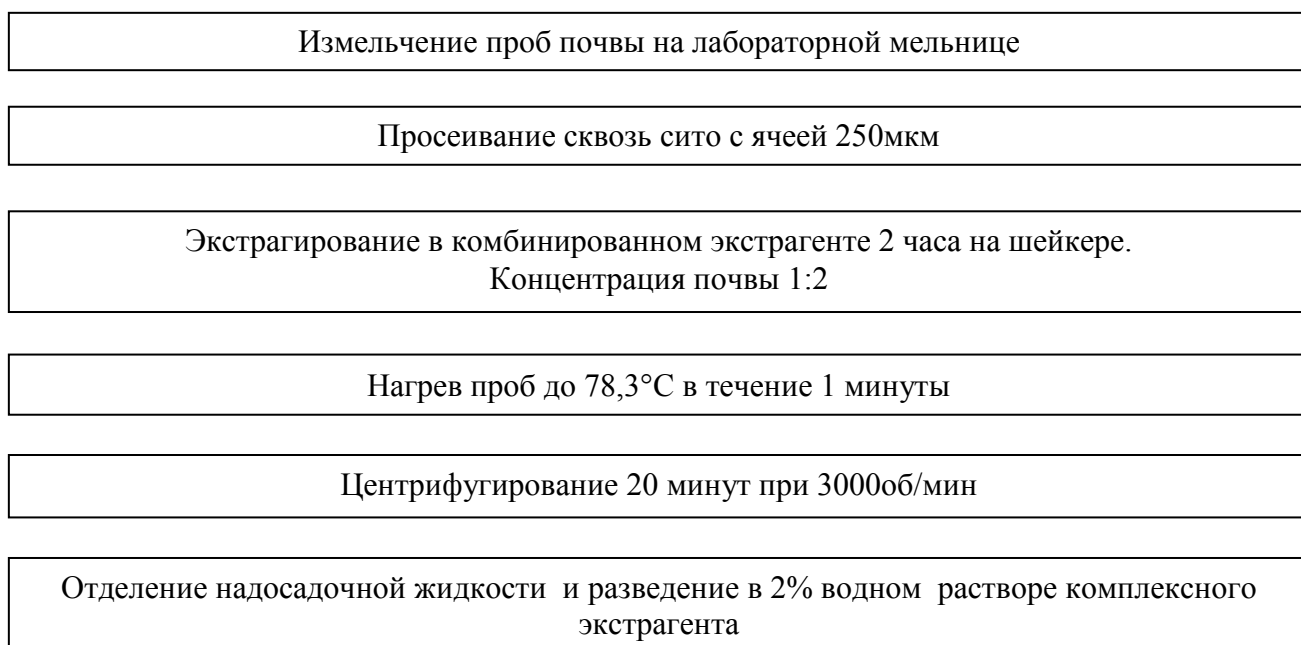


Рис. 12. Алгоритм подготовки проб почвы с помощью комбинированного экстрагента

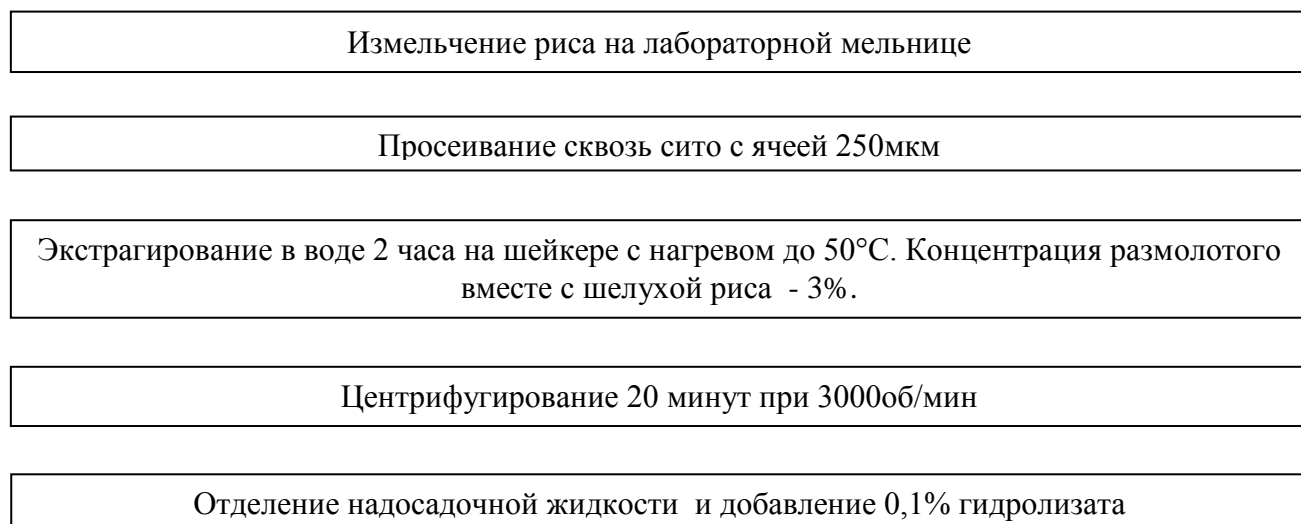


Рис. 13. Алгоритм подготовки проб риса

ВЫВОДЫ

1. Комплексное биотестирование на инфузориях продукции и почвы рисовых полей позволяет получить объективную картину степени загрязнения этих объектов и сделать вывод о характере загрязнения исследованных объектов.

2. Чувствительность инфузорий *Tetrahymena pyriformis* сопоставима с предельно допустимыми концентрациями пестицидов в почве, а при оценке действия комбинаций препаратов они оказываются более токсичными, чем отдельные пестициды.

3. Результаты исследования на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* и дафниях коррелируют между собой и отражают наличие пестицидов в образцах почвы, установленное хроматомасс-спектрометрией. Результаты фитотеста коррелируют с содержанием других групп антропогенных поллютантов (ПАУ и алканы).

4. По результатам биотестирования 11 образцов почвы на трех биотестах проведено ранжирование всех образцов и выявлены три самых загрязненных участка и эти результаты совпадают с пестицидной историей полей.

5. Результаты исследования риса позволили выделить две группы: с положительным и ингибирующим действием на клеточный метаболизм. Эти результаты дополняют экологическую оценку почвы и повышают достоверность биотестирования.

6. Комплексный подход, состоящий в сочетании биологических и аналитических методов анализа почвы и продукции с использованием разработанных алгоритмов подготовки проб почвы является основой для создания рабочей методики для экологического контроля рисовых агроценозов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ*

1. Воронина Л.П., Май Тху Лан, Черемных Е.Г. Оценка фитотоксичности почв рисовых полей Вьетнама// Проблемы агрохимии и экологии. – Январь-март 2012.– № 1.– С. 47-52.

2. Май Тху Лан. Биотестирование на инфузориях образцов риса// Химия 2011. Физическая химия – Теория, эксперимент, практика: Материалы 2-ой научной региональной конференции с международным участием, г. Коломна. – 2011.– С. 90-94.

3. Май Тху Лан. Комплексная оценка почвы рисовых полей Вьетнама// Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2013. – № 3.

4. Май Тху Лан. Оптимизация культивирования инфузорий *Tetrahymena pyriformis*// Бизнес. Наука. Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции–выставки экологических проектов с международным участием, г. Киров. – 2013. – С. 110-112.

5. Черемных Е.Г., Козлов Л.В., Май Тху Лан, Кулешина О.Н. Возможности биотестирования на инфузориях// Международная конференция «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред», г. Москва. – 2013. – С. 236.

6. Черемных Е.Г., Май Тху Лан. Биотестирование риса из Вьетнама на приборе БиоЛат// Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2011. – № 4. – С. 65-71.

7. Черемных Е.Г., Май Тху Лан. Исследование почв и продукции рисовых полей Вьетнама с помощью автоматизированного биотеста на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*// Труды III Всероссийской конференции «Научные аспекты глобальных экологических проблем», г. Москва. – 2011.

8. Черемных Е.Г., Май Т.Л. Пестициды на фоне диоксиновых загрязнений во Вьетнаме// Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации: Сб. Материалов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Выпуск VIII, часть 2, г. Киров.– 2010. – С. 139.

9. Morasgevskay E.V., Voronina L.P., Cheremnykh E.G., Lan May Th. Complex bioassay for environmental of the estimate agricultural lands// The 20th International Conference on Environmental Indicators 16 – 19 September 2013, Trier University, Campus II, Germany. – 2013.

* Жирным шрифтом выделены публикации в изданиях, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией для публикации результатов диссертационных работ.