

Оптимизация условий определения токсичности водных растворов тетразольно-топографическим методом

© 2021. А. И. Фокина¹, к. б. н., доцент, С. Ю. Огородникова², к. б. н., с. н. с.,
Е. В. Веселова¹, магистрант, Л. В. Трефилова³, к. б. н., доцент,

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

²Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук,

167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

³Вятский государственный агротехнологический университет,
610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 133,

e-mail: svetao_05@mail.ru, nm-flora@rambler.ru

В ходе исследования устанавливали оптимальные условия реализации тетразольно-топографической методики определения токсичности растворов с помощью почвенной цианобактерии (ЦБ) *Nostoc paludosum* 18. Возраст культуры ЦБ – 2 месяца (фаза стационарного роста), титр – 10^7 кл./см³. Токсиканты (сульфат меди(II) и флорасулам) оказывали влияние на активность клеточных дегидрогеназ, что проявилось в изменении количества образовавшегося 2,3,5-трифенилформазана (ТФФ) из 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Количественно описывали образование ТФФ по результатам прямого счёта под микроскопом (считается доля клеток микроорганизмов, в которых образовались кристаллы ТФФ) и фотометрирования экстракта ТФФ из ЦБ. За токсичность принимали отклик, отличающийся от контроля более чем на 50% (культура без внесения токсикантов или оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов). С помощью метода спектрофотометрии установлено, что в клетках ЦБ из ТТХ образуется формазан. Оптимальные значения pH для определения токсичности растворов сульфата меди(II) и флорасулама тетразольно-топографическим методом находятся в интервале от 4 до 9 единиц. Коррелирующие между собой результаты, полученные методом спектрофотометрии и прямого счёта, лежат в области pH от 6 до 9 ед. Однако, в данном интервале pH заметно варьирование результатов спектрофотометрического анализа, особенно оно выражено в вариантах с флорасуламом. Для установления токсичности надёжнее оказалось использование метода прямого счёта клеток ЦБ под микроскопом. Установлено, что сульфат меди(II) и флорасулам достоверно не влияют на концентрацию формазана в растворе. Минерализация воды в интервале от 0,5 до 3,5 г/дм³ не оказывала токсического влияния на ЦБ, при более высоком уровне минерализации происходила резкая активация дегидрогеназной активности, приводящая к интерпретации результата тестирования, как соответствующего категории «токсичность».

Ключевые слова: тетразольно-топографический метод, цианобактерии, спектрофотометрия, прямой счёт под микроскопом, токсичность, флорасулам, медь.

Tetrasol-topographic method for determining toxicity of aqueous solutions: conditions and approaches to realization

© 2021. A. I. Fokina¹ ORCID: 0000-0001-8265-8882, S. Yu. Ogorodnikova² ORCID: 0000-0001-8865-4743,
E. V. Veselova¹ ORCID: 0000-0002-0968-8759, L. V. Trefilova³ ORCID: 0000-0002-9932-5803

¹Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

²Institute of Biology of Komi Science Centre
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

³Vyatka State Agrotechnological University,
133, Oktyabrskiy Prospekt, Kirov, Russia, 610017,

e-mail: svetao_05@mail.ru, nm-flora@rambler.ru

2,3,5-triphenylformazan (TPF) from 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TPC). A quantitative description of the formation of TPF can be obtained by direct counting under a microscope (the fraction of cells of microorganisms in which TPF crystals were formed is counted) and photometry of the TFP extract from CB. For indicator of toxicity, a response was taken that differs from the control (culture without toxicants) by more than 50%. Using the spectrophotometry method, it was proved that formazan is formed from the TPC in CB cells. The optimal pH values for determining the toxicity of solutions of copper(II) sulfate and florasulam by the tetrazole-topographic method are in the range 4 to 9. Comparable results are obtained by spectrophotometry and direct counting at pH from 6 to 9. It has been found that copper(II) sulfate and florasulam do not significantly affect the concentration of formazan in solution. It is better to use acetone as the TPF extractant; this allows you to determine formazan in a wider range of concentrations.

Keywords: tetrazole-topographic method, cyanobacteria, spectrophotometry, direct counting under a microscope, toxicity, florasulam, copper.

Микроорганизмы (МО) – одни из самых перспективных объектов исследования разнообразных научных направлений, в том числе и в области развития методов экологического контроля и мониторинга. В начале 2000-х годов на базе Вятской государственной сельскохозяйственной академии (г. Киров, Кировская область) начали оценивать токсичность водных растворов с помощью почвенных цианобактерий (ЦБ). За основу была взята методика определения жизнеспособности семян (ГОСТ 12039-82), однако она была применена не к семенам, а к почвенным ЦБ [1]. Под действием токсикантов активность дегидрогеназ микроорганизмов (МО) изменяется [2–4] и, как следствие, меняются количественные характеристики образования 2,3,5-трифенилформазана (ТФФ) из 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Количественно описать образование ТФФ можно по результатам прямого счёта под микроскопом (считается доля клеток МО, в которых образовались кристаллы ТФФ) и фотометрирования экстракта ТФФ из МО [5–8]. За токсичность принимается отклик, отличающийся более, чем на 50% от контроля (культура без внесения токсикантов или оптимальные условия для жизнедеятельности МО).

Важно, чтобы процесс определения токсичности был экспрессным, экономически целесообразным, тест-функция – чувствительной и адекватной, на результат не влияло субъективное мнение исследователя.

Применение живых организмов в ходе определения токсичности, а также аналитического сигнала (образование ТФФ), который может зависеть не от токсичности, а от различных химических факторов, вызывает необходимость детального исследования влияния условий на сигнал. По литературным данным известно, что формазаны реагируют с ионами тяжёлых металлов (ТМ) [9–11], что может влиять на аналитический сигнал при тестировании растворов, содержащих ионы ТМ, в частности меди, а кислотность

среды влияет как на жизнедеятельность МО, независимо от присутствия токсикантов, так и на синтез формазана [4, 12]. При этом данные о влиянии кислотности и специфики взаимодействия веществ – токсикантов на адекватность получения аналитического сигнала тетразольно-топографическим методом с использованием ЦБ отсутствуют. Методика определения токсичности тетразольно-топографическим методом может быть использована для экспресс-оценки загрязнения водных объектов, токсичности водных растворов. Для внедрения методики в практику эколого-токсикологических исследований необходимо определить оптимальные условия выполнения анализа.

Важным этапом реализации любой методики является регистрация ответной реакции. Метод прямого счёта под микроскопом себя зарекомендовал давно. Однако, спектрофотометрическое окончание определения токсичности (фотометрирование экстракта формазана из ЦБ) позволяет получить более объективный результат, так как в ходе анализа учитывается 100% отклик всей исследуемой группы МО и исключается визуальная (субъективная) оценка наличия формазана. Для прямого счёта исследователь произвольно отбирает часть МО. Неоспоримым преимуществом метода прямого счёта является простота и экономичность, следовательно, доступность для реализации методики практически в любой лаборатории. Однако он продолжительнее, чем с применением спектрофотометрии и носит элементы субъективности.

Главным преимуществом использования ферментных анализов является то, что это относительно простые и общедоступные аналитические методы. Тетразольно-топографический метод определения токсичности различных объектов перспективен и входит в практику использования [5–8, 11]. Широкая распространённость, безопасность, простота и экономичность культивирования ЦБ, наличие отклика ферментативных

систем данных МО на действие токсикантов, позволяет видеть их перспективными тест-объектами. Однако для тетразольно-топографической методики определения токсичности растворов на основе ЦБ отсутствуют данные о влиянии:

- кислотности среды на токсичность поллютантов для ЦБ;
- концентрации токсикантов на концентрацию образовавшегося ТФФ;
- способа регистрации ответной реакции на результат анализа;
- типа экстрагента ТФФ из ЦБ на аналитические возможности методики;
- жёсткости и степени минерализации исследуемого раствора.

Изучение влияния различных факторов на результат, получаемый с помощью методики, позволяет выявить необходимые (оптимальные) условия её реализации.

Цель работы – установить оптимальные условия для процедуры определения токсичности водных растворов тетразольно-топографическим методом.

Объекты и методы исследования

Для установления оптимальных условий при процедуре определения токсичности водных растворов использовали почвенную ЦБ *Nostoc paludosum* 18. Цианобактерию предварительно выращивали на безазотистой среде Громова № 6 в условиях климатостата (освещённость 2000–3000 лк и температуре 20–22 °С). Систематически осуществляли контроль за чистотой культуры и её состоянием путём микроскопирования. На жизнеспособность цианобактерий указывает отсутствие разрушенных лизированных клеток, характерная пигментация, высокое содержание гетероцист (клеток, в которых идёт процесс азотфиксации), малое содержание спор. Для опытов применяли 2-х месячную культуру ЦБ в фазе стационарного роста, титр – 10^7 кл./см³.

В качестве токсикантов использовали сульфат меди(II) и флорасулам. Актуальность использования в ходе исследования соли меди и флорасулама (гербицид) обусловлена широким распространением ионов меди и гербицидов в природных водах в процессе хозяйственной деятельности человека [13, 14].

Для достижения цели:

1) экспериментально проверяли факт образования ТФФ из ТГХ в клетках ЦБ. Для

этого суспензию ЦБ заливали 0,1% раствором ТГХ, оставляли на 3 часа. Затем суспензию центрифугировали, ТФФ экстрагировали из ЦБ смесью ледяной уксусной кислоты с ацетоном (1 : 1), снимали спектрограмму с экстракта на спектрофотометре ПЭ5300ВИ (ООО «ЭКРОСХИМ», Санкт-Петербург) с шагом 10 нм в интервале 430–570 нм;

2) изучали влияние рН на образование ТФФ в ЦБ. Для этого культуру ЦБ вносили в водные растворы с разными значениями рН от 2 до 9 ед. (шаг – 1 ед.). Определённое значение рН создавали, добавляя растворы гидроксида натрия или лимонной кислоты, имеющих молярную концентрацию, равную 2 моль/дм³. В зависимости от варианта опыта изучаемые растворы содержали:

- сульфат меди(II) с концентрацией Cu^{2+} равной 1 мг/дм³ (ПДК в питьевой воде [15]);
- флорасулам с концентрацией 0,01 мг/дм³ (ПДК в воде [16]);
- смесь соли меди и флорасулама с такими же концентрациями как в растворах индивидуальных веществ.

В качестве контроля использовали водные растворы с рН в исследуемом диапазоне без добавок изучаемых токсикантов.

Экспозиция ЦБ на исследуемых растворах составила 20 ч. Такая продолжительность экспозиции обеспечивает получение постоянных значений измерений. Затем культуру ЦБ отделяли от раствора центрифугированием и заливали на 3 ч 0,1%-ным раствором ТГХ. Далее методом прямого счёта под микроскопом, а также параллельно методом спектрофотометрии (экстракция смесью уксусной кислоты с ацетоном в соотношении 1 : 1) определяли долю клеток с кристаллами ТФФ и содержание ТФФ в клетках МО соответственно. Использовали индекс токсичности T , равный отношению:

$$T = 100 \cdot \frac{I_o - I}{I_o},$$

где I_o и I соответственно ответные реакции ЦБ на действие токсикантов в контроле и опыте. Тетразольно-топографическая методика допускает отклонение аналитического сигнала относительно контроля более 50% для интерпретации результата, как соответствующего категории «токсичность»;

3) получали формазан по методике [5]. Методом спектрофотометрии идентифицировали, что образовавшееся вещество ТФФ. Далее исследовали влияние Cu^{2+} (0,1; 1 и 10 мг/дм³) и флорасулама (0,001; 0,01 и 0,1 мг/дм³) на

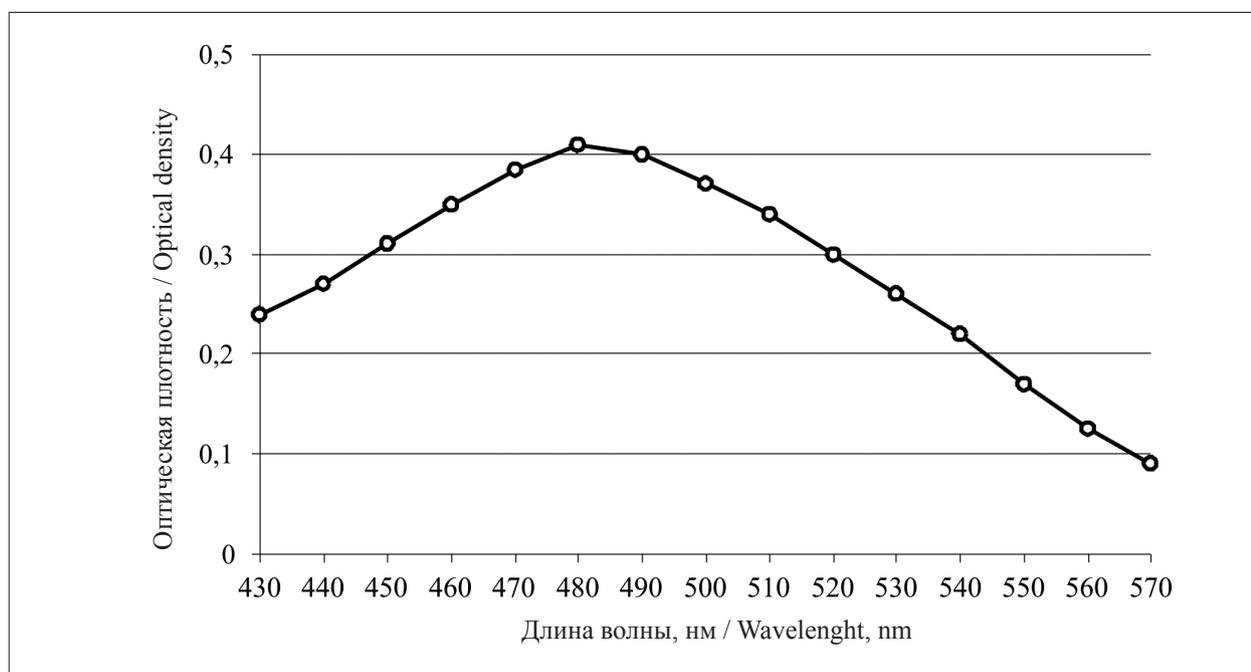


Рис. Спектрограмма, снятая с экстракта (смесь ацетона с уксусной кислотой в соотношении 1 : 1) из цианобактерии *Nostoc paludosum* 18
Fig. Spectrogram of an extract (mixture of acetone and acetic acid in a 1 : 1 ratio) from the cyanobacterium *Nostoc paludosum* 18

концентрацию ТФФ в растворе (в качестве растворителя ТФФ использовали ацетон);

4) исследовали влияние жёсткости и минерализации водных растворов на аналитический результат методики. Для изучения влияния жёсткости готовили растворы из ацетата кальция с указанными концентрациями ионов кальция (ммоль/дм³): 1,0; 2,5; 5,0; 7,0; 14,0 [17]. В качестве контроля использовали раствор с жёсткостью аналогичной той, которая была в культуральной жидкости ЦБ (7 ммоль/дм³). Для изучения влияния минерализации готовили растворы из смеси солей (хлорид кальция, сульфат магния, гидрокарбонат натрия, сульфат калия) в соотношениях ионов, характерных для минеральной воды «Нишне-Ивкинская № 2К» (Кировская область), варианты соответствовали градации минерализации вод (г/дм³): 0,5; 1,5; 3,5; 7,5; 12,5 (ГОСТ Р 54316-2011). В подготовленные растворы вносили культуру ЦБ и действовали аналогично пункту 2.

Опыты проводили в трёхкратной биологической и в двухкратной аналитической повторностях. В таблицах представлены средние арифметические значения и ошибки средних (доверительные интервалы). Обработку полученных данных измерений и статистический анализ проводили с использованием стандартного пакета Microsoft Office Excel. До-

стоверность различий вариантов с контролем определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Идентификация формазана в клетках цианобактерии. С помощью метода спектрофотометрии в клетках ЦБ идентифицировано наличие ТФФ, образующегося из ТТХ. При 470–490 нм на спектрограмме, снятой с ацетонового экстракта из ЦБ, проконтактировавших с ТТХ, наблюдается максимальное светопоглощение. В данном диапазоне лежит максимум светопоглощения формазана (рис.).

Влияние pH на результат определения токсичности растворов.

В таблице 1 представлены значения величин отклонений ответных реакций в вариантах опыта от таковой в контроле (%), так как именно значения отклонений несут информацию о токсичности исследуемой среды. Если отклонение больше 50%, то раствор оказывает токсическое действие на ЦБ. Отрицательные значения говорят о том, что ответная реакция в опыте больше, чем в контроле.

Результаты спектрофотометрии и подсчёта клеток ЦБ с ТФФ под микроскопом позволили сделать вывод о том, что оптимальными значениями pH для определения токсичности данным методом являются 4–9 ед. (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Влияние кислотности растворов на отклонение результатов определения методом прямого счёта и спектрофотометрии от результатов в контрольных опытах / The influence of the acidity of solutions on the deviation of the results of determination by the method of direct counting and spectrophotometry from the results in control experiments

рН ед. units	Вариант / Variant								r_1
	контроль control		Cu ²⁺ (1 мг/дм ³) Cu ²⁺ (1 mg/dm ³)		флорасулам (0,01 мг/дм ³) florasulam (0.01 mg/dm ³)		Cu ²⁺ (1 мг/дм ³) + флорасулам (0,01 мг/дм ³) Cu ²⁺ (1 mg/dm ³) + florasulam (0.01 mg/dm ³)		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
2	84*	100*	84*	100*	58*	98*	51*	100	0,43
3	47*	95*	60*	99*	58*	92*	69*	97	0,35
4	-29*	2	62*	47*	-4	58*	21*	74	0,53
5	-6	-1	45*	40*	8	56*	43*	78	0,67
6	0	0	47*	70*	-24*	24*	50*	67	0,84
7	-31*	1	49*	49*	13	60*	51*	77	0,86
8	-25*	3	14*	37*	0	54*	61*	74	0,88
9	-17*	-2	40*	40*	16*	67*	54*	76	0,80
r_2	0,94		0,73		0,97		0,39		

Примечание: 1 – отклонение результата, полученного методом спектрофотометрии от контроля, %; 2 – отклонение от контроля результата, полученного методом прямого счёта, %; r – коэффициент корреляции между величинами отклонений от контроля (при уровне значимости 0,05): r_1 – варианты с одинаковым рН, r_2 – с разным рН, но одинаковым составом веществ в растворе; * – уровень значимости различий вариантов с контролем 0,05.

Note: 1 – deviation of the result obtained by spectrophotometry from the control, %; 2 – deviation from the control of the result obtained by the direct counting method, %; r – is the correlation coefficient between the values of deviations from the control (at a significance level of 0,05): r_1 – variants with the same pH, r_2 – with different pH, but the same composition of substances in the solution; * – level of significance of differences between variants with control 0.05.

При рН 2 и 3 ед., клетки ЦБ погибали во всех вариантах, кроме варианта с рН 3 ед. в присутствии флорасулама.

Значения коэффициентов корреляции (r_1) между результатами, полученными методами спектрофотометрии и прямого счёта, полученными при разных рН, но при одинаковом составе растворов, показало, что без добавления токсикантов между результатами очень высокая положительная корреляция ($r_1 = 0,94$). Добавление в раствор соли меди(II) снижает значение коэффициента корреляции до 0,73 (высокая положительная взаимосвязь), а флорасулама – повышает до 0,97 (очень высокая положительная взаимосвязь). Совместное присутствие веществ вызывает процессы, приводящие к уменьшению силы корреляционной связи результатов, получаемых разными способами (табл. 1). Причиной могут быть особенности влияния веществ на ЦБ при различной кислотности среды.

Значения r между результатами спектрофотометрии и прямого счёта при одинаковом рН, но различном составе растворов (r_2) показывает, что коэффициент корреляции зависит от рН раствора: увеличивается от 0,43 до 0,84 при рН 2 и 6 ед. соответственно. Очень

высокая положительная взаимосвязь между результатами спектрофотометрии и прямого счёта наблюдается в интервале рН 6–8 ед., при рН 9 ед. величина r_2 начинает снижаться (табл. 1).

Всё вышесказанное указывает на то, что поддержание кислотности во время проведения биотестирования – важнейшее условие получения адекватного отклика тест-объекта. Результаты, полученные двумя способами в интервале рН от 6 до 9 ед., будут коррелировать между собой. При этом в вариантах с медью оба способа позволят диагностировать токсичность и уровень, близкий к токсичности. Однако, в данном интервале рН заметно варьирование результатов при различной кислотности в случае спектрофотометрического анализа, особенно оно выражено в вариантах с флорасуламом, в связи с чем для установления токсичности надёжнее оказалось использование метода прямого счёта.

Одной из причин того, что в результате спектрофотометрической реализации тетразольно-топографического метода не удастся однозначно диагностировать токсичность, может быть присутствие в растворе веществ – токсикантов, способных влиять на

концентрацию ТФФ [8]. Поэтому нами было исследовано влияние концентрации Cu^{2+} и флорасулама на концентрацию формазана в модельном растворе.

Влияние ионов Cu^{2+} и флорасулама на концентрацию формазана в модельном растворе. Установлено, что сульфат меди (II) и флорасулам не влияют достоверно на концентрацию формазана в пределах концентраций равных 0,1–10 ПДК (табл. 2). Данный факт говорит о том, что даже, если в среде образования формазана будут находиться ионы меди (II) и флорасулам, то они не повлияют на величину ответной реакции.

Исследование влияния жёсткости и минерализации воды на результат анализа. Было

изучено влияние жёсткости и минерализации воды на количественные характеристики образования формазана в клетках ЦБ. Классификация вод по минерализации приведена в соответствии с ГОСТ Р 54316-2011. В качестве контроля был выбран образец воды со средней жёсткостью, равной жёсткости культуральной жидкости ЦБ (7 ммоль/дм³). Установлено, что ни один из вариантов с жёсткой водой нельзя интерпретировать, как токсичный (отсутствует отклонение от варианта со средней жёсткостью более 50%).

Согласно СанПиН 2.1.4.1116-02, физиологически полноценной считается вода, у которой значение показателя минерализации лежит в пределах 0,1–1,0 г/дм³. В связи

Таблица 2 / Table 2

Влияние Cu^{2+} и флорасулама на концентрацию формазана в растворе
Influence of Cu^{2+} and florasulam on formazan concentration in solution

Вариант Variant	Концентрация, мг/дм ³ Concentration, mg/dm ³	Формазан, мг/дм ³ Formazan, mg/dm ³
Контроль / Control		6,75±0,06
Cu^{2+}	0,1	6,757±0,014
	1	6,57±0,16
	10	6,87±0,14
Флорасулам Florasulam	0,001	6,74±0,07
	0,01	6,49±0,07
	0,1	6,54±0,09

Таблица 3 / Table 3

Влияние жёсткости и минерализации воды на аналитический сигнал, получаемый тетразольно-топографическим методом / Influence of water hardness and salinity on the analytical signal obtained by the tetrazole-topographic method

Жёсткость / Water hardness			Минерализация / Salinity		
C(Ca^{2+}) ммоль/дм ³ mmol/dm ³	класс class	отклонение от контроля, % deviation from control, %	концентрация солей, г/дм ³ salt concentration, g/dm ³	класс class	отклонение от контроля, % deviation from control, %
1,0	мягкая soft	8,7	0,5	пресная (контроль) fresh (control)	0,0
2,5		-3,3			
5,0	средняя medium	-17,7	1,5	слабоминерализованная slightly mineralized	41,0
7,0	средняя (контроль) medium (control)	0,0	3,5	маломинерализованная low mineralized	19,0
10,0	жёсткая hard	6,9	7,5	среднеминерализованная medium mineralized	107,0
14,0	очень жёсткая very hard	27,3	12,5	высокоминерализованная highly mineralized	144,6

с этим, вода с минерализацией 1,0 г/дм³ была выбрана в качестве контроля. Минерализация воды оказывает влияние на результат анализа. Пробы с минерализацией 0,5; 1,5 и 3,5 г/дм³ не относятся к токсичным. При более высоких значениях минерализации происходит значительное возрастание образования формазана, что может быть связано с активизацией процессов, препятствующих влиянию гиперосмотических условий и, как следствие, активизацию дегидрогеназной активности. Таким образом, высокая минерализация воды ограничивает проведение биотестирования тетразольно-топографическим методом.

Выводы

Присутствие ТФФ в клетках ЦБ *N. paludosum* идентифицировали по наличию максимума оптической плотности экстракта из культуры МО в интервале длин волн 470–490 нм на спектрограмме, в котором находится максимум светопоглощения формазана.

Оптимальные значения рН для определения токсичности растворов тетразольно-топографическим методом находятся в интервале от 4 до 9 ед. Коррелирующие между собой результаты, полученные методом спектрофотометрии и прямого счёта, лежат в области рН от 6 до 9 ед. Исходя из стабильности значений величин отклонений ответных реакций в опытах от таковой в контроле, для установления токсичности надёжнее оказалось использование метода прямого счёта.

Выявлено, что сульфат меди (II) в концентрациях 0,1–10 мг/дм³ и флорасулам в диапазоне концентраций 0,001–0,1 мг/дм³ достоверно не влияют на концентрацию формазана в модельном растворе.

Установлено, что высокая минерализация воды (> 3,5 г/дм³) ограничивает проведение биотестирования тетразольно-топографическим методом.

Знание оптимальных характеристик изучаемых водных растворов при проведении тестирования с помощью ЦБ будет способствовать более широкому применению тетразольно-топографического метода в эколого-токсикологических исследованиях за счёт повышения объективности получаемой информации.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме «Оценка и прогноз отсроченного техногенного воздействия на природные и трансформиро-

ванные экосистемы подзоны южной тайги» № 0414-2018-0003.

References

1. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ashikhmina T.Ya., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. The use of the tetrazole-topographic method for determining the dehydrogenase activity of cyanobacteria in contaminated media // Theoretical and Applied Ecology. 2008. No. 2. P. 23–28 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2008-2-023-28
2. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. Biological monitoring of natural-technogenic systems. Primenenie tetrazolno-topograficheskogo metoda opredeleniya degidrogenaznoy aktivnosti tsianobakteriy v zagryaznennykh sredakh. Syktyvkar: Komi nauchnyy tsentr UrO RAN, 2011. P. 110–120 (in Russian).
3. Zyrin N.G., Valova E.E., Tsybenov Yu.B., Tsibikova E.V. The influence of heavy metals on the enzymatic activity of soils // Uchenye zapiski Zabaykalskogo gosudarstvennogo gumanitarno-pedagogicheskogo universiteta im. N.G. Chernyshevskogo. 2012. No. 1 (42). P. 63–66 (in Russian).
4. Casida L.E., Klein D.A., Santoro T. Soil dehydrogenase activity // Soil Science. 1964. V. 98. P. 371–376.
5. Instructions for laboratory control of treatment facilities in livestock complexes. Part III, Appendix I. Moskva: Kolos, 1984. 57 p. (in Russian).
6. Fokina A.I., Domracheva L.I., Zykova Yu.N., Skugoreva S.G., Lyalina E.I., Trefilova L.V. Improving the tetrazole-topographic bioassay method using cyanobacteria. Theoretical and Applied Ecology. 2017. No. 1. P. 31–41 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-1-031-041
7. Fokina A.I., Dabakh E.V., Domracheva L.I., Skugoreva S.G., Lyalina E.I., Ashikhmina T.Ya., Zykova Yu.N., Leonova K.A. Methodological approaches to chemical and biological diagnostics of the state of soils of technologically transformed territories // Soil Science. 2018. No. 5. P. 589–600 (in Russian). doi: 10.7868/S0032180X18050088
8. ISO 23753-1:2019. Soil quality – Determination of dehydrogenases activity in soils – Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC). 2019. 9 p. (in Russian).
9. Malachowska-Jutz A., Matyja K., Ziembinska A. Cadmium and copper toxicity assessment in activated sludge using TTC bioassay // Archives of Environmental Protection. 2011. V. 37. No. 4. P. 85–94.
10. Malachowska-Jutz A., Matyja K. Discussion on methods of soil dehydrogenase determination // International Journal of Environmental Science and Technology. 2019. V. 16. P. 7777–7790. doi: 10.1007/s13762-019-02375-7
11. Berdonosov D.G., Korsakova N.V., Ivanov S.A. The use of certain formazans for spectrophotometric determination of copper // Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya. 2000. V. 41. No. 2. P. 136–139 (in Russian).

12. Hisashi J., Takahashi S., Kitamura M. Influence of acidic conditions on formazan assay: a cautionary note // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010. V. 162. P. 1529–1535. doi: 10.1007/s12010-010-8934-z

13. Naumova M.E., Bukharin I.L., Vedernikov K.E. Development of a methodology for calculating the standards for the allowable intake of pollutants from the Podborenka river into the Izhevsk reservoir (on the example of nickel, copper and zinc) // *Voda i ekologiya: problemy i resheniya*. 2019. No. 1. P. 75–85 (in Russian). doi: 10.23968/2305-3488.2019.24.1.75-85

14. Olkova A.S., Berezin G.I. Investigation of the sensitivity of certified biotests to water pollution by modern

herbicides: model experiments // *Voda i ekologiya: problemy i resheniya*. 2019. No. 1. P. 111–119 (in Russian). doi: 10.23968/2305-3488.2019.24.2.111-119

15. GN 2.1.5.1315-03. Maximum allowable concentration (MPC) of chemicals in the water of water bodies of domestic, drinking, and cultural and domestic water use. Moskva: Standartinform, 2003. 213 p. (in Russian).

16. GN 1.2.3111-13. Hygienic standards for the content of pesticides in environmental objects (list). Moskva: Standartinform, 2014. 133 p. (in Russian).

17. Guseva T.V., Zaika E.A., Vinichenko V.N., Molchanova Ya.P., Averochkin E.M. Hydrochemical indicators of the state of the environment: reference materials. Moskva: SoES, 2000. 148 p. (in Russian).