

УДК 504.064:504.37(045)

С.М. МАДЖД

## УДОСКОНАЛЕННЯ КОНТРОЛЮ ТЕХНОСФЕРИ СУЧАСНИМИ БІОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ

***Анотація.** Проведена біологічна оцінка компонентів довкілля територій, прилеглих до авіапідприємств. Здійснена якісна характеристика техносфери за допомогою інтегрального показника токсичності. Визначена токсичність на ракоподібних *Daphnia magna* Straus. Встановлена фітотоксичність за зміною довжини корінців салату посівного (*Lactuca sativa*) та цибулі звичайної (*Allium sera*).*

***Ключові слова:** контроль токсичності води, інтегральна токсичність, індикатори забруднення, метод біотестування, забруднення вод.*

### Вступ

Біологічна рівновага в неземних та водних екосистемах підтримується динамічними зв'язками організмів між собою та абіотичними чинниками середовища, що їх оточує. Антропогенні впливи можуть порушувати цю рівновагу, що знаходить відображення у видовому та чисельному складі біоценозів [1].

Виходячи із принципу єдності живих організмів і середовища їх існування, можна припустити, що існують тісні корелятивні зв'язки між факторами довкілля і реакцією на них живих організмів. Особливо це виражено у рослин, які прикріплені до середовища існування.

### Постановка проблеми

Проводячи формальну аналогію і спираючись на існування кореляції між ступенем зовнішнього впливу і реакцією на нього організмів, можна представити організми як «чутливі елементи» в системі біологічної діагностики і моніторингу довкілля, які безпосередньо змінюють свій стан під дією чинників довкілля [2].

На нашій планеті майже не лишилось природних водойм, які прямо або опосередковано не піддавались би техногенному впливу, відповідно одним із головних аспектів екологічної безпеки є проведення якісного аналізу водних об'єктів для оцінки складу та властивостей стічних вод. Найбільш ефективним сучасним біологічним методом контролю можливої небезпеки тих чи інших джерел забруднення є біотестування – інтегральний метод експериментального визначення токсичності води, оснований на реєстрації реакцій тест-об'єктів [3]. За технологією це експеримент, що проводиться з дотриманням певних методичних вимог.

Концентрація токсиканту і час його впливу на організм пов'язані між собою простою залежністю (рівняння Хабера) [4]:

$$T = C \cdot t,$$

де  $T$  – токсичність;  $C$  – концентрація;  $t$  – час впливу токсиканта.

Як впливає з цього рівняння, малі концентрації за тривалий час можуть рещтою впливати так само, як і великі – за короткий час.

Вважається, що первинним критерієм токсичності є смертність (летальність). Статистично отримана величина концентрації, яка відповідає 50-відсотковій смертності дослідних тварин, називається медіанною летальною концентрацією.

Під чутливістю розуміють видову властивість реагувати на мінімальні концентрації токсиканту в навколишньому середовищі, під стійкістю (резистентністю) – здатність витримувати максимальні концентрації токсичних речовин, а під витривалістю (толерантністю) – величину діапазону коливань концентрації токсичних речовин, яку може витримувати гідробіонт [5].

### **Аналіз досліджень і публікацій**

У своїх роботах ряд авторів [1–3, 6–11] віддають перевагу біологічному методу контролю стану довкілля над хімічними та фізико-хімічними.

Ці методи забезпечують ідентифікацію та кількісне визначення вмісту токсикантів в компонентах довкілля, але не дозволяють оцінити сумарну дію полютантів на живі організми, і це змушує шукати інші малозатратні методи контролю стану компонентів довкілля [10]. В цьому випадку безперечну перевагу мають біологічні методи. За їх допомогою існує можливість оцінити вплив забруднюючих речовин на живі організми в залежності від дози і часу їх впливу, включаючи і транслокацію по ланцюгу живлення [8–9].

Біологічні методи дають чітку інтегральну картину, навіть тих забрудників, котрі можуть лишитися поза увагою вимірювальних приладів [10]. Реакція живих організмів дозволяє оцінити антропогенний вплив на середовище існування, в показниках, які мають біологічну основу. Чинники, які впливають на довкілля, інколи дуже сильно модифікуються чинниками живої і неживої природи, і в результаті цього їх остаточний вплив не завжди легко з'ясувати.

Переваги застосування методу біотестування полягають у ефективності, низькій собівартості проведення експериментів, відносно малій тривалості дослідів, простоті культивування тест-об'єктів [3].

Загалом, перевага зводиться до того, що біологічні методи дозволяють [7]:

- швидко виявити наявність чи відсутність токсикантів;
- встановити найслабші антропогенні зміни якості довкілля, які навіть не фіксуються вимірювальними приладами;
- на початковому етапі виявити і попередити зміни в довкіллі;
- оцінити рівень забруднення обмеженим числом термінів;
- вирішити завдання, які не під силу вирішити іншим методам досліджень;
- виявити наслідки разового забруднення, які можуть пропустити інші методи, оскільки результати хімічного і фізико-хімічного аналізу довкілля відносяться тільки до методу взяття проб;
- оцінити та охарактеризувати антропогенний вплив на довкілля, який відбувався в минулому та скласти прогноз на майбутнє.

**Мета роботи:** удосконалення контролю техносфери сучасними біологічними методами досліджень.

### Схема проведення контролю біологічними методами

Для визначення діапазону концентрацій, при яких той або інший вид гідробіонтів може існувати (зони токсичної дії), вводяться такі поняття, як мінімальна смертельна (летальна) концентрація токсиканту ( $СК_{50}$ ) і максимально смертельна (летальна) концентрація ( $СК_{100}$ ). Для встановлення летальних концентрацій токсикантів проводяться спеціальні досліди, в яких використовують не менше 50 піддослідних тварин (риб або безхребетних) однакового розміру і по можливості нащадків однієї самиці-матері.

Піддослідних тварин витримують при різних розведеннях досліджуваних речовин (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 і так далі). Смертність виражається у відсотках по відношенню до контролю, тобто до досліду з тими ж організмами, що експонуються в чистій воді, без доданого токсиканта. Тривалість таких гострих токсикологічних дослідів становить, як правило, 24 або 48 годин. Досліди, які тривають 72 і 96 годин, вважаються підгострими, а ще триваліші – хронічними.

Результати дослідів опрацьовують статистично, за спеціальними формулами та графіками. Найчастіше використовують простий графічний метод Дудорова. Класифікація токсичних речовин подається за величиною  $СК_{50}$ <sup>24</sup> або  $СК_{50}$ <sup>48</sup>, яка встановлюється переважно на рибах.  $СК_{50}$  при 1 мг/дм<sup>3</sup> речовин вважається високотоксичною, при 1–10 мг/дм<sup>3</sup> – сильнотоксичною, при 10–100 мг/дм<sup>3</sup> – помірно токсичною, при концентраціях вищих 100 мг/дм<sup>3</sup> – слаботоксичною. Практично нетоксичні речовини характеризуються значенням  $СК_{50}$  більше 1000 мг/дм<sup>3</sup> [6].

Токсичність речовини кількісно визначається як величина, зворотна медіанній смертельній концентрації, тобто  $T = 1/СК_{50}$ . Проте такий підхід може бути застосований тільки для розчинів окремих чистих речовин за дією на окремі види гідробіонтів в умовах лабораторного експерименту. Він прийнятий при попередній оцінці токсичності різних речовин, зокрема нових продуктів органічного синтезу.

При дослідженні токсичності складних багатокомпонентних розчинів, стічних та забруднених природних вод розрахувати концентрацію діючих речовин, яка викликає смертельний ефект, практично неможливо. У таких випадках доцільно користуватися розведенням досліджуваної води, при якому має місце 50-відсоткова або мінімальна смертність піддослідних організмів. Такий показник, в якому не враховуються хімічна природа діючих речовин та їх концентрація, а враховується тільки біологічна дія, називається інтегральною токсичністю [5].

Вибрані стандартні тест-об'єкти, на яких зазвичай проводяться досліди з визначення токсичності води – це переважно гіллястовусі ракоподібних: *Daphnia magna* та *Ceriodaphnia affinis*, які відрізняються досить високою чутливістю до токсикантів.

У міжнародній практиці контролю токсичності різних речовин, які реалізуються по імпорту, закріплена оцінка із застосуванням трьох тест-об'єктів: зеленої (хлорококової) водорості (*Selenastrum capricornutum*), дафнії (*Daphnia magna*) та риби гупі (*Lebistes reticulatus*).

Перш за все, тест-об'єкти повинні мати високу чутливість до токсичних речовин. Якщо використовуються лабораторні маточні культури, то їх необхідно утримувати з додержанням жорстких вимог щодо хімічного складу штучного середовища, годівлі тест-організмів, підтримання оптимального газового режиму і рН.

Серед застосовуваних в біотестуванні тест-об'єктів розрізняють види індикаторні, що мають універсальне значення для будь-яких токсикологічних досліджень, і представницькі види – специфічні для певних акваторій чи водних об'єктів.

Експеримент включає серію повторень з різними розведеннями (концентраціями) досліджуваної речовини, а контроль – ті ж самі тест-організми в чистій (лабораторній) воді.

Біотести проводяться в лабораторних умовах, а також безпосередньо на водних об'єктах (*in situ*), причому біля випусків стічних вод – в дещо спрощених варіантах.

При утворенні комплексних сполук металів з органічними речовинами їх токсичність зменшується. До того ж між різними речовинами виникають складні взаємозв'язки. Вони можуть посилювати токсичну дію одне одного (синергізм) або, навпаки, протидіяти (антагонізм), взаємодіяти між собою, утворюючи або послаблюючи токсичність. Тому наслідки біотестування забруднених вод слід розглядати як інтегральну оцінку життєвого середовища гідробіонтів, його можливого негативного впливу на основні їх функції [7].

При моніторингових дослідженнях довкілля все більшого значення набуває саме цей метод біологічної діагностики довкілля, який дозволяє формувати диференційовані та інтегральні уявлення про організми та середовища їх існування і цим самим має визначальну значимість [5].

## **Результати проведення біологічних досліджень**

Під час проведення токсикологічних досліджень природних компонентів в зоні експлуатації та ремонту авіаційної техніки було здійснено серії дослідів за допомогою методів, розроблених як вітчизняними (біотестування на *Daphnia magna*), так і закордонними вченими – досліді, що використовуються у міжнародній практиці (біотестування на *Allium sera*, *Lactuca sativa*) [7, 10, 12, 13].

Проби вважалися токсичними, якщо протягом 48 годин спостерігалася загибель 25% тест-об'єктів і гостро токсичними, якщо була виявлена смертність 50% дафній або пригнічення росту корінців складало понад 50% [13].

Статистичний аналіз проводився за допомогою статистичного пакету Corel Quatro Pro 7.

*Визначення гострої токсичності на ракоподібних Daphnia magna Straus.* Біотестування проб здійснювалось за допомогою піддослідних тест-об'єктів *Daphnia magna* згідно із КНД 211.1.4.054–97 [12].

Для перевірки токсичності проб використовували молодь дафній у віці до 24 годин.

У день тестування відокремлювали дорослих самок від молоді. Молодь відбиралась за допомогою піпетки з широким носиком. Під час переносу молодь не контактувала з повітрям, максимальний об'єм при відборі молоді складав 2 мл. Цей об'єм був врахований при розрахунку розведення.

Для кожної проби, що тестувалась, для забезпечення розрахунків  $LC_{50}$  при довірчому інтервалі 95% кількість концентрацій дорівнювала 5.

Методика ґрунтувалась на встановленні різниці між кількістю загинлих дафній у пробах, що тестувались, та у контролі.

Проби дослідних зразків наливались в скляний посуд об'ємом 100 см<sup>3</sup>. Таким же об'ємом дистильованої води заповнювали контрольний зразок (контроль). У кожній з дослідних і контрольних посудин вміщали 10 дафній віком до 24 годин.

Під час біотестування проб дафній не годували, наприкінці досліду візуально підраховували кількість живих тест-об'єктів. Результати спостерігали через 1, 2, 24 і 48 годин. Живими вважались дафнії, які вільно рухались у товщі води або спливали із дна посудини після її легкого струшування. Решту дафній вважали загинлими.

Метод біотестування на основі смертності дафній представлений на рис. 1.

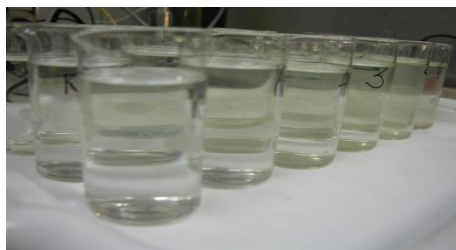


Рис. 1 – Біотест на *Daphnia magna* Straus

На підставі підрахунку кількості живих дафній у контролі та досліді визначались середні арифметичні, які використовували для розрахунку кількості загинлих дафній у досліді відносно контролю за формулою:

$$A = [(X_k - X_d) / X_k] \cdot 100,$$

де  $A$  – кількість загинлих дафній у досліді відносно контролю, %;  $X_k$  – середнє арифметичне кількості живих дафній у контролі, екземпляри;  $X_d$  – середнє арифметичне кількості живих дафній у досліді, екземпляри.

*Біотест на токсичність за зміною довжини корінців салату посівного (Lactuca sativa L.).* Фітотоксичність проб визначалась за зміною довжини корінців салату посівного *Lactuca sativa* [7, 13].

Біотест на салаті дає змогу проаналізувати ріст корінців та оцінити ранні стадії розвитку, росту та виживання рослин. Як правило, ріст корінців інгібується при більш низьких концентраціях токсиканту, ніж проростання насінин. Тому цей тест є більш чутливим індикатором забруднення.

Для проведення дослідів готувались водні розчини зразків (розчинення – 1:1, 1:5, 1:10 і 1:20 в 20 мл об'єму). З метою економії часу проводилось попереднє тестування зразків (використовувалось 10 насінин на один тест), а випробування в повному обсязі – тільки на тих зразках, які пригнічують довжину корінців більше ніж на 20% порівняно з контролем.

У кожен чашку Петрі наливалось приблизно 5–7 мл розведеного зразку або контрольної води, зверху клався фільтрувальний папір у два шари, який був достатньо зволожений, але без надлишку вологи (без води, яка б залишилась не усмоктаною). На ньому розкладались рядами 25 насінин салату (приблизно однакові за розміром, формою та кольором). Потім чашки закривались і встановлювались в темний вологий термостат при температурі  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  на 120 годин (5 днів).

Біотестування на основі інгібування росту салату посівного представлено на рис. 2.

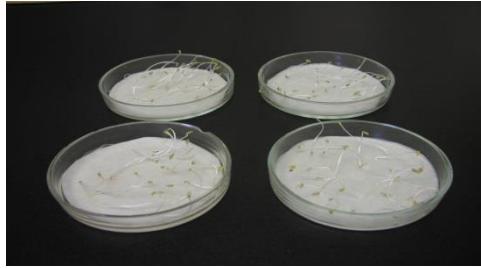


Рис. 2 – Біотест на *Lactuca sativa*

Після періоду інкубації визначалась частка пророслих насінин серед тест-об'єктів і вимірювалась довжина пророслих корінців від потовщення до їх кінчиків, мм.

*Біотест на токсичність за зміною довжини корінців цибулі звичайної (Allium cepa).* Метод біотестування на цибулі звичайній – легкий і чутливий спосіб для визначення загальної токсичності, виражений в інгібуванні росту корінців [13].

Критерієм токсичності у фітотесті було інгібування корінців епікальної мерестеми по відношенню до контролю та відсоток проростання насіння [6].

За допомогою маленького ножа (або скальпеля), видалялись жовто-коричнюваті зовнішні лусочки і частина коричнюватої плити основи, при цьому кільце кореня залишали неушкодженим. Цибулю, необхідну для досліду, збирали у посуд з водою.

Пробірки заповнювались досліджуваними зразками – 5 пробірок для кожної концентрації та контролю.

Усі цибулини поміщались на м'який папір і злегка підсушувались. По одній цибулині розміщували на верхівку кожної дослідної пробірки таким чином, щоб коренева пластина торкалася рідини в пробірці. Через 24 години заміняли досліджувані зразки в контролі і у всіх концентраціях, що тестувались.

Заміну рідин в дослідних зразках і контролі повторювали після 48 годин (24 год + 24 год). При невеликих кількостях досліджуваних зразків, замінювалась тільки кількість рідини, що випарувалась (0,5–1 мл). Через 72 години вимірювали довжину всіх 5 пучків корінців у кожному зразку. Обчислювали середню довжину корінців для кожного зразку проб.

Біотестування на основі інгібування росту цибулі звичайної представлено на рис. 3.



Рис. 3 – Біотест на Allium cepa

На цьому експеримент може бути завершений. Однак, з метою вивчення можливої оборотності впливу, виконання дослідження продовжували: через 72 години вимінювались досліджувані рідини в 2 дослідних пробірках у ряді з 5 і заповнювались інші 3 пробірки водою контролю. Через додаткові 24 години спостерігалось поліпшення росту корінців у 3 заповнених водою дослідних пробірках у порівнянні з 2 випробуваними зразками. Це означає, що ці корінці відновилися і в такий спосіб вплив більш-менш оборотний. Це може мати місце для всіх, декількох чи жодної з концентрацій у ряді.

## Висновки

Одним із головних аспектів екологічної безпеки є проведення якісного аналізу техносфери для оцінки складу та властивостей компонентів довкілля. Найбільш ефективним сучасним біологічним методом контролю можливої небезпеки тих чи інших джерел забруднення є біотестування.

Переваги застосування методу біотестування полягають у ефективності, низькій собівартості проведення експериментів, відносно малій тривалості дослідів, простоті культивування тест-об'єктів.

Біологічні методи дають чітку інтегральну картину, навіть тих забрудників, котрі можуть лишитися поза увагою вимірювальних приладів. Реакція живих організмів дозволяє оцінити техногенний вплив на середовище існування, в показниках, які мають біологічну основу.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ю.С. Бадтиев, В.А. Барков, Г.П. Усов. Биондикация поверхностных водоемов. // Экология и промышленность России, 2013. – С. 24–26.
2. Патин С.А. Эколого-токсикологические аспекты изучения и контроля качества водной среды / С.А. Патин // Гидробиол. журн. – 1997, № 3. – С. 75–78.
3. Ольхович О.П. Фітоіндикація та фітомоніторинг: Метод. рек. / О.П. Ольхович, М.М. Мусієнко. – К. : Фітосоціоцентр, 2005. – 64 с.
4. Гроховська Ю.Р. Фітоіндикація антропогенного забруднення водних екосистем: дис. канд. с.-г. наук: 03.00.16 / Юлія Романівна Гроховська – Рівне, 2002. – 155 с.
5. Гідроєкологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень: Теорія, методи, практика використання / [відпов. ред. Олексіва І. Т.]. – Львів : Світ, 1995. – 440 с.
6. Романенко В.Д. Основи гідроєкології: навч. посіб. / Романенко В.Д. – К. : Обереги, 2001. – 728 с.
7. Методы биотестирования вод / Под ред. А.Н. Крейнюковой – Черноголовка: Ин-т проблем химической физики, 2004. – 127 с.

8. Романенко В.Д. Методика встановлення і використання екологічних нормативів якості поверхневих вод суші та естуаріїв України / В.Д. Романенко, В.М. Жукинський, О.П. Оксіюк та ін. – К. : Символ, 2001. – 48 с.
9. Артеменко А.В. Моделирование эколого-экономического состояния территории / А.В. Артеменко, Н.В. Караева, Р.В. Корпан и др. – К.: Знания Украины, 2006. – 215 с.
10. Руководство по методам исследования качества вод / УНИИВЭП. – Т. 2 – К.: Токсикология, 1995 – 183 с.
11. Коршиков И.И. Взаимодействие растений с техногенно загрязненной средой: Устойчивость. Фитоиндикация. Оптимизация. / Коршиков И.И., Котов В.С., Михеенко И.П. и др. – К. : Наук. думка, 1995. – 192 с.
12. КНД 211.1.4.054-97. Методика визначення гострої токсичності води на ракоподібних *Daphnia magna* Straus. – К., 1997. – 92 с.
13. Методи аналізу об'єктів довкілля: Метод. рек. / ред. А.Г. Волощук. – Чернівці: Рута, 2005. – 28 с.

*Стаття надійшла до редакції 23.06.2015*