

Петренко Т. Ф., Новицька Л. Л., Єфремова О. О., Семенюк Н. В.

БІОТЕСТКАРТУВАННЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ЕКТОКСИКАНТІВ

Наведено результати біотестування розчинів сульфазолу (концентрація 0,1 та 1 г/л), міді та заліза двовалентних (концентрації 0,001; 0,01; 0,1 та 1 г/л). Побудовано розгорнуті моделі поведінки тест-об'єкта (п'явки медичної) в ході досліджу. Запропоновані карти біотестування дозволяють визначати концентрацію розчину, що тестується, та прогнозувати поведінку тест-об'єкта в ході тестування розчину відомої концентрації.

Сьогодні надійні та короткострокові біотести привертають увагу спеціалістів служб державного контролю якості вод, що викликано необхідністю проведення своєчасних водоохоронних заходів.

В основу використаного нами методу покладено один із варіантів гострого дослідження визначення токсичності з використанням як тест-об'єкта п'явок *Hirudo medicinalis* (L). Тест-реакцією на токсичність є зміна природного статичного стану п'явок (який завжди настає при вміщенні їх у колби, заповнені чистою водою) на

динамічний (повзання, плавання, скручування в кільце) при внесенні їх в забруднену воду.

П'явки *Hirudo medicinalis* - ендемік Памарктики. Поширені в південній половині європейської частини Росії, на Кавказі та Закавказзі, півдні України, в Молдові, Середній Азії, Білорусії. Вони мешкають у ровах, болотах, ставках, невеликих повільних річках, які не пересихають влітку та не промерзають до дна взимку.

Сприятливими умовами, які визначають їх поширення, є достатньо висока температура води влітку (20-25 °С); наявність прибережної

смуги, придатної для відкладення коконів; рН води в межах 6,1–9, вміст Са 11–94 мг СаО/л; присутність у водоймі жаб та відвідування її ссавцями.

П'явка може ссати кров представників усіх класів хребетних, але риби відіграють другорядну роль у їх харчуванні. Безхребетних медична п'явка не ссе.

У природі *H. medicinalis* досягає статевої зрілості на третьому році життя і відкладає кокони один раз улітку.

У лабораторних умовах статевозрілих п'явок можна виростити за 12–18 місяців при температурі 18–22 °С взимку та 24–27 °С влітку; змусити розмножуватися в будь-який час і відкладати кокони кожні 6–8 місяців. У природних умовах п'явки відкладають кокони дещо вище рівня води в прибережній смузі.

Цикл розвитку від яйця до яйця завершується через 1,5 року в лабораторних умовах та приблизно через 3 роки в природі. Одна п'явка відкладає від 3 до 8 коконів за одну кладку, кількість яєць у коконі варіюється від 6 до 33, але частіше становить 15–20. Тривалість розвитку зародків при температурі 22–26 °С – близько місяця.

П'явки, що розвинулися (нитчатки), виходять з кокона, якщо температура повітря дорівнює 18 °С та кокони знаходяться у вологому середовищі. В іншому випадку вихід нитчаток затримується. Стравохід нитчаток заповнений білком, і протягом 3–4 місяців вони можуть обходитися без їжі. Нитчатка мають вагу 20–30 мг, довжину 7–8 мм. Щелепи їх слабкі, тому їм важко прокушувати шкіру ссавців, але вони легко роблять ранки на шкірі земноводних.

У штучних умовах п'явок годують дефібрильованою кров'ю або пропонують їм спінованих риб зі знятою лускою.

Температурний оптимум для п'явок становить 18–26 °С. Для біотестування краще використовувати молодих п'явок, які ще не харчувалися, або після одного-трьох годувань вагою 20–30 мг. Можна використовувати і крупніших п'явок, але вони менш чутливі до токсикантів і менш зручні в роботі.

Утримування п'явок дуже нескладне: їх вміщують у 1–3-літрові банки, на третину заповнені відстояною водопровідною водою з температурою 15–25 °С. Банки закривають газом або марлею, додаткової аерації непотрібно; воду змінювати через 2–3 доби. Щільність посадки нитчаток – 50–60 особин на 1 л води, крупніших п'явок – не більше як 30 особин. Годують нитчаток через 2–3 місяці перший раз, а потім 1 раз

на 5 місяців. У таких умовах п'явки зберігають активність і придатність для біотестування протягом року й більше. П'явки дуже добре переносять будь-який вид транспорту (при цьому банки можна наглухо закривати кришкою без шкоди для п'явок на 1–3 доби).

Біотестування здійснюють у два етапи. На першому етапі проводиться попередній «відсіювальний» експеримент, що визначає діапазон концентрацій для досліджуваної п'явки.

За годину до тестування п'явок розсаджують у колби по 3 штуки в кожную. Колби попередньо заповнюють водопровідною водою до половини ($t = 18\text{--}23$ °С, $\text{pH} = 6,5\text{--}8,5$). До тестування необхідно впевнитися, що всі особини перебувають в природному стані спокою (статичний стан). Якщо в одній із колб хоча б одна п'явка рухається, то необхідно замінити як колбу з водою, так і п'явку, дочекавшись повної нерухомості особини, посаженої замість цієї п'явки.

Температура досліджуваної води та контрольної (відстояної водопровідної води) повинна бути однаковою з температурою води в колбах, де знаходяться п'явки. Різниця показника рН досліджуваної та контрольної води не повинна перевищувати 0,5 одиниці.

Біотестування здійснюють таким чином. Впевнившись, що всі п'явки перебувають в стані спокою, воду з колби з піддослідними та контрольними особинами зливають. Контрольних п'явок знову заливають чистою водою (250 мл), а піддослідних – розчином, що тестується (також 250 мл). У результаті цієї операції внаслідок механічної дії всі п'явки спочатку рухаються, але через 3–7 хвилин залежно від того, чи використовують нитчаток, чи вже годованих п'явок, контрольні п'явки заспокоюються; проводиться перша реєстрація наявності або відсутності у кожної піддослідної і контрольної особини статичного стану. Другу та наступні реєстрації проводять через рівні проміжки часу (5–10 хвилин) протягом наступних 250 хвилин, необхідних для завершення біотестування. В окремих випадках вода, що тестується, настільки токсична, що п'явки її залишають, виповзають на стінку колби, де можуть прийняти статичну позу. Цю реакцію потрібно вважати динамічною.

У результаті оцінюють за достовірним зменшенням кількості зареєстрованих випадків статичного стану в піддослідних п'явок у порівнянні з контрольними. При статичній обробці використовується критерій Стьюдента.

Для оцінки результатів біотестування ми використовували шкалу активності, де «0» відпо-

відає тривалому статичному стану; «1» – нерухомість; «2» – повільні рухи; «3» – плавання, скручування; «4» – активні рухи, вигинання дугою; «5» – активне бурхливе плавання, виповзання з розчину.

Як модельні розчини ми використовували розчини сульфанола (ПАР) (концентрації 0,1 г/л), заліза двовалентного (концентрації 10,101; 0,01; 0,1 та 1 г/л), міді двовалентної (0,001; 0,01; 0,1 та 1 г/л).

Посидуючи часові характеристики з оцінкою активності п'явок за шкалою (0–5), ми зробили розгорнуті моделі поведінки тест-об'єкта в ході біотестування. На всіх моделях спостерігаються східні коливання оцінки активності. Це дає змогу стверджувати, що поведінку тест-об'єкта в ході дослідження можна поділити на певні стани, і цей поділ є універсальним. Розглянемо розгорнуту модель поведінки тест-об'єкта в ході біотестування та відокремлення станів поведінки для розчину міді двовалентної з концентрацією 0,001 г/л як приклад. Оцінки за введеною нами шкалою подано в табл. 1.

Таким чином, висока активність «5»–«3» спостерігається лише для перших часових періодів, далі активність зменшується, її оцінки становлять «3»–«0», а наприкінці дослідження знову дещо

зростають до «3»–«4», але початкової активності вже не досягається.

Розгорнуту модель поведінки тест-об'єкта, побудовану за цими даними, представлено на рис. 1. На цій моделі можна виділити кілька етапів (станів) поведінки п'явки в ході дослідження. Ці етапи ми назвали фазами. Кожна фаза відрізняється від інших середньою оцінкою активності за шкалою. Взагалі ми виділили п'ять фаз:

- 1 – фаза активності (початкової);
- 2 – фаза виділення слизу;
- 3 – фаза малої активності та нерухомості;
- 4 – повторний сплеск активності;
- 5 – фаза смерті.

Моделі поведінки особин у ході тестування для інших тестованих розчинів подібні до наведеної. У них використовуються такі самі фази, тобто ці фази можна вважати універсальними для всього комплексу розчинів, що розглянуті нами (розчини Cu з іншими концентраціями, розчини заліза та сульфазолу).

Кожна фаза характеризується певною тривалістю (часова характеристика). Залежно від концентрації тривалість фаз змінюється. У цій зміні нами виведено ряд закономірностей:

1) чим вища концентрація токсиканту, тим триваліша фаза початкової активності та швид-

Таблиця 1. Оцінка активності тест-об'єктів в ході біотестування розчину міді двовалентної з концентрацією 0,001 г/л

Номр часового інтервалу (через кожні 10 хв)	Оцінка активності тест-об'єктів в ході дослідження			
	I варіант	II варіант	III варіант	Середня оцінка
1	5	5	5	5
2	3	4	1	2,7
3	2	5	0	2,3
4	2	3	0	1,7
5	5	1	2	2,7
6	3	2	1	2
7	5	0	2	2,3
8	0	3	0	1
9	0	1	1	0,7
10	1	1	0	0,7
11	1	1	0	0,7
12	0	1	2	1
13	0	1	1	0,7
14	0	1	0	0,33
15	1	1	1	1
16	2	1	1	1,3
17	2	2	5	3
18	3	2	1	2
19	2	2	0	1,3
20	4	2	4	3,3

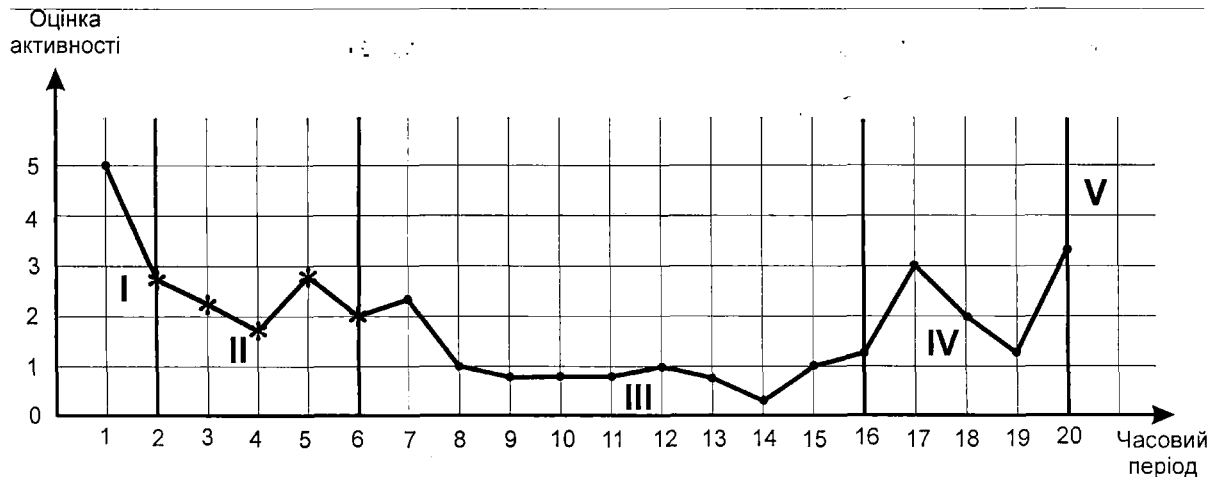


Рис. 1. Розгорнута модель поведінки п'явки в ході тестування розчину міді двовалентної з концентрацією 0,001 г/л
* – виділення слизу

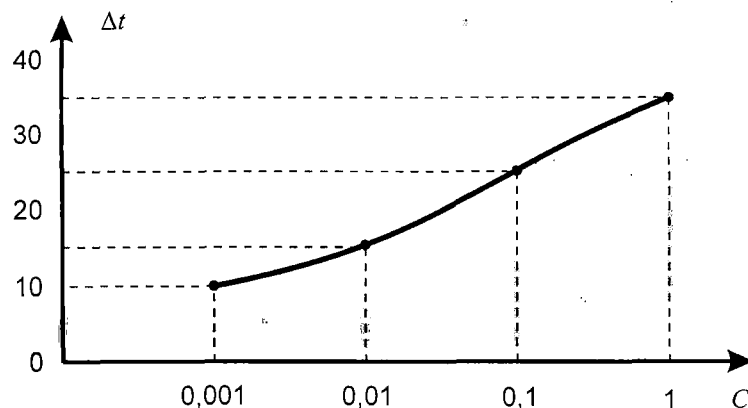


Рис. 2. Залежність тривалості фази початкової активності від вмісту іонів Fe^{2+} у тестовому розчині:
 Δt – тривалість фази, хв; C – концентрація розчину, г/л

ще настає фаза виділення слизу і тим вона триваліша (для незначних концентрацій вона може «розривати» фазу малої активності та нерухомості);

2) чим вища концентрація, тим більший час перебігу фази повторної активності;

3) зі збільшенням концентрації токсиканту зменшується тривалість фази нерухомості та малої активності;

4) чим більша концентрація, тим швидше настає смерть тест-об'єкта.

Використовуючи ці закономірності, ми побудували залежності «тривалість фази – концентрація токсиканту». Ці залежності і є карти біотестування.

Прикладом такої залежності може служити графік «Залежність тривалості фази початкової активності від концентрації іонів заліза в розчині» (рис. 2).

Подібні карти біотестування розроблено нами для інших фаз та токсикантів, що використовувалися в досліді. Надані рекомендації щодо їх застосування.

Карти біотестування дозволяють визначити концентрацію тестового розчину токсиканту за тривалістю фаз біотестування. Крім того, використовуючи карти біотестування, можна вирішувати й обернену задачу, тобто прогнозувати поведінку тест-об'єкта в ході досліді, виходячи із заданої концентрації тестового розчину.

Таким чином, біотестування наближається до фізико-хімічних методів аналізу водних розчинів за точністю. При цьому карти біотестування можна порівняти з градуйованими кривими. Але цей метод має й безсумнівну перевагу – оцінка вмісту токсиканту безпосередньо за поведінкою живого об'єкта – п'явки. Це дуже важливо з точки зору екології.

1. Турунина Н. В. Влияние загрязнений на гидробионты // ч/з. НИИОРХ, 1975,- № 93.- С. 18-22.
2. Котова Л. И. Биологический контроль качества вод.- М.: Наука, 1983.- 256 с.

T. Petrenko, L. Novic'ka, O. Yefremova, N. Semeniuk

BIOTESTMAPPING OF WATER SOLUTIONS OF ECOTOXICANTS

In this article shown the results of biotesting of sulfazole (concentration 0.1 and 1 g/l), cuprum (II) and iron (II) (concentrations 0.001, 0.01, 0.1 and 1 g/l) solutions. Developed the detailed models of testing object (medicinal leech) behavior during experiment. Suggested maps of biotesting allow to determinate the concentration of testing solution, and to forecast the behavior of testing object during the testing of solution with known concentration.