

УДК (574.64:574.58):001.891

**В. Д. Романенко, М. Т. Гончарова, И. Н. Коновец,
Л. С. Кипнис, Ю. Г. Крот**

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ
ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ
БЕНТОСНЫХ И ПЛАНКТОННЫХ ОРГАНИЗМОВ¹**

Разработан метод оценки токсичности донных отложений с одновременной экспозицией двух видов водных беспозвоночных — бентосного *Chironomus riparius* и планктонного *Daphnia magna*. Метод пригоден также для исследования биодоступности токсикантов при их внесении как в донные отложения, так и в воду в модельном эксперименте. Показана адекватность метода при исследовании природных донных отложений с различным уровнем токсического загрязнения.

Ключевые слова: токсичность, биодоступность, донные отложения, *Chironomus riparius*, *Daphnia magna*.

Проблема загрязнения донных отложений в условиях усиления антропогенной нагрузки на водные экосистемы является особенно актуальной. Загрязняющие вещества могут в значительном количестве накапливаться в донных отложениях и при изменении гидрологических и физико-химических условий являются источником вторичного загрязнения воды [4]. Комплексный характер загрязнения и все возрастающее количество ксенобиотиков значительно затрудняют экстраполяцию данных химического анализа на возможное биологическое действие токсических веществ донных отложений, поскольку при этом практически невозможно учесть синергическое взаимодействие токсикантов, точно определить формы их нахождения, что, в свою очередь, значительно влияет на их биодоступность и токсичность.

При оценке токсичности донных отложений широкое применение нашли методы биотестирования, с помощью которых можно установить реакцию организма на негативное воздействие в целом. Для этих целей используют водные вытяжки донных отложений или поровые воды с применением

¹ Работа выполнена при поддержке Агентства по охране окружающей среды США в рамках совместного проекта «Development and application of Diagnostic Tools for Identifying Causes of Environmental Impairments in the Estuarine Systems of Ukraine»

© Романенко В. Д., Гончарова М. Т., Коновец И. Н., Кипнис Л. С., Крот Ю. Г., 2011

планктонных организмов *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis* и др. [5—7, 9], а также собственно донные отложения с применением бентосных видов *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, *Ch. riparius*, *Lumbriculus variegatus*, *Tubifex tubifex* и др. [9, 11, 12, 15, 18, 20, 25].

С нашей точки зрения, перспективными являются подходы, включающие одновременное тестирование донных отложений несколькими тест-объектами, принадлежащими к различным систематическим группам [14, 16, 17, 21, 22], поскольку не существует универсальных организмов, одинаково чувствительных к веществам различной химической природы [1]. Однако методы исследования токсичности пресноводных донных отложений с применением нескольких видов разработаны еще недостаточно. Среди недостатков этих методов, можно назвать использование неоправданно большого количества тест-организмов, зачастую нестандартизированных, необходимость работы с большими навесками донных отложений, повышенная трудоемкость.

Целью нашей работы была разработка комплексного метода оценки токсичности пресноводных донных отложений с использованием тест-объектов различной биотопической приуроченности.

Материал и методика исследований. Для тестирования донных отложений в качестве бентосного вида использовали представителя инфауны детритофага *Chironomus riparius* Meigen (личиночная стадия), а для водной фазы — планктона *Daphnia magna* Straus, лабораторные культуры которых содержатся в биотехнологическом комплексе Института гидробиологии НАН Украины. Исследования проводили при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$, освещении 750 лк с фотопериодом свет : темнота 16 : 8.

За сутки до проведения эксперимента исследуемые донные отложения гомогенизировали и вносили в количестве 20 г на одну повторность в экспериментальные камеры объемом 100 см³. Затем на слой донных отложений аккуратно, для предотвращения их взмучивания, наслаивали отстоянную дехлорированную воду объемом 60 см³. Количество повторностей составляло восемь.

Через 24 ч в экспериментальные камеры рассаживали животных — по десять личинок *Ch. riparius* (возраст $7,0 \pm 0,5$ сут, 2—3-я стадии) и по пять ювенисов *D. magna* (возраст 24 ± 4 ч). В камеры вносили корм TetraMin® в количестве 60 мг пятью равными порциями раз в два дня. Для поддержания оптимального гидрохимического режима экспериментальные камеры аэрировали через капилляр с интенсивностью барботации один пузырек воздуха в секунду.

Выживаемость личинок *Ch. riparius* регистрировали в конце экспозиции (10 сут). Учитывая короткий жизненный цикл *D. magna*, их смертность регистрировали через 24, 48, 72 и 96 часов. На 1, 3, 6 и 10-е сутки эксперимента

проводили измерение рН, концентрации растворенного кислорода и аммонийного азота в водной фазе [5].

Исследования проведены на условно чистых и загрязненных донных отложениях Днепровско-Бугского лимана, отобранных на участках с минерализацией воды, не превышающей 2‰. Уровень загрязнения токсическими веществами (полиароматические углеводороды, полихлорированные бифенилы, пестициды, тяжелые металлы) рассчитывали как сумму отношений (quotient, Q) концентрации токсикантов в донных отложениях к ее пороговому значению (Threshold Effect Concentration, TEC) [19]:

$$\sum TEC-Q = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{TEC_i}.$$

Для расчетов использовали исходные данные о содержании токсических веществ в исследуемых пробах, опубликованные ранее [13]. Биотестирование водных вытяжек донных отложений проводили на *D. magna* [6] и ряске *Lemna minor* [5]. Водные вытяжки готовили согласно рекомендациям [10]. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики [3].

Результаты исследований и их обсуждение

При разработке метода были использованы рекомендации американских исследователей [16], работающих с морскими донными отложениями. В предложенном ими методе в качестве тест-объектов одновременно используется два организма — бентосный *Ampelisca abdida* и нектобентосный *Americamysis bahia*. С целью экономии экспериментального материала объем камер был несколько уменьшен по сравнению со стандартными методами Американского общества по испытанию материалов (ASTM) [23, 24]. Было показано, что сосуществование сравнительно небольших по размерам организмов двух видов в экспериментальной камере практически не влияет на чувствительность каждого из них.

В таблице 1 представлены условия проведения экспериментов для разработанного нами метода в сравнении с методом биотестирования пресноводных донных отложений ASTM [25]. Как видно, последний характеризуется применением лишь одного тест-объекта, несколько большими размерами системы, ежедневной заменой водной фазы во избежание ухудшения ее гидрохимических показателей.

В качестве бентосного тест-объекта был выбран представитель комаров-звонцов *Ch. riparius*, поскольку он характеризуется сравнительно высокой чувствительностью к токсикантам, непосредственно контактирует с донными отложениями, толерантен к их гранулометрическому составу, имеет сравнительно короткий жизненный цикл и культивируется в лабораторных условиях [2]. Как было показано нами ранее [8], использование личинок *Ch. riparius* второй стадии развития при проведении субхронического

1. Условия проведения экспериментов

Параметры	Метод ASTM [25]	Разработанный метод
Объем камеры, см ³	300	100
Масса донных отложений, г	100	20
Объем воды, см ³	175	60
Замена воды	Ежедневно не менее 1/2 объема или проточная система	Нет
Аэрация	Нет	Есть
Кормление	Tetramin [®] 6 мг/лич. в течение опыта	Tetramin [®] 6 мг/лич. в течение опыта
Вид и количество бентосных тест-организмов	<i>Ch. riparius</i> или <i>Ch. tentans</i> , 10 экз.	<i>Ch. riparius</i> , 10 экз.
Вид и количество планктонных тест-организмов	Отсутствуют	<i>D. magna</i> , 5 экз.
Тест-функции	Смертность и прирост линейных размеров	Смертность и прирост линейных размеров (<i>Ch. riparius</i>), смертность и плодовитость (<i>D. magna</i>)
Длительность эксперимента, сутки	10	10

эксперимента является оптимальным, так как в этом возрасте они легко поддаются визуальной идентификации и при этом обладают достаточной чувствительностью. Для тестирования водной фазы был выбран классический тест-объект водной токсикологии — *Daphnia magna*.

Для проведения исследований была создана установка, включающая 32 камеры, оснащенная автономной системой подачи воздуха, а также предусматривающая предотвращение испарения жидкости при проведении длительного эксперимента (рис. 1).

Поскольку ухудшение гидрохимических условий в экспериментальных камерах может приводить к искажению результатов биотестирования, была изучена динамика основных показателей, лимитирующих жизнедеятельность тест-организмов [20]: концентрации растворенного кислорода, аммонийного азота и pH в водном слое. В исследованиях использованы условно чистые донные отложения с различным содержанием общего органического углерода.

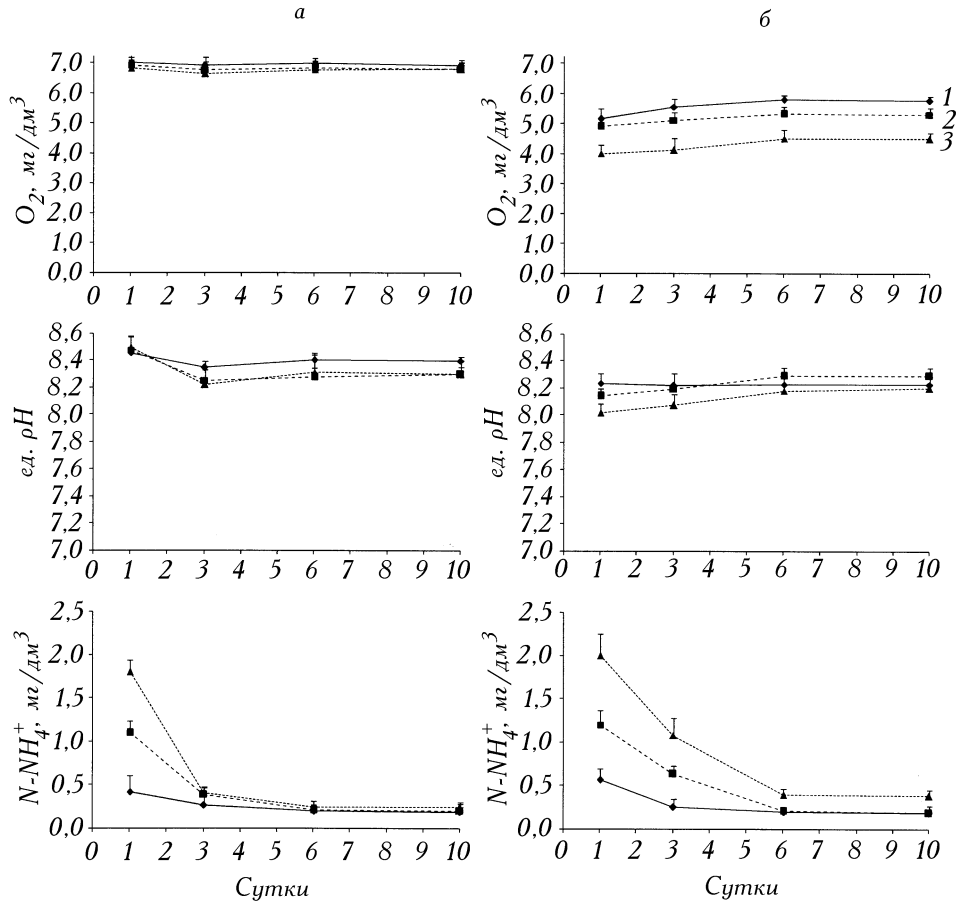


1. Экспериментальная установка для оценки токсичности донных отложений и воды.

В экспериментах, проведенных по предлагаемому методу, повышенная концентрация аммонийного азота в начале опыта (0,4—1,8 мг/дм³) стабилизировалась уже к 3-м суткам, при этом концентрация растворенного кислорода не падала ниже 6,5 мг/дм³, значение рН не выходило за пределы оптимальных (рис. 2, а).

В то же время в исследованиях, выполненных по методу ASTM, в начале экспозиции в водном слое отмечалась более низкая концентрация растворенного кислорода (4,00—5,15 мг/дм³) на фоне повышенного содержания аммонийного азота (0,6—2,0 мг/дм³), что было особенно выражено при тестировании донных отложений с большим содержанием общего органического углерода. Величины этих показателей стабилизировались к 6-м суткам эксперимента (рис. 2, б).

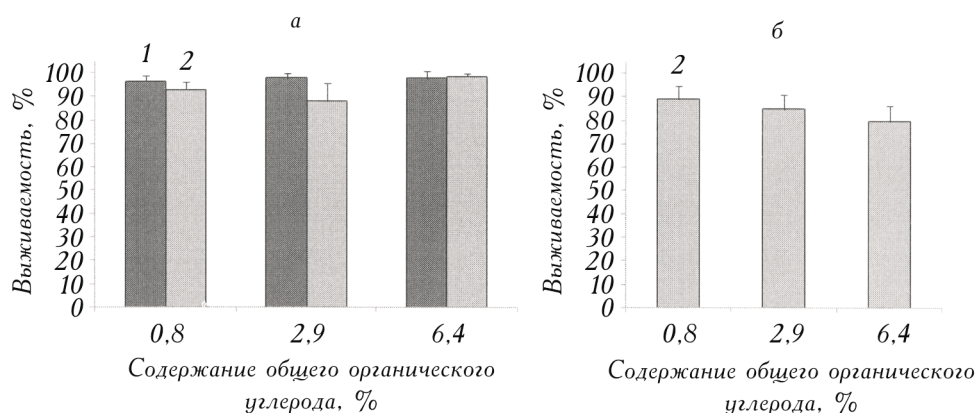
В экспериментах, поставленных по обоим сравниваемым методам, выживаемость *Ch. riparius* в референтных донных отложениях превышала 70%, *D. magna* — 90% (рис. 3), что соответствует нормативным требованиям [6, 25]. Однако следует отметить, что аэрация водной среды и изменение соот-



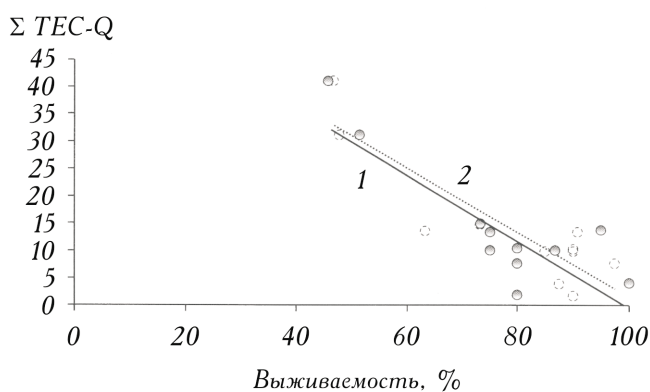
2. Содержание растворенного кислорода, рН и концентрация аммонийного азота в водном слое экспериментальных камер в опытах по разработанному методу (а) и методу ASTM [25] (б) с донными отложениями с различным содержанием общего органического углерода: 1 — 0,8%; 2 — 2,9%; 3 — 6,4%.

ношения массы донных отложений и воды до 1 : 3 (по методу ASTM — 1 : 1,75) привели к более быстрой стабилизации величин гидрохимических показателей, тем самым способствуя повышению выживаемости *Ch. riparius* на 5—15%.

С целью оценки адекватности разработанного метода биотестирования поставленным задачам были проведены исследования донных отложений Днепровско-Бугского лимана различной степени загрязнения с целью сопоставления уровня загрязнения (Σ ТЕС-Q) с реакцией тест-организма. Анализ результатов выявил достаточно высокую положительную связь между уровнем загрязнения и смертностью тест-объектов *Ch. riparius* и *D. magna*, значения квадрата коэффициента корреляции R^2 составили соответственно 0,72 и 0,65 (рис. 4).



3. Выживаемость тест-организмов в опытах по разработанному методу (а) и методу ASTM [25] (б) в пробах донных отложений: 1 — *Daphnia magna*; 2 — *Chironomus riparius*.



4. Связь между расчетным уровнем загрязнения донных отложений (ΣТЕС-Q) и выживаемостью тест-организмов: 1 — *Daphnia magna*; 2 — *Chironomus riparius*.

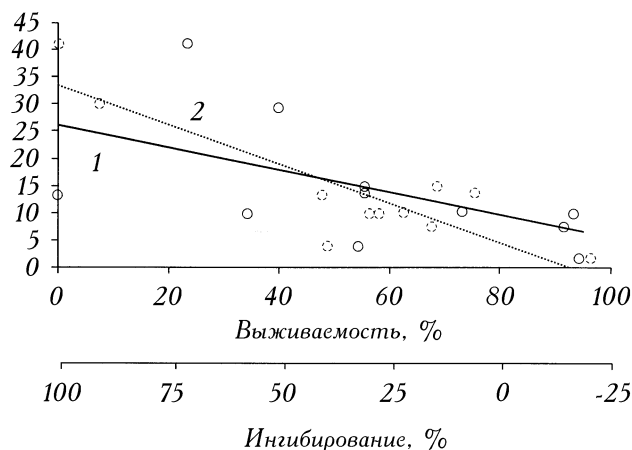
Существенное отрицательное воздействие исследованных донных отложений на выживаемость организмов наблюдалось только при загрязнении свыше 30 ΣТЕС-Q, при меньших значениях смертность организмов находилась на контрольном уровне или несколько его превышала. Некоторое несоответствие между реакцией тест-объектов и расчетной величиной токсического загрязнения

может объясняться двумя причинами, противоположными по своему характеру: заниженная, по отношению к ожидаемой, смертность может свидетельствовать о низкой биодоступности токсических веществ, содержащихся в донных отложениях, а завышенная — о присутствии неидентифицированных загрязняющих веществ.

Сравнение разработанного метода с широко используемым методом водных вытяжек [7, 9] показали, что связь между расчетным уровнем загрязнения и реакцией тест-объектов *Daphnia magna* и *Lemna minor* в тестах с водными вытяжками несколько слабее — R^2 соответственно 0,27 и 0,59 (рис. 5).

Обращает на себя внимание тот факт, что ослабление корреляции в опытах с водными вытяжками в основном происходит за счет средне- и слабозагрязненных донных отложений, при исследовании которых иногда выявляется сильный токсический эффект. Поскольку подготовка водных вытяжек предполагает проведение дополнительных манипуляций (продолжительное встряхивание образцов донных отложений с водой, их последующее отстаивание или фильтрация), то могут происходить процессы, приводящие к потере летучих веществ, частичному окислению органических соединений, изменению форм нахождения тяжелых металлов, что неизбежно модифицирует токсическое действие.

Σ ТЕС-Q



5. Связь между расчетным уровнем загрязнения донных отложений (Σ ТЕС-Q) и реакцией тест-организмов при тестировании донных отложений Днепровско-Бугского лимана методом водных вытяжек: 1 — выживаемость *Daphnia magna*; 2 — ингибирование роста *Lemna minor*.

Заключение

Разработанный комплексный метод оценки токсичности донных отложений с использованием бентосных и планктонных тест-организмов может быть весомой альтернативой применяемым методам благодаря его более высокой информативности и достоверности полученных результатов.

Сравнение уровня загрязнения донных отложений по результатам химического анализа и предложенного комплексного метода показало, что последний адекватно отображает токсикологическую ситуацию в водоеме, удовлетворяет необходимым требованиям для последующей стандартизации и может быть использован при разработке нормативных документов по оценке качества донных отложений.

Созданная экспериментальная установка обеспечивает и поддерживает оптимальные условия содержания тест-организмов благодаря более быстрой стабилизации величин гидрохимических показателей в экспериментальных камерах. Поскольку подготовка донных отложений в разработанном методе не предполагает дополнительных манипуляций (встряхивания, отстаивания, фильтрации), модифицирующих проявление токсического действия, процессы, происходящие в экспериментальных камерах, приближаются к природным.

Наличие в экспериментальных камерах донных отложений и водной фазы позволяет рассматривать их в качестве микрокосма, в котором возможно исследование процессов миграции веществ токсического действия и их биодоступности путем ежедневного контроля выживаемости и популяционных характеристик тест-организмов.

**

*Розроблено метод оцінки токсичності донних відкладів з одночасним використанням двох видів водних безхребетних — бентосного *Chironomus riparius* та планктонного *Daphnia magna*. Метод може бути застосований також для вивчення біодоступності токсикантів при їх внесенні як в донні відклади, так і у воду в модельному експерименті. Показано адекватність методу при вивченні природних донних відкладів з різним ступенем токсичного забруднення.*

**

*The method of the bottom sediments toxicity assessment using two species of the aquatic invertebrates — benthic *Chironomus riparius* and planktonic *Daphnia magna* — has been developed. It can be used also for investigation of toxicants' bioavailability in the model experiments at the toxicants' adding either to the bottom sediments or to water. Reliability of the method has been shown at analysis of the natural bottom sediments with different toxicity rate.*

**

1. Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень: Теорія, методи, практика використання / За ред. І. Т. Олексіва, Л. П. Брагінського. — Львів: Світ, 1995. — 440 с.
2. Константинов А. С. Биология хирономид и их разведение // Тр. Саратов. отд-ния ВНИОРХ. — Т. 5. — 358 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1973. — 343 с.
4. Линник П.Н. Донные отложения водоемов как потенциальный источник вторичного загрязнения водной среды соединениями тяжелых металлов // Гидробиол. журн. — 1999. — Т. 35, № 2. — С. 97—109.
5. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / За ред. В. Д. Романенка. — К.: ЛОГОС, 2006. — 408 с.
6. Методика визначення гострої токсичності води на ракоподібних *Daphnia magna* Straus. — К.: Мінприроди України, 1997. КНД 211.1.4.054-97. — 18 с.
7. Методические указания. Проведение наблюдений за токсическим загрязнением донных отложений в пресноводных экосистемах на основе биотестирования. РД 52.24.635-2002. — 20 с.
8. Романенко В. Д., Гончарова М. Т. Личинки *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) як чутливий до міді тест-об'єкт // Гидробиол. журн. — 2011. — Т. 47, № 4. — С. 107—111.
9. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. — М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002. — 118 с.

10. Щербань Э.П., Арсан О.М., Шаповал Т.Н. и др. Методика получения водных вытяжек из донных отложений для их биотестирования // Гидробиол. журн. — 1994. — Т. 31, № 4. — С. 100—111.
11. *Biological Test Method: Test for growth and survival in sediment using the freshwater amphipod *Hyaella azteca**. — Environment Canada, Ottawa, Ontario, 1997. — 117 p.
12. *Biological Test Method: Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*)*. — Environment Canada, Ottawa, Ontario, 1997. — 125 p.
13. Burgess R., Terletsкая A., Milyukin M. et al. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine // Marine Pollution Bull. — 2009. — Vol. 58, N 8. — P. 1103—1115.
14. Cairns J. Multispecies toxicity testing. — New York: Pergamon Press, 1985. — 261 p.
15. Hill I.R., Matthiessen P., Heimbach F. Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. — SETAC-Europe, 1993. — 105 p.
16. Ho K.T., Kuhn A., Pelletier M. et al. Sediment toxicity assessment: comparison of standard and new testing designs // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 2000. — Vol. 39, N 4. — P. 462—468.
17. Holcombe G.W., Phipps G.L., Sulaiman A.H., Hoffman A.D. Simultaneous multiple species testing: acute toxicity of 13 chemicals to 12 diverse freshwater amphibians, fish, and invertebrate families // Environ. Contam. Toxicol. — 1987. — Vol. 16. — P. 697—710.
18. Ingersoll C. G., Nelson M. K. Testing sediment toxicity with *Hyaella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera) // Aquatic Toxicology and Risk Assessment, ASTM STP 1096. American Society for Testing and Materials. — Philadelphia, PA, USA, 1990. — P. 93—109.
19. MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Berger T.A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems // Archives of Environ. Contamination and Toxicology. — 2000. — Vol. 39. — P. 20—31.
20. *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. EPA 600/R-99/064. — Washington DC, USA. — 192 p.
21. Norberg-King T., Mount D.I., Durhan E.J. et al. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase I toxicity characterization procedures, 2nd ed. — US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Draft, EPA-699/6-91/003. — 98 p.
22. Sánchez P., Tarazona J. V. Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra* // Aquatic Toxicology. — 2002. — Vol. 60. — P. 249—256.

23. *Standard* guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods // Annual Book of ASTM standards. Section 11, Water and Environ. Technology, V. 11.05. E 1367-99. — P. 4584—4610.
24. *Standard* guide for conducting life-cycle toxicity tests with saltwater mysids // Annual Book of ASTM standards. Section 11, Water and Environ. Technology, V. 11.05. E 1191-00. — 17 p.
25. *Test* method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates // Annual Book of ASTM standards. Section 11, Water and Environ. Technology, V. 11.05. E 1706-00. — P. 1146—1228.

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев

Поступила 31.10.11