

УДК 574.64

Петросян А. Г.¹, ст. наук. сп., Дятлов С. Є.², канд. біол. наук, доц.¹ Одеський філіал Інституту біології південних морів НАН України,
вул. Пушкінська, 37, Одеса, 65011, Україна² Одеський державний університет, каф. гідробіології та загальної екології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ШКАЛА ТОКСИЧНОСТІ ДЛЯ ОЦІНКИ ЯКОСТІ МОРСЬКОГО СЕРЕДОВИЩА З ВИКОРИСТАННЯМ НАУПЛІАЛЬНИХ СТАДІЙ *ARTEMIA SALINA* L.

Запропонована шкала оцінки токсичності морського середовища, що пов'язує порушення розвитку і зниження виживання початкових наупліальних форм *Artemia salina* L. у несприятливих умовах з формалізованими характеристиками токсичності середовища, вираженої в балах.

Ключові слова: *Artemia salina* L., токсичність, шкала токсичності, морська вода, стічні води, донні відклади.

Для морського біотестування використовуються стандартні тест-об'єкти різної систематичної належності (бактерії, одноклітинні водорості, ракоподібні) [2]. За останній час у всьому світі [4, 5, 6], у тому числі і в Україні, як тест-об'єкт найчастіше використовується *Artemia salina* L. (тип — *Arthropoda*, клас — *Crustacea*, ряд — *Branchiopoda*). Це пояснюється тим, що у циклі розвитку тварини є стадія покою, яка дозволяє отримувати та зберігати необхідну кількість синхронізованої за часом вильову молоді.

Тести з артемією різноманітні. Використовується матеріал різного віку (від початкових наупліальних стадій до дорослих тварин) і контролюються різні тест-функції (смертність, ріст, репродукція, швидкість живлення, фототаксис та ін.). Термін проведення експериментів коливається в межах від 2,5 годин (реакція фототаксису) до 2—3 тижнів (репродуктивний тест). При цьому на початковому етапі експерименту використовуються всі стадії розвитку: цисти, які ще не почали ділитися, різні стадії метаморфозу наупліусів чи дорослі тварини [4].

Метою нашої роботи була апробація створеного раніше методу біотестування [2] при виконанні біологічного моніторингу у “гарячих точках” на чорноморському шельфі, а також розширення можливостей методу за рахунок введення шкали токсичності, яка дозволяє зв'язати зниження виживання тварин за несприятливих умов з формалізованими характеристиками токсичності середовища, що оцінюється у балах.

Матеріал і методи

Методика біотестування з використанням наупліусів артемії базується на порівнянні виживання тест-об'єктів у середовищі, що тестується, і у контролі протягом 72 годинної експозиції. Метод дозволяє оцінювати токсичність морських вод, розчинних хімічних сполук, стічних вод морського походження солоністю не нижче

12‰, а також донних відкладів, їх водних екстрактів та зважених часток. Для визначення токсичної дії середовища, що тестується, використовують личинок на ранніх стадіях метаморфозу, властивих низчим ракам, — орто- і метанаупліусів (рис. 1). В ці фази розвитку тварини знаходяться на ендогенному живленні.

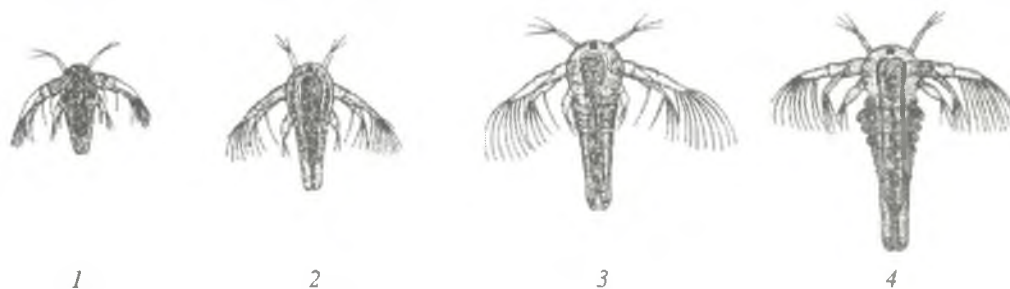


Рис. 1. Нормальний розвиток наупліусів *Artemia salina* (у контролі): 1 — I-й ортонаупліус (0,5 год.); 2 — II-й ортонаупліус, (24 год.); 3 — I-й метанаупліус (48 год.); 4 — I-й метанаупліус, збільшення числа сегментів (72 год.)

Біотестування на ранніх наупліусах *A. salina* складається з трьох послідовних етапів:

1. Підготовка тест-об'єкту і проб, що тестуються

1.1. Гідратація цист у прісній воді з аерацією (24 год.).

1.2. Інкубація цист у морській воді (18—24 год.), яка закінчується отриманням наупліусів (умови: аерація, солоність води 15 ± 30 , температура 20 ± 2 °C, 12-годинне освітлення лампами ЛДС 1500—2500 лк/м², рН 8,0—8,5).

1.3. Підготовка середовищ, які тестуються (у залежності від об'єкту досліджень та цілей експерименту: підготовка розчинів речовин, проб природної морської води, розбавлення проб стічних вод, отримання водних екстрактів донних відкладів та ін.).

1.4. Відбір наупліусів шляхом використання їх позитивного фототаксису.

2. Експеримент

2.1. Отримання тест-об'єктів на стадії I-го ортонаупліуса (рис. 1) в експерименті та в контролі (для статистичної обробки матеріалу у кожному варіанті використовується не менше 3-х повторностей, у кожній з яких — по 10 наупліусів). Мінімальний об'єм середовища для 10 наупліусів — 50 мл.

2.2. Підрахунок виживання, у % від контролю.

2.3. Спостереження за синхронністю розвитку наупліусів.

3. Підведення підсумків експериментів

3.1. Статистична обробка даних — визначення вірогідності відмінностей контрольних та дослідних варіантів — провадилась за критерієм Ст'юдента [3]. Підбір концентрації токсикантів, при яких гине відповідно 0, 50 и 100% тест-об'єктів (LC_0 , LC_{50} , LC_{100}); розрахунок мінімальної кратності розбавлення стічних вод, за якої тест-об'єкти не гинуть протягом експозиції (Kp_{min}); визначення виживання тест-об'єктів у природній морській воді, у водних екстрактах донних відкладів та ін. (у % від контролю).

3.2. Перевірка тест-реакцій наупліусів артемії за допомогою стандартного токсиканта біхромату калію [2]. Для І-ортонаупліусу визначення концентрації стандартного токсиканта, за якої не спостерігається будь-яких ефектів токсичної дії, у тому числі і порушень синхронності метаморфозу (при LC_0 загибель тест-об'єктів не спостерігається, але можливі відхилення у розвитку тварин). З'ясувалось, що $EC_{0\ 24\text{год}} = 8\text{ мг/л}$, а $LC_{50\ 24\text{год}} = 27,8 \pm 3,6\text{ мг/л}$ біхромату калію.

Результати та їх обговорення

В районі розсіювання стічних вод СБО "Південна" та "Північна" у 1992—1995 рр. регулярно по сезонах, а в останні роки — епізодично провадили дослідження, результати яких свідчать про відсутність гострої токсичності у природної морської води за даними біотестування. Проби води з поверхневого та придонного горизонтів у районі розсіювання стічних вод СБО "Південна" (травень, серпень 1993 р.) та з придонного горизонту у районі впливу цієї ж СБО (травень 1993 р.) викликали затримку розвитку тест-об'єктів на стадії І-метанаупліусу. Аналогічні порушення спостерігались на тест-об'єктах, яких інкубували у пробах води, що були відібрані в районі Аркадійського аварійного колектора та Іллічівського морського порту (вересень 1993 р.).

Мозаїчний просторовий розподіл водних мас в Одеській затоці, на Одеській банці, в гаванях Одеського порту, що викликає збільшення загибелі тест-об'єктів порівняно з контролем, спостерігався у липні 1994 р.

У квітні 1993 р. проведено дослідження якості очистки води на станції очистки баластових вод (СОБВ), з якої стічні води скидаються у акваторію нафтогавані Одеського порту. Встановлено, що стічна вода була токсичною для ранніх наупліусів *A. salina*, оскільки, як і у скидній воді, загибель наупліусів була практично миттєвою, і тільки розбавлення проб чистою морською водою у співвідношенні 1:7 сприяло нормалізації виживання та синхронності розвитку тест-об'єктів. У районі розсіювання стічних вод СОБВ показники виживання наупліусів не відрізнялись від контролю, що дало можливість оцінити природну морську воду у акваторії нафтогавані в цілому як нетоксичну.

У жовтні 1998 р. проведено тестування токсичності води і донних відкладів у Аджалицькому лимані. За результатами цих досліджень поверхневі води лиману були віднесені до категорії нетоксичних, а порові води і водні екстракти донних відкладів у районі підхідного каналу — до категорії токсичних та слаботоксичних. Звертає на себе увагу те, що слаботоксичні властивості притаманні донним відкладам не тільки у поверхневому шарі 0—3 см, але й на глибині 1 м (відбір проведений геологічною трубкою). При цьому у порових водах донних відкладів смертність тест-об'єктів не перевищувала 77,8%, однак у наупліусів спостерігалось відставання у рості та затримка у формуванні стадії І-метанаупліусу.

Дані, що були отримані у 1992—1994 рр. для забруднених гаваней Одеського порту, акваторій Одеської затоки і Одеської банки, Дніпровсько-Бугського лиману та ділянки гідрофронті р. Дунай, дозволили виділити найбільш забруднені (за даними біотестування) райони північно-західної частини Чорного моря. Донні відклади, що були досліджені у районах моря з різними рівнями антропогенних навантажень у більшості випадків віднесені до категорії нетоксичних для наупліусів *A. salina*. Виняток складали деякі акваторії Одеського порту (Нафтога-

вань, Військова гавань, ділянка біля Старого хвилелому), де смертність тварин у водних екстрактах донних відкладів складала 20—80%, подекуди зростаючи з глибиною залягання зразка. Це дало можливість віднести донні відклади цього району до категорії токсичних і навіть до досить рідкої для північно-західної частини Чорного моря категорії летальних для тест-об'єкту [1].

При вивченні реакції ракоподібних на забруднюючі речовини, що скидаються у морське середовище, до дуже токсичних для наупліусів *A. salina* було віднесено миючий засіб нового покоління “Аквар” (у концентраціях вище 5 мг/л), дизельне паливо (25 мг/л), а також суміш “Аквару”, дизельного палива та стічних вод СБО “Північна”.

Критерієм гострої токсичності середовища є вірогідне зниження виживання ракоподібних у пробі, що тестується, порівняно з контролем. Досі відсутні чіткі критерії, які б дозволяли оцінити токсичність проб, що тестуються. Зрозуміло, що у випадку морської води, екстрактів донних відкладів та ін. традиційні еко-токсикологічні показники, які вказують на чутливість або стійкість організму до токсичного впливу, неприйнятні, бо мова йде не про окрему розчинену речовину, а про складне середовище. Загибель організму в експерименті — це фінальна його реакція на токсичність середовища. Досить часто спостерігаються відхилення від норми у метаморфозі наупліусів, які дозволяють прогнозувати нежиттєздатність організмів у майбутньому.

Для оцінки ступеня шкідливості впливу забруднень на досліджуваний тест-об'єкт нами на підставі попередніх досліджень запропонована спеціальна шкала токсичності, наведена у табл. 1.

Таблиця 1

Шкала оцінки якості водного середовища за виживанням наупліусів артемії

Бали токсичності	0	1	2	3	4
Характеристика середовища	Нетоксичне	Слабо-токсичне *	Середньо-токсичне *	Гостро-токсичне	Летальне
Зниження виживання наупліусів, (% від контролю)					
Kp _{min}	—	1:1	1:3—1:10	1:11—1:25	> 1:25

Примітка: * — іноді спостерігається асинхронність метаморфозу.

Шкала токсичності може бути використана за тестування різних середовищ (стічних та природних вод, водних екстрактів донних відкладів, порових вод, розчинених хімічних сполук та ін.). В основу шкали покладено ступінь виживання ранніх наупліусів *A. salina* після 72-годинного перебування у середовищі, що тестується (табл. 1).

На підставі аналізу великої кількості проб морської води із згаданих вище акваторій, а також розчинів хімічних сполук, які викликають смертність тест-об'єктів, розрахована необхідна кратність розбавлення проб (Kp_{min}), при який проба, що тестується, позбавляється токсичних властивостей. Відхилення у виживанні наупліусів порівняно з нормою оцінюються у балах.

Зниження виживання до 50—90% ми вважаємо порогом ризику для тест-об'єкту. Проби, що тестуються, при цьому оцінюються як слабо чи середньотоксичні. Як правило, у середовищах такого типу спостерігається асинхронний метаморфоз, затримується або припиняється розвиток початкових стадій ортонаупліусу. Ці порушення, як правило, не викликають масової смертності тест-об'єктів за 72 години експозиції і спостерігаються за тестування проб, які за шкалою токсичності оцінюються в один-два бали. Критичною стадією метаморфозу у артемій, що розвиваються в слабо- і середньотоксичному середовищі, є перехід на екзогенний тип живлення (через 72—96 год. після початку метаморфозу). У цей час, як правило, відбувається масова загибель тварин.

У гостротоксичних та летальних середовищах (3 і 4 бали) інтоксикація призводить до загибелі більш як 50% тварин на самих ранніх стадіях метаморфозу. При цьому у тих тест-організмів, що вижили, часто буває порушеною найважливіша функція — фототаксис, що надалі впливає на активність живлення, а, отже, не дозволяє тваринам, що вижили, закінчити метаморфоз і призводить їх до загибелі. При 3—4 балах токсичності масова загибель артемій спостерігається через 1—24 год., тобто на стадії І-ортонаупліуса. В умовах північно-західної частини Чорного моря донні відклади з подібними характеристиками були знайдені у 1993 р. в акваторії Одеського порту. Частіше такими параметрами відрізняються і недостатньо очищені стічні води.

Література

1. Дятлов С. Е., Петросян А. Г., Ходаков И. В., Доценко Т. В., Эльстер А. М. Экспериментальная оценка качества прибрежных вод и донных отложений методами биотестирования // Исследование экосистемы Черного моря: Сб. научных трудов УкрНЦЭМ. — Вып. 1. — 1994. — С. 141—148.
2. КНД 211.1.4.047-95. Біотестування морської води та стічної, яка відводиться в море. Методика. Видання офіційне. — К., 1995. — 37 с.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия — М.: Высшая школа. — 1990. — 352 с.
4. Persoone G., Wells P. G. Artemia in aquatic toxicology: a review // Artemia Research and its Applications. — Vol. 1. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology. Universa Press, Wetteren, Belgium. — 1987. — P. 260—275.
5. Vanhaecke P., Persoon G. The ARC-test: a standartized short-term routine toxicity test with Artemia nauplii. Methodology and evaluation // Ecotoxicological testing for the marine Environment. State Univ. Ghent; Inst. Mar. Sci. Res. — Vol. 2. — Bredne, Belgium, 1984. — P. 143—157.
6. Van Streertegem M., Persoone G. Cyst-based Toxicity Tests: V. Development and critical evaluation of standardized toxicity tests with the brine shrimp *Artemia* (Anostraca, Crustacea) // Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. — Lewis Publishers, 1993. — P. 81—97.

Петросян А. Г.¹, Дятлов С. Е.²

¹ Одесский филиал Института биологии южных морей НАН Украины,
ул. Пушкинская, 37, Одесса, 65011, Украина

² Одесский государственный университет, каф. гидробиологии и общей экологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ШКАЛА ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА МОРСКОЙ СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАУПЛИАЛЬНЫХ СТАДИЙ *ARTEMIA SALINA* L.

Резюме

Предложена шкала оценки токсичности морской среды, связывающая снижение выживаемости *Artemia salina* L. на ранних науплиальных стадиях в неблагоприятных усло-

виях с формализованными характеристиками токсичности среды, выраженными в баллах. Впервые для морских организмов вводится понятие минимальной кратности разбавления, необходимое для устранения острой токсичности тестируемой пробы.

Ключевые слова: *Artemia salina* L., токсичность, шкала токсичности, морская вода, сточные воды, донные осадки.

Petrosyan A. G.¹, Dyatlov S. E.²

¹ Odessa Branch, Institute of Biology of Southern Seas NAS of Ukraine,
Pushkinskaya St., 37, Odessa, 65011, Ukraine

² Odessa State University, Department of Hydrobiology and General Ecology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE SCALE OF TOXICITY ASSESSMENT OF THE QUALITY OF MARINE ENVIRONMENT USING NAUPLII OF *ARTEMIA SALINA* L.

Summary

The scale of toxicity assessment of marine environment that show the dependence of survival of nauplii *Artemia salina* L. (early stages) under the unfavorable conditions on characteristics of environmental toxicity expressed in marks has been suggested.

Key words: *Artemia salina* L., toxicity, scale of toxicity, marine water, waste waters, bottom sediments.