ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ БІОТЕСТУВАННЯ У МОНІТОРИНГОВИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ ПРИРОДНИХ ПОВЕРХНЕВИХ ТА ПІДЗЕМНИХ, А ТАКОЖ ПРОМИСЛОВИХ СТІЧНИХ ВОД

Саламатін Д.М., Дігтяр С.В.

Кременчуцький національний університет імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева, 20, 39600, м. Кременчук, Полтавська область
sergiusvictor@gmail.com

Проведено біотестування проб природних підземних і поверхневих, а також промислових стічних вод. Об'єктом досліджень, проведених протягом 2019 – початку 2020 рр., були проби природних поверхневих і підземних вод, відібраних на території промислових підприємств, а також вода поверхневого джерела централізованого питного водопостачання комунального підприємства «Кременчукводоканал». Також було проведено роботи з визначення фактичного рівня токсичності й радіоактивності зворотної води двох випусків Криворізького заводу приватного акціонерного товариства «ХайдельбергЦемент Україна». В ході процедури біотестування було застосовано методику, передбачену національним стандартом визначення якості води, що передбачає використання як тест-об'єктів типових мешканців місцевих гідроєкосистем, представників гіллястовусих рачків виду *Daphnia magna* Straus. Методика ґрунтується на встановленні різниці між кількістю загинувших дафній у воді, що тестується (дослід), та воді, в якій дафнії утримуються (контроль). Критерієм гострої токсичності є загибель 50% дафній і більше в досліді в порівнянні з контролем за 48 годин біотестування. Біотестування проводили за стандартних умов у термолюміностації при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, освітленості 400–600 люкс, тривалості світлого періоду 16 год, темного – 8 год. Для контролю та приготування розбавлень води використовували питну воду, яку попередньо дехлорували шляхом відстоювання. Здійснено порівняльний аналіз отриманих результатів. Виявлена гостра токсична дія в ряді проб і здійснено спробу пояснити результат. Висока практичність і корисність процедури біотестування була доведена експериментально з використанням як тест-об'єктів представників різних таксономічних груп. **Ключові слова:** біотестування, тест-об'єкт, *Daphnia magna*, гостра токсична дія, моніторингові дослідження, токсиканти, промислові стічні води.

Application of biotesting methods in monitoring research natural surface and underground, and also industrial waste water. Salamatin D., Digtiar S.

The biotesting samples of natural underground and surface water, as well as industrial water was carried out. The object of research conducted during 2019 – early 2020 were samples of natural surface and groundwater taken on the territory of industrial enterprises, as well as water from the surface source of centralized drinking water supply KP “Kremenchukvodokanal”. Work was also carried out to determine the actual level of toxicity and radioactivity of the return water of two issues of the Kryvyi Rih plant of PJSC “HeidelbergCement Ukraine”. During the biotesting procedure, the method provided by the national standard for determining water quality was applied, which provides for the use as test objects of typical inhabitants of local hydroecosystems, representatives of *Daphnia magna* Straus. The method is based on establishing the difference between the number of dead daphnia in the tested water (experiment) and the water in which the daphnia is kept (control). The criterion of acute toxicity is the death of 50% of daphnia and more in the experiment compared with the control for 48 hours of biotesting. Biotesting was performed under standard conditions in a thermoluminescent temperature $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, illumination 400–600 lux, duration of light period 16 hours, dark period – 8 hours. Drinking water, which was previously dechlorinated by settling, was used to control and prepare water dilutions. In the course of the procedure, the test procedure was staged, transferred to the national standard for the definition of water quality, transmission of the test as standard test cases of typical industrial systems, a representative of the city district. The comparative analysis of the received results is carried out. Acute toxicity was detected in a number of samples and an attempt was made to explain the result. The high practicality and usefulness of the biotesting procedure has been proven experimentally with the use of representatives of different taxonomic groups as test objects. **Key words:** bioassay, test report, *Daphnia magna*, acute toxic effect, monitoring studies, toxicants, industrial wastewater.

Постановка проблеми. Вода – основа всіх життєвих процесів. Вона присутня у всій біосфері: не тільки у водоймах, але й у повітрі, ґрунті, у всіх живих організмах. Усі живі істоти містять до 80–90 % води у своїй біомасі. Втрата 10–20% води живими організмами спричиняє їх загибель. Вона незамінна для збереження екосистем, для економічного та соціального розвитку суспільства. Вода є власністю всього людства. Необхідно співпрацювати з країнами, що здійснюють транскордонний захист поверхневих та підземних запасів прісної

води. Вода є стратегічною сировиною № 1 для XXI століття

Неухильне зростання антропогенного навантаження на екосистеми та пов'язане з ним забруднення навколишнього, зокрема водного середовища, обумовлює гостру актуальність проблеми індикації стану довкілля. Починаючи з другої половини минулого століття на європейських підприємствах, де технологічний процес передбачає скидання промислових стічних вод у природні водойми, поряд з фізичними та хімічними методами оцінки якості

водойм почав широко застосовуватися метод біотестування. Його принциповою особливістю є використання в якості тест-об'єктів живих організмів. До переваг такої методики перед традиційними можна віднести простоту проведення процедури й економічність (не потребує складного обладнання та цінних реактивів), швидкість отримання результатів та їх висока інформативність (результати короточасного біотестування можуть бути отримані протягом годин, а в якості тест-об'єктів використовуються типові представники водних екосистем). Все це зумовило впровадження такої технології й на території нашої держави.

Найповніша оцінка еколого-токсикологічного стану водних об'єктів ґрунтується на використанні даних біотестування у комплексі з даними гідробіологічного і хімічного аналізів.

Постановою Кабінету Міністрів України № 1100 від 11 вересня 1996 року «Про порядок розроблення і затвердження нормативів гранично допустимого скидання забруднюючих речовин та перелік забруднюючих речовин, скидання яких нормується», до списку речовин, які нормуються, включено показник «Рівень токсичності води», який визначається на основі біотестування. Використання методу біотестування при аналізі проб води надає значні переваги щодо встановлення рівня екологічної безпеки досліджуваного об'єкту.

Чинний натеper в Україні документ «Методика екологічної оцінки якості поверхневих вод за відповідними категоріями» був розроблений у 1998 році. Відтоді відбулися значні зміни у водоохоронній практиці більшості країн Європи. У 2000 році була введена у дію Водна Рамкова Директива Європейського Союзу (далі – ЄС) 2000/60/ЄС [1; 2], яка визначила основні пріоритети у водоохоронній діяльності та шляхи досягнення доброго стану поверхневих вод. Згідно із цим документом, головним питанням при оцінці якості поверхневих вод є визначення структурних та функціональних показників біологічної складової водних екосистем як основного чинника забезпечення стабільності умов відтворення водних ресурсів. Протягом наступного десятиліття було виконано значну роботу щодо інтеркалібрації біологічних методів оцінки якості поверхневих вод у країнах ЄС. Провідними фахівцями країн ЄС був розроблений комплекс методичних керівництв щодо проведення аналізу стану різнотипних водних об'єктів та представлення його результатів. Підготовлено рекомендації щодо втілення положень Водної Рамкової Директиви ЄС 2000/60/ЄС у водоохоронну практику країн Східної Європи. Ці обставини обумовили необхідність коригування діючої в Україні методики екологічної оцінки якості поверхневих вод, перш за все щодо підвищення ролі біологічного аналізу, розширення переліку біологічних показників і введення принципу оцінювання якості вод на основі порівняння з еталонними умовами.

В наш час відповідно до наказу Держспоживстандарту України від 10 червня 2003 р. № 100 з 2004–07–01 як національний стандарт України застосовується ДСТУ 4173:2003 (ISO 6341:1996, MOD) «Якість води. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (*Cladocera*, *Crustacea*)» [3], а також ДСТУ 7387:2013 «Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо реріо (*Brachydanio rerio* Hamilton–buchanan)» [4], який було прийнято та набув чинності відповідно до наказу Мінекономрозвитку України від 11 червня 2013 р. № 622 з 2014–07–01.

Матеріал і результати досліджень. Методи біотестування питних вод, будучи одними з сучасних біологічних методів контролю якості питних вод, набувають все більшої актуальності і значимості за визначенням токсикантів у водному середовищі. Показником стану живих організмів є ефективність фізіологічних процесів, що забезпечують нормальну життєдіяльність організму. Розглянуто біологічні методи контролю якості води, які засновані на використанні для вимірювання реакцій біологічних об'єктів фізіологічних і поведінкових характеристик, та доцільність використання батареї тестів [4; 5].

Води більшості поверхневих джерел питного водопостачання України характеризуються помірним і високим рівнем забруднення. Нині майже немає поверхневої водойми, яку можна віднести до водойм першої категорії за ступенем забрудненості води та екологічним станом [1]. Основними забруднювальними речовинами впродовж багатьох років залишаються органічні речовини, синтетичні поверхнево-активні речовини, важкі метали, радіонукліди, пестициди тощо. Останнім десятиліттям їх накопичення інтенсивно збільшується через забруднювачі, що потрапляють у водойми внаслідок застосування сучасних інноваційних технологій у сільськогосподарському виробництві та промисловості, зокрема наночастинки штучного походження, які істотно відрізняються від решти складових води за фізико-хімічними та біологічними властивостями [2]. Вивчення впливу таких частинок на стан водних екосистем достатньою мірою ще не проводилось. Вказані зміни у складі природних вод відбуваються на фоні вже давно існуючого низького рівня (або взагалі відсутності) процесів самоочищення водних об'єктів. За таких умов різко ускладнюється можливість отримання якісної питної води, оскільки водопровідні станції не здатні ефективно затримувати більшість техногенних хімічних речовин [1; 2].

Основою біотестування якості води є відповідна тест-реакція різних організмів на пригнічувальний чи згубний вплив токсичних речовин, які потрапили у воду. Тест-об'єктами можуть бути істоти всіх таксономічних груп – від бактерій до ссавців. Біотестування є можливим на всіх рівнях організації

живої матерії (генетичному, цитологічному, гістологічному та інших). Проте лише незначну частину організмів визнано уніфікованими (водорості, інфузорії, риби гупі та форель, планктонні рачки, цибуля звичайна, салат посівний тощо), на основі чого і були розроблені стандартні досліди [6].

У багатьох дослідженнях було продемонстровано [4–7], що ефективність методу біотестування істотно зростає за використання не поодиноких організмів (навіть якщо вони уніфіковані), а так званих наборів тест-об'єктів, до складу яких входять тваринні та рослинні форми. Серед тваринних форм найчастіше використовують дафній (*Daphnia magna* Straus) стандартизовані тест-організми, а рослинні форми (як додаткові до уніфікованих дафній) часто репрезентують *Allium cepa* L. та *Lactuca sativa* L. Упродовж тривалого часу подібні набори тест-об'єктів застосовували для визначення токсичності природних та стічних вод, а з розробкою ДСанПіНу 2.2.4-171-10 їх використання було «перенесено» і на питну воду. Однак для біотестування токсичності питної води, що є значно чистішою порівняно з іншими водами, традиційні тест-об'єкти не завжди виявляються достатньо чутливими. Тому доцільно як додаткові тестори випробувати ті рослини, які мають вищу чутливість до забруднення довкілля, ніж традиційні. Доволі відомою в цьому аспекті є традесканція (*Tradescantia fluminensis* Vellozo), яка широко використовується для визначення токсичності (у тому числі генотоксичності) атмосферного повітря та ґрунту, а також може бути застосована для біотестування води [6].

Для стандартних екотоксикологічних біологічних аналізів розроблені методи, які реєструються, рекомендуються або впроваджуються в організаціях стандартизації – Міжнародна організація зі стандартизації (ISO), Європейський комітет стандартизації (CEN), США Агентство з охорони довкілля (EPA США), Організація економічного співробітництва та розвитку (OECD), національні уряди та закони.

Для стандартних біологічних аналізів існують стандартизовані процедури та методології для оцінки та моніторингу впливу речовин як на одноразові, так і на багатовимірні випробування, а також на польові експерименти. Метою стандартизації окремих кроків експериментальної процедури є, зокрема, максимальне обмеження фактора «Інтерлабораторна мінливість» [6].

Випробування на гостру токсичність – це короткострокові тести, що оцінюють вплив токсичних речовин на організм протягом короткого періоду їх життя. Він оцінює вплив речовин на ціноутворення організмів через 24–96 годинний період (рис. 1). Спочатку ці тести були розроблені для водної екотоксикології, але тепер на його гостру токсичність, навіть коли земні організми шляхом модифікації звичайних випробувань гострої токсичності у водному середовищі в залежності від природи і існування звичок [7].

Ми виділяємо дві основні категорії токсичних ефектів:

Гостру токсичність – велика доза отрути короткої дії, зазвичай смертельна, тобто отруйний ефект токсичної речовини негайно проявляється, безпосередньо впливає на виявлений організм.

Хронічна токсичність – низька доза отрути протягом тривалого періоду може бути смертельною або сублетальною, ефект не проявляється, поки через кілька днів, місяців або років діяльності і часто відбувається накопичення токсинів в організмі організмів, симптоми хронічної інтоксикації визначаються в основному для наступних поколінь розвитку [4].

Рис. 1. Основний тест-об'єкт, що використовується при визначенні токсичної дії досліджуваних зразків – *Daphnia magna* Straus

Методика ґрунтується на встановленні різниці між кількістю загиблених дафній у воді, що тестується (дослід), та воді, у якій дафнії утримуються (контроль). Критерієм гострої токсичності є загибель 50% дафній і більше у досліді порівняно з контролем за 48 годин біотестування.

Біотестування проводили за стандартних умов у термолюмініостаті при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, освітленості 400–600 люкс, тривалості світлого періоду 16 год, темного – 8 год. Для контролю і приготування розбавлень води використовували питну воду, яку попередньо дехлорували шляхом відстоювання.

Для визначення гострої летальної токсичності проби води та її розбавлення наливають по 15 см^3 у посудини (дослід). Інші посудини заповнюють таким самим об'ємом контрольної води. У кожну з дослідних та контрольних посудин поміщують по одній дафнії. Під час біотестування дафній не годують. Наприкінці біотестування візуально підраховують живих дафній. Живими вважають дафній, які вільно рухаються у товщі води або спливають з дна посудини після легкого струшування.

За результатами підрахунку живих дафній розраховують кількість загиблених періодафній у досліді відносно контролю, отримавши значення А. Вважається, що гостра летальна токсичність води виявляється, якщо $A \geq 50\%$. За результатами розрахунків загиблених

дафній (в процентах) у кожному розбавленні порівняно з контролем проводиться кількісна оцінка (клас токсичності) кожної проби. Класифікація проб води за ступенем та рівнем токсичності надано у таблиці 1.

Таблиця 1

**Класифікація проб води
за ступенем та рівнем токсичності**

Клас токсичності	Ступінь токсичності	Фактичний рівень токсичності
1	нетоксична	менше або дорівнює 0
2	слаботоксична	більше 0 до 2
3	помірно токсична	більше 2 до 5
4	середньо токсична	більше 5 до 10
5	високотоксична	більше 10 до 25
6	надзвичайно токсична	більше 25

Об'єктом досліджень, проведених протягом 2019 – початку 2020 років, були проби природних поверхневих та підземних вод, відібраних на території промислових підприємств, а також вода поверхневого джерела централізованого питного водопостачання КП «Кременчукводоканал».

Також було проведено роботи з визначення фактичного рівня токсичності та радіоактивності зворотної води двох випусків Криворізького заводу ПрАТ «ХайдельбергЦемент Україна».

Роботи виконувались згідно зі ст. 44, 70 Водного кодексу України.

Відбір проб зворотної води Криворізького заводу ПрАТ «ХайдельбергЦемент Україна» для визначення гострої летальної токсичності методом біотестування здійснювали у серпні 2019 року.

Результати визначення гострої летальної токсичності проб зворотної води підприємства наведено у таблиці 2.

Висновки. Серед основних результатів, яких вдалося досягти в ході досліджень:

- переважна більшість протестованих проб води не виявили гострої токсичної дії на тест-об'єкти;
- незначне погіршення якості води в окремих пробах може бути пояснене сезонними змінами у їх хімічному складі в наслідок несприятливих погодних умов у регіоні;
- фактичні рівні токсичності зливових та дренажних вод ПрАТ «ХайдельбергЦемент Україна» (м. Кривий Ріг) дорівнюють нулю, води нетоксичні, відносяться до 1 класу токсичності;
- гостра токсична дія проби підземної води, відібраної на території ТОВ НВП «Глобинський

■ цех дорощування
 □ Цех відгодівлі №1, св. 2
 ■ Репродуктор №1, св. 1484-B
 ■ Цех відгодівлі №3, св. 2
 ■ Цех відгодівлі свиней, св. 1578
 ■ Племенний репродуктор №2, св. 6
 ■ Репродуктор №1
 □ Цех відгодівлі №1, св. 2313
 ■ Цех відгодівлі №3, св. 1
 □ Цех відгодівлі №3, св. 3
 ■ Племенний репродуктор, св. 172
 ■ Цех дорощування №2, св. 1

Рис. 2. Результати біотестування підземних вод
ТОВ НВП «Глобинський свиномкомплекс»

Таблиця 2

**Результати визначення гострої летальної токсичності проб зворотної води
Криворізького заводу ПрАТ «ХайдельбергЦемент Україна»**

Місце відбору проби	Дата відбору проби	Висновок щодо токсичності проби зворотної води
Промислова площадка Випуск № 2 (дренажні води)	13 серпня 2019 року	нетоксична
Промислова площадка Випуск № 1 (зливові води)	13 серпня 2019 року	нетоксична
Промислова площадка Випуск № 2 (дренажні води)	13 серпня 2019 року	нетоксична
Промислова площадка Випуск № 1 (зливові води)	13 серпня 2019 року	нетоксична
Промислова площадка Випуск № 2 (дренажні води)	13 серпня 2019 року	нетоксична
Промислова площадка Випуск № 1 (зливові води)	13 серпня 2019 року	нетоксична

Рис. 3. Результати біотестування проб води
КП «Кременчукводоканал»

свинокомплекс» 21.01.2020, може бути обумовлена потраплянням до водоносного горизонту органічних продуктів життєдіяльності худоби, зокрема йонів амонію, що підтверджується зокрема результатами хімічного аналізу;

– випробувана методика біотестування з використанням ракоподібних довела своє вагоме практичне значення, до її переваг можна віднести те, що будучи застосованою разом з іншими аналітичними методами (фізичними, хімічними тощо), суттєво допомагає досліднику максимально об'єктивно інтерпретувати отримані дані, надає результатам високу інформативність та репрезентативність.

Практичні результати роботи в такому напрямку закріплені у вигляді ряду публікацій у вітчизняних та закордонних фахових виданнях.

Література

1. Водна Рамкова Директива ЄС 2000/60/ЄС Основні терміни та їх визначення. Київ, 2006. 8 с.
2. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy Official Journal L 327, 22/12/2000 P. 0001 – 0073. URL: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32000L0060:EN:HTML>.
3. ДСТУ 4173: 2003. Якість води. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (*Cladocera*, *Crustacea*). ISO 6341: 1998, MOD. [Чинний від 2004-07-01]. Київ, 2004.
4. ДСТУ 7387: 2013. Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Данію реріо (*Brachydanio rerio* Hamilton – buehner). [Чинний від 2013-07-01]. Київ, 2013.
5. Губачов О.І., Сливка Г.В. Біотестування. Кривий Ріг : Мінерал, 2011. 192 с.
6. Чалова И.В. Оценка качества природных и сточных вод методами биотестирования с использованием ракообразных (*Cladocera*, *Crustacea*). Рыбинск : Рыбинский Дом печати, 2007. 73 с.
7. Кутикова Л.А., Старобогатов Я.И. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР (планктон и бентос). Ленинград : Гидрометеиздат, 1977. 511 с.