

# ВЛИЯНИЕ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПРИРОДНЫХ И АНТРОПОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЭКОСИСТЕМЫ

УДК 574.64:57.083.3

**О. А. Бедункова**

*Национальный университет водного хозяйства и природопользования, г. Ровно, Украина*

## ДИАГНОСТИКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ПО ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ ИЗМЕНЕНИЯМ ВЫСШЕЙ ВОДНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ

*Проведено биотестирование поверхностных вод малой реки в пределах городской территории по цитологическим показателям лабораторной культуры макрофита элодея канадская. Соотношение клеток листьев растения на разных жизненных стадиях и степень плазмолиза в них свидетельствовали о хроническом токсическом действии поверхностных вод на протяжении года. Рекомендовано в качестве тест-реакции использовать долю живых клеток в зоне нарастания побега.*

➤ **Ключевые слова:** *поверхностные воды, токсичность, тест-реакция.*

### **Введение**

С целью оценки токсичности химических веществ для гидробионтов, индикации токсических загрязнений и общего уровня токсификация водных экосистем современные ученые используют три основных метода: индикация по шкале токсобности, биотестирование и использование организмов-мониторов (биоиндикация) [1, 2]. Среди них наиболее доступным и достаточно информативным методом контроля токсичности является биотестирование. Это объясняется тем, что чувствительность тест-объектов к изменениям, которые происходят в ряде случаев значительно выше, чем существующих физических и химических методов [3]. Кроме того, определенные показатели жизнедеятельности организмов-биотестеров реагируют не только на малые дозы экологических факторов, но и позволяют выявить синергизм, потенцирование или ингибирование влиятельных факторов [4].

Такие подходы имели место в течение всего периода развития гидроэкологических исследований, а в последние десятилетия стали официально признанными в ряде руководящих нормативных документов многих стран [5–8].

### **Объекты и методы исследований**

Задачей наших исследований было диагностирование токсического воздействия воды малой реки Устья и выявление наиболее загрязненных участков водотока в пределах города Ровно. На участках реки в пределах города происходят периодические внезапные заморы рыбы. Имеет место зарастание русла и наличие признаков эвтрофикации, которые сохраняются в определенных местах до зимнего периода. Возможно предположить, что причиной замора могут быть спонтанные попадания в речку ряда загрязнителей как с поверхностным так и с несанкционированными стоками, которые вступают в реакцию с присутствующими в воде органическими веществами, что усиливает их негативное влияние. Речь идет об аддитивности - простой сумме токсического эффекта или синергизме - взаимном усилении токсического действия. Длительные признаки эвтрофикации в свою очередь, подтверждают наличие в воде высоких концентраций органических и определенных концентраций токсичных веществ.

Отметим, что качество поверхностных вод реки в исследуемых точках заметно отличается от своих характеристик в истоке, что, прежде всего, обусловлено сменой типа вод с гидрокарбонатного на хлоридно-гидрокарбонатный. Содержание хлоридов на исследуемом отрезке реки составляет в среднем 60–70 мг/дм<sup>3</sup>. До города вода имеет нейтральную реакцию (рН = 7,4–8), а в пределах горо-

да меняется на слабощелочную (рН = 8,48–8,62). Начиная со второй исследуемой точки, в воду реки с канализационным стоком поступают азотные соединения, и концентрации нитратов увеличиваются до 3,3–6,6 мг/дм<sup>3</sup>, что в два раза превышает их концентрацию в верхней части реки. Загрязнение воды реки в пределах городской территории, в первую очередь обусловлено бытовыми стоками и в несколько меньшей степени промышленными. Особенно велико содержание в сточных водах нефтепродуктов (превышение ГДК в 14 раз), фенолов (19 раз), нитратов и некоторых тяжелых металлов: цинк (2, 3 раза), свинец (2 раза), марганец (11 раз). Без сомнения, ситуация, которая сложилась с состоянием речки в пределах города вызывает беспокойство, поскольку указывает на ухудшение ее самоочищающей способности и экологического состояния.

Тест-объекто для диагностики токсичности воды реки Устья мы выбрали макрофит *Elodea canadensis* (элодея канадская), который является достаточно чувствительным к токсическим веществам и позволяет оценить как токсический, так и евтрофирующий эффект антропогенной нагрузки на гидроэкосистему и ее биологические ресурсы. При этом чувствительными оказываются как морфометрические, так и цитологические показатели данного тест-объекта [3, 6, 7, 9].

Оценивали воду реки Устья в черте города Ровно в трех створах: створ № 1 – 100 м ниже плотины Басовкутского водохранилища; створ № 2 – у моста (центральный городской рынок); створ № 3 – расширенный участок реки возле кафе "La Riva". Отбор воды реки осуществляли согласно стандартизированных методик [6, 10] в декабре и январе до наступления ледяного покрова (осенне-зимний период) и в апреле-июне (весенне-летний период).

Экспериментальные емкости с вариантами опыта были размещены на дневном рассеянном свете, в помещении при температуре 20–21 °С. На 1 дм<sup>3</sup> воды размещали по три отсеченных верховых побега *E. canadensis* длиной 4 см. Для обеспечения надлежащей аэрации осуществляли продувку с помощью микрокомпрессора.

Оценка изменений цитологических показателей тест-объекта *E. canadensis* предусматривала:

- 1) учет живых, отмерших и погибающих клеток листа *E. canadensis* после экспозиции в хроническом эксперименте в разных вариантах;
- 2) установление стадии плазмолиза клеток листа *E. canadensis* после экспозиции в хроническом эксперименте в разных вариантах.

Продолжительность экспозиции составляла 14 суток.

При проведении подсчета количества клеток в различных жизненных стадиях исследовали листья растения, которые были размещены ближе к зоне нарастания. В качестве красителя использовали раствор метиленового синего в фосфатном буфере (200 мг красителя на 1 литр буферного раствора), в концентрации 1:10 с дистиллированной водой.

Для анализа готовились временные препараты из листьев *E. canadensis*, которые наблюдались с помощью биологического тринокулярного микроскопа Микротон-400 (Россия) при увеличении 8×40. В ходе эксперимента регистрировались одиночные темно-синие (мертвые) клетки, заключенные между непрокрашенными светлыми, зелеными (живыми) клетками.

Бледно-голубая окраска клеток, которая встречалась на препаратах, свидетельствовала об увеличении проницаемости мембран в результате серьезных нарушений клеток на начальных стадиях некроза (погибающие клетки).

Подсчеты проводились в трехкратной повторности по каждому из вариантов опыта после экспозиции побегов *E. canadensis* в образцах поверхностных вод р. Устья. Учет вели по количеству живых клеток, клеток на начальной стадии некроза (погибающие клетки) и клеток в стадии некроза (мертвые) на 1000 клеток листа *E. canadensis* в зоне нарастания побега. Результаты подсчетов выражали в промилле (‰).

Стадии плазмолиза клеток листа элодея в различных вариантах опыта хронического эксперимента оценивались визуально, согласно критериям [6].

Результаты биотестирования представляли с помощью индекса токсичности, который определяет величину отклонения тест-реакции в опытном варианте от контроля в процентных долях изменений учетных параметров, по формуле:

$$A_i = \frac{L_k - L_d}{L_k} * 100, \%$$

где:  $A_i$  – индекс токсичности (величина тест-реакции);  $L_k$  – значение учетного параметра вначале эксперимента;  $L_d$  – значение учетного параметра в конце эксперимента [6].

Критерием хронической токсичности считалось статистически значимое отклонение в опыте от контроля при доверительной вероятности показателей  $P \leq 0,05$  (по критерию Стьюдента) [6, 7].

### Результаты исследований и их обсуждение

Результаты подсчета живых клеток листа *E. canadensis* и клеток на различных этапах некроза приведены в табл. 1. Здесь же приведены результаты вычисления среднеарифметической доли клеток ( $M$ , %), ошибки среднеарифметического ( $\pm m$ ) и величина доверительной вероятности ( $P$ ) по критерию Стьюдента для повторностей каждого из вариантов опыта.

Таблица 1

Учет и оценка результатов подсчета количества клеток *Elodea Canadensis* на разных жизненных стадиях

Вариант	Жизненные стадии клеток листов побега в зоне нарастания								
	Живые			Начальные стадии некроза			Некроз		
	$M \pm m, \%$	$A_i, \%$	$P \leq$	$M \pm m, \%$	$A_i, \%$	$P \leq$	$M \pm m, \%$	$A_i, \%$	$P \leq$
Осенне-зимний период									
Контроль	966 ± 13,7	—	—	32 ± 14,18	—	—	2 ± 0,29	—	—
Створ № 1	781 ± 22,95	19,15	0,05	178 ± 24,06	—	0,05	41 ± 4,27	—	0,05
Створ № 2	888 ± 21,29	8,1	0,05	85 ± 25,75	—	0,05	27 ± 4,58	—	0,05
Створ № 3	644 ± 31,43	33,3	0,05	242 ± 31,76	—	0,05	114 ± 2,65	—	0,05
Весенний период									
Контроль	968 ± 5,1	—	—	24 ± 4,1	—	—	8 ± 1,04	—	—
Створ № 1	814 ± 14,5	15,9	0,05	167 ± 16,5	—	0,05	19 ± 2,2	—	0,05
Створ № 2	816 ± 4,6	15,7	0,05	91 ± 8,04	—	0,05	93 ± 3,5	—	0,05
Створ № 3	482 ± 39,1	50,2	0,05	410 ± 43,9	—	0,05	108 ± 3,9	—	0,05

Из представленных результатов можно заметить, что в осенне-зимний период по всем вариантам опыта наиболее многочисленными оказались живые клетки в контроле, где их средняя доля составила  $966 \pm 13,7\%$ . Среди проб поверхностных вод реки, доля живых клеток *E. canadensis* была наибольшей в створе № 2, наименьшей в створе № 3, соответственно  $888 \pm 21,29\%$  и  $644 \pm 31,34\%$ . В образцах воды, отобранных в створе № 1, доля живых клеток составляла  $781 \pm 22,95\%$ .

Доля клеток в стадии некроза была наибольшей в створе № 3 –  $114 \pm 2,65\%$ . Значительно меньше клеток в стадии некроза было обнаружено в листьях растения, которое находилось в воде из створа № 2, где их доля составила  $27 \pm 4,58\%$ . В воде из створа № 1 доля таких клеток составила  $41 \pm 4,27\%$ , что было средним значением по трем исследуемым створам.

Средняя доля клеток листа *E. canadensis* на начальных стадиях некроза была наибольшей в пробах поверхностных вод из створа № 3, где составляла  $242 \pm 31,76\%$ . Значительно меньше их было в листьях растения, которое находилось в пробах воды из створа № 2 –  $85 \pm 25,75\%$ .

Таким образом, прослеживается факт цитологических изменений в листьях зоны нарастания побегов *E. canadensis* после их пребывания во всех пробах воды р. Устья. С высокой вероятностью можно предположить, что здесь имеет место влияние химического состава поверхностных вод реки на живые организмы.

Наиболее показательным параметром при оценке цитологических изменений высшей водной растительности оказывается именно численность живых клеток, которые проявляют наиболее четкие колебания между вариантами опыта и являются самыми многочисленными в контроле. Иными словами, в ходе наших исследований, средняя доля живых клеток *E. canadensis* оказалась наиболее адекватным критерием при определении хронической токсичности поверхностных вод.

Несколько иная ситуация с численностью клеток в начальных стадиях некроза и мертвых клеток (некроз), поскольку в вариантах опыта их количество было большим чем в контроле, что затруд-

няет оценку статистической значимости и достоверности полученных результатов с учетом заключения о токсичности воды.

В весенний период наблюдается определенное распределение доли клеток на разных жизненных стадиях в вариантах опыта и контроле. Так, наименьшая доля клеток в некрозе и на его начальных стадиях была характерной для контроля. Среди вариантов опыта, клетки в начальных стадиях некроза и мертвые клетки оказались наиболее многочисленными в пробах воды из створа № 3. Поверхностные воды из створов № 1 и № 2 характеризовались примерно одинаковой долей клеток в ранних стадиях некроза, а некротических (мертвых) клеток было значительно больше во втором створе.

Наибольшим, в данный период, было количество живых клеток, как в вариантах опыта, так и в контроле. Так, их средняя доля в контроле составила  $968 \pm 5\%$ , в варианте опыта с водой из створа № 1 –  $814 \pm 14,5\%$ , из створа № 2 –  $816 \pm 4,6\%$ , из створа № 3 –  $482 \pm 39,1\%$ , что было наименьшим среди всех вариантов.

Также, в пробах воды из третьего створа была наибольшей доля клеток на начальных стадиях некроза, где ее величина составила  $410 \pm 43,9\%$ . В контроле их доля составила  $24 \pm 4,1\%$ . В варианте с пробами воды из створа № 2 их доля составила  $91 \pm 8,04\%$ , из створа № 1 –  $167 \pm 16,5\%$ .

Отмершие клетки (некроз) были наиболее многочисленными в пробах из створа № 3, где их средняя доля составила  $108 \pm 3,9\%$ . Наименьше их оказалось в контроле –  $8 \pm 1,04\%$ . Среди вариантов опыта, в воде из створа № 1 их доля составила  $19 \pm 2,2\%$ . В створе № 2 доля клеток в стадии некроза была почти равной доле клеток в начальных стадиях некроза, соответственно  $93 \pm 3,5\%$  и  $91 \pm 8,04\%$ .

Таким образом, по количеству живых и мертвых клеток среди вариантов опыта в хроническом эксперименте растения, размещенные в воде из створа № 3 проявили наиболее существенные значения тест-реакции.

Оценка статистически значимого отклонения по критерию Стьюдента дала основания утверждать о достоверности полученных данных во всех вариантах опыта по количеству клеток на разных жизненных стадиях, как в осенне-зимний, так и в весенний периоды. Во всех вариантах величина доверительной вероятности показателей соответствовала уровню ошибки в пределах 5% ( $P \leq 0,05$ ), что дает основания утверждать о хроническом токсическом действии поверхностных вод р. Устья во всех исследуемых створах [6].

На рис. 1 в виде линейной диаграммы показана сезонная динамика уровней токсичности поверхностных вод исследуемой реки, выраженная с помощью индекса токсичности ( $A_i$ ), установленного по соотношению доли живых клеток *E. canadensis* в вариантах опыта и в контроле.

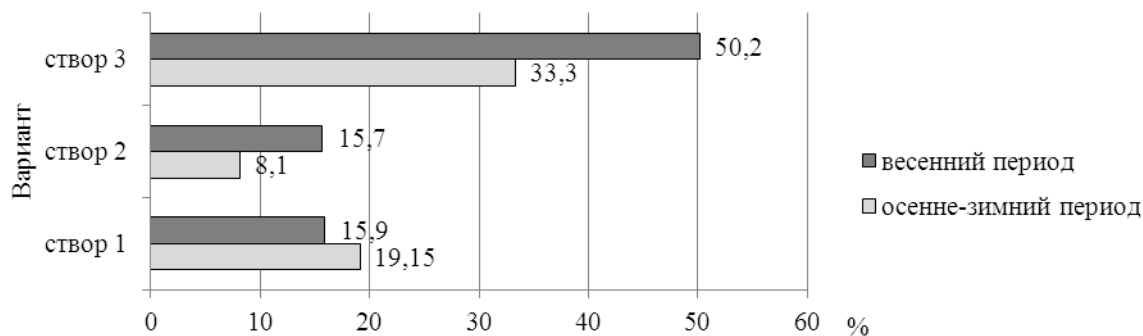


Рис. 1. Динамика индекса токсичности поверхностных вод р. Устья, %

Таким образом, по наиболее удобной на наш взгляд тест-реакции – количеству живых клеток *E. canadensis* можно заметить, что самые высокие уровни токсичности воды были характерны для створа № 3 как в осенне-зимний так и в весенний периоды. В створах № 1 и № 2 ситуация менялась в разные сезоны: весной вода из створа № 2 имела более высокие уровни токсичности по сравнению с водой из створа № 1; в осенне-зимний период наоборот. Очевидно, сказывается результат самоочищения, который происходит в зимний период в озере Басов Кут, откуда непосредственно вода поступает в русло реки (створ № 1).

Как дополнительный показатель при цитологических исследованиях в биотестировании используют степень плазмолиза клеток [8]. Этот показатель может отражать цитологическую нестабильность растительных тест-объектов в результате действия токсичности водной среды. По нашим наблюдениям

ям, изотонический (значительный) плазмолиз среди всех вариантов опыта наблюдался в клетках растений *E. canadensis*, которые находились в воде из створа № 3. В клетках растений, размещенных в воде из створов реки № 1 и № 2, а также в контроле, степень плазмолиза была значительно меньше: здесь его проявление носило в основном гипертонический характер, а местами проявление плазмолиза и вообще отсутствовало (рис. 2).

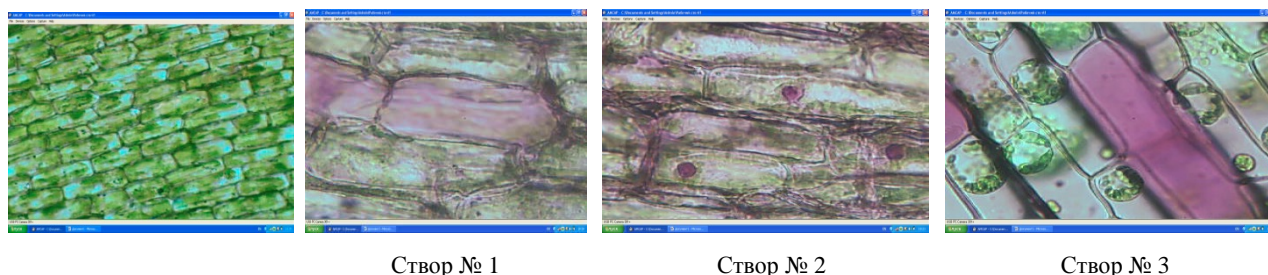


Рис. 2. Вид клеток листков зоны нарастания побега *E. canadensis* в вариантах эксперимента

Итак, учитывая степень плазмолиза клеток тест-объекта можно утверждать, что наиболее благоприятной средой для *E. canadensis* оказались пробы поверхностных вод исследуемой реки, отобранные из створа № 3.

### Выводы

1. Анализ результатов биотестирования с помощью цитологических показателей *E. canadensis* в разные сезоны года выявляет факт хронического токсического действия поверхностных вод реки Устья, что подтверждает установленная статистически достоверная разница между тест-реакциями в контроле и в вариантах опыта.

2. Сравнение величин цитологических тест-реакций *E. canadensis* относительно контроля обнаруживает их высокие значения для створа № 3 как в осенне-зимний так и в весенний период. В створах № 1 и № 2 ситуация меняется в зависимости от сезона года.

3. Проведенные нами целенаправленные исследования по выявлению в воде экотоксикантов различной природы и диагностики их хронического токсического действия, позволяют считать надежным и вполне показательным метод учета цитологических изменений высшей водной растительности. В качестве наиболее показательной тест-реакции рекомендуем использовать долю живых клеток *E. canadensis*.

4. Представленные результаты исследований могут быть использованы при комплексных эколого-токсикологических исследованиях поверхностных вод малых рек, на основе которых должны разрабатываться действенные меры по оздоровлению их гидроэкосистем.

### Список литературы

1. Никаноров А. М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никаноров, А. В. Жулидов. – Ленинград: Гидрометеиздат, 1991. – 312 с.
2. Бакаева Е. Н. Гидробионты в оценке токсичности вод суши / Е. Н. Бакаева, А. М. Никаноров – М.: Наука, 2006. – 257 с.
3. Майстренко В. Н. Экологический мониторинг суперэкотоксикантов / В. Н. Майстренко, Р. З. Хамитов, Г. К. Будников. – М.: Химия, 1996. – 320 с.
4. Романенко В. Д. Основы гидроэкологии / Романенко В. Д. – Киев: Генеза, 2004. – 661 с.
5. Охорона довкілля та раціональне поводження з ресурсами. Сигналізатори токсичності природних та стічних вод біологічні. Загальні технічні вимоги та методи випробувань : ДСТУ 3959–2000 – [Чинний від 2001-07-01]. – К.: Держсоживстандарт України 2001. – IV, 81 с. – (Національний стандарт України).
6. Біотестування у природоохоронній практиці. / Технічний комітет з стандартизації ТК 82 «Охорона навколишнього природного середовища та раціональне використання ресурсів України». Київ 1997. – 240 с. – (Мінекобезпеки України).
7. РД 52.24.669-2005 Унифицированные методы биотестирования для обнаружения токсического загрязнения поверхностных вод суши. Ростов-на-Дону, 2005. – 13 с.

8. Временное методическое руководство по нормированию уровней содержания химических веществ в донных отложениях поверхностных водных объектов (на примере нефти) Москва 2001. – 104 с.

9. Пат. 2315006 Российская федерация. Способ биотестирования воды на загрязнение тяжелыми металлами / Цаценко Л. В., Темиров Ю. В., Гарькавый К. А., Борсук О. Ю.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Кубанский государственный аграрный университет" (RU)

10. Якість води. Вибір та застосування апробованих методів випробування для аналізування води: ДСТУ ISO 17381:2007 (ISO 17381:2003, IDT). – [Чинний від 2009-07-01] – К.: Держсоживстандарт України 2001. – VII, 37 с. – (Національний стандарт України).

**O. Biedunkova**

## **DIAGNOSTICS OF TOXICITY IN SURFACE WATER UNDER CYTOLOGICAL CHANGES OF AQUATIC VEGETATION**

*A bioassay surface waters of small rivers in the urban area on the cytological indicators laboratory culture macrophyte *Elodea canadensis*. The ratio of leaf cells of the plant on different life stages and the degree of plasmolysis they showed chronic toxic river water. Recommended as a test reaction to use the share of living cells in the area of knots in the escape.*