

**ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

**щодо відбору зразків,
культивування тест-об'єктів, оцінки токсичності,
ідентифікації класу забруднювальних речовин
у воді та донних відкладах**



**Інститут гідробіології
Національної академії наук України**

Юришинець В.І., Коновець І.М., Кіпніс Л.С.,
Гончарова М.Т., Леонтьєва Т.О.,
Старосила Є.В., Романенко О.В.

**Методичні рекомендації
щодо відбору зразків,
культивування тест-об'єктів,
оцінки токсичності,
ідентифікації класу забруднювальних
речовин у воді та донних відкладах**

КИЇВ-2024

Методичні рекомендації щодо відбору зразків, культивування тест-об'єктів, оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднювальних речовин у воді та донних відкладах / Юришинець В.І., Коновець І.М., Кіпніс Л.С., Гончарова М.Т., Леонтєва Т.О., Старосила Є.В., Романенко О.В. – Київ: Інститут гідробіології НАН України, 2024. – 100 с.

У публікації наведено рекомендації щодо відбору зразків, культивування тест-об'єктів, оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднювальних речовин у воді та донних відкладах з урахуванням особливостей досліджуваної матриці оточуючого середовища (вода, порові води, донні відклади) та мети випробувань. Узагальнено вітчизняний та світовий досвід щодо методів культивування планктонних та бентосних гідробіонтів, яких використовують для біотестування, особливостей використання різних біотестів у процедурах випробування на токсичність. Описано деякі з можливих фізико-хімічних маніпуляцій зі зразками води та донних відкладів, які здатні змінювати токсичність зразка і вплив яких є елементом процедури Оцінки ідентифікації токсичності (ТІЕ — Toxicity Identification Evaluation) води та донних відкладів.

Для фахівців з гідроекології, екологічної токсикології, лабораторного аналізу, науковців та освітян, аспірантів, студентів екологічного та біологічного напрямів, усіх хто переймається проблемами безпечного довкілля.

The publication provides recommendations for samples collection, cultivation of test objects, toxicity evaluation and identification of the class of pollutants in water and bottom sediments, taking into account the characteristics of the studied environmental matrix (water, interstitial water, bottom sediments) and the purpose of the tests. The national and international experience in methods of cultivation of planktonic and benthic hydrobionts applied for biotesting, the features of different biotests applications in toxicity testing procedures are summarized. Some of the possible physicochemical manipulations with water and bottom sediment samples that can change the toxicity of the sample and the effect of which is an element of the Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedure for water and bottom sediments are described.

For specialists in hydroecology, environmental toxicology, laboratory analysis, scientists and lecturers, graduate students, students of environmental and biological disciplines, and everyone who is concerned with the problems of a safe environment.

Рецензенти:

Афанасьєв С.О. — доктор біологічних наук, професор, академік НАН України

Якушин В.М. — доктор біологічних наук

Рекомендовано до друку Вченою радою Інституту гідробіології НАН України (протокол від 29.10.2024 р. № 9).

Публікація підготовлена за підтримки Національного фонду досліджень України — Проект 2023.04/0045 «Розробка уніфікованої тест-системи для оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин, що потрапляють у водні об'єкти внаслідок воєнних дій».

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	5
ПЕРЕДМОВА	6
1. ВІДБІР ЗРАЗКІВ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ МАТЕРІАЛІВ ДО ЛАБОРАТОРІЇ.....	8
1.1. Відбір зразків.....	10
1.1.1. Відбір зразків води	10
1.1.2. Відбір зразків донних відкладів.....	10
1.2. Зберігання і транспортування до лабораторії	11
2. КУЛЬТИВУВАННЯ ТЕСТ-ОБ'ЄКТІВ	12
2.1. Планктони – Утримання лабораторних культур гіллястовусих ракоподібних та зелених мікроводоростей	12
2.1.1. Утримання лабораторних культур <i>Daphnia magna</i> та <i>Ceriodaphnia affinis</i> ...	12
2.1.2. Утримання лабораторних культур зелених мікроводоростей	19
2.2. Бентони - Утримання лабораторних культур гамарид та хірономід.....	23
2.2.1. Утримання лабораторної культури <i>Chaetogammarus ischnus</i>	23
2.2.2. Утримання лабораторної культури <i>Chironomus riparius</i>	27
3. ВСТАНОВЛЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ ТА ДОННИХ ВІДКЛАДІВ.....	32
3.1. Встановлення придатності культур до біотестування	32
3.1.1. Встановлення придатності культур гіллястовусих ракоподібних до біотестування.....	32
3.1.2. Оцінка придатності культур бентонтів до біотестування	33
3.1.3. Встановлення придатності культур зелених мікроводоростей до біотестування.....	34
3.2. Рекомендації щодо проведення експериментів з оцінки токсичності води.....	35
3.2.1. Встановлення токсичності води та витяжок донних відкладів із застосуванням гіллястовусих ракоподібних.....	35
3.2.2. Оцінка токсичності за пригніченням росту (пригнічення зростання чисельності) зелених мікроводоростей.....	39

3.3. Рекомендації щодо проведення експериментів з оцінки токсичності донних відкладів.....	41
3.3.1. Встановлення токсичності донних відкладів із застосуванням амфіпод	43
3.3.2. Встановлення токсичності донних відкладів із застосуванням хірономід....	47
4. ІДЕНТИФІКАЦІЯ КЛАСУ ЗАБРУДНЮЮЧИХ РЕЧОВИН У ВОДІ ТА ДОННИХ ВІДКЛАДАХ.....	53
4.1. Рекомендації щодо ідентифікації класу забруднюючих речовин у воді (поверхневі, стічні, порові води, водні витяжки донних відкладів)	54
4.1.1. Початковий тест на токсичність (Initial Toxicity Test)	59
4.1.2. Базовий тест на токсичність (Baseline Toxicity Test).....	60
4.1.3. Тест зі зміною рН (pH Adjustment Test).....	61
4.1.4. Тест зі зміною рН та фільтрацією (pH Adjustment/Filtration Test).....	64
4.1.5. Тест зі зміною рН та ТФЕ-С ₁₈ (pH Adjustment/C ₁₈ SPE)	65
4.1.6. Тест зі зміною рН та аерацією (pH Adjustment/Aeration Test).....	68
4.1.7. Тест на відновлення окиснювачів (Oxidant Reduction Test).....	69
4.1.8. Хелатний тест ЕДТА (EDTA Chelation Test).....	71
4.1.9. Тест з градуванням рН (Graduated pH Test).....	73
4.2. Рекомендації щодо ідентифікації класу забруднюючих речовин у донних відкладах.....	75
4.2.1. Початковий тест на токсичність	77
4.2.2. Тест на базову токсичність.....	79
4.2.3. Тест на виявлення токсичної дії аміаку	79
4.2.4. Тест на виявлення токсичної дії катіонних металів.....	81
4.2.5. Тест на виявлення токсичної дії неполярних органічних сполук	83
4.2.6. Тест на врахування розбавлення домішками	85
5. СТАТИСТИЧНІ МЕТОДИ	87
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ПОДАЛЬШІ ІДЕЇ.....	88
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	90

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ДВ – донні відклади

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)

ЕК₅₀ – середньоефективна концентрація

ІК₅₀ – концентрація, що інгібує ріст на 50 %

ЛК₅₀²⁴ – медіанна летальна концентрація за 24 год експозиції

ЛР₅₀ – середньолетальне розбавлення

ТФЕ – твердофазна екстракція

С₁₈ – октадецилсилан

SPE – solid phase extraction - твердофазна екстракція

TIE – Toxicity Identification Evaluation - Оцінка ідентифікації токсичності

TU – одиниці токсичності (toxic units)

УСТ – комбінований корм приготовлений з дріжджів, висушених рослин та риби

ПЕРЕДМОВА

Сьогодення ставить перед людською цивілізацією виклики, вирішення яких є екзистенційно необхідним. Антропогенна трансформація біосфери призвела до різноманітних негативних наслідків, які позначаються на середовищі існування людини та живих організмів, екологічній та біологічній безпеці, вичерпанні невідновних та відновних ресурсів нашої планети.

Забруднення навколишнього середовища походить з багатьох джерел промислового та сільськогосподарського виробництва, сфер побуту, споживання та використання, що формують пул численних та різноманітних хімічних речовин, які здійснюють навмисний, або ненавмисний вплив на біосферу. За приблизними оцінками нині близько 100 000 хімічних речовин використовуються щодня, а понад 50 мільйонів хімічних речовин відомі та зареєстровані, зокрема, у реєстрах Хімічної Реферативної Служби (Chemical Abstracts Service, CAS). Комплексний хімічний моніторинг усіх цих хімічних речовин разом із величезною кількістю їхніх побічних продуктів і продуктів трансформації неможливий і не вельми дієвий через обмежену доступність даних про вплив кожної речовини (Brack 2011).

Оцінити комплексний вплив забруднювальних речовин за рівнем токсичності дозволяє біотестування. Головні переваги біотестування – простота та доступність прийомів їх постановки, висока чутливість тест-організмів до мінімальних концентрацій токсичних агентів, швидкість, відсутність потреби у дорогих реактивах та устаткуванні. Інформативність біотестування може бути значно розширена за допомогою методу ідентифікації класу забруднювальних речовин води і донних відкладів, що спричиняють токсичну дію, який є ефективним скринінговим методом виявлення причин їх токсичності. Визнано, що застосування методу доцільне при прийнятті рішень про вилучення донних відкладів (ДВ), або

виборі ефективної схеми їх ремедіації; перед проведенням складних і вартісних хімічних аналізів на вміст специфічних речовин токсичної дії (Ho et al. 2013), при оцінці можливості ризику вторинного забруднення води (EPA-600/6-91/003). Перші розробки методів ідентифікації токсичності (TIE, toxicity identification evaluation), що були передусім спрямовані на виявлення джерела токсичної дії стічних вод (Ankley 1992, Burgess et al. 1995), згодом увійшли до стандартної практики токсикологічних досліджень морських та прісноводних екосистем. Суть методу полягає у реєстрації відповіді тест-організмів під час проведення серії фізико-хімічних маніпуляцій з токсичним середовищем, що дозволяє послідовно визначити джерело токсичної дії (EPA/600/R-07/080). Одним із загальноприйнятих прийомів є додавання до токсичних проб речовин, які здатні зв'язувати токсиканти певних хімічних класів. Широкого використання набули йонообмінні смоли, що специфічно зв'язують катіонні форми перехідних металів, йони амонію, аніонні форми металів та напівметалів тощо (Ho et al. 2002).

Пропоновані методичні рекомендації стосуються відбору зразків, культивування тест-об'єктів, оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднювальних речовин у воді та донних відкладах з урахуванням особливостей матриці оточуючого середовища, яка досліджується (вода, порові води, донні відклади) та мети випробувань. Авторами узагальнено вітчизняний та світовий досвід щодо методів культивування планктонних та бентосних гідробіонтів, яких використовують у біотестуванні, особливостей використання різних біотестів у процедурах випробування на токсичність. Описано деякі з можливих фізико-хімічних маніпуляцій зі зразками води та донних відкладів, які здатні змінювати їхню токсичність і вплив яких є елементом процедури Оцінки ідентифікації токсичності (TIE) води та донних відкладів.

1. ВІДБІР ЗРАЗКІВ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ МАТЕРІАЛІВ ДО ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні зауваження. Перед відбором зразків води та донних відкладів необхідно спочатку визначити мету відбору, і, з огляду на це – основні чинники, які слід врахувати під час визначення місця, частоти, тривалості, способу відбору та подальшого лабораторного опрацювання, наявного лабораторного обладнання.

При відборі проб води та донних відкладів особі, яка відбирає зразки (оператор) необхідно дотримуватись вимог безпеки, затверджених в установленому порядку. Окрім заходів попередження фізичних травм, потрібно запобігати небезпеці отруєння токсичними газами та контакту шкіри з потенційно токсичним оточуючим середовищем.

У випадку застосування підходів оперативного (кризового) моніторингу здійснюється відбір зразків в тих регіонах, які визначено як зони надзвичайної екологічної ситуації, а також у районах аварій (техногенних впливів) із шкідливими екологічними наслідками.

Для забезпечення оперативного реагування на такі кризові ситуації та прийняття належних та своєчасних рішень щодо їхньої ліквідації, варто спробувати експертно визначити мінімально достатню кількість зразків, аналіз яких дозволить прийняти необхідні рішення початкового етапу ліквідації негативних наслідків.

На нашу думку мінімально можливою кількістю зразків води можна вважати один зразок води – разова проба з місця, де оператор вважає прояви забруднення максимальними (точка А) та один зразок донних відкладів – разова проба донних відкладів, з місця, де оператор допускає максимальне накопичення забруднювальних речовин у донних відкладах внаслідок забруднення (точка А'). Наступною підставою збільшення кількості проб є необхідність встановлення вектору (напряму) впливу забруднення та основний осередок очікуваного впливу. Тому наступним можливим кроком збільшення кількості відібраних зразків є ще одна проба води, яка

відбирається на деякій відстані від першої точки у напрямку максимально ймовірного поширення забруднення (точка Б). Відстань між точками А та Б повинна обиратись з урахуванням гідрологічних характеристик водного об'єкту: якщо це річка – нижче за течією, швидкість якої варто враховувати; якщо це озеро чи інший лентичний об'єкт – у напрямку переважаючого впливу вітрових течій, чи інших чинників, які сприяють дисперсії забруднення. Положення точки Б повинно також враховувати і місце, де заходи з ліквідації негативних наслідків техногенного впливу планують цей вплив мінімізувати (водозабір, межа населеного пункту, рекреаційна зона та ін.).

Наступна ітерація зростання кількості проб визначається завданнями дослідження. Якщо необхідно переконатись, що забруднення не поширюється в інших напрямках – відбір певної кількості разових проб води на певних відстанях у напрямі очікуваного поширення (вище за течією у річці, чи ближче до іншого берега річки; в озері/водосховищі – в напрямках, що відрізняються від очікуваного напрямку поширення забруднення).

У випадку, коли необхідно прослідкувати накопичення забруднення у донних відкладах та загрози вторинного забруднення води, відбираються додаткові разові зразки донних відкладів – спочатку у точці Б', потім у інших напрямках.

Правила відбору зразків води та донних відкладів для дослідження описано у відповідних ДСТУ, які унормовують роботу суб'єктів моніторингу довкілля і яких потрібно дотримуватися (ДСТУ EN ISO 5667-6:2022, ДСТУ EN ISO 5667-1:2022, ДСТУ ISO 5667-12-2001, ДСТУ ISO 10381-1:2004).

Наші пропозиції щодо можливо прийняттого зменшення кількості зразків стосуються насамперед досліджень, які можуть виникнути в кризових ситуаціях за дефіциту часу та ресурсів, за особливих обставин і потреб та стосуватися необхідності швидкого встановлення токсичності та її чинників у воді та донних відкладах.

1.1. Відбір зразків

1.1.1. Відбір зразків води

Обладнання. Для відбору проб на поверхні водних об'єктів застосовують відкриті пробовідбірники – ємності з широким горлом. Об'єм відібраної води залежить від плану подальшого дослідження. Для досліджень токсичності методами біотестування об'єм відібраної води не повинен бути менше 2 дм³, оцінки ідентифікації токсичності – 5 дм³.

Для відбору проб на глибині застосовують закриті пробовідбірники – бутелі, заповнені повітрям чи інертним газом або батометри. Пробовідбірники занурюють на необхідну глибину й заповнюють водою.

Документування. При відборі проб потрібно зазначити: назву водойми; місце відбору з докладним описом; точку відбору (координати за GPS, маркер на карті відповідного масштабу); дата і час відбору; причина / призначення відбору проби (фоновий моніторинг, оперативний моніторинг, техногенна аварія / явище); прізвище оператора, який проводив відбір проб; метеорологічні дані (температура, напрям вітру, наявність та кількість опадів тощо) під час відбору проб та, за необхідності – напередодні; умови течії / проточності; характеристика відібраного зразка (запах, кольоровість, прозорість, наявність завислих часток тощо); тип пристрою для відбору проб; умови зберігання та транспортування зразків; бажано фотодокументування місця відбору, яке ілюструє ділянку водного об'єкта в аспекті проточності та гідрографічного розташування.

1.1.2. Відбір зразків донних відкладів

Обладнання: Для відбору проб застосовують пристрої різних типів, зокрема, такі що забезпечують відбір проб донних відкладів з порушенням стратифікації (дночерпачі, драги), або без порушення стратифікації (стратиметри, трубки різних конструкцій) – залежно від мети дослідження і схеми відбору. Оператор, який відбирає зразки, повинен експертно

визначити достатність та відповідність матеріалу з донних відкладів цієї локальної ділянки дна для встановлення фізико-хімічних характеристик, які можуть містити інформацію про потенційне забруднення. Кількість відібраних донних відкладів залежить від плану подальшого дослідження. У випадку досліджень токсичності методами біотестування кількість (об'єм) відібраних донних відкладів не повинен бути менше 2 дм³, оцінки ідентифікації токсичності – 5 дм³.

Документування. Відповідно до документування для проб води. Можливо варто зазначити більш детальну гідроморфологічну характеристику місця відбору, особливості відбору проб, що можуть вплинути на їхні характеристики при подальших випробуваннях.

1.2. Зберігання і транспортування до лабораторії

Проби води та донних відкладів, які планують оцінювати методами біотестування та піддавати маніпуляціям, передбаченим процедурою ідентифікації чинників токсичності, не підлягають консервуванню хімічними речовинами чи заморожуванню. Якщо неможливо відразу доставити проби до лабораторії, їх охолоджують до 2–4 °С і зберігають в темряві (до 72 годин). Посуд зі зразком повинен бути наповнений до верху і щільно закритий.

2. КУЛЬТИВУВАННЯ ТЕСТ-ОБ'ЄКТІВ

2.1. Планктонти – Утримання лабораторних культур гіллястовусих ракоподібних та зелених мікродоростей

2.1.1. Утримання лабораторних культур *Daphnia magna* та *Ceriodaphnia affinis*

Біологія: Належать до типу Arthropoda, підтипу Crustacea, класу Branchiopoda, ряду Anomopoda, родини Daphniidae (база даних WoRMS). Населяють переважно стоячі та слабопроточні водойми, (озера, ставки, річки з повільною течією, водосховища). Тіло овальної форми довжиною до 6 мм у *D. magna* та до 2 мм у *C. affinis* (рис. 2.1), захищене прозорим хітиновим панциром (карапаксом), який на черевній стороні не з'єднаний і утворює щілину (рис. 2.2). Тіло нечітко сегментоване на головний, грудний та черевний відділи. Голова покрита щитом, передній край якого утворює роstrum.

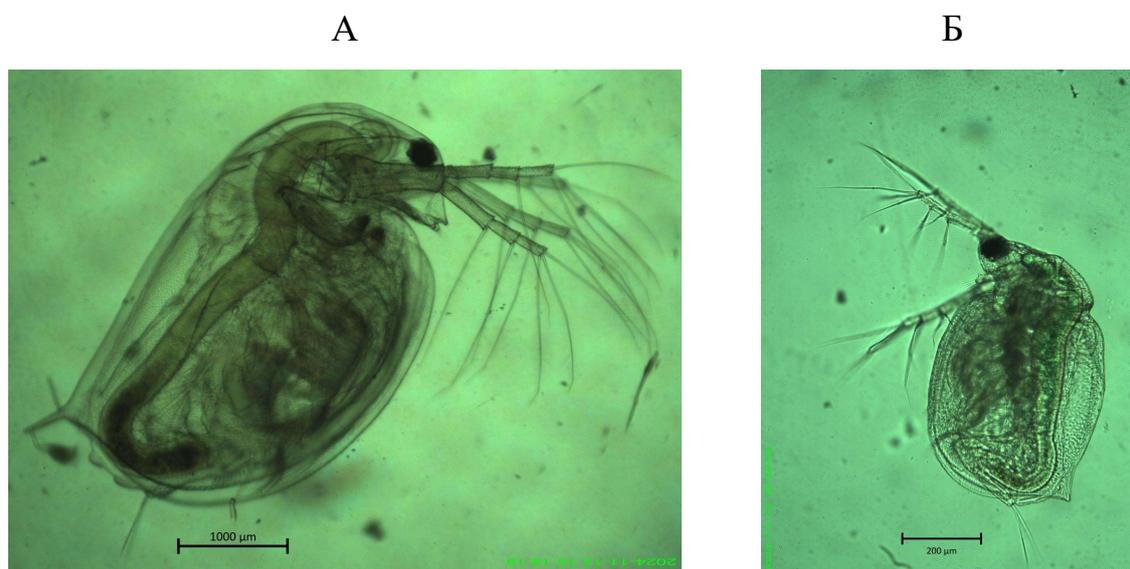


Рисунок 2.1 – Гіллястовусі ракоподібні у лабораторній культурі: *Daphnia magna* (А), *Ceriodaphnia affinis* (Б) (фото авторів)

Під ростром чітко вирізняються дві передні маленькі антенули (антени I), які більш розвинені в самців і є зручним критерієм їхнього виявлення при перевірці культури за допомогою бінокюляра. Про присутність самців у культурі може свідчити також наявність ефіпіумів (зимуючих яєць) у виводкових камерах самиць.

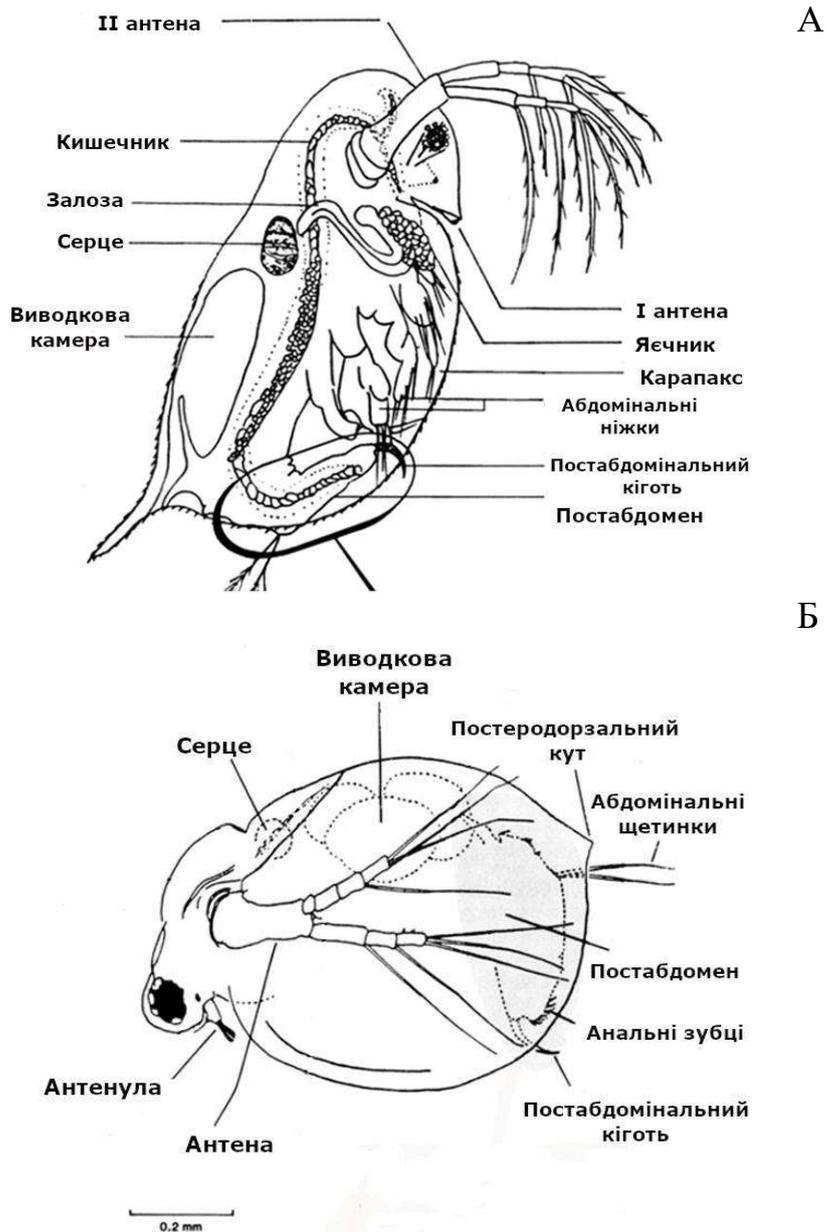


Рисунок 2.2 – Загальний вигляд *D. magna* (А) та *C. affinis* (Б). Рисунки приведено зі змінами за (EPS 1/RM/11, EPS 1/RM/21)

Пересуванню тварин у товщі води сприяють розташовані в основі голови дві дуже розвинені антени (антени II). На передній частині голови знаходиться ротовий отвір. На голові рачок має фасеточне око – непарний орган, що відповідає за зір. У грудному відділі містяться п'ять пар сильно розчленованих грудних (абдомінальних) ніжок, функції яких пов'язані з процесами фільтрації води, живлення та дихання. Завислі речовини у воді можуть викликати забивання грудних ніжок, що може стати причиною нестабільного стану і навіть загибелі культури.

Поза кишечником на спинному боці грудного відділу міститься серце, що скорочується 200–300 разів за хвилину. З обох боків кишечника розташовані парні гонади – яєчники у самиць і сім'яники у самців. Виводкова камера, де відбувається ембріональний розвиток рачків, міститься між спинною частиною тулуба та панциром. Ріст ракоподібних протягом життя нерівномірний, що пов'язано з періодичним линянням. За оптимальних умов утримання розміри молодих тварин після линяння збільшуються удвічі. Період дозрівання рачків *D. magna* при температурі 20 ± 2 °C – 6–8 діб, *C. affinis* при температурі 25 ± 2 °C – 3 доби.

За сприятливих умов ці види розмножуються без запліднення – партеногенетичним шляхом, при цьому народжуються лише самиці. За настання несприятливих умов (нестача корму, перенаселення, зниження температури) в популяції з'являються самці і тварини переходять до статевого розмноження, продукуючи розміщені в ефіпіумах зимуючі яйця. За сприятливих умов середовища з них народжуються самиці, які дають в подальшому партеногенетичні генерації.

Вимоги до приміщення. Для підтримки культур рекомендується використовувати кліматостат або бокс – обладнання, яке забезпечує певну ізоляцію частини приміщення та контроль умов середовища (температурний, світловий, кисневий режими та ін.). У приміщенні, де утримуються тест-організми, не повинно бути токсичних для них пари та пилу. Оптимальна температура для культивування становить: для *D. magna*

20±2 °С, для *C. affinis* 25±2 °С, освітленість – від 400 до 600 лк при тривалості світлового періоду 16±1 годин, темряви – 8±1 годин.

Посуд для культивування. Культури *D. magna* та *C. affinis* утримують в прозорому скляному посуді об'ємом 1-3 дм³. Посуд миють питною содою або соляною кислотою і ретельно споліскують дистильованою водою. Не можна застосовувати для миття посуду синтетичні миючі засоби і органічні розчинники.

Утримання. Одночасно рекомендується підтримувати 4 різновікові культури рачків у 2–3 повторах кожену. Культури мають відрізнятися між собою за віком – 1 тиждень для *D. magna* і 0,5 тижня для *C. affinis*. У найстаршій культурі *D. magna* максимальний вік може становити 4 тижні, у *C. affinis* – 2 тижні. Після цього найстарші культури поновлюють з молоді.

Безперервне отримання тест-організмів забезпечують щотижневим започаткуванням нової культури. Щільність посадки рачків повинна складати від 10 до 20 особин молоді на 1 дм³ води. Двічі на тиждень рачків пересаджують у посуд із свіжим середовищем, або ж, задля економії середовища, воно на 30–50 % може складатися із старого. За таких умов новонароджену молодь відбирають і використовують для поновлення культур та для біотестування. У щільних культурах *C. affinis* молодь рекомендується відбирати щодоби. Рачків пересаджують обережно, щоб не травмувати. Діаметр піпетки для пересадження *D. magna* складає 6–8 мм, для *C. affinis* – 3 мм. Для зручності при пересадці молоді можна використовувати піпетки, що мають діаметр в 2–3 рази менше зазначених. Потрапляння повітря під панцирі тест-організмів не допускається, тому при пересадці кінець піпетки з рачками занурюють під поверхню води. У посуді з рачками аерувати воду не рекомендується.

Середовище для культивування. Оптимальні гідрохімічні показники для підтримання культур: вміст розчиненого кисню – не менше 4 мг/дм³ (бажано 6 мг/дм³), рН – 6,5–8,5 (бажано 7,0–8,5), твердість води за вмістом СаСО₃ – 15–350 мг/дм³ (бажано 100–250 мг/дм³) загальна мінералізація 0,1–

1 г/дм³ (переважно 0,2–0,8 г/дм³). Більшість нормативних документів рекомендує використовувати для цього реконструйовану воду (ЕРА 600/4-89/001), яку готують на дистильованій воді з додаванням до неї відповідної кількості солей (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Приготування реконструйованої води необхідної твердості

Тип води	Солі, мг/дм ³				Характеристика	
	NaHCO ₃	CaSO ₄ ·2H ₂ O	MgSO ₄	KCl	Твердість*	pH**
Дуже м'яка	12,0	7,5	7,5	0,5	10–13	6,4–6,8
М'яка	48,0	30,0	30,0	2,0	40–48	7,2–7,6
Середньої твердості	96,0	60,0	60,0	4,0	80–100	7,4–7,8
Тверда	192,0	120,0	120,0	8,0	160–180	7,6–8,0
Дуже тверда	384,0	240,0	240,0	16,0	280–320	8,0–8,4

Примітка: * – мг/дм³ CaCO₃; ** – після 24-годинної аерації.

Згідно з рекомендаціями готують 50-кратні розчини необхідних солей, які можна зберігати протягом 2–3 місяців за температури 2–4 °С. Після їх змішування (див. наведений у таблиці 2.1 порядок), з відповідною кількістю дистильованої води приготоване середовище перед використанням потребує 24-годинного аерування. Для отримання стабільніших результатів, окрім зазначених солей, рекомендується додавання до штучного середовища 2–5 мкг/дм³ селену та 1–2 мкг/дм³ вітаміну В₁₂.

Наш досвід багаторічного утримання тест-культур дозволяє рекомендувати як надійне середовище для культивування використання реконструйованої води середньої жорсткості, а також відстояної водопровідної води після її фільтрації за допомогою вискоєфективного побутового фільтра тріступеневого очищення.

Годівля. Годують гіллястовусих ракоподібних суспензіями хлібопекарських дріжджів та зелених водоростей 1 раз на добу (рис. 2.3). При годівлі тест-організмів треба пам'ятати: краще недогодувати, аніж їх перегодувати.



Рисунок 2.3 – Годування гіллястовусих ракоподібних

Дріжджовий корм готують наступним чином: 1 г свіжих або 0,3 г сухих дріжджів заливають 100 см³ дистильованої води. Після набухання дріжджів суспензію перемішують і відстоюють протягом 30 хвилин. Надосадову рідину додають у ємності з рачками у співвідношенні 3 см³ на 1 дм³ води. Дріжджову суспензію зберігають за температури 2–4 °С 1–2 доби.

Мікрводорості як корм. Водорості вирощують у колбах, які розміщують у люміностації або за природного освітлення, уникаючи попадання прямого сонячного проміння (Методи... 2006). Освітлення повинно бути рівномірним з інтенсивністю від 2500 до 5000 лк. Лампи

денного світла розміщують знизу та збоку колб на відстані 30–40 см. Водорості вирощують за температури 22 ± 4 °С.

Для культивування водоростей використовують плоскодонні колби ємністю 1 дм³, які закривають ватно-марлевими корками і паперовими ковпачками. Попередньо колби стерилізують у сушильній шафі 2 години за температури 180 °С і заповнюють живильним середовищем Прата за стерильних умов (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Склад живильного середовища Прата

Реактив	Концентрація, г/дм ³
Нітрат калію (KNO ₃)	0,100
Сульфат магнію (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,010
Фосфат калію 2-заміщений (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	0,010
Хлорид заліза (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	0,001
Розчин мікроелементів*	1 см ³

Примітка: * – H₃BO₃ – 2,86; MnCl₂·4H₂O – 1,81; ZnSO₄·7H₂O – 0,222 г/дм³; MoO₃ – 17,64; NH₄VO₃ – 22,96 мг/дм³ (готується окремо)

Для приготування живильного середовища відповідні наважки кожної солі, крім хлорного заліза, розчиняють окремо у 300 см³ дистильованої води, змішують у тій послідовності, у якій вони вказані у таблиці, і стерилізують в автоклаві при тиску 1 атм протягом 45–60 хвилин. Наважку хлорного заліза розчиняють окремо у 100 см³ дистильованої води кип'ятінням, потім охолоджують і доливають до охолодженого середовища в стерильних умовах.

Культуру водоростей вносять у колбу з живильним середовищем до появи світло-зеленого забарвлення. Після посіву колбу закривають ватно-марлевим корком і паперовим ковпачком. Культуру водоростей періодично перемішують, струшуючи 1–2 рази на добу. Через 6–10 діб, коли забарвлення культури водоростей стає інтенсивно зеленим, колби

розміщують у холодильнику протягом 2–3 діб для осадження водоростей. Осад удвічі розбавляють дистильованою водою. Отриману суспензію зберігають у холодильнику не більше 14 діб. Для годівлі рачків можна також використовувати пасту хлорели комерційного виробництва, вміст клітин в одиниці маси якої визначають експериментально. Пасту зберігають за температури 2–4 °С не більше 3 місяців. Водорості вносять у культуру з розрахунку 1 см³ на 1 дм³ води (що містить 350–700 млн. кл./см³).

Підрахунок кількості водоростей можна проводити за допомогою лічильної камери Горяєва. Камеру та покривне скельце знежирюють, покривним скельцем накривають камеру і притирають його до виникнення райдужних кілець інтерференції. Піпеткою наносять по краплині ретельно перемішану суспензію на верхній і нижній краї покривного скельця так, щоб уникнути утворення пухирців повітря під ним. Кількість клітин підраховують у 5 великих квадратах, розташованих по діагоналі. Отриману кількість клітин водоростей множать на 50000 і одержують кількість клітин у 1 см³. Дослідження виконують у трьох повторях.

2.1.2. Утримання лабораторних культур зелених мікрководоростей

Біологія. Зелені водорості (Chlorophyta) – найбагатша за кількістю видів та найбільш неоднорідна з точки зору морфологічних особливостей група водоростей, що характеризується широкою мінливістю форм, розмірів та кольорів клітин. Їхня морфологічна структура представлена переважно монадним та кокоїдним типом, часто мають півмісяцеву, прямокутну, яйцеподібну, видовжену форму, також клітини зелених водоростей можуть мати різні види виростів та шипів. До складу фотосинтетичних пігментів зелених мікрководоростей входять хлорофіли α і β та каротиноїди (Naselli-Flores 2009, Leliaert et al. 2012, Lee 2018).

Розмноження зелених водоростей відбувається статевим або безстатевим шляхом та залежить від виду й умов навколишнього середовища (Догадина и др. 2013).

Тест-об'єкти. Зелені мікроводорості активно використовують як тест-об'єкти, що зумовлено їхніми наступними особливостями:

- Нескладне лабораторне культивування з невеликими затратами.
- Короткий життєвий цикл, що зумовлює швидке розмноження.
- Прозора клітинна оболонка дозволяє вивчати внутрішні структури і процеси за допомогою мікроскопії та інших методів.
- Значне поширення у природі.
- Чутливість до токсикантів.

Вибір тест-об'єктів зелених водоростей прийнято проводити відповідно до ДСТУ 4166:2003, який рекомендує такі види: *Desmodesmus subspicatus* Chodat (= *Scenedesmus subspicatus*), *Raphidocelis subspicata* Korshikov (= *Selenastrum capricornutum*) та *D. communis* E.Hegewald (= *S. quadricauda*) (ДСТУ 4166:2003). Однак, у біотестуванні використовують низку інших видів із родів *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Selenastrum*, *Chlamydomonas*, *Ankistrodesmus*, *Pediastrum*, *Oocystis* тощо.

Серед зелених мікроводоростей колекції культур (HPDP) Інституту гідробіології НАН України за показниками питомої швидкості росту найпродуктивнішими є види *Desmodesmus brasiliensis*, *Tetradesmus dimorphus* та *Chlorella vulgaris* (Leontieva et. al. 2024), що дозволяє використовувати їх як тест-об'єкти (рис. 2.4).

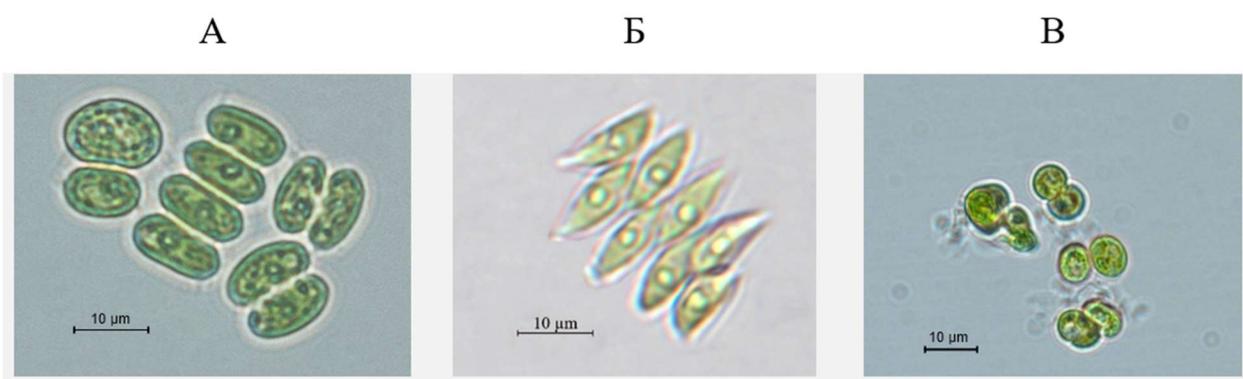


Рисунок 2.4 – Культури зелених мікроводоростей *D. brasiliensis* (А), *T. dimorphus* (Б) та *Ch. vulgaris* (В)

Обрані культури мікродоростей періодично перевіряють на альгологічну чистоту (> 95 %) та пересівають на свіже поживне середовище з метою постійної підтримки фази експоненційного зростання.

Приготування поживного середовища. Мікродорості вирощують у поживному середовищі, що містить комплекс усіх необхідних компонентів для їх життєдіяльності.

Під час підтримання Колекції культур мікродоростей Інституту гідробіології НАН України хороші та стабільні результати культивування зелених водоростей отримано при застосування середовища Фітцджеральда у модифікації Цендера і Горема (табл. 2.3) (Білоус та ін. 2018).

Таблиця 2.3 – Склад поживного середовища Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горема

Речовина	Вміст, мг/дм ³
Нітрат натрію (NaNO ₃)	496,00
Гідроортофосфат калію (K ₂ HPO ₄)	39,00
Сульфат магнію (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	75,00
Хлорид кальцію (CaCl ₂)	36,00
Карбонат натрію (Na ₂ CO ₃)	20,00
Силікат натрію (Na ₂ SiO ₃)	58,00
Залізо (III) лимоннокисле (C ₆ H ₅ O ₇ Fe)	6,00
Лимонна кислота (C ₆ H ₈ O ₇)	6,00
ЕДТА (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)	1,00
Розчин мікроелементів, см ³ /дм ³	0,04

Примітка. Склад розчину мікроелементів (г/дм³): H₃BO₃ – 3,1; MnSO₄ · H₂O – 2,23; ZnSO₄·7H₂O – 0,287; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O – 0,088; Co(NO₃)₂·6H₂O – 0,146; Na₂WO₄ – 0,033; KBr – 0,119; KI – 0,083; Cd(NO₃)₂·4H₂O – 0,154; NiSO₄·(NH₄)₂SO₄·6H₂O – 0,198; VSO₄·3H₂O – 0,02; Al₂(SO₄)₃·K₂SO₄·24H₂O – 0,474; Cr(NO₃)₃·7H₂O – 0,037.

Для його приготування наважки солей з кваліфікацією ч.д.а або х.ч. розчиняють у дистильованій або деіонізованій воді, стерилізують у автоклаві при температурі 120 °С упродовж 20 хв. Змішують розчини солей безпосередньо перед кожним випробуванням у послідовності, як вказано у таблиці 2.3. Розчин мікроелементів готується окремо заздалегідь та зберігається у темному місці до 6 місяців.

Обладнання. Культури мікроводоростей вирощують у лабораторній шафі з температурним режимом $25,0 \pm 2$ °С, інтенсивністю освітлення $47,5$ мкмоль/м²·с, співвідношенням світлового і темного періодів – 16 : 8 год. Утримують культури у скляних конічних колбах місткістю 250–1000 см³ закритими ватно-марлевими корками, крізь які проникає повітря (рис. 2.5).



Рисунок 2.5 – Лабораторна шафа з культурами зелених мікроводоростей
(Інститут гідробіології НАН України, Київ)

2.2. Бентонти - Утримання лабораторних культур гамарид та хірономід

2.2.1. Утримання лабораторної культури *Chaetogammarus ischnus*

Біологія. Бокоплав *Chaetogammarus ischnus* (Stebbing 1899) (Рис. 2.6) належить до родини Gammaridae ряду Amphipoda (тип Arthropoda, підтип Crustacea, клас Malacostraca) (база даних WoRMS), є представником ендемічної солонуватоводної понто-каспійської фауни. Цей бокоплав – евригалінний вид, може жити і розмножуватись у прісних та солонуватих водах (з солоністю до 13–18 ‰) (Jazdzewski 1980, Дедю 1980); успішно натуралізувався у дніпровських водосховищах, де домінує на мілководдях. Активно поширюється водоймами Європи та світу (Copilas-Ciocianu et al. 2023). Цей вид має високу чутливість до токсикантів – ЛК₅₀⁴⁸ (Cr⁶⁺) 0,34 мг/дм³ (Romanenko et al. 2014).



Рисунок 2.6 – Зовнішній вигляд *Chaetogammarus ischnus* в лабораторній культурі (фото авторів)

Ch. ischnus має виражений статевий диморфізм, самець має більші розміри за самку. Довжина дорослої особини – від 6 до 15 мм для самців і від 5 до 13 мм для самок (рис. 2.7) (Nalepa et al. 2001).

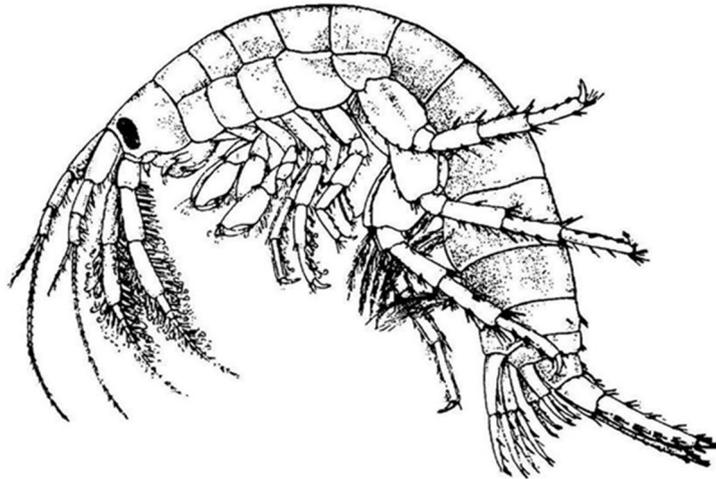


Рисунок 2.7 – *Chaetogammarus ischnus* (Carausu 1955)

Ch. ischnus розмножується статевим шляхом, розмір виводка 2–50 яець. Розмноження часто розпочинається навесні або влітку і закінчується восени, проте в теплих, термічно стабільних водах може відбуватися двічі протягом року (Kley et al. 2006). В лабораторних умовах розмноження гаммарид відбувається постійно.

Ch. ischnus – всеїдна тварина, що харчується водоростями, водяними рослинами, іноді безхребетними (Krisp et al. 2005), включно з іншими амфіподами (Kestrup et al. 2009).

Умови утримання маточної культури. Маточні культури *Ch. ischnus* утримують в скляних ємностях (об'єм 5–6 дм³), які розміщують в аквакамерах з регульованим температурним і газовим режимом. В цих ємностях розміщують штучні субстрати – поліуретанові пористі мати з вічком 2,0 та 10,0 мм (для сховку молодших та старших розмірно-вікових груп рачків).

В культурі рекомендується підтримувати одночасно популяцію з різновікових груп рачків у 2–3 повторах. Видалення надлишкової маси гамарид відбувається один раз на місяць.

Оптимальна температура для утримання лабораторної популяції *Ch. ischnus* становить 22–24 °С, фотоперіод – 12 годин світла / 12 годин темряви при освітленості 750 лк. Не допускається освітлення культури прямим сонячним промінням.

Середовище для культивування. Для культивування гамарид використовується питна відстояна (протягом тижня) вода, яка насичується киснем шляхом аерації стислим повітрям і, за необхідності, коригується за концентрацією йонів кальцію та величиною рН (табл. 2.4). Один раз на тиждень в культиваційній ємності відбувається заміна ¼ водного середовища.

Таблиця 2.4 – Рекомендовані показники якості води при культивуванні *Ch.ischnus*

Показник	Оптимальні величини	Допустимі величини
Температура, °С	22–24	16–27
Величина рН, од.	7,0–8,0	6,5–8,5
Вміст розчиненого кисню, мг/дм ³	5,0–8,5	5,0
Мінералізація, мг/дм ³	300,0–500,0	250–1200
Кальцій, мг/дм ³	30,0–50,0	20,0–90,0
Амоній (NH ₄ ⁺), мг/дм ³	0,4–2,0	12,5
Нітрити (NO ₂ ⁻), мг/дм ³	0,15–1,0	1,5
Нітрати (NO ₃ ⁻), мг/дм ³	0,5–5,0	18,0

Зважаючи на те, що водопровідна вода навіть після тижневої підготовки може проявляти негативну дію, для утримання маточних культур використовують відстояну протягом 2–3 діб водопровідну воду після її фільтрації за допомогою вискоелективного побутового фільтра

триступеневого очищення. За відсутності чистої води також застосовують реконструйовану воду.

Годівля. Годують рачків один раз на добу у темний період доби штучними комбікормами (у кількості, що складає до 10 % від загальної маси рачків), у щотижневому раціоні також необхідно додавати тваринні і рослинні корми.

Використовують високобілкові комбікорми, як тваринні корми – коловертки *Brachionus calyciflorus*, *Br. plicatilis*, гіллястовусі ракоподібні *Moina macroscopa* та *Daphnia magna*, личинки хірономід, так і рослинні корми – нитчасті водорості *Cladophora glomerata*. Для гамарид значення має не тільки склад їжі, але й її агрегатний стан.

Утримання маточної культури *Ch. ischnus* вимагає врахування динаміки чисельності впродовж року, яка варіює і характеризується трьома піками підвищення: у лютому-березні, липні та вересні-жовтні. Наявність в популяції особин молодших розмірно-вікових груп та яйценосних самиць (13–30 %) свідчить про цілорічне розмноження рачків за даних умов існування (рис. 2.8.).

Отримання стартової культури. Процес отримання стартової культури гамарид відбувається шляхом інокуляції робочої дезінфікованої ємності маточною культурою зі щільністю посадки 13–15 екз./дм³, підтримки температурного режиму в діапазоні 22–24 °С та внесення кормів у кількості 12,5 % від до загальної маси рачків. Отриману новонароджену молодь вилучають і використовують для біотестування. Поліуретановий мат з гамаридами з культивацийної ємності переміщують до кювети з невеликою кількістю води, залишаючи більшу частину мату на повітрі, що примушує рачків залишати його і переміщуватись, концентруючись у кюветі. Для відбору і пересаджування молоді використовують скляні трубки з витягнутим кінцем і гумовою грушою на іншому кінці або пластикові піпетки комерційного виробництва. Рачків пересаджують обережно, щоб не травмувати. Діаметр трубки для пересадки *Ch. ischnus* складає 6–8 мм.

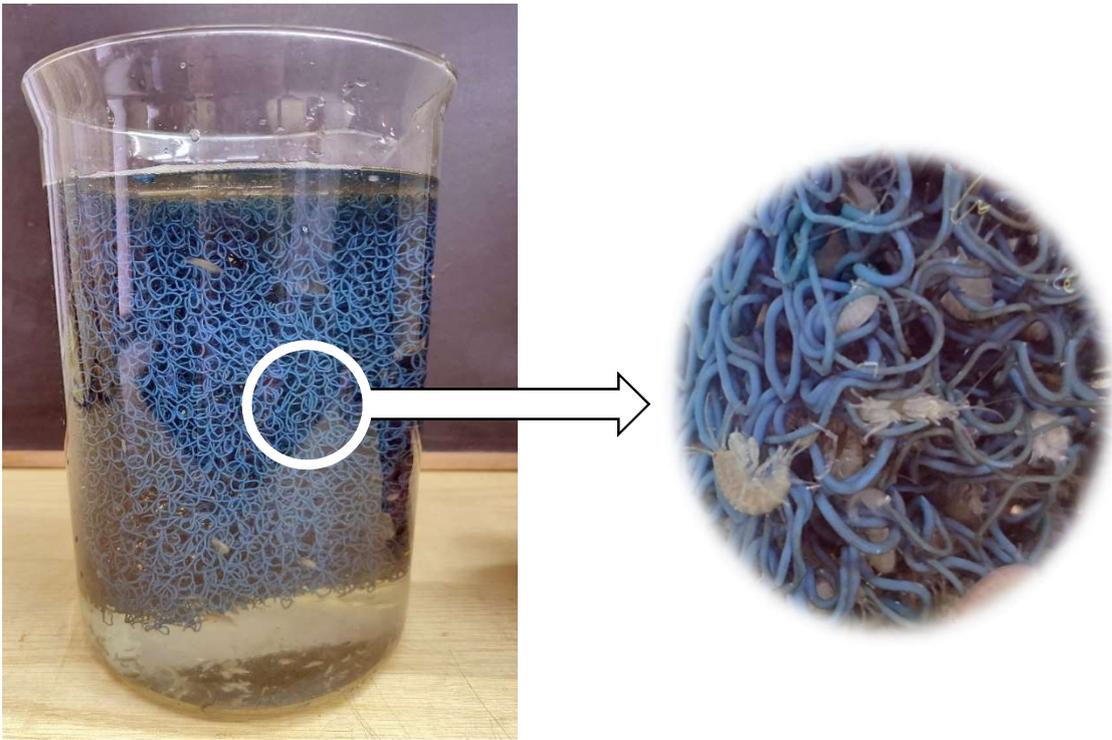


Рисунок 2.8 – Утримання культури *Chaetogammarus ischnus* в лабораторних умовах

2.2.2. Утримання лабораторної культури *Chironomus riparius*

Біологія. *Chironomus riparius* (Meigen 1804) належить до родини Chironomidae довговусих двокрилих комах (Insecta: Diptera), які є найчисленнішою групою водних макробезхребетних та зустрічаються практично в усіх прісноводних та солонуватоводних водоймах і водотоках (Jan et al. 2025). Личинки *Ch. riparius* є представниками бентосної інфауни, зокрема, мулистих та мулисто-піщаних біотопів, вони мають порівняно високу чутливість до впливу багатьох токсикантів, завдяки чому їх застосовують як тест-об'єкт для біотестування донних відкладів.

Комарі-дзвінці родини Chironomidae належать до групи комах з повним метаморфозом, вони проходять етапи ембріонального розвитку, личинки, лялечки та імаго; більшу частину життя вони проводять у воді на стадії личинки (зазвичай від кількох тижнів до 50 діб) і лише кілька діб – на стадії імаго в повітряному середовищі. Стадія імаго ефемерна, має

редукований ротовий апарат, не живиться, за особливостями будови імаго вид *Chironomus riparius* відносять до групи «thummi» (Гребенюк 1993, Thompson et al. 1999),

Основні етапи життєвого циклу лабораторної культури *Ch. riparius* наведено на рис. 2.9. Середня тривалість життя *Ch. riparius* в умовах лабораторного культивування за температури 20 ± 1 °C складає 30–35 діб. Ембріональний етап триває в середньому 3 доби.

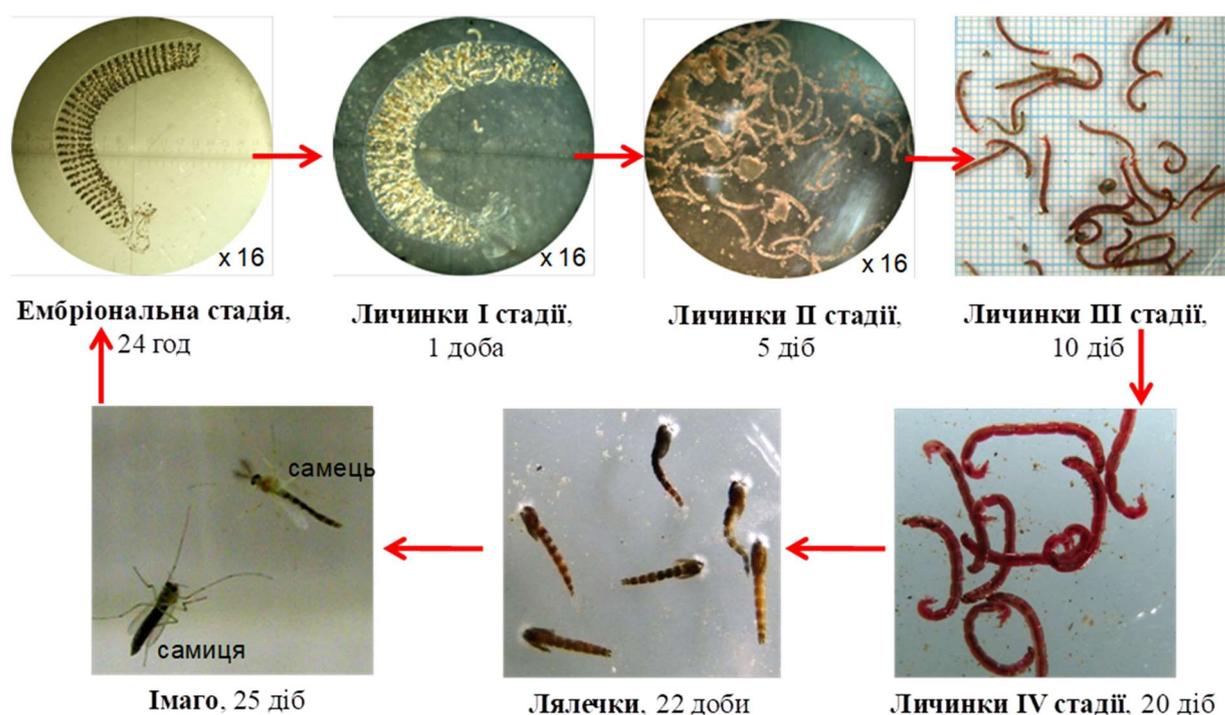


Рисунок 2.9 – Життєвий цикл *Chironomus riparius* (Гончарова та ін. 2019)

Личинковий етап розвитку триває в середньому 24 доби та супроводжується трьома линьками. Виділяють чотири личинкові стадії, які відрізняються розмірами головної капсули, які не змінюються в період між линьками, на відміну від розмірів тіла. Середні показники ширини головної капсули, довжини гулярно-лабіального склериту та тіла личинок *Ch. riparius* різного віку наведені в табл. 2.5.

Таблиця 2.5 – Основні морфометричні характеристики личинок *Chironomus riparius* на різних стадіях розвитку

Параметри	Личинкова стадія			
	I	II	III	IV
Ширина головної капсули, мм	0,112±0,007	0,193±0,010	0,321±0,014	0,544±0,014
Довжина гулярно-лабіального склериту, мм	0,120±0,008	0,232±0,012	0,396±0,027	0,665±0,010
Довжина тіла, мм	0,892–1,481	2,056–3,859	4,030–7,047	6,910–14,200

Перша личинкова стадія триває близько чотирьох діб, друга – трьох, третя – п'яти, четверта – десяти. Наступна стадія лялечки триває біля двох діб, а імагінальна – три–п'ять діб.

Умови утримання маточної культури. Утримання культури *Ch. riparius* відбувається обтігнутій сіткою культивувальною установці в якій розміщено кювети з субстратом. Загальний вигляд культивувальної установки роказано на рис. 2.10.

Кювети розміщують ярусами, їх кількість залежить від дослідницьких завдань та потреби в отриманні необхідної кількості яєць та личинок комарів. На найнижчому ярусі розташовують кювету з чистою водою для відкладання кладок самицями. Рекомендовані умови культивування: температура – 20±2 °С, вологість – не менше 60 %, освітленість 750 лк, світловий режим – світло: темрява 16:8.

Середовище для культивування. Культивування личинок проводиться в кюветах, заповнених мулистими умовно чистими донними відкладами товщиною біля 2 см та шаром води над ними не більше 2–3 мм. Донні відклади перед застосуванням знезаражують (кип'ятіння, прожарювання), гомогенізують та розливають в кювети з щільністю 1,4–1,5 г/см³ (консистенція сметани). Як воду для культивування можна використовувати чисту природну чи штучну реконструйовану воду.



Рисунок 2.10 – Культиватор *Chironomus riparius* розміром 0,7×0,5×2 м
(Гончарова та ін. 2019)

Годівля. Для кормління личинок використовують штучні корма, наприклад, пластинчатий корм для риб (Tetramin, TetraPhyll та інші). Корм вносять раз на дві доби з розрахунку 5 мг на личинку / на весь період вирощування, порціями пропорційно росту личинок.

Отримання стартової культури. Кладки відбирають щоденно; біля 10 % відкладених імаго в нижню частину культиватора яєць відбирають на підрощування для цілей біотестування, іншу частину повертають у кювети для підтримання маточної культури. Щільність посадки кладок – близько 60 шт/м².

Кладки *Ch. riparius* культивують у чашках Петрі протягом трьох діб. Після викльову, залежно від тривалості та мети експерименту, протягом 1–2 діб личинок застосовують у біотестах, або ж підрощують до потрібної стадії на дрібнопіщаному субстраті, з нормою витрат корму 3 мг/личинку, що дозволяє підтримати стабільні гідрохімічні умови та чутливість культури.

Технологічну схему культивування *Chironomus riparius* з метою біотестування зображено на рис. 2.11.

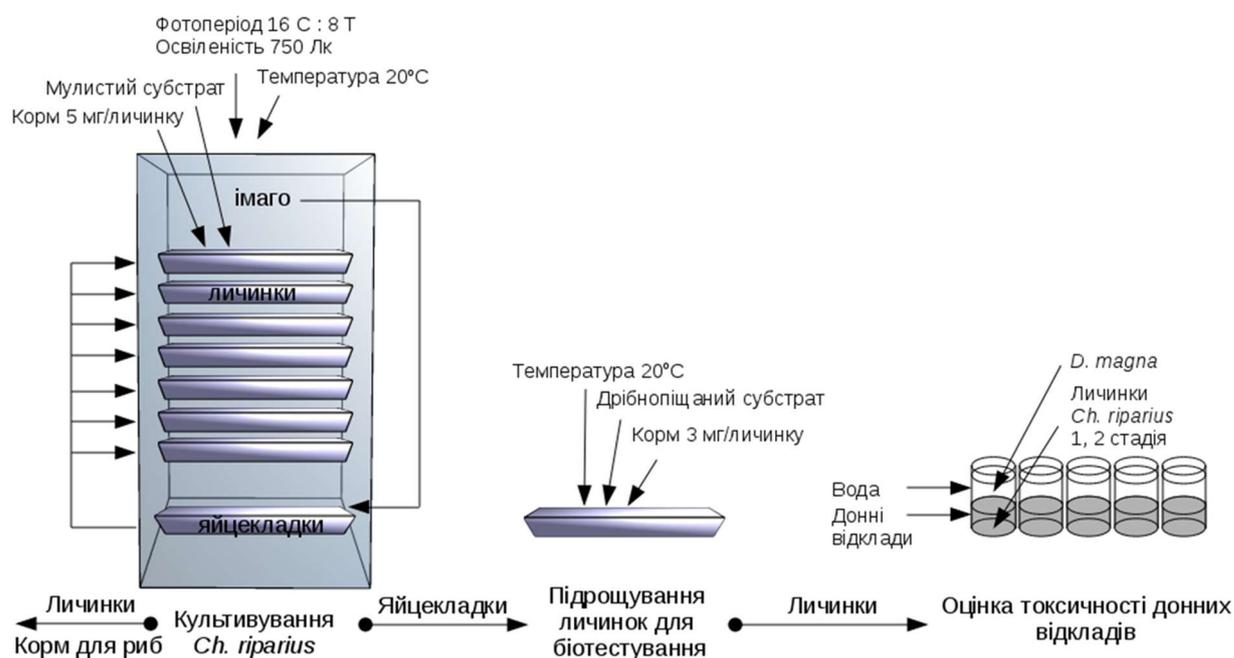


Рисунок 2.11 – Технологічна схема культивування *Chironomus riparius* з метою біотестування (Гончарова та ін. 2019)

3. ВСТАНОВЛЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ ТА ДОННИХ ВІДКЛАДІВ

3.1. Встановлення придатності культур до біотестування

3.1.1. Встановлення придатності культур гіллястовусих ракоподібних до біотестування

Під час культивування *D. magna* і *C. affinis* в період між змінами культурального середовища потрібно запобігати присутності в культурі самців, ефіпіальних самиць та смертності самиць понад 10 %. Придатність культури ракоподібних до біотестування визначають не рідше одного разу на місяць (ДСТУ 4174-2003). Для цього встановлюють середню летальну концентрацію за 24 години біотестування (LK_{50}^{24}) розчину еталонної речовини. Еталонною речовиною може бути токсична речовина з певними фізико-хімічними характеристиками (добра розчинність у воді, стабільність розчинів протягом експерименту та ін.). Рекомендується використовувати дихромат калію ($K_2Cr_2O_7$) кваліфікації "ч.д.а". З нього готують вихідний розчин: 1 г $K_2Cr_2O_7$ на 1 дм³ дистильованої води. Далі методом розбавлень готують серію розчинів від 0,5 до 4,0 мг/дм³ $K_2Cr_2O_7$ з інтервалом між варіантами 0,5 мг/дм³. Біотестування розчинів проводять тривалістю 24 години відповідно до процедури, викладеної у підрозділі 3.2.1. На підставі одержаних результатів розраховують LK_{50}^{24} (рис. 3.1). Для розбавлень вихідного розчину токсиканта використовують середовище для культивування. Якщо отримана величина LK_{50}^{24} потрапляє в експериментально встановлений діапазон реагування тест-об'єкта, який становить: для *D. magna* – 0,9–2,5 мг/дм³, а для *C. affinis* – 0,9–3,3 мг/дм³, то культура визнається придатною для біотестування. Якщо LK_{50}^{24} $K_2Cr_2O_7$ виходить за межі згаданих діапазонів реагування, то перевіряють умови культивування, щоб виявити причини погіршення стану культури. За необхідності замінюють культуру на нову.



Рисунок 3.1 – Визначення чутливості культур ракоподібних до референтного токсиканту

3.1.2. Оцінка придатності культур бентонтів до біотестування

Слід періодично проводити оцінку придатності лабораторних культур бентосних видів до біотестування шляхом оцінки чутливості на референтних токсикантах у водному розчині протягом 24–48 год (рис. 3.2). Якщо в тесті застосовуються відібрані з природи організми, перед початком експерименту їх також необхідно перевірити на чутливість. Як референтні можуть застосовуватися наступні сполуки (EPA 600/R-99/064, ISO 16303:2013): хлорид натрію чи калію, хлорид кадмію або сульфат купруму, також застосовують 3,5-дихлорфенол.

Згідно зі стандартом OECD 235, діапазон значень LK_{50} для референтних токсикантів для *Chironomus* sp. повинен лежати в межах: 3,5-дихлорфенол: LK_{50}^{24} 0,8–5,3 мг/дм³, LK_{50}^{48} 0,50–3,6 мг/дм³; KCl: LK_{50}^{24} 1,5–5,4 мг/дм³, LK_{50}^{48} 0,60–2,1 мг/дм³.

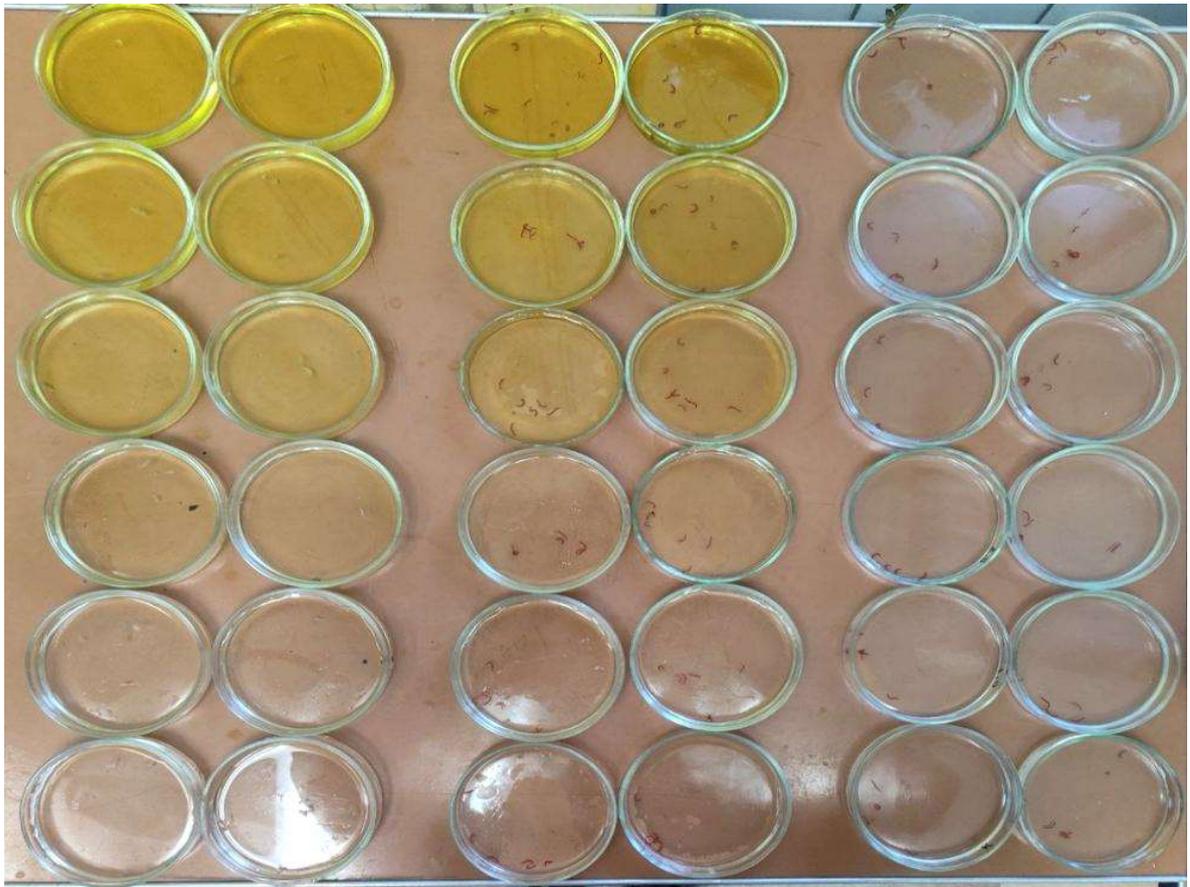


Рисунок 3.2 – Визначення чутливості культур бентонтів до референтних токсикантів

3.1.3. Встановлення придатності культур зелених мікродоростей до біотестування

Перевірку придатності культур водоростей для біотестування проводять один раз на місяць (рис. 3.3). Для цього встановлюють середню ефективну концентрацію за 48 годин біотестування (EK_{50}^{48}) розчину еталонної речовини, найчастіше використовують дихромат калію ($K_2Cr_2O_7$) кваліфікації "ч.д.а". Методом розбавлень готують серію розчинів від 0,5 до 4,0 мг/дм³ $K_2Cr_2O_7$ з інтервалом між варіантами 0,5 мг/дм³.



Рисунок 3.3 – Визначення чутливості зелених мікродоростей до референтного токсиканту

Наприклад, культура *D. communis* придатна до випробування, якщо середня ефективна концентрація $K_2Cr_2O_7$ за 48 год випробування (LK_{50}^{48}) знаходиться у межах 1,3–2,5 мг/дм³. Якщо вона виходить за межі даного діапазону, перевіряють умови культивування. За необхідності замінюють культуру на нову.

3.2. Рекомендації щодо проведення експериментів з оцінки токсичності води

3.2.1. Встановлення токсичності води та витяжок донних відкладів із застосуванням гіллястовусих ракоподібних

Загальні зауваження. Біотестування ґрунтується на визначенні змін у виживанні та плодючості гіллястовусих ракоподібних внаслідок дії токсичних речовин, що містяться у дослідній воді, порівняно з цими показниками в контрольних умовах. Короткотривале тестування (24–96 год.) дозволяє визначити гостру токсичну дію води та водних витяжок донних відкладів на гіллястовусих ракоподібних за показником їх

виживання. Критерієм токсичності при цьому є загибель піддослідних тварин протягом певного часу (48 та 48–96 год для *Ceriodaphnia affinis* і *Daphnia magna* відповідно) (ДСТУ 4174-2003). Для порівняння токсичності особливо забруднених проб води поміж собою або ж токсичності проб з однієї точки в різний час встановлюють середнє летальне розбавлення (LP_{50}) за певний термін дії.

Умови біотестування. Біотестування проводять у приміщенні без шкідливих випарів і газів, при розсіяному світлі, тривалості світлового періоду 16 ± 1 годин, темряви – 8 ± 1 годин. Температура середовища при біотестуванні повинна становити: для *D. magna* – 20 ± 2 °С; для *C. affinis* – 25 ± 2 °С. У пробах води або водних витяжках перед біотестуванням визначають концентрацію розчиненого кисню. Якщо його концентрація нижче 4 мг/дм^3 , воду аерують. У ході біотестування проби не аерують.

Молодь, яку використовують для біотестування, повинна бути віком до 24 годин, тому за добу перед проведенням дослідів всю молодь з культур забирають. Для цього самиць тимчасово пересаджують у невелику ємність, а середовище фільтрують через планктонний газ (сито) з розміром вічка 80–100 мкм для видалення молоді. За 2–3 години до проведення біотестування рачків годують. Без цього смертність рачків у контролі може зростати, а результати визначення токсичності проб – завищуватися.

Вимоги до процедури біотестування для *D. magna*. Пробу води (порову воду або водну витяжку донних відкладів) наливають по 80 см^3 у скляний посуд об'ємом 100 см^3 (дослід) (рис. 3.4). Контрольні ємності теж заповнюють середовищем для культивування. У досліді і контролі проводять по три паралельних визначення. У кожному з дослідних і контрольних посудин вміщують по 10 дафній віком до 24 годин. Їх швидко переносять піпеткою, занурюючи її під поверхню води. Згідно національного стандарту тривалість біотестування становить 96 годин, за рекомендаціями міжнародних стандартів – 48 год, проте для високотоксичних зразків тривалість експозиції може бути зменшена до 24

год, іноді зручно користуватися таким показником, як середньолетальний час. Під час біотестування дафній не годують.

Вимоги до процедури біотестування для *C. affinis*. Пробу води (водну витяжку) наливають по 15 см³ у десять ємностей (дослід). У десять контрольних ємностей заливають такий же об'єм свіжого середовища для культивування. У кожну з дослідних і контрольних посудин вміщують по 1 особині церіодафній віком 4–8 годин. Тривалість біотестування становить 48 годин. Під час біотестування церіодафній не годують. Таке розміщення церіодафній зумовлено можливістю спостереження за ними неозброєним оком (новонароджена молодь церіодафнії має розмір близько 100 мкм). Досвідченим операторам можна рекомендувати проведення дослідів у посудині об'ємом 50 см³ (у трьох повторах), в які вміщують по 5–10 особин молоді *C. affinis*. Бажаними є мінімальна товщина і максимальна прозорість матеріалу, з якого зроблено посуд для тестування.



Рисунок 3.4 – Проведення експериментів на гіллястовусих ракоподібних

При проведенні біотестування візуально підраховують кількість живих рачків. Живими вважають рачків, які вільно рухаються у товщі води або спливають із дна ємності після її легкого струшування. Решту вважають

загиблими. Після підрахунку рачків у контролі та досліді у кожній дослідній ємності визначають концентрацію розчиненого у воді кисню. Результати враховують, якщо наприкінці біотестування концентрація кисню у воді була не менше 2 мг/дм³, кількість загиблих рачків у контролі не перевищувала 10 %, а вихідна культура задовольняла вимогам, описаним у підрозділі 3.1. Якщо будь-яка з перелічених умов не була дотримана, біотестування повторюють.

Для оцінки токсичності поверхневих вод та водних витяжок донних відкладів можна використати класифікацію, розроблену для стічних вод (табл. 3.1) (РД 211.1.7.049-96). Класифікація базується на показнику виживання *D. magna* за умов проведення стандартного гострого досліді. Облік живих дафній проводять через 1, 6, 24, 48, 72 і 96 годин. Якщо у будь-який з періодів часу спостережень у досліді гине 50 і більше відсотків дафній, то біотестування закінчують.

Таблиця 3.1 – Класифікація токсичності стічних вод

Клас токсичності	Характеристика стічної води за рівнем гострої летальної токсичності	Час закінчення біотестування, годин	Кількість загиблих дафній, відсоток
1	не виявляє гострої летальної токсичності	96	менше 50
2	слаботоксична	96	50 і більше
3	помірно токсична	48	50 і більше
4	середньо токсична	24	50 і більше
5	високо токсична	6	50 і більше
6	надзвичайно токсична	1	50 і більше

Якщо для порівняння ступеня токсичності різних проб води або водних витяжок використовується показник середньолетального розбавлення (ЛР₅₀), то для проведення дослідів за загальною схемою готують не менше п'яти розбавлень вихідної води або водної витяжки (наприклад, 50, 25, 10, 5, 1 % вмісту проби у розчині). Для проведення

точного розрахунку LP_{50} бажано, щоб у двох розбавленнях (або у вихідній пробі і найменшому розбавленні) було досягнуто більше 50 % смертності тест-організмів. Для розбавлення проб води або водних витяжок використовують свіже середовище для культивування.

3.2.2. Оцінка токсичності за пригніченням росту (пригнічення зростання чисельності) зелених мікроводоростей

Приготування розчинів для тестування. Вихідний зразок розводять таким чином, щоб вміст потенційних токсикантів відрізнявся між варіантами у геометричній прогресії.

Зазвичай тест проводять без регулювання рН, за необхідності – коригують рН до 7,0. Дослідні розчини (варіанти) готують змішуючи відповідні об'єми вихідного зразка, поживного середовища та інокуляту водоростей у дослідних ємностях. Одночасно готують контрольні варіанти, що складаються із води, поживного середовища та інокуляту. Кожен дослідний варіант, включно з контрольним, готують у трьох повторностях. Інокулят додають у таких кількостях, щоб початкова чисельність клітин у дослідних варіантах становила 10–100 тис. кл/см³. Випробування проводять у пробірках або колбах із однаковим об'ємом середовища у всіх ємностях.

Умови біотестування. Проведення біотестування має відбуватися за аналогічних умов, що і утримання тест-об'єктів: температурний режим $25,0 \pm 2$ °С, інтенсивність освітлення 47,5 мкмоль/м²·с, співвідношення світлового і темного режимів – 16 : 8 год. Клітини водоростей підтримують у стані суспензії струшуванням. Тривалість випробування зазвичай становить 72 год.

Вимірювання. Чисельність клітин у кожному дослідному та контрольному варіанті підраховують щодоби за допомогою мікроскопа та камери Горяєва. Камеру та покривне скельце знежирюють, притирають і піпеткою наносять по краплині ретельно перемішаної суспензії.

Дослідження виконують у трьох повторностях. Наприкінці випробування вимірюють рН дослідних варіантів і контролю.

Випробування вважається дійсним, за умов збільшення чисельності клітин у контролі у >16 разів та зміни величини рН не більше, ніж у 1,5 рази. упродовж періоду тестування.

Розрахунок питомої швидкості росту та інгібування росту. За показником чисельності клітин на початку та наприкінці періоду випробування розраховують питому швидкість росту для кожного дослідного варіанту за рівнянням:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t}$$

де N_0 та N_t – кількість клітин відповідно на початку та наприкінці досліджуваного періоду, часу відповідно; Δt – тривалість досліджуваного періоду.

Розраховують середні значення в кожному дослідному варіанті і контролі. За цими значеннями знаходять відсоток пригнічення (інгібування росту) в кожному варіанті розбавлення вихідного зразку за рівнянням:

$$l_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

де $l_{\mu i}$ – відсоток пригнічення (швидкість росту) в i -варіанті розбавлення; μ_i – середня швидкість росту в i -варіанті розбавлення; μ_c – середня швидкість росту в контролі.

Визначання величини ЛК₅₀ або ЛР₅₀. Критерієм токсичності є пригнічення росту або зменшення швидкості росту водоростей на 50 % і більше у досліді порівняно з контролем за 72 год випробування.

Концентрації або розбавлення, що призводили до пригнічення росту культур водоростей *Ch. vulgaris*, *T. dimorphus* та *D. brasiliensis* за 72 години біотестування маркерними токсичними речовинами (дихромат калію, плюмбум, купрум, фенол, пікринова кислота) наведені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Величини EK_{50}^{72} токсичних речовин при біотестуванні за допомогою зелених мікроводоростей

Речовина, мг/дм ³	<i>C. vulgaris</i>	<i>T. dimorphus</i>	<i>D. brasiliensis</i>
Дихромат калію	4,83	2,82	6,38
Плюмбум	17,53	5,95	2,63
Купрум	2,33	1,80	2,35
Фенол	559,5	516,1	372,3
Пікринова кислота	616,1	836,1	756,2

3.3. Рекомендації щодо проведення експериментів з оцінки токсичності донних відкладів

Оцінка токсичності донних відкладів є важливим елементом визначення якості гідроекосистем і є необхідною для вибору стратегій управління ними. Біотести є базовим інструментом для ідентифікації класу речовин, що викликають токсичність. З цією метою особливо цінними є найбільш короткотривалі тести.

Для оцінки токсичності донних відкладів існують багато стандартизованих методів (EPA 600/R-99/064, ASTM 2003, EPS 1/RM/32, EPS 1/RM/33, OECD 218, OCSPP 850.1735, OCSPP 850.1740, ISO 16303:2013, ISO 14371:2012). Основними бентосними видами, що застосовують для біотестування донних відкладів є амфіподи *Hyalella azteca*, личинки комарів-дзвінців *Chironomus* sp., остракоди *Heterocypris incongruens* та інші види. Ці види виявляють досить високу чутливість та безпосередньо контактують з донними відкладами у процесі життєдіяльності. Тривалість короткотривалих експериментів з донними відкладами на виживання та ріст тест-організмів становить переважно 10–14 діб. В експериментах застосовують 10 тест-організмів в 300 см³ ємностях із співвідношенням донних відкладів та води 1 : 1,75, також можливо – 1 : 4.

Підготовка зразків донних відкладів до аналізу. Відібрані донні відклади перед початком тестування мають зберігатися за температури 4 °С. Заморожування зразків небажане. Через можливу присутність у донних відкладах лабільних летких сполук тестування слід проводити якомога швидше після відбору, однак не пізніше ніж через два тижні. Контрольні донні відклади, що використовуються паралельно з дослідними, мають відбиратися з умовно чистих (фонових) ділянок, та бути подібними за гранулометричним складом та вмістом органічного вуглецю до дослідних.

Перед проведенням аналізу донні відклади слід підготувати. Для цього пробу ретельно перемішують, видаляючи каміння, рештки організмів та сміття, потім необхідну наважку перетирають на металевому ситі з вічком не більше 1 мм для уникнення потрапляння аборигенних живих організмів в тест-систему. Бажано також дослідити характеристики донних відкладів: рН та вміст амонію у поровій воді, вміст загального органічного вуглецю, гранулометричний склад (відсоток піску, мулу, глини) та вологість.

Вимоги до якості води, що застосовується в тестах. Вода для досліду має бути придатною для нормального росту, розвитку та розмноження організмів. З цією метою можна застосовувати незабруднену природну поверхневу воду, воду з артезіанських свердловин, або очищену відстояну (дехлоровану) водопровідну воду. Не потрібно застосовувати демінералізовану воду, оскільки вона позбавлена важливих для росту і розвитку організмів солей. Також можна використовувати реконструйовану воду – дистильовану або деіонізовану, яку штучно збагачують мінеральними речовинами, необхідними для нормального розвитку тест-організмів. Природну воду слід фільтрувати через фільтр 0,45 мкм та стерилізувати ультрафіолетом для уникнення потрапляння патогенних організмів. Воду перед дослідом слід аерувати, насичення киснем має становити 90–100 %.

Реконструйовану воду готують наступним чином (ЕРА 600/R-99/064):

1. Наливають у чисту ємність 75 дм³ деіонізованої води.

2. Додають 5 г CaSO₄ та 5 г CaCl₂ до 2 дм³ деіонізованої води та перемішують на шейкері протягом 30 хв до розчинення солей.

3. Додають 3 г MgSO₄, 9,6 г NaHCO₃ та 0,4 г KCl у другу ємність з двома літрами деіонізованої води, перемішують на шейкері.

4. Обидві ємності (по 2 дм³ з п. 2 і п. 3) виливають в ємність з 75 дм³ води та доводять до мітки 100 дм³ деіонізованою водою.

5. Суміш аерують перед використанням щонайменше 24 год.

6. Якість реконструйованої води, отриманої таким чином, має бути приблизно такою: твердість 90–100 мг/дм³ за CaCO₃, лужність 50–70 мг/дм³ за CaCO₃, електропровідність 330–360 мСм/см, рН 7,8–8,2.

Вимоги до тест-організмів. Організми, що використовують у тестах, утримують зазвичай в лабораторній культурі (див. розділ 2.2). Відбір організмів з природних умов небажаний, однак у цьому випадку їх слід утримувати в лабораторних умовах протягом не менш ніж 14 діб перед проведенням дослідів. У досліді застосовують організми приблизно одного віку або розміру. Для лабораторних культур слід періодично проводити досліді на чутливість до референтного токсиканту (див. розділ 3.1.2). Організми, відібрані з природи, перед початком експерименту також потрібно перевірити на чутливість.

3.3.1. Встановлення токсичності донних відкладів із застосуванням амфіпод

Основними видами амфіпод, що застосовують для біотестування донних відкладів, є *Hyalella azteca*, однак можливе застосування й інших чутливих бентосних видів амфіпод – представників місцевої донної фауни. Для оцінки токсичності води та встановлення токсичності забруднюючих речовин застосовують види *Gammarus fasciatus*, *Gammarus pseudolimnaeus*, *Gammarus lacustris* (EPA 712–C–96–130).

Перспективними видами амфіпод, що мешкають безпосередньо у донних відкладах, є види роду *Corophium*. У літературі описані дослідження

з застосуванням *Corophium multisetosum*, *Corophium volutator* (Re at al. 2007; Scarlett et al. 2007).

Для мілководної зони дніпровських водосховищ характерними є наступні вили амфіпод: *Chaetogammarus ischnus* (*Echinogammarus ischnus*), *Pontogammarus robustoides*, *Dikerogammarus villosus*, *D. haemobaphes* та ін.

Для оцінки перспективи застосування цих видів для біотестування нами було проведено аналіз їхньої чутливості цих видів. Вона виявилась досить високою навіть порівняно з стандартними планктонними організмами *Daphnia magna* та *Ceriodaphnia affinis* (Romanenko et al. 2014). Ці види амфіпод за чутливістю можна розташувати наступним чином $D. villosus = D. haemobaphes > Ch. ischnus > P. robustoides$.

Умови проведення експерименту. Опис методу оцінки токсичності донних відкладів звикористанням амфіпод базується на основі нормативних документів (ASTM E1706-19, EPA 600/R-99/064). Найкоротший тест для амфіпод становить 10 діб.

10-денний тест на токсичність донних відкладів на амфіподах проводять за температури 23 °C та чергуванням світла і темноти 16 : 8 при освітленості від 100 до 1000 лк. Як тестові камери використовують високі скляні ємності (наприклад, лабораторні склянки) об'ємом 300 см³, куди розміщують 100 см³ донних відкладів і 175 см³ контрольної води. В тестові камери вносять по 10 екземплярів амфіпод віком від 7 до 14 діб (різниця у віці 1–2 доби), рекомендовано у восьми повторах. З нульової по дев'яту добу амфіпод щоденно годують кормом УСТ по 1 см³ на кожну досліджувану камеру.

Двічі на добу рекомендується проводити заміну шару води над донними відкладами. Дослід проводиться без аерації. Водний шар аерують, якщо рівень розчиненого кисню у воді опускається нижче 2,5 мг/дм³. Для шару води над донними відкладами використовують воду, що застосовується при культивуванні організмів або поверхневу воду доброї якості, з місця дослідження чи реконструйовану воду.

На початку і в кінці експерименту контролюють такі фізико-хімічні параметри: твердість, лужність, електропровідність, рН та рівень амонію. Щоденно контролюють температуру та рівень розчиненого кисню.

Тривалість тесту 10 діб. В кінці експозиції фіксують виживання та ріст тест-організмів. Тест вважається валідним, якщо виживання тест-організмів не нижче 80 % в контрольному варіанті донних відкладів.

Через 10 діб підраховують живі організми. Для цього відбирають організми, що знаходяться у водній товщі, донні відклади просіюють через сито з розміром вічок 300–425 мкм. Для зважування організми фіксують цукрово-формаліновим розчином, який готують так: до 120 г сахарози додають 80 см³ формаліну, суміш доводять деіонізованою водою до об'єму 1 дм³.

Довжина тіла амфіпод вимірюється від основи першої антени до основи третього уроподу вздовж кривої спинної поверхні з точністю $\pm 0,1$ мм (рис. 3.5). Вимірювання можна робити під бінокляром чи мікроскопом, або аналізуючи мікрофотографії.

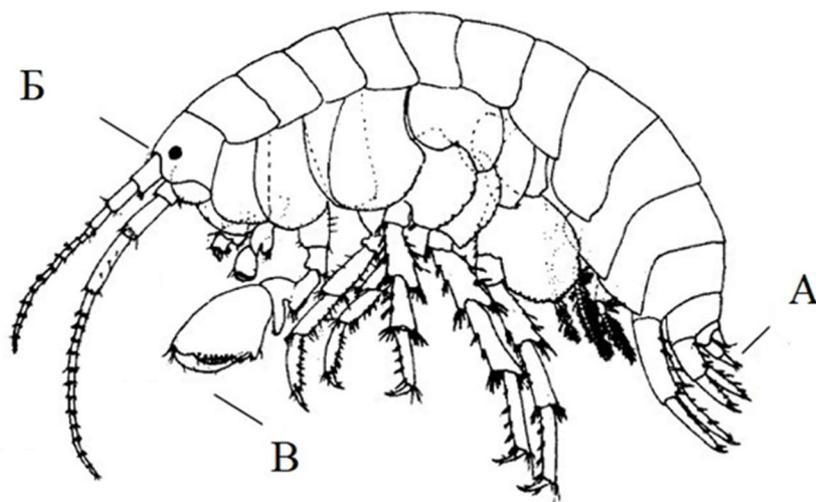


Рисунок 3.5 – *Hyalella azteca*: А – уроподи; Б – основа першої антени; В – гнатопода, що застосовується для захоплення самиць (ЕРА 600/R-99/064)

Процедура приготування корму YCT. YCT – це комплексний корм, що складається з дріжджів, Cerophyll (або замітника) та корму для форелі (або замітника).

Приготування дріжджів: до 5,0 г сухих дріжджів додають 1 дм³ деіонізованої води, добре розчиняють та перемішують магнітною мішалкою. Щойно приготовану суміш (не даючи осісти) додають рівними об'ємами до супернатанту з форелевого корму та препарату Cerophyll.

Приготування Cerophyll (сушені, подрібнені в порошок листя злаків): до 5,0 г сухого подрібненого Cerophyll (або відповідного замітника, що включає висушене, подрібнене в порошок листя злаків, листя люцерни або кролячі гранули) додати 1 дм³ деіонізованої води, змішати в блендері на високій швидкості протягом 5 хвилин, дати відстоятися протягом 1 години, потім використовувати супернатант, осад не використовується.

Приготування форелевого корму (гранул): до 5,0 г гранул форелевого корму додають 1 дм³ деіонізованої води, ретельно перемішують в блендері та переливають в розподільчу воронку ємністю 2 дм³. Суміш безперервно аерують (аерацію подають знизу) протягом одного тижня при кімнатній температурі. Перед використанням охолоджують в холодильнику мінімум 1 годину. Супернатант відфільтровують через сито з вічком 110 та використовують, осад викидають.

Приготування комбінованого корму дріжджів-Cerophyll-форелевого (YCT): ретельно змішують рівні об'єми трьох продуктів, як описано раніше. Аліквоти суміші (50–100 см³) можна розлити в пластикові пляшки. Корм потрібно зберігати при 4°C і використовувати протягом двох тижнів після приготування. Свіжоприготований корм можна використовувати відразу, або заморозити до потреби. Розморожений корм зберігають у холодильнику між годуваннями, використовують його максимум тиждень після розморожування. YCT не слід зберігати в замороженому вигляді більше трьох місяців. Перед використанням необхідно виміряти суху масу твердих

речовин корму УСТ. Корм повинен містити від 1,7 до 1,9 г сухих речовин/дм³.

Послідовність процедур проведення тесту. За 7 днів до проведення тесту необхідно відібрати організми певного віку з культури та розмістити в окремій ємності (різниця у віці має становити 1–2 доби). Готується корм для тесту та протягом наступних семи днів організмів годують та спостерігають, контролюють температуру та рівень розчиненого кисню.

За один день до експерименту донні відклади готують та вносять в тестові камери, також наливають шар води над донними відкладами.

В день посадки тварин спочатку вимірюють загальні показники якості води (рН, температура, розчинений кисень, твердість, лужність, електропровідність, вміст амонію). Вносять 10 тест-організмів віком 7–14 діб у дослідні камери. В кожну дослідну камеру додають 1 см³ корму УСТ. 20 особин тест-організмів зберігають для вимірювання довжини, а 80 особин – для визначення сухої маси.

Спостерігають за поведінкою організмів. З 1 по 8 день вносять корм та досліджують температуру, концентрацію розчиненого кисню, спостерігають за поведінкою організмів. На 9 день вимірюють загальні показники якості води. На 10 день вимірюють температуру та концентрацію розчиненого кисню. Потім підраховують живі організми, зважують їх та вимірюють довжину.

Для оцінки росту амфіпод також можна застосовувати вимірювання сухої або мокрої маси організмів. Суха маса вимірюється при висушуванні організмів за температури 60–90 °С до постійної маси.

3.3.2. Встановлення токсичності донних відкладів із застосуванням хірономід

Серед рекомендованих організмів для біотестування донних відкладів – личинки комарів-дзвінців роду *Chironomus*, що є представниками бентосної інфауни. Види цього роду використовують у біотестах завдяки

їхній порівняно високій чутливості до дії токсичних речовин, можливості довготривалого утримання у лабораторних умовах, толерантності до фізико-хімічних властивостей донних відкладів та короткий життєвий цикл (Romanenko 2011).

Умови проведення експерименту. Опис методу оцінки токсичності донних відкладів за допомогою хірономід базується на нормативних документів (ASTM E1706-19, EPA 600/R-99/064). В тесті можливе застосування личинок роду *Chironomus* sp., найчастіше використовують *Ch. tentans*, *Ch. riparius*, *Ch. dorsalis*.

10-денний тест на токсичність донних відкладів на личинках хірономід проводять за температури 23 °С з фотоперіодом 16 світло: 8 темрява за освітленості від 100 до 1000 лк.

Як тестові камери використовують високі скляні ємності (наприклад, лабораторні склянки) об'ємом 300 см³, в які вносять 100 см³ донних відкладів і 175 см³ контрольної води. В тесті застосовують по 10 екз. комарів-дзвінців 2–3 личинкової стадії (віком приблизно 10 діб), рекомендовано вісім повторів. Личинок щоденно годують з 0 по 9 добу 1,5 см³ суспензії (4 г/дм³ корму Tetramin або аналог), яку додають у кожную дослідну камеру. Заміну шару води над донними відкладами проводять двічі на день.

Дослід проводиться без аерації. Водний шар аерують, якщо рівень розчиненого кисню у воді опускається нижче 2,5 мг/дм³. Для шару води над донними відкладами використовують воду, що застосовується при культивуванні організмів або поверхневу воду доброї якості, з місця дослідження чи реконструйовану воду. На початку і в кінці експерименту контролюють такі фізико-хімічні параметри: твердість, лужність, електропровідність, рН та рівень амонію. Щоденно контролюють температуру та рівень розчиненого кисню.

Тривалість тесту 10 діб. В кінці експозиції фіксують виживання та ріст тест-організмів. Тест вважається валідним, якщо виживання тест-організмів

не нижче 70 % в контрольних донних відкладах; мінімальна суха маса організмів в контролі 0,48 мг для *Ch. tentans*.

Послідовність процедур проведення тесту. За 14 днів до експерименту відбувається відбір імаго для отримання кладок яєць, співвідношення самець:самиця 1 : 3 (наприклад, для отримання 5–25 кладок відбирають 10 самців та 30 самок). Кладки розміщують в ємності для викльову, тим часом готують камери для підрощування личинок зі свіжим субстратом.

Через 3-4 дні перевіряють вилуплення личинок та відбір для підрощування личинок першої стадії, личинок годують. За добу до внесення організмів у тестові камери личинок також годують. Також готують тестові камери та вносять туди протерті через сито донні відклади і наливають воду у відповідній кількості.

На наступний день проводять вимірювання загальних показників якості води (рН, температура, розчинений кисень, твердість, лужність, електропровідність, вміст амонію), а потім вносять по 10 личинок 2–3 стадії та 1,5 см³ корму (суспензія 4,0 г/дм³ Tetramin або аналог) у дослідні камери. Зберігають 20 тест-організмів для визначення личинкової стадії, лінійних розмірів або маси. Спостерігають за поведінкою організмів.

З 1-го по 8-й день вносять 1,5 см³ корму (суспензія 4,0 г/дм³ Tetramin або аналог) у дослідні камери; вимірюють температуру та концентрацію розчиненого кисню, спостерігають за поведінкою організмів. На дев'яту добу вимірюють загальні показники якості води. На десяту добу тест завершують. Вимірюють температуру та концентрацію розчиненого кисню, проводять підрахунок живих організмів та їх зважування чи вимірювання їхніх лінійних розмірів.

Стадію розвитку личинки *Ch. tentans* визначають за шириною головної капсули (табл. 3.3), довжиною тіла (від 4 до 6 мм), або сухою масою (0,08 до 0,23 мг/особину). Для личинок *Ch. riparius* ці параметри зазначені в методиці культивування (див. табл. 2.5). Спосіб визначення стадії розвитку на початку і в кінці тесту має бути однаковий.

Таблиця 3.3 – Ширина головної капсули *Chironomus tentans* на різних личинкових стадіях

Личинкова стадія	Доба після викльову	Середнє значення, мм	Довірчий інтервал, мм
I	1–4,4	0,10	0,09–0,13
II	4,4–8,5	0,20	0,18–0,23
III	8,5–12,5	0,38	0,33–0,45
IV	≥12,5	0,67	0,63–0,71

Після завершення тесту на десяту добу підраховують кількість живих організмів, для цього відбирають тварин, що знаходяться у водній товщі, потім донні відклади просіюють через сито з розміром вічок 300–425 мкм. Беззольна суха маса та виживання є тест-критеріями, що дозволяють оцінити токсичність донних відкладів у досліді з хірономідами.

Встановлено, що мінеральні частки дрібнозернистих донних відкладів можуть становити значну долю сухої маси личинок хірономід, тому потрібно вимірювати суху беззольну масу личинок. Беззольну суху масу личинок визначають так: організми висушують за температури 60 °С протягом 24 год до постійної маси, потім спалюють за температури 550 °С протягом 2 год. За різницею показників маси встановлюють беззольну суху масу. Середня суха маса личинок *Ch. tentans* в кінці тесту має бути не менше ніж 0,6 мг (беззольна 0,48 мг). Беззольна суха маса та виживання є тест-критеріями, що дозволяють оцінити токсичність донних відкладів у досліді з хірономідами.

Скорочення строків експозиції та оптимізація тестової схеми з метою ідентифікації класу речовин, що викликають токсичність. З метою проведення процедури ідентифікації класу речовин, що викликають токсичність, виникає необхідність у скороченні строку експозиції тест-організмів.

Нами було досліджено та успішно апробовано можливість скорочення експозиції до 5 діб. Скорочення строків експозиції було успішно реалізовано і іншими авторами (Ho et al. 2000).

Нами було апробовано також зменшення тестових камер зі збереженням пропорції об'єму донних відкладів та води (Romanenko et al. 2012).

Тест на токсичність донних відкладів на амфіподах та личинках хірономід проводили за температури 23 °С з чергуванням світла і темряви 16 : 8. Як тестові камери застосовували високі скляні склянки об'ємом 100 см³, куди розміщували 20 см³ донних відкладів і 60 см³ контрольної води. Для запобігання випаровуванню води ємність накривали пластиковою чашкою Петрі з отвором для аерації. Застосовувалась помірна аерація водного шару кожної дослідної камери (рис. 3.6).



Рисунок 3.6 – Експериментальна установка для оцінки токсичності донних відкладів з аерацією дослідних камер (Romanenko et al. 2012)

В тестові камери розміщували по 6 екземплярів амфіпод (*Ch. ischnus*) чи личинок хірономід (*Ch. riparius*), у п'яти повторах. У тесті з амфіподами *Ch. ischnus* у водний шар додавали як корм 5 екз. дафній та щоденно вносили корм Tetramin по 1,5 см³ суспензії 4 г/дм³ на кожную досліджувану камеру. У тестах з хірономідами додавали лише корм Tetramin з такою ж нормою витрат. Досліджували гідрохімічні параметри водного шару: рН, температуру та рівень розчиненого кисню.

Через 5 діб підраховували кількість живих організмів. Для цього спочатку відбирали організми, що знаходились у водній товщі, потім донні відклади просіювали через сито з розміром вічок 300–425 мкм.

Вживання тест-організмів в контрольних донних відкладах становило вище 80 %.

4. ІДЕНТИФІКАЦІЯ КЛАСУ ЗАБРУДНЮЮЧИХ РЕЧОВИН У ВОДІ ТА ДОННИХ ВІДКЛАДАХ

Провідну роль у розробці сучасних методологічних підходів та принципів визначення й оцінки чинників токсичності води і донних відкладів прісноводних екосистем за допомогою біологічних методів відіграла Агенція з охорони довкілля США (US EPA – United States Environmental Protection Agency). Її спеціалістами було розроблено процедуру ТІЕ (Toxicity Identification Evaluation) – Оцінювання ідентифікації токсичності, суть якої полягає у реєстрації відповіді тест-організмів на проведення послідовної серії фізико-хімічних маніпуляцій з токсичним середовищем, що дозволяє ідентифікувати чинник (чинники) токсичної дії. У цьому підході вирізняють три стадії: Фаза I (ТІЕ-Фаза I) – визначення фізико-хімічних властивостей чинника токсичності (Characterisation – характеризування); Фаза II (ТІЕ-Фаза II) – аналітичне визначення чинника токсичності (Identification – ідентифікація); Фаза III (ТІЕ-Фаза III) – підтвердження того, що саме визначений чинник токсичності викликає відповідає за всю виявлену негативну дію (Confirmation – підтвердження).

Оскільки ТІЕ є основним сучасним підходом, що в різних модифікаціях широко застосовується в токсикологічних та аналітичних дослідженнях, нижче наводимо більш детальний опис деяких складових цього підходу на основі відповідних методичних рекомендацій EPA.

Також ми спробували адаптувати інформацію наших попередніх методичних розробок, які стосувалася насамперед оцінки токсичності стічних вод та зон значного забруднення донних відкладів (наприклад, акваторії портів), до дослідження води та донних відкладів з водойм та водотоків, які можуть потерпати від непередбачуваних техногенних катастроф.

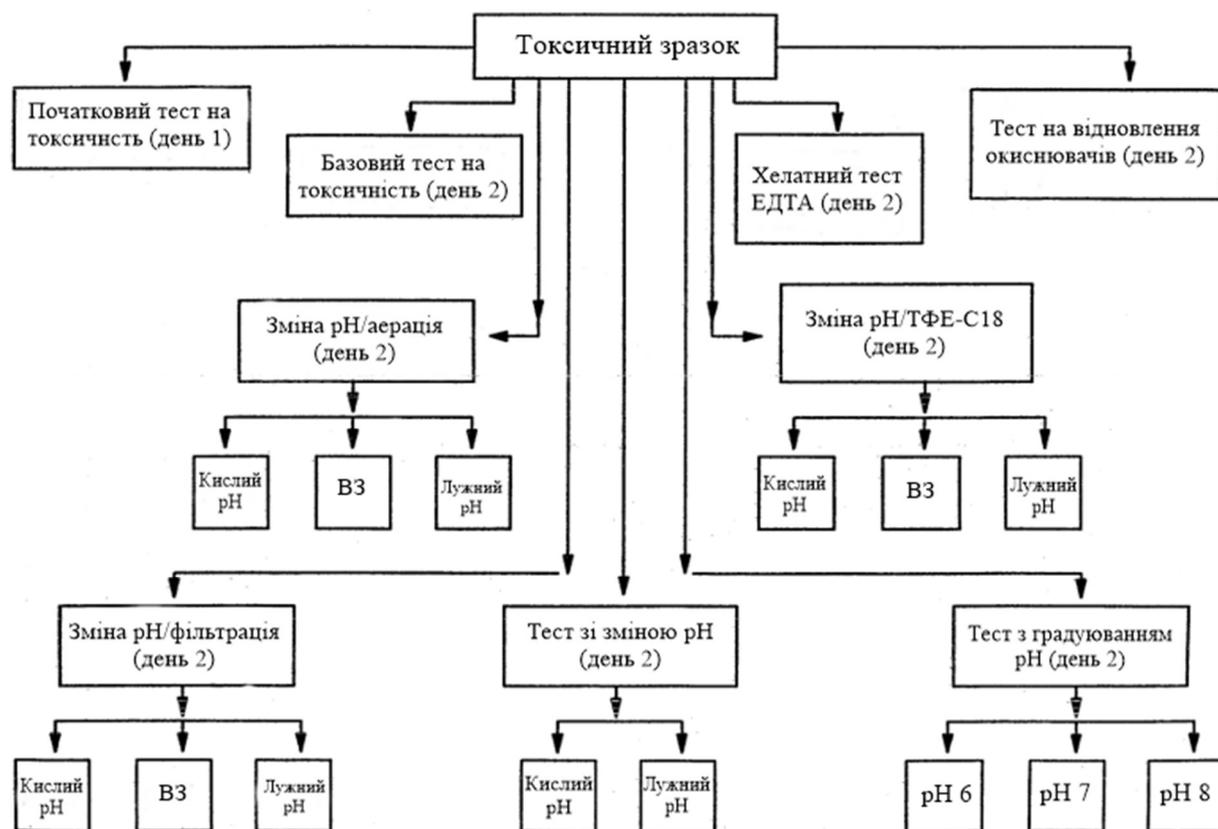
4.1. Рекомендації щодо ідентифікації класу забруднюючих речовин у воді (поверхневі, стічні, порові води, водні витяжки донних відкладів)

Загальна схема ТІЕ-Фаза І для випробувань стічних/поверхневих вод та схема для досліджень порових вод, які приводяться в рекомендаціях ЕРА (ЕРА-600/6-91/003, ЕРА/600/R-07/080), демонструють значну подібність алгоритмів випробувань, хоча і мають певні особливості.

Всі дії із водними зразками, щодо яких планується характеризування можливих чинників токсичності (ТІЕ-Фаза І), орієнтовані на максимально стислі терміни проведення – 3–4 доби, залежно від обраної тривалості експозиції тест-організмів у пробах після проведення маніпуляцій ТІЕ-Фаза І (24 або 48 год). Першим вважається день надходження до лабораторії зразка стічних/поверхневих вод, або отримання з донних відкладів порової води чи водних витяжок. Цього дня виконуються фізико-хімічні дослідження (вміст кисню, рН та ін.) та розпочинається «початковий» (initial) тест на токсичність з використанням аліквоти водного зразка (частини зразка, яка є результатом ділення всього об'єму на ціле число). Цей тест виконують для розрахунку величини LP_{50}^{24} вихідного зразка й обрання бажаного діапазону розбавлень при проведенні наступних маніпуляцій ТІЕ-Фаза І.

Під час дослідження зразків поверхневих/стічних вод або водних витяжок донних відкладів, коли відбір необхідного об'єму зразку не становить методичних труднощів, проведення ТІЕ-Фаза І рекомендується виконувати за розширеною схемою (рис. 4.1). У такому випадку в перший день готують дві аліквоти з кислим і лужним рН (3 і 11 відповідно), проводять їхню аерацією, фільтрування й екстрагування на смолі C_{18} . Ємності зі зразками накривають для зменшення випаровування і зберігають до наступного дня при температурі 4°C. Протягом цього часу відбувається їх врівноваження. На другий день готують розбавлення вихідного та видозмінених зразків для проведення тестів на токсичність. Рекомендована

кратність розбавлення складає 4, 2, 1 і 0,5 рази від величини 24-годинної ЛР₅₀, розрахованої за результатами проведення початкового тесту. Якщо токсичність вихідного зразку є помірною, можна використовувати зразок без розбавлення. Також проводяться інші тести на токсичність, що передбачають додавання хелатоутворювачів або відновників і тест з градуванням рН (6–8).



Примітка. ВЗ – рН вихідного зразка

Рисунок 4.1 – Схема проведення Фази I ТІЕ для поверхневих і стічних вод (приведено за ЕРА-600/6-91/003)

Таким чином, повна схема проведення ТІЕ-Фази I включає дев'ять категорій, які передбачають виконання 18 тестів на токсичність, а саме: перший день – 1 початковий тест на токсичність; другий день – 17 тестів: 1 базовий тест, 11 тестів з коригуванням рН (кислотний, вихідний і лужний, кожен з фільтрацією, аерацією, твердофазною екстракцією на колонці С₁₈ та

2 холостими пробами на маніпуляції з рН у воді для розбавлення), 1 тест з додаванням ЕДТА, 1 тест з додаванням тіосульфату натрію, а також 3 тести з градуюванням рН (6, 7 та 8 для прісноводних зразків).

При виконанні ТІЕ-Фази І для порових вод основна практична перешкода полягає у їхній обмеженій кількості. В зв'язку з цим відповідні процедури для порових вод, хоч і побудовані за близькою схемою до дослідження поверхневих і стічних вод, передбачають зменшення об'ємів тестових ємностей і скорочення кількості процедур (рис. 4.2) порівняно з відповідними рекомендаціями для поверхневих і стічних вод.



Рисунок 4.2 – Схема проведення ТІЕ-Фаза І для порових вод прісноводних донних відкладів (приведено за ЕРА/600/R-07/080)

При проведенні маніпуляцій ТІЕ-Фаза І для порових вод були виключені наступні тести: тест на відновлення окисників (додавання тіосульфату), тести на фільтрацію та тести на коригування рН, включаючи фільтрацію, аерацію та твердофазну екстракцію при кислому та лужному рН. У цьому випадку схема проведення ТІЕ-Фаза І включає сім категорій, які передбачають проведення 9 тестів на токсичність.

Результати тестів на токсичність за необхідності стають підставою для додаткових тестів, спрямованих на подальше визначення або підтвердження природи токсикантів. Деякі з можливих чинників токсичності (зокрема,

сполуки, що швидко розкладаються) можуть бути виявлені лише шляхом проведення послідовних біотестів, що супроводжують «старіння» зразка. Окремі маніпуляції із аліквотами зразків, які передбачені при проведенні ТІЕ-Фаза I, можуть впливати на біодоступність і токсичність більше ніж одного класу токсикантів. У такому випадку може бути необхідним проведення додаткових маніпуляцій для подальшого уточнення чинників токсичності.

Досвід застосування ТІЕ-Фаза I (Характеризування) на стічних водах показав, що у більшості випадків принаймні одна маніпуляція із зразком призводила до істотного зменшення токсичності. Її збереження після усіх застосованих маніпуляцій може відбуватися за двох причин: 1) присутності нецільових токсикантів, на біодоступність яких не впливають застосовані фізико-хімічні процедури; 2) вміст певних токсикантів настільки значний, що перевищує діапазон реагування певних процедур, і для зменшення токсичності необхідні додаткові умови (наприклад, збільшення часу взаємодії з реагентами, тривалості аерації, застосування більшого об'єму колонки C₁₈, збільшення концентрації реагентів тощо).

Іншим результатом серії випробувань на ТІЕ-Фаза I може бути повне або часткове усунення токсичності зразку при виконанні декількох маніпуляцій. Така ситуація може виникати також за двох умов: 1) присутність у зразку більше ніж одного класу токсикантів, відмінних за фізико-хімічними властивостями; 2) біодоступність певного токсиканту може бути змінена за допомогою різних маніпуляцій.

Зауваження.

- Рекомендації ЕРА застерігають від проведення випробувальних процедур, спрямованих на визначення певного (апріорі обраного) токсиканту і від відмови від частини тестів, що призводить до ігнорування можливих чинників токсичної дії і, в кінцевому рахунку, до збільшення тривалості і вартості. До дослідження зразків важливо підходити без упередження про можливу причину токсичності.

- Проте вищенаведені рекомендації стосувалися більшою мірою зразків стічних вод, що мали високу токсичність. На нашу думку, процедура ТІЕ-Фаза I природних помірно забруднених зразків вод може зазнавати спрощення у результаті пріоритизації можливих чинників токсичності (багаторічні дослідження показали, що неіонні органічні речовини та метали є причиною токсичних ефектів у 70–90 % випадків), проте непередбачуване катастрофічне забруднення внаслідок воєнних дій не завжди дозволить подібне спрощення.

Контрольні процедури та «холості» проби. Під час проведення фізико-хімічних маніпуляцій із зразками важливо бути впевненим, що прояви негативної дії викликаються токсичністю зразка, а не доданих реагентів (кислота, луг, ЕДТА тощо). Пропонується застосування двох типів перевірок, які можна використовувати для виявлення «помилкової» токсичності (artifact toxicity).

Перший метод перевірки полягає у застосуванні всіх фізико-хімічних маніпуляцій до середовища для розбавлення – так звана «холоста токсичність» (toxicity blank), проте застосування цього методу не підходить для маніпуляцій, в яких реагенти можуть зазнавати впливу мінливої хімічної матриці зразка, не пов'язаної із вмістом токсичних забруднюючих речовин. Цей метод, зокрема, не підходить для перевірки тестів із застосуванням ЕДТА, оскільки токсичність цього реагента суттєво залежить від жорсткості води.

Другий метод – «контроль токсичності» – передбачає порівняння токсичності, яку спостерігали у базовому тесті та у тестах після проведення маніпуляцій. Вважається, що у результаті фізико-хімічних маніпуляцій ТІЕ-Фаза I токсичність зростати не повинна, а якщо це відбувається – процедура спричинила штучну токсичність зразка. Застосування цих методів повинно також супроводжуватися контролем чутливості культур тест-об'єктів та їхньою реакцією на контрольні тести з чистою водою (середовищем для розбавлення).

Рекомендовано припускати, що жодна процедура (фізико-хімічна маніпуляція з аліквотою зразка) не може вважатися вільною від штучної токсичності. Адже багато випробувань ТІЕ-Фаза І пов'язані з істотними та нестандартними маніпуляціями зі зразком. Різні методи контролю повинні послідовно використовуватися для виявлення проявів штучної токсичності, чи інших змін в досліджуваному зразку, які підвищують його токсичність.

Нижче наводимо опис деяких тестів та фізико-хімічних маніпуляцій, які їм передують у ТІЕ-Фаза І (Характеризування), відповідно до керівного нормативного документу ЕРА 600/6-91-003.

4.1.1. Початковий тест на токсичність (Initial Toxicity Test)

Цей тест виконується у перший день проведення ТІЕ-Фаза І. Його основна мета полягає в розрахунку 24-годинного середньо летального розбавлення (LR_{50}^{24}) з метою підбору концентрацій зразка під час подальших випробувань. Для початкового тесту порових вод рекомендовано використовувати декілька видів тест-об'єктів (мешканців планктону та бентосу).

Процедура. Проводять тестування ряду розбавлень, які містять 100, 50, 25, 12,5 і 6,25 % вихідного зразку. В разі припущення, що зразок має помірну токсичність (LR_{50} становить близько 75 % вихідного зразку), серію розбавлень можна відкоригувати в бік зменшення розбавлень вихідного зразку (наприклад, 100, 75, 50 та 35 %). Якщо величина LR_{50}^{24} становить 6,25 % і нижче, тест слід повторити у серії більших розбавлень (3,13 та 1,56 %).

Зауваження.

Як зазначалося раніше, особливістю випробувань порових вод є менші об'єми зразка з потенційно високими концентраціями хімічних сполук у їхньому складі. У випадку кризового моніторингу можливе зменшення варіантів розбавлені до трьох (100, 50, 25 % порової води) з подальшим відповідним коригуванням залежно від результатів тестів.

4.1.2. Базовий тест на токсичність (Baseline Toxicity Test)

Цей тест проводять з аліквотою незміненого зразка на наступний день після його надходження у лабораторію. Саме його результати порівнюють з тестами після проведення фізико-хімічних маніпуляцій, передбачених ТІЕ-Фаза I. Іншою функцією базового тесту є відстеження стабільності токсичності зразка у часі. Базовий тест на токсичність необхідно повторювати щоразу, коли проводяться додаткові тести для характеризування зразка у ТІЕ-Фаза I. Зміни базової токсичності можуть вказувати на присутність летючих або нестабільних токсикантів.

Тест виконується у двох серіях концентрацій і у двох повторях (статичний тест на гостру токсичність). Готуючи досліджувані розчини для базового тестування на 2-й день важливо звернути увагу на будь-які фізичні зміни у зразку, які відбулись за добу зберігання (утворення осаду, запах тощо).

Для *першої серії* випробувань пропонується обрати дослідні концентрації, розраховані на основі величини LP_{50}^{24} початкового тесту (відсоток розбавлення вихідного зразка, який призводить до загибелі 50 % тест-організмів). Дослідні концентрації відповідають розбавленням, що становлять 4-, 2-, 1- та 0,5-кратні величини LP_{50} . Тобто, якщо LP_{50} дорівнює розбавленню вихідного зразка 10 %, максимальна і мінімальна концентрації становитимуть 40 і 5 % відповідно. Кількість варіантів може бути зменшена, якщо токсичність зразка є посередньою (LP_{50} є більшою за 25 %-не розбавлення вихідної проби).

Друга серія випробувань повторює розбавлення вихідного зразка при постановці початкового тесту (наприклад, 100, 50, 25, 12,5 і 6,25 %). Ця серія дозволяє порівняти результати з початковим тестом. Проте, в зв'язку з обмеженим об'ємом зразків порових вод, другу серію випробувань у базовому тесті можна не виконувати.

Підтвердження факту зниження токсичності при порівнянні результатів тестів між аліквотами незміненого зразка 2-го дня (базовий тест)

та інших тестів проводять на основі оцінки статистичної достовірності різниці у смертності організмів у порівнюваних вибірках. Вважається, що зміни у величині LP_{50} , що дорівнюють одному концентраційному інтервалу (зміна концентрації вдвічі), є істотними.

Контролем слугують результати тесту з культуральним середовищем (водою для розбавлення). Смертність тест-організмів у контролі вище допустимого мінімуму (10 %) унеможлиблює порівняння результатів тестів, зводячи таким чином нанівець всю роботу.

Зауваження.

- Проведення маніпуляцій ТІЕ-Фаза I зі смертністю менше 50 % у нерозбавленому зразку потребує застосування максимально можливої кількості повторів з метою належного статистичного опрацювання отриманих результатів і розрізнення фактичних змін у токсичності.

- Для адекватного порівняння результатів базового тесту на токсичність і тестів з проведенням маніпуляцій ТІЕ-Фаза I, в усіх тестах на токсичність 2-го дня організми мають додаватись до досліджуваних розчинів приблизно в один і той же час.

- Якщо базовий тест не демонструє токсичності у відповідності до результатів початкового тесту, варто розглянути необхідність повторного відбору зразку і скоригувати процедуру випробувань.

4.1.3. Тест зі зміною рН (pH Adjustment Test)

Величина рН істотно впливає на токсичність багатьох сполук, що потрапляють в оточуюче середовище. Тому коригування рН використовується протягом ТІЕ-Фаза I, щоб отримати більше інформації про природу токсикантів. Зміни рН можуть впливати на хімічні та фізичні властивості сполук (розчинність, полярність, летючість, хімічну форму та стабільність), тим самим змінюючи їхню біодоступність та токсичність.

Дві групи сполук, на які істотно впливає рН розчину, це речовини з кислотними та оснóвними властивостями. Вплив рН на співвідношення

іонізованих і неіонізованих форм кислот і основ може змінювати результати тестів на токсичність, адже сполуки можуть бути більш токсичними в неіонізованій формі порівняно з іонізованою. Наприклад, неіонізований аміак (NH_3) є токсичнішим ніж йони амонію (NH_4^+), що пояснюється більшою проникністю клітинних мембран для неіонізованих форм. Також рН впливає на процеси комплексоутворення, що притаманно для металів. Прикладом можуть бути рН-залежні форми мангану (купрум тощо), які спричиняють неоднаковий вплив на організм гідробіонтів внаслідок різного ступеня їхньої токсичності. Оскільки від рН значною мірою залежить швидкість гідролізу складних органічних речовин, це також може бути механізмом впливу на токсичність органічних забруднювальних речовин.

Інший аспект впливу рН стосується розчинності токсикантів. Неіонізовані форми кислот і основ можна вважати менш полярними, ніж їхні іонізовані форми, які більшою мірою взаємодіють з молекулами води. Отже, неіонізовані форми кислот і лугів легше видалити з водних розчинів за допомогою аерації, фільтрації, рідинної екстракції неполярними розчинниками або методами твердофазної екстракції.

У дослідах із зміною рН зразка обов'язково проводять «холості проби» з використанням середовища для розбавлення (toxicity blanks), постановка яких повторює відповідні маніпуляції зі зміни рН і його повернення до вихідного рівня. За допомогою цих проб визначають, чи додавання кислоти, лугу, або використаний лабораторний посуд і матеріали не викликають токсичну дію.

Процедура. Її суть полягає у зміні рН у двох аліквотах зразка (по 300 cm^3) до величин 3 і 11 з використанням розчинів хлоридної кислоти і гідроокису натрію (1,0, 0,1 і 0,01 н NaOH, а також 1,0, 0,1 і 0,01 н HCl). Після цього вони підлягають паралельним маніпуляціям (фільтрація, TFE- C_{18} , аерація), проведення яких будуть описані нижче у відповідних розділах. Після проведення цих маніпуляцій рН отриманих проб повертають до рН

вихідного зразка і залишають до наступного дня. Всі ці маніпуляції проводяться у перший день випробувань.

“Холостими” при виконанні цієї процедури є проби (30 см³ з 300 початкових), в яких рН повернено до вихідної величини після її зміни до 3 і 11 без жодного проміжного втручання. Результати цього тесту порівнюють з базовим тестом, який слугує також позитивним контролем при порівнянні результатів з маніпуляційними тестами.

Перед постановкою тестів на токсичність (другий день) рН проб перевіряють, і за необхідності доводять до рН вихідного зразка.

Зауваження.

- Для встановлення рівноваги рН необхідно певний час, який залежить від буферної ємності вихідного зразка води.

- Під час зміни рН в осад можуть випадати як неорганічні, так і органічні речовини. Осад, що утворюється, не обов'язково є чинником токсичної дії. Осадження може відбуватись через процеси флокуляції, утворення зважених твердих часток, росту мікроорганізмів, утворення колоїдів тощо.

- Зниження токсичності в процесі зміни рН може також викликатися збільшенням об'єму зразка внаслідок додавання значного об'єму кислоти чи лугу. Це припущення перевіряється шляхом додавання відповідної кількості середовища для розбавлення та потребує використання більш концентрованих розчинів реагентів.

- Зменшення або втрата токсичності також може бути результатом розкладу токсиканту в процесі зміни величин рН. У деяких випадках токсичність збільшується, якщо продукт розпаду є токсичнішим, ніж вихідна сполука.

- Якщо тести після регулювання рН до 3 або 11 виявляють значно більшу токсичність, ніж базовий тест, можливі дві причини: 1) іони Na⁺ і Cl⁻, внесені при додаванні кислоти чи лугу, призвели до утворення сольового

розчину за межами зони толерантності тест-організмів, або 2) система не повернулася до рівноважного стану після відновлення рН вихідного зразка.

4.1.4. Тест зі зміною рН та фільтрацією (pH Adjustment/Filtration Test)

Випробування токсичності зразків після проведення фільтрації надає інформацію про наявність токсичних речовин, пов'язаних з зависями. Токсичні забруднювачі, які сорбовані на зважених частках, можуть бути менш біологічно доступними, однак гідробіонти можуть зазнавати впливу цих забруднюючих речовин через аліментарний шлях надходження. Цей шлях впливу може бути значущим для гіллястовусих ракоподібних і інших організмів-фільтраторів, які поглинають мікроводорості, бактеріальні клітини та тверді частинки разом із сорбованими на них токсичними речовинами.

Фільтрацією проби із зміненим рН видаляються ті сполуки, які зазвичай перебувають розчиненими у вихідному зразку, проте переходять у нерозчинний стан або зв'язуються зі зваженими частками при екстремальних значеннях рН (3 та 11), що призводить до зниження токсичності видозміненої проби. Проте зміна рН також може зруйнувати або розчинити зважені частки, тим самим порушивши рівновагу у напрямку зростання вмісту розчиненої форми, що може викликати підвищення токсичності проби зі зміненим рН.

Проблема подальшої ідентифікації чинника токсичності пов'язана із вирішенням питання, які механізми відповідальні за зменшення токсичності проби завдяки фільтрації (осадження, сорбція, випаровування тощо).

Процедура. Фільтрування проводять на скловолоконних (переважно) або целюлозних фільтрах з діаметром пор 1,0 та 0,45 мкм вівповідно у перший день. Перед виконанням процедури їх готують шляхом пропускання крізь них 25 см³ дистильованої води, що має відповідний рН. Для фільтрування проб з підвищеним вмістом завислих речовин може знадобитися більше одного фільтра.

Відфільтровують частину (235 см³) з аліквот, отриманих після процедур зі зміни рН до 3 і 11, а також відповідну кількість незміненого вихідного зразка. Частина об'ємом 35 см³ цих проб використовується на другий день для проведення тесту на токсичність, інша профільтрована частина (200 см³) підлягає процедурі твердофазної екстракції на колонці C₁₈, яка буде описана нижче. В кожному випадку після проведення маніпуляцій рН зразків доводять до рН вихідного зразка.

«Холості» проби готуються з використанням середовища для розбавлення. Вони точно повторюють процедури, що виконуються у відповідних тестах.

Результати випробування токсичності проб після маніпуляцій з рН і фільтрації порівнюються з базовим тестом. Перед постановкою тестів на токсичність (другий день) рН перевіряють, і за необхідності доводять до величини вихідного зразка.

Зауваження.

- Рекомендується фільтрація під тиском, оскільки у випадку використання вакуумної фільтрації існує потенційна можливість втрати летких сполук, якщо вони стають більш леткими у результаті зміни рН.

- Пропонується уникати лабораторного посуду з нержавіючої сталі, перевагу слід надавати покриттю з тефлону, пластиковому або скляному посуду.

4.1.5. Тест зі зміною рН та ТФЕ-C₁₈ (рН Adjustment/C₁₈ SPE)

Твердофазна хроматографія зі зворотною фазою призначена для встановлення токсичності зразка, спричиненої присутністю переважно неполярних сполук (органічні сполуки, хелати металів). Досліджуваний зразок проходить через наповнену сорбентом колонку, при цьому сполуки у зразку взаємодіють із сорбентом і екстрагуються. Встановлюючи низькі чи високі величини рН можна досягати стану, коли деякі з токсикантів

будуть існувати переважно в неіонізованій формі та сорбуватимуться на колонці C₁₈.

Тест ТФЕ-C₁₈ у поєднанні з аналітичними процедурами ТІЕ-Фаза II є ефективним інструментом виявлення чинників токсичності. Зменшення токсичності в дослідному розчині після проходження через колонку C₁₈ – надійний індикатор токсичності, що викликається органічними сполуками. Подальше фракціонування та ідентифікація певних сполук може дати розуміння джерел і факторів стресу, які діють у донних відкладах на бентонтів. Відомо, що органічні сполуки є найпоширенішим джерелом токсичності у донних відкладах, які здатні активно поглинати стійкі гідрофобні сполуки з водного середовища (Ho 2013).

Процедура. Тест ТФЕ зазвичай проводиться з картриджами C₁₈ об'ємом 3 см³ для зразка до 300 см³, або 6 см³ для зразка об'ємом близько 1 дм³, хоча можна використовувати і колонки більшого розміру (12 см³). Маніпуляцію проводять у перший день випробувань, тест з визначення токсичності проводять у другий день. Перед використанням колонку ініціюють, пропускаючи через неї невеликі об'єми метанолу і чистої води відповідно до рекомендацій виробника.

Необхідність поєднання процедури ТФЕ-C₁₈ з фільтруванням зумовлена високою ймовірністю швидкого засмічення пор картриджів C₁₈ у випадку присутності у пробі завислих речовин. При роботі з поровими водами додаткове фільтрування не проводиться, оскільки методика їх отримання передбачає власне фільтрування або центрифугування, що унеможлиблює присутність завислих речовин. Також процедура дослідження порових вод з міркувань економії зразку не передбачає маніпуляцій зі зміною рН до 3 і 11.

У разі проведення дослідів за повною схемою більша частина попередньо профільтрованої аліквоти (200 см³) в перший же день підлягає процедурі ТФЕ-C₁₈ з наступним відновленням рН до початкового рівня. Отримані в результаті цього проби на другий день досліджують на

токсичність після коригування рН до величини рН вихідного зразка (за необхідності). Результати випробування токсичності проб після проведення процедури ТФЕ-С₁₈ порівнюються з базовим тестом.

«Холості» проби готуються з використанням середовища для розбавлення. Вони точно повторюють процедури, що виконуються у відповідних тестах.

Зауваження.

- Через особливості взаємодії між матрицею хімічних речовин зразка і твердою фазою С₁₈ та можливість прояву штучних токсичних ефектів при виконанні процедури, інтерпретація результатів цього тесту може бути дещо суб'єктивною. У рекомендаціях ЕРА зазначається, що якщо жодна з передбачених ПЕ-Фаза I маніпуляцій не зменшила токсичність вихідного зразка, або якщо зменшення токсичності спостерігали лише у варіанті з ТФЕ-С₁₈, доцільно виконати елюювання колонки 100 % метанолом або хлористим метиленом. Застосування відповідних методичних прийомів дозволяє вилучити з колонки сорбовані речовини у концентраціях, що перевищують такі у вихідному зразку у 200 разів. Після цього перевіряють токсичність розбавленого елюату у різних варіантах, які можуть підтвердити належність токсиканту до певного класу забруднювальних речовин.

- Під час тестування порових вод рекомендовано застосовувати подвійне центрифугування як альтернативу фільтрації, оскільки остання здатна призводити до істотного зменшення токсичності. Процедура передбачає початкове центрифугування зразка донних відкладів (10 тис g, 30 хв) та декантацію (відбір надосадового шару сифоном або піпеткою), а потім друге центрифугування для остаточного видалення залишкових часток.

- Колонка С₁₈ може діяти як фільтр або неспецифічний адсорбент для катіонних металів (купрум, плумбум тощо). З цієї причини усунення токсичності лише за допомогою ТФЕ не обов'язково вказує на наявність

токсичних органічних сполук. Важливим підтвердженням цього є супутнє відновлення токсичності у фракціях ТФЕ, через це рекомендовано включити випробування на токсичність елюатів до тестів ТІЕ-Фаза І.

4.1.6. Тест зі зміною рН та аерацією (pH Adjustment/Aeration Test)

Тест з аерацією призначений для перевірки того, що токсичність зразка викликана леткими, легкокорозчинними легкоокиснюваними речовинами. Маніпуляцію виконують на частині аліквот зі зміненим рН (3 та 11) та вихідній пробі. Результати тестів із токсичності цих трьох варіантів часто є показовими для подальшого виявлення чинників токсичності у ТІЕ-Фаза І, оскільки ряд токсичних сполук досить легко видаляються або окиснюються при певних величинах рН. Щоб відрізнити леткі сполуки від окислюваних, замість повітря для продування використовують азот. До виділення з водних проб шляхом аерації особливо схильні деякі поверхнево-активні речовини та високомолекулярні кислоти.

Процедура. Маніпуляцію проводять з частиною аліквот (35 см³), отриманих після процедур зі зміни рН до 3 і 11 (300 см³), а також з відповідною кількістю незміненого вихідного зразка у перший день ТІЕ-Фаза І. Для дослідження порових вод маніпуляції зі зміною рН не передбачено, тому проводять аерування безпосередньо вихідного зразка.

Проби переносять в циліндр об'ємом 50 см³. В процесі проведення процедури рівень рН може змінюватися, іноді досить швидко, тому під час барботації необхідно перевіряти рН та підтримувати його протягом усього періоду аерації. Чим вищий стовп води і дрібніші бульбашки, тим краще проходить процедура, проте вона має бути однаковою для всіх проб. Пробу потрібно аерувати помірно (приблизно 500 см³ повітря/хв) протягом 60 хв. Після цього рН кислої і лужної проби повертають до рівня вихідного зразка.

На другий день отримані проби досліджують на токсичність, перед цим за потреби коригують рН. «Холості» проби готують з використанням

середовища для розбавлення та повторюють процедури, які виконуються у відповідних тестах.

Якщо після проведення аерації спостерігається значне зниження токсичності проби у будь-яких (або всіх трьох) варіантах рН, для визначення причини такого ефекту повітря замінюють на азот. Якщо тести з повітрям та азотом покажуть однакові результати, видалення токсичних речовин відбувається, імовірно, внаслідок процесів барботації, а чинником токсичної дії є леткі сполуки.

Зауваження.

- Важливим летким токсикантом в порових водах є сірководень. При підозрі на токсичність сірководню ще однією маніпуляцією для підтвердження наявності його токсичності є дослід з градуйованим рівнем рН.

- Якщо зменшення, або повне усунення токсичності виявляється лише у тесті із застосуванням повітря, ймовірною причиною вважається окиснення. Однак, у зразках можуть міститись речовини, які реагують і на окиснення, і на барботацію. Для їхнього виявлення можуть знадобитися більш специфічні маніпуляції.

- Додатковим механізмом, за допомогою якого токсиканти можуть бути видалені зі зразка при проведенні аерації, є субляція (різновидність процесу флотації), що представляє собою концентрування сполук на поверхні бульбашок повітря з подальшим осадженням у вигляді твердої речовини на межі розділу «повітря-вода».

4.1.7. Тест на відновлення окиснювачів (Oxidant Reduction Test)

Цей тест дозволяє встановити присутність у зразку сполук, токсичність яких зменшується при додаванні натрію тіосульфату ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). При проведенні цієї маніпуляції нейтралізуються хімічні речовини, що використовуються для дезінфекції (хлор, діоксид хлору, озон тощо), речовини, що утворюються під час хлорування (такі як моно- та

дихлораміни), бром, йод, іони марганцю та деякі електрофільні органічні сполуки. Часто відновлена форма токсиканту має значно меншу токсичність.

Тест на відновлення окислювача виключений з переліку обов'язкових при проведенні ГІЕ-Фаза I для порових вод, оскільки окисно-відновні умови в природних донних відкладах роблять тривале існування окиснювачів малоімовірним.

Процедура. Максимальний об'єм зразка води для проведення цього тесту становить 100 см³. Точний об'єм залежатиме від величини ЛР₅₀²⁴ початкового тесту. Тест розпочинають на другий день.

Існує дві схеми додавання натрію тіосульфату при проведенні цього тесту: 1) градієнт концентрації тіосульфату створюється у кількох випробувальних ємностях, що містять однакову концентрацію зразка води, і 2) матриця концентрацій води і тіосульфату 3x3.

В разі градієнтного підходу найвища концентрація натрію тіосульфату розпочинається з величини ЛК₅₀ для виду тест-організмів, який використовується. Далі концентрація Na₂S₂O₃ зменшується в порядку 0,8, 0,6, 0,4 і 0,2 цієї величини. Розбавлення досліджуваної води в цьому тесті однакове, і має відповідати чотирикратному ЛР₅₀ вихідного зразка, або 100 % у разі його помірної токсичності. Для виконання тесту згідно матричною схемою готують три набори розбавлень досліджуваного зразка води (4x-, 2x- і 1xЛР₅₀) і додають кількість тіосульфату, що відповідає його 0,5x-, 0,25x- і 0,125xЛК₅₀ Na₂S₂O₃.

Величина ЛК₅₀²⁴ Na₂S₂O₃ для *Ceriodaphnia affinis* і *Daphnia magna* у воді різної жорсткості знаходиться в межах 1,3–6,4 г/дм³ і збільшується з її підвищенням (ЕРА 600/6-91-003).

Оскільки тіосульфат чинить певну токсичність відносно тест-об'єктів (зокрема, гіллястовусих ракоподібних), зниження токсичності зразку порівняно з “холостою” пробою (вода для розбавлення + тіосульфат) може свідчити про зв'язування реагенту з присутніми у пробі окиснювачами.

Зниження токсичності зразка води при додаванні натрію тіосульфату порівняно з базовим тестом свідчить про те, що тіосульфат або зменшив вміст токсиканту, або утворив із ним комплекс. Якщо варіант із найвищою концентрацією тіосульфату підвищує токсичність зразка, можна вважати, що сам тіосульфат чинить токсичний вплив.

Зауваження.

- Дослідження показали, що тіосульфат також може слугувати хелатним агентом для деяких катіонних металів. Тоді зниження токсичності зразків води може бути наслідком утворення комплексів металів з тіосульфат-аніоном. Для звуження кола речовин, причетних до токсичності зразка, може бути корисним порівняння результатів цього тесту із тестом з додаванням ЕДТА.

- Відсутність змін у токсичності зразка означає відсутність токсичної дії окиснювача, або додана кількість тіосульфату виявилася недостатньою. В цьому випадку треба розглянути необхідність повторення досліду, збільшивши концентрацію доданого тіосульфату.

4.1.8. Хелатний тест ЕДТА (EDTA Chelation Test)

Метою цього тесту є перевірка гіпотези про те, що токсичність зразка води спричинена певними катіонними металами. У процесі маніпуляції до аліквот зразка води додають градієнтні кількості ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота, динатрієва сіль).

ЕДТА є сильним хелатним агентом, і його додавання до водних розчинів утворює відносно нетоксичні комплекси з багатьма металами. Ефективність ЕДТА у зменшенні токсичності металу залежить від рН розчину, типу та виду металу, інших лігандів у розчині та ступеня спорідненості комплексу ЕДТА з певним металом порівняно зі спорідненістю металу до зв'язування з іншими речовинами та тканинами гідробіонтів.

Більшість позитивно заряджених іонів металів взаємодіють з ЕДТА, але двовалентні перехідні метали Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} і Mn^{2+} мають особливо високу спорідненість (Schubauer-Berigan 1993, Alves 2022).

Процедура. Об'єм зразка води у 100 см^3 зазвичай достатній для хелатного тесту ЕДТА. Тест розпочинають на другий день.

Підходи до проведення цієї маніпуляції ТПЕ-Фаза I схожі з тими, які описані у тесті на відновлення окиснювачів з додаванням тіосульфату натрію (градієнтна і матрична схеми). Величина ЛК_{50}^{24} ЕДТА для *Ceriodaphnia affinis* у воді різної жорсткості знаходиться в межах $0,03\text{--}0,44 \text{ г/дм}^3$ і збільшується з її підвищенням (ЕРА 600/6-91-003).

При проведенні тесту з додаванням ЕДТА необхідний певний час для утворення її комплексу з наявними у зразку іонами металів, тому цю процедуру рекомендовано виконувати першою серед інших процедур другого дня ТПЕ-Фази I, а тест на визначення токсичності цього зразка ставити останнім.

Зауваження.

- Виявлено, що ЕДТА не знижує токсичність аргентуму, селену (селеніт або селенат натрію), алюмінію ($\text{Al}(\text{OH})_4^-$), хрому (Cr^{3+} або дихромат калію) та арсену (арсеніт або арсенат натрію) при тестуванні на помірно жорсткій воді по відношенню до *Ceriodaphnia affinis*.

- Якщо додавання ЕДТА не призводить до зменшення токсичності у порівнянні з базовим випробуванням, ймовірність присутності катіонних металів, що спричиняють токсичність зразка води, є низькою. Проте порівняння отриманих у цьому тесті даних з тестом на додавання тіосульфату натрію може виявити необхідність проведення досліджень з додаванням більших концентрацій ЕДТА.

- Додавання ЕДТА до зразка може знижувати його рН. Якщо є підозра на присутність залежного від рН токсиканту (сірководень, аміак тощо), до інтерпретування результатів цього тесту слід ставитися обережно. Може знадобитися більш жорсткий контроль рН в експериментальних ємностях.

4.1.9. Тест з градуванням рН (Graduated pH Test)

Цей тест призначений для виявлення чинників токсичності, дія яких значно змінюється залежно від величини рН у діапазоні фізіологічної толерантності рН (рН 6–9). Дві форми таких сполук (іонізована та неіонізована) повинні демонструвати помітні відмінності в токсичності для тест-організмів.

Прикладом поширених іонізованих сполук, які зазвичай зустрічаються в міських і промислових стічних водах, є аміак, сірководень, ціанід і деякі органічні сполуки (наприклад, пентахлорфенол). Різниця в рН може також впливати на токсичність металів через зміни їхньої розчинності та переходу в інші хімічної форми.

Градуваний рН-тест вважається найбільш ефективним у виявленні токсичності, пов'язаної з аміаком і сірководнем, якщо вони є домінуючими токсикантами у порових водах.

У водних розчинах аміак поводить себе як основна сполука. Неіонізована форма (NH_3) є більш токсичною і переважає при рН вище 9,3, а іонізована нетоксична форма (NH_4^+) найбільш поширена при рН нижче 9,3 при 25 °С. У діапазоні рН 6,0–8,5 відсоток токсичної форми аміаку збільшується в 250 разів. Кінцевим результатом є підвищення токсичності зразку через зростання загального вмісту аміаку з підвищенням рН.

Якщо у зразку води присутні більше одного рН-залежного токсиканта, ефекти рН можуть виявляти як антагоністичну, так і синергічну взаємодію. Зокрема, сульфід водню (H_2S) часто міститься у стічних водах, і його токсичність можна виявити за допомогою градуованого рН-тесту. Розчинений сульфід існує у двох формах: H_2S та HS^- . Частка неіонізованої форми при рН 6 складає понад 90 %, тоді як при рН 7 – лише 50 %. При рН 8,5 менше ніж 5 % розчиненого сульфиду існує у вигляді неіонізованої форми. Оскільки H_2S є більш токсичною для гідробіонтів формою, можна очікувати збільшення токсичності за зниження рН розчину. При розгляді

подібних результатів доцільно їх порівнювати із проявами токсичності у тестах зі зміни рН/аерація.

Процедура. Необхідний об'єм зразка води залежить від обраного дизайну тесту (розмір ємностей, кількість розбавлень і токсичність зразка), однак 200 см³ в більшості випадків достатньо. Тест розпочинають на другий день.

Для регулювання рН в випробувальних ємностях існують кілька різних методів зі своїми перевагами і недоліками, найпоширеніших є три: 1) метод вуглекислого газу – через зміну концентрації CO₂ у повітряній фазі над випробувальними ємностями змінюється, що у свою чергу змінює рН проб; 2) метод нульового повітряного простору – для регулювання рН зразка використовується хлоридна кислота або гідроокис натрію, після чого випробувальна ємність герметизується, що допомагає підтримувати скоригований рН проби; 3) буферний метод – з використанням відносно нетоксичних буферних систем (MES-рН 6, MOPS-рН 7, POPSO-рН 8), що додаються до зразків води для підтримки необхідних рівнів рН. Для детальніших роз'яснень щодо використання цих методів рекомендуємо звернутись до керівного нормативного документу EPA/600/R-07/080.

Досвід роботи з природними прісноводними зразками свідчить про те, що після врівноваження і насичення киснем їхній рН часто досягає 8,2–8,5, тому у тестах з градуванням рН доцільно використовувати величини 6,5, 7,5 і 8,5.

Зауваження.

- Підкислення зразка може збільшити біодоступну частину металів, проте в деяких випадках (кадмій, купрум, цинк) прояву негативного впливу протидіє зниження токсичності металу зі зниженням рН середовища. Токсичність алюмінію при відхиленні рН від нейтрального зростає.

- Результати тесту з градуйованим рН рекомендується аналізувати в поєднанні з результатами тесту з додаванням ЕДТА. Правильність ідентифікації токсичності, яка викликається впливом певного металу,

значною мірою залежатиме від концентрації інших токсикантів у досліджуваному зразку, що залежать від рН.

- Важливіше забезпечити близькі величини рН у повторях, аніж точно встановити його на рівні 6,5, 7,5 і 8,5.

4.2. Рекомендації щодо ідентифікації класу забруднюючих речовин у донних відкладах

Необхідність виявлення чинників токсичності у донних відкладах зумовлена їхньою здатністю акумулювати токсиканти різної природи, зменшуючи вміст забруднювальних речовин у водній товщі, та перетворюватися на потенційне джерело вторинного забруднення води, що загрожує воді як ресурсу, а також гідробіонтам. Дослідження донних відкладів деяких водних об'єктів України виявили їхню токсичність за допомогою методів біотестування, при цьому у деяких випадках це підтверджувалось і негативними змінами структури бентосних угруповань (Burgess et al. 2011, Goncharova et al. 2020, Romanenko et al. 2010, Romanenko et al. 2011). Оцінка ризиків для водних екосистем, викликаних наявністю токсичного забруднення донних відкладів, а також прийняття адекватних управлінських рішень залежать від точного визначення чинника або чинників токсичності, що призводять до негативних змін.

Аналітичне визначення токсичних речовин шляхом хімічного скринінгу та виявлення вірогідних чинників токсичної дії у конкретному випадку через порівняння з певними граничними величинами їхнього вмісту у донних відкладах (див. наприклад ЕРА-600-R-02-011, ЕРА-600-R-02-013, ЕРА-600-R-02-016.) значно ускладнюється з різних причин. Серед них варто зазначити наступні: біодоступність присутніх токсичних речовин у донних відкладах залежить від фізико-хімічного складу останніх; токсичні речовини, що знаходяться у допорогових концентраціях, можуть чинити синергічну дію; вміст деяких забруднюючих речовин у донних відкладах певних водних об'єктів є зкорельованим, що може призводити до хибної

ідентифікації чинника токсичності; присутність у донних відкладах токсичних речовин, що не були визначені тощо. З метою подолання цих труднощів були розроблені методичні підходи до ідентифікації класу забруднюючих речовин у донних відкладах, що включають в себе як маніпуляції з цільними ДВ, так і поровими водами (ЕРА 600/R-07-080). За нашим переконанням, з цією метою можуть бути успішно використані також водні екстракти (витяжки) донних відкладів.

У цьому розділі особлива увага буде приділена опису маніпуляцій з цільними донними відкладами, що входять до проведення процедури ТІЕ-Фази І (рис. 4.3). Вони спрямовані на з'ясування загального «профілю» забруднюючих речовин донних відкладів, що чинять токсичну дію, з метою визначення їхнього класу або типу (наприклад, метали, неполярні органічні речовини, леткі речовини, аміак).

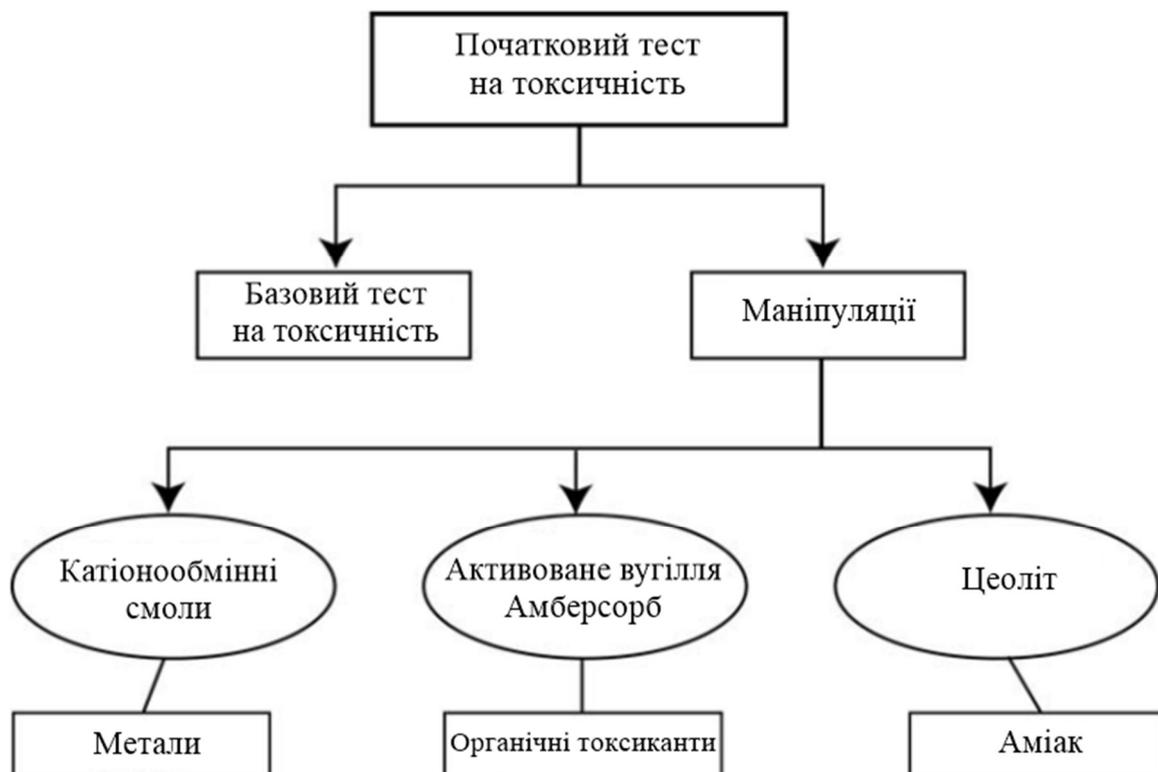


Рисунок 4.3 – Схема проведення ТІЕ-Фази І для цільних прісноводних донних відкладів (приведено за ЕРА/600/R-07/080)

Ускладнюючим чинником для проведення процедури ТІЕ з донними відкладами є наявність двох «тестових матриць», що відповідає двом фазам у дослідних ємностях – шару осаду і шару води. Така підвищена складність тестової системи з притаманним їй різноманіттям перебігу фізико-хімічних процесів вимагає застосування більшої кількості маніпуляцій, спрямованих на ідентифікацію однієї і тієї ж групи токсичних речовин, задля достовірного підтвердження певного чиннику токсичності.

4.2.1. Початковий тест на токсичність

Як і у випадку з проведенням процедури ТІЕ для стічних і поверхневих вод, початкові випробування на токсичність цільних донних відкладів виконуються для того, щоб визначити ступінь їхньої токсичності і необхідне розбавлення перед проведенням маніпуляцій ТІЕ-Фаза I. Ступінь розбавлення може розраховуватися і виражатися на основі сирової ваги донних відкладів, їхньої сухої ваги або об'єму, важливо, щоб обраний спосіб розрахунку використовувався протягом проведення всіх маніпуляцій ТІЕ-Фаза I.

Процедура. Випробування токсичності донних відкладів проводять у ряді розбавлень вихідного зразка, що відповідає його вмісту 100, 75 і 50 %. Також перевіряють токсичні властивості субстрату, який використовується для розбавлення донних відкладів. Для надзвичайно токсичних донних відкладів можуть бути необхідні більші розбавлення. Важливо зазначити, що хоча розбавлення токсичних зразків донних відкладів призводить до відповідного зменшення загальної початкової концентрації забруднюючих речовин, токсичність розбавленого зразка може змінюватися у іншій пропорції, залежно від складу донних відкладів та субстрату для розбавлення, оскільки біодоступність токсичних речовин контролюється багатьма чинниками. Це ставить певні вимоги до підбору субстрату для розбавлення. Рекомендовано використовувати для цього природні незабруднені донні відклади. Бажано, щоб їхні фізико-хімічні

характеристики були більш-менш подібні до досліджуваних донних відкладів, проте найважливіша властивість полягає у відсутності будь-якої негативної дії на досліджувані тест-організми. Це дозволяє багаторазово готувати зразки розбавлених донних відкладів, які би характеризувалися однаковою токсичністю.

На відміну від водних зразків, які досягають стабільного фізико-хімічного стану практично відразу після перемішування, донні відклади вимагають більш тривалого часу для відновлення рівноваги, тому ретельно перемішані зразки токсичних донних відкладів з субстратом для розбавлення мають бути витримані протягом певного часу (температура 4 °С, темрява, рекомендований мінімальний час – 7 діб). Витримання зразків розбавлених донних відкладів при низьких температурах сповільнює досягнення рівноваги, але важливе з огляду на необхідність уповільнення перебігу мікробіальних процесів, які можуть призводити до накопичення аміаку, сульфїду водню тощо.

Зауваження.

- Подальші маніпуляції ТІЕ-Фази I із донними відкладами з великими концентраціями токсичних речовин, що виходять за межі діапазону реагування відповідного методу і все ще викликають 100 % смертність тест-організмів, можуть призводити до помилкового висновку про неефективність маніпуляції та призводити до хибнонегативного висновку при ідентифікації певного класу хімічних речовин як чинника токсичності.

- Оптимальним при переході до виконання Фази I є таке розбавлення токсичних донних відкладів, яке все ще призводить до значної негативної дії на тест-організми (від 75 до 100 % смертності), оскільки забезпечує широкий діапазон відповіді при проведенні маніпуляції. У такому випадку слід приготувати достатній об'єм розбавлених і урівноважених донних відкладів для завершення всіх випробувань Фази I. Якщо досліджувані донні відклади не призводять до 100 % смертності тест-організмів, їх слід випробувати без розбавлення.

4.2.2. Тест на базову токсичність

Тести на базову токсичність мають обов'язково супроводжувати інші маніпуляції при проведенні ТІЕ-Фази І. Як і випадку зі зразками води, базовий тест повторюється у день проведення певних тестових процедур та у наступні дні, у разі продовження випробувань для спостережень за змінами токсичності у вихідному зразку з часом.

Процедура. Враховуючи труднощі, що супроводжують відбір, доставку і зберігання цільних донних відкладів, а також у зв'язку із значними часовими і трудомісткими витратами, базовий тест та всі інші маніпуляції з токсичними донними відкладами на Фазі І можуть бути виконані на одному розбавленні, визначеному за результатами проведення початкового тесту на токсичність.

Зауваження.

- Зміни або відсутність змін у відповіді організмів при проведенні базових тестів, порівняно з початковим тестом за того ж самого розбавлення донних відкладів, є важливим показником потенційної стабільності їхніх токсичних властивостей.

- Непостійність і невимірюваність показників токсичності у базовому тесті унеможлиблює проведення процедури ТІЕ, оскільки за таких умов важко оцінити вплив конкретних маніпуляцій на токсичність донних відкладів.

4.2.3. Тест на виявлення токсичної дії аміаку

Ідентифікація аміаку, як чинника токсичності в експериментах з цільними донними відкладами за допомогою маніпуляції з рН, у тест-системі призводить до складних і небажаних побічних ефектів, тому у подібних дослідженнях перевагу отримали методи адсорбції алюмосилікатними мінералами та поглинання рослинними організмами. На жаль, застосування останніх при проведенні цієї маніпуляції з

прісноводними цільними донними відкладами розроблено недостатньо і поки що не увійшло в практику виконання ТПЕ-Фаза I.

Цеоліт є природним матеріалом (гідратований алюмосилікатний мінерал, у якому оксид алюмінію та сіліцію утворюють відкриту тривимірну структуру з негативним зарядом), доступний у вигляді різних комерційних продуктів (SIR-600 (ResinTech Inc.), Clinoptilolite (Aquatic Eco-Systems) або аналогів, присутніх на ринку України). Для використання з цією метою бажана відносно дрібнозерниста форма, що має велику відносну площу поверхні і здатна добре розподілятися у зразках донних відкладів. Важливо попередньо переконатися, що використовуваний засіб з цеолітом у своєму складі не спричиняє токсичний вплив на тест-організми та ефективно адсорбує аміак.

Зниження токсичності донних відкладів після додавання цеоліту може свідчити про те, що саме аміак є чинником токсичності, оскільки цеоліт, як правило, має більшу спорідненість до йону амонію (NH_4^+), ніж до токсичних металів (Kesraoui-Ouki et al. 1994), не знижує токсичність забруднених кадмієм відкладень (Besser et al. 1998). За даними виробника SIR 600, його селективність знижується у такому порядку: $\text{Cs}^+ \gg \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Sr}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Підтвердженням токсичної дії аміаку може бути також більший прояв токсичності при використанні статичної схеми дослідів (без періодичної заміни верхнього шару води) порівняно з тими, де така заміна передбачена. Додаткову важливу інформацію можна отримати при визначенні концентрації аміаку безпосередньо у водній фазі.

Зауваження.

- Цеоліт не є високоселективним до аміаку (NH_3) і має певну спорідненість до деяких катіонних металів, зокрема, аргентуму, кадмію, цезію, купруму, нікелу, плюмбуму та цинку (Kesraoui-Ouki et al. 1994; Ouki et al. 1999) і полярних органічних забруднюючих речовин (Anderson 2000).

4.2.4. Тест на виявлення токсичної дії катіонних металів

Вважається, що токсичність катіонних металів у донних відкладах пов'язана з їхньою концентрацією у поровій воді (Di Toro et al. 1990). У безкисневих умовах у донних відкладах сульфіди є основною формою зв'язування таких металів як кадмій, купрум, нікель, плюмбум, цинк, аргентум та ін. Вони утворюють малорозчинні сполуки, які обмежують їхню присутність у порових водах. Органічний вуглець також здатний утворювати комплекси з катіонними металами як у кисневих, так і в безкисневих умовах; в кисневих умовах помітну роль відіграють також метали зі змінною валентністю (зокрема, залізо і марганець) (Tessier et al. 1993).

Беручи до уваги те, що токсичність металів в донних відкладах пов'язана переважно з їхньою концентрацією у водній фазі, методи ПІЕ для катіонних металів спрямовані на зменшення концентрації розчиненої форми металу в досліджуваній матриці. У методах, описаних при проведенні відповідної процедури для води, порових вод і водних витяжок, це досягається шляхом хелатування іонів металів за допомогою ЕДТА. Однак експерименти з цільними донними відкладами показали, що додавання ЕДТА не завжди дає стабільні результати. Натомість для донних відкладів розроблені методи, що використовують два альтернативні способи зниження концентрації токсичних металів у порових водах: додавання катіонообмінних смол, які адсорбують розчинені іони токсичних металів з водної фази та додавання сульфід-аніонів, які переводять іони металів в нерозчинні сульфідні солі.

Важливими перевагами використання спеціальних селективних катіонообмінних смол (смола SIR 300 або присутні на комерційному ринку України аналоги) є їхня відносно висока спорідненість до катіонів токсичних металів (купрум, кадмій, цинку, нікелю, плюмбуму тощо) і незначна токсичність для бентосних тест-організмів. Для контролю оцінюють токсичність використовуваних смол за смертністю тест-

організмів при проведенні цієї маніпуляції. Після проведення тесту на токсичність смола може бути механічно відсіяна від донних відкладів за допомогою сита з діаметром вічок 0,5 мм, а сорбовані на ній метали – елюйовані кислотою (наприклад, HCl) для подальшого хімічного аналізу.

Процедура. Перед примішуванням до токсичних прісноводних донних відкладів катіонообмінну смолу слід тричі промити у деіонізованій воді у об'ємному співвідношенні приблизно 1 : 4 шляхом ретельного перемішування і наступного декантування води. Далі декантовану смолу з'єднують з чотирма об'ємами солоної води (30 % натуральної морської води або відповідної концентрації хлориду натрію), змішують і зберігають у цьому розчині при температурі 4 °C у темряві.

Важливо, щоб смола зберігалась у цьому розчині не менше 24 год перед використанням, інакше під час проведення процедури ТІЕ може спостерігатися небажане зміщення рН водної фази у лужний бік. Після цього смола знову промивається деіонізованою водою для видалення зайвої солі. Смолу додають до донних відкладів у кількості 20 % у перерахунку на об'єм або сиру вагу (загальна вага складає 120 % від початкової ваги донних відкладів). Приготована суміш катіонообмінної смоли і донних відкладів врівноважується протягом принаймні 24 год перед додаванням тест-організмів. Як позитивний контроль використовують чисті донні відклади з додаванням смоли.

Зауваження.

- Зниження токсичності за рахунок додавання катіонообмінних смол у більшості випадків свідчить про токсичність, спричинену металами. Проте цей факт сам по собі не є переконливим доказом, оскільки селективні катіонообмінні смоли певним чином взаємодіють також з аміаком і з полярними органічними речовинами (Burgess et al. 2000). Як і при аналізі результатів, отриманих про проведенні більшості маніпуляцій, висновки стосовно впливу селективної катіонообмінної смоли на токсичність слід розглядати в контексті проведення всієї ТІЕ-Фаза I.

4.2.5. Тест на виявлення токсичної дії неполярних органічних сполук

В рамках проведення ПІЕ-Фаза I на цільних донних відкладах існує два підходи для характеризування токсичності, спричиненої досить великою групою хімічних речовин, віднесених до категорії неполярних органічних забруднюючих речовин, а саме: 1) додавання порошкоподібного активованого вугілля; 2) додавання вуглецевих смол (carbonaceous resins). Обидва методи мають спільний механізм дії, що полягає у зниженні токсичних властивостей органічних речовин у донних відкладах за допомогою їхньої сорбції і перерозподілу до твердої фази. Оскільки органічні токсиканти, особливо неполярні, досить міцно зв'язуються з органічним вуглецем донних відкладів, це дозволяє передбачити токсичність неполярних органічних речовин у донних відкладах виходячи з їхньої концентрації і константи розподілу між органічним вуглецем і водною фазою. Оскільки зв'язуюча здатність сорбентів пропорційна площі поверхні, тому малі розміри частинок повинні бути більш ефективними при сорбуванні органічних хімічних речовин.

Додавання порошкоподібного активованого вугілля і вуглецевих смол із відповідними сорбуючими властивостями (Ambersorb та аналоги присутні на комерційному ринку України) до донних відкладів, штучно забруднених мало- і неполярними органічними сполуками (ендосульфат, діельдрин, флуорантен, нонілфенол і тетрахлорбензол) показало високу ефективність зниження їх біодоступності та токсичності. Аналогічні результати були отримані у експериментах з природними донними відкладами (відібраними у польових умовах), забрудненими ДДТ, ПХБ і ПАВ (Anderson et al. 2006). Очікується, що додавання сорбуючих смол (Ambersorb та аналоги) буде знижувати біодоступність і токсичність тих же забруднювачів донних відкладів, що і додавання активованого вугілля. Однак, активоване вугілля потенційно впливає на більший спектр токсикантів.

Додавання активованого вугілля.

Ця маніпуляція зменшує токсичність широкого спектру органічних забруднюючих речовин за рахунок наявності в активованому вугіллі високоспоріднених до них ділянок зв'язування.

Процедура. Перед використанням порошкоподібне активоване вугілля розмішують у дистильованій воді і витримують приблизно 18 годин (зазвичай, до ранку наступного дня). Рекомендоване співвідношення активованого вугілля і води становить 1 : 2 за об'ємом або 2 : 3 за вагою. Після гідратації зайву воду видаляють за допомогою фільтрації (скловолокну) або центрифугування (200–250 g, 30 хв), залишкова вологість зазвичай становить близько 60 %. Гідратоване активоване вугілля до використання зберігають в холодильнику.

При проведенні субхронічних тестів (10 діб) з використанням прісноводних організмів (гамариди, личинки хірономід) додають 2 % дрібної або 5 % середньої фракції активованого вугілля (у перерахунку на сиру вагу). Суміш активованого вугілля та донних відкладів урівноважують принаймні протягом 24 год перед додаванням тест-організмів. Позитивний контроль готують з використанням чистих донних відкладів.

Зауваження.

- Хоча порошкоподібне активоване вугілля ефективно абсорбує широкий ряд токсичних органічних речовин, його додавання може знизити токсичність інших хімічних речовин (аміак, деякі метали).

- Для прісноводних тест-організмів (*H. azteca*, *C. dilutus* тощо) рекомендовані норми додавання активованого вугілля (2 % для дрібної та 5 % для середньої фракції) дуже близькі до концентрацій, які можуть чинити певну негативну дію. З цієї причини не можна нехтувати позитивним контролем, суть якого полягає у дослідженні впливу відповідної суміші активованого вугілля з чистими донними відкладами на тест-організми.

Додавання вуглецевих смол.

При розробці цього методу використовувалися такі смоли як Amborsorb 1500, 572 і 563 (Rohm і Haas). Інші вуглецеві смоли (присутні на комерційному ринку України) також можуть бути ефективними для проведення цієї маніпуляції ТЕ, але перед використанням слід визначити їхню ефективність щодо зв'язування органічних забруднювачів і токсичність для тест-організмів.

Процедура. Вуглецеві смоли можуть бути попередньо кондиціоновані дистильованою водою згідно з процедурою, описаною для активованого вугілля, проте експерименти з прісноводними тест-організмами не показали такої необхідності. Рекомендована наважка смоли становить 30 % (суха вага) від такої донних відкладів (сира вага). Приготована суміш смоли і донних відкладів врівноважується протягом 24 год перед додаванням тест-організмів. У випадку зберігання зразка в заповнених азотом ємностях, суміш може перебувати у холодильнику до 72 год. Як позитивний контроль використовують чисті донні відклади з відповідним додаванням смоли.

Зауваження.

- Здатність вуглецевих смол знижувати токсичність донних відкладів залежить не лише від того, які токсиканти в них присутні, але і від їхніх концентрацій. Вважається, що сорбційна ємність активованого вугілля більша, ніж у вуглецевих смол.

- За умов сильного забруднення донних відкладів високотоксичними органічними речовинами і перевантаження центрів зв'язування, ці сорбенти можуть виявитися неефективними для помітного зниження токсичності. Тому підбір правильного розбавлення токсичних донних відкладів у цьому випадку має важливе значення.

4.2.6. Тест на врахування розбавлення домішками

Концепція цього тесту полягає в додаванні відносно інертної речовини, яка забезпечує об'ємне розбавлення досліджуваних донних

відкладів без участі в сорбційних або обмінних процесах. Тест проводиться шляхом додавання піску або інших інертних матеріалів. Він відрізняється від початкового тесту на токсичність тим, що останній проводиться для визначення робочої концентрації токсичного осаду і розбавляється субстратом, що має подібні фізико-хімічні характеристики (вміст вуглецю, розмір часток тощо), але не має токсичних складових. Проте даний тест проводиться для визначення того, чи може суто збільшення об'єму зразку за рахунок додавання домішок, що використовуються в процесі виконання ТІЕ-Фаза I, впливати на результати тесту на токсичність.

Маніпуляції ТІЕ-Фаза I з токсичними донними відкладами передбачають додавання значної кількості домішок, що призводить до розбавлення досліджуваного зразку. Врахування розбавлення домішками є особливо важливим, якщо донні відклади демонструють помірну токсичність.

Процедура. Як субстрат для розбавлення в цьому тесті використовують чистий кварцовий пісок, або чистий пляжний пісок, який був попередньо прожарений протягом 6 годин при температурі 450 °С. Хоча вибір кількості піску для додавання є дещо довільним, рекомендована його масова частка становить 30 % (суха вага) від наважки донних відкладів (сиря вага), що близько або вище тієї частки домішок, які використовуються для більшості маніпуляцій Фази I.

Зауваження.

- Якщо цей тест демонструє зниження токсичності донних відкладів для тест-організмів, слід бути обережним при інтерпретації даних, отриманих за допомогою маніпуляцій з об'ємним додаванням домішок (тест з цеолітом, активованим вугіллям, вуглецевою смолою, тест на катіонний обмін).

5. СТАТИСТИЧНІ МЕТОДИ

Зручними критеріями оцінки токсичності матриць оточуючого середовища (вихідних та модифікованих) є показники LP_{50} та EK_{50} . EPA рекомендує для їхнього обрахунку відповідні статистичні підходи (Probit, Spearman-Kärber, Inhibition Concentration (IK_p , де p – інгібування у відсотках: смертність, зниження росту тощо)). Перетворення результатів точкових оцінок у одиниці токсичності (toxic units (TU): наприклад, $TU = 100/LK_{50}$ або $100/IK_p$) усуває обернену залежність між токсичністю та значеннями LK_{50} або EK_{50} , полегшуючи інтерпретацію ТІЕ (більшими величинам відповідає вища токсичність). Також, якщо відомі концентрації токсикантів для конкретного зразка, TU для окремих токсикантів можна порівняти з загальною величиною TU зразка. Сума TU окремих токсикантів має бути подібною до загальної TU зразка, припускаючи, що всі вони виміряні, біодоступні, та що їх токсичність є сумісною.

При аналізі результатів ТІЕ цільних донних відкладів на основі єдиної концентрації (тобто 100 % донних відкладів) рекомендується перевірка гіпотези за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA), щоб визначити, чи існують статистичні відмінності між дослідженими варіантами (наприклад, базовий тест, тест після додавання активованого кокосового вугілля, тест з додаванням катіонообмінної смоли та ін.). Якщо дисперсійний аналіз справді вказує на наявність статистичних відмінностей, рекомендовано використати тест множинного порівняння Даннетта (Dunnett's multiple comparison test), щоб визначити, чи існують відмінності між базовим тестом та іншими маніпуляціями. Цей тест показує чи маніпуляції ТІЕ змінили токсичність порівняно з базовим тестом із незмінним зразком. Також можливе використання інших тестів, які порівнюють середні величини та їхні дисперсії (Fisher's Least Significant Difference (LSD) Test та ін.) (EPA/821/R-02/012).

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ПОДАЛЬШІ ІДЕЇ

Аналіз світового та вітчизняного досвіду показує, що наявний науковий та технічний потенціал дозволяє розробити наукові основи та впровадити в Україні у практику комплексну процедуру ідентифікації забруднювальних речовин, що спричиняють токсичність води і донних відкладів.

Сучасні підходи пропонують широкий спектр методів, спрямованих на виявлення речовин різної хімічної природи і фізико-хімічних властивостей. Арсенал цих методів постійно доповнюється, а алгоритми їхнього поєднання вдосконалюються. Їхнє застосування в практиці вітчизняних скринінгових досліджень може бути надзвичайно перспективним для виявлення чинника токсичності у водних об'єктах, що потерпають внаслідок воєнних дій.

Оцінити комплексний вплив різноманітних забруднювальних речовин за рівнем токсичності дозволяє використання методології та методів біотестування. Головні переваги цього підходу полягають у його відносній простоті та доступності, порівняно високій швидкості виконання дослідження, відсутності потреби у вартісних устаткуванні та реактивах, високій чутливості коректно підібраних тест-організмів до мінімальних концентрацій токсичних агентів у водному середовищі.

Посилити інформативність біотестування може поєднання тестів на токсичність з певними процедурами обробки зразків води і донних відкладів, що призводять до зменшення біодоступності присутніх у сумішах оточуючого середовища забруднювачів токсичної дії. Виявилося, що цей підхід може бути ефективним скринінговим методом при виявленні чинника токсичності у водному середовищі.

Суть методу ТІЕ полягає у реєстрації відповіді тест-організмів при проведенні послідовної серії фізико-хімічних маніпуляцій з токсичним середовищем, що дозволяє ідентифікувати чинник або чинники токсичної дії.

На нашу думку, спрощення процедури оцінки ідентифікації токсичності можливе за умов щонайшвидшого виявлення феномену токсичності або його відсутності. Для цього можливе проведення експрес-тестів на виявлення впливу токсикантів на рухову активність гідробіонтів (Bownik et al. 2021).

За умови виявлення токсичності в початкових та базових тестах, у подальшому необхідно спрямовувати зусилля на найбільш ймовірні чинники формування токсичності води та донних відкладів. Відомо, що переважаючими токсикантами у прісноводних екосистемах є неіонні органічні сполуки та різні форми металів, зокрема їх іони. Відповідно, увагу варто зосередити (не нехтуючи усіма іншими процедурами) на дослідженнях токсичності при зміні рН вихідного зразка в кислий бік, після хелатування ЕДТА та твердофазної екстракції (матриця середовища – вода); додавання цеоліту та селективних сорбуючих вуглецевих смол (матриця середовища – донні відкладення). Ще одним з можливих елементів прискорення процедури виявлення токсичності може бути виконання деяких процедур на шляху від місця відбору зразків до лабораторії (аерація, фільтрація – для зразків води), або під час відбору зразків (фільтрація – зразки порових вод). Безумовно, пропонувані методичні підходи потребують подальшої перевірки та апробації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Білоус О.П., Незбрицька І.М., Ключенко П.Д., Кірпенко Н.І. Колекція культур мікроводоростей HPDR. Київ, 2018. 36 с.

Гончарова М.Т., Кіпніс Л.С., Коновець І.М., Крот Ю.Г. Оцінка токсичності донних відкладів прісноводних об'єктів за допомогою біотестування. Методичні рекомендації. Київ, 2019. 131 с.

Гребенюк Л.П. Сравнительная морфологическая характеристика личинок п'яти видов рода *Chironomus* группы «thummi» (Diptera, Chironomidae). Пресноводные беспозвоночные: биология, систематика, эволюция. *Труды ИБВВ*. 1993. Вып. 68, № 71. С. 147–161.

Дедю И.И. Амфиподы пресных и солоноватых вод Юго-Запада СССР. Кишинев: Штиинца, 1980. 224 с.

Догадина Т. В., Комаристая В. П., Горбулин О. С., Рудась А. Н. Общая и экспериментальная альгология. Харьков: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2013. 148 с.

ДСТУ 4166:2003. Випробовування за пригніченням росту прісноводних водоростей *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989, MOD).

ДСТУ 4174-2003. Якість води. Визначення сублетальної та хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 1076:2000, MOD).

ДСТУ EN ISO 5667-1:2022 Якість води. Відбирання проб. Частина 1. Настанови щодо розроблення програм і методів відбирання проб (EN ISO 5667-1:2022, IDT; ISO 5667-1:2020, IDT).

ДСТУ EN ISO 5667-6:2022 Якість води. Відбирання проб. Частина 6. Настанови щодо відбирання проб із річок і струмків (EN ISO 5667-6:2016, IDT; ISO 5667-6:2014, IDT).

ДСТУ ISO 10381-1:2004 Якість ґрунту. Відбирання проб. Частина 1. Настанови щодо складання програм відбирання проб (ISO 10381-1:2002, IDT).

ДСТУ ISO 5667-12-2001 Якість води. Відбирання проб. Частина 12. Настанови щодо відбирання проб донних відкладів (ISO 5667-12:1995, IDT).

Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / Арсан О.М. та ін.; за ред В.Д. Романенка. Київ: Логос, 2006. 408 с.

РД 118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды.

РД 211.1.7.049-96. Методичні вказівки по контролю токсичності промислових стічних вод на різних етапах технологічного процесу.

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. 30, № 4. С. 100–111.

Alves A.V., Ferraz M.A., Moreno B.B. et al. Microscale Toxicity Identification Evaluation (TIE) for interstitial water of estuarine sediments affected by multiple sources of pollution. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022. Vol. 29, № 7. P. 10122–10137.

Anderson M.A. Removal of MTBE and other organic contaminants from water by sorption to high silica zeolites. *Environ. Sci. Technol.* 2000. Vol. 34. P. 725–727.

Anderson B.S., Hunt J.W., Phillips B.M., Tjeerdema R.S. Navigating the TMDL Process: Sediment Toxicity. Alexandria, VA.: Water Environment Research Foundation (WERF). 2006. 02-WSM-2.

Ankley G.T., Burkhard L.P. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 1992. Vol. 11. P. 1235–1248.

ASTM E1706-19. Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. ASTM, International, West Conshohocken, PA, 2019.

ASTM E1706-05. Test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. ASTM, Philadelphia, PA, 2009.

Besser J.M., Ingersoll C.G., Leonard E.N., Mount D.R. Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: implications for toxicity

identification evaluation procedures. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998. Vol 17. P. 2310–2317.

Bownik A., Wlodkovic D. Advances in real-time monitoring of water quality using automated analysis of animal behaviour, *Sci. Total Environ.* 2021. Vol. 789. P.147796

Brack W., Ulrich N., Bataineh M. Separation techniques in effect-directed analysis. In: Brack, W. (eds) Effect-directed analysis of complex environmental contamination. The Handbook of environmental chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011. Vol 15. P. 83–118.

Burgess R.M., Cantwell M.G., Pelletier M.C., Ho K.T., Serbst J.R., Cook H.F., Kuhn A. Development of a toxicity identification evaluation (TIE) procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000. Vol. 19, № 4. P. 982–991.

Burgess R.M., Cantwell M.G., Pelletier M.C. et al. Development of a toxicity identification evaluation procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000. Vol. 19, № 4. P. 982–991.

Burgess R.M., Ho K.T., Tagliabue M.D., et al. Toxicity characterization of an industrial and a municipal effluent discharging to the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 1995. Vol. 30. P. 524–535.

Burgess R.M., Konovets I.M., Kipnis L.S. et. al. Distribution, magnitude and characterization of the toxicity of Ukrainian estuarine sediments. *Mar. Poll. Bull.* 2011. V. 62. P. 2442–2462.

Cărauşu S., Dobreanu E., Manolache C. Amphipoda forme salmastre și de apă dulce. Fauna Republ. pop. Romine, Crustacea 1955. Vol. 4. P. 1–407.

Copilaş-Ciocianu, D., Sidorov, D., Šidagytė-Copilas, E. Global distribution and diversity of alien Ponto-Caspian amphipods. *Biol. Invasions.* 2023. Vol. 25. P.179–195.

Di Toro D., Toro M.D., Mahony J.D., Hansen D.J., Scott K.J., Hicks M.B., Mayr S.M., Redmond M.S. Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.* 1990. Vol. 9. P. 1487–1502.

EPA 600/4-89/001. Short-term methods for estimation the Chronic Toxicity of effluents and receiving Waters to freshwater organisms. 1989. 356 p.

EPA 600/6-91-003. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I. Toxicity characterization procedures (second edition). 1991. 100 p.

EPA-600-R-02-011. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Metal Mixtures. 2005. 121 p.

EPA-600-R-02-013. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: PAH Mixtures. 2003. 176 p.

EPA-600-R-02-016. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Compendium of Tier 2 Values for Nonionic Organics. 2003. 75 p.

EPA 600/R-07-080. Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I, II, and III. Guidance Document. 2007. 145 p.

EPA 600/R-99/064. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, 2000. 192 p.

EPA 712-C-96-130. Ecological effects test guidelines OPPTS 850.1020. Gammarid acute toxicity test. 1996. 9 p.

EPA/821/R-02/012. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth edition. 2002. 275 p.

EPS 1/RM/11 Biological test method : Acute lethality test using *Daphnia* spp. Canada. 1990. 75p.

EPS 1/RM/21 Biological test method : Test of reproduction and survival using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Canada. 2007. 100 p.

EPS 1/RM/32. Biological test method: Test for survival and growth in sediment using larvae of freshwater midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Ottawa. 1997. 150 p.

EPS 1/RM/33. Biological test method – test for survival and growth in sediment and water using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Second edition. Ottawa. 2013. 184 p.

First Finding of the Amphipod *Echinogammarus ischnus* and the Mussel *Dreissena bugensis* in Lake Michigan / T. F. Nalepa et al. *J. Gt. Lakes Res.* 2001. Vol. 27, № 3. P. 384–391.

Goncharova M.T., Kipnis L.S., Konovets I.M., Nezbyrtytska I.M., Yarovy M.M. Ecological assessment of water and sediments quality of the Opechen Lakes System (Kyiv). *Hydrobiol. J.*, 2020, Vol. 4, N 56. P. 71–83.

Ho K., Burgess R., Pelletier M. et al. An overview of toxicant identification in sediments and dredged materials. *Mar. poll. bull.* 2002. Vol. 44. P. 286–293.

Ho K.T., Burgess R.M. What's causing toxicity in sediments? Results of 20 years of toxicity identification and evaluations. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013. Vol. 32, № 11. P. 2424–2432.

Ho K.T., Kuhn A., Pelletier M., McGee F., Burgess R.M., Serbst J. Sediment toxicity assessment: comparison of standard and new testing designs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000. Vol. 39, no. 4. P. 462–468.

Ian R. Walker, Scott A. Elias. Chironomid overview. Encyclopedia of quaternary science (Third edition), Elsevier, 2025, P. 409–417.

ISO 14371:2012. Water quality. Determination of fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). 2012. 16 p.

ISO 16303:2013. Water quality. Determination of toxicity of fresh water sediments using *Hyalella azteca*. 2013. 27 p.

Jazdzewski K. Range extensions of some Gammaridean species in European inland waters caused by human activity. *Crustaceana*, Suppl. 1980. № 6. P. 84–107.

Kesraoui-Ouki S., Cheeseman C.R., Perry R. Natural zeolite utilization in pollution control: A review of applications to metals' effluents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1994. Vol. 59. P. 121–126.

Kestrup A., Ricciardi A. Are interactions among Ponto-Caspian invaders driving amphipod species replacement in the St. Lawrence River?. *J. Great Lakes*. 2009. Vol. 35, № 3. P. 392–398.

Kley A., Maier G. Reproductive characteristics of invasive gammarids in the Rhine-Main-Danube catchment, South Germany. *Limnologica*. 2006. Vol. 36, № 2. P. 79–90.

Krisp H., Maier G. Consumption of macroinvertebrates by invasive and native gammarids: a comparison. *J. Limnol.* 2005. Vol. 64, no. 1. P. 55.

Lee R. E. Phycology. Cambridge University Press. 2018. 535 p.

Leontieva T.O., Krot Yu.G., Usenko O.M., Konovets I.M., Kipnis L.S., Krasnyuk Yu.M. Criteria for evaluation the production potential of green microalgae (Chlorophyta) for mass cultivation. *Hydrobiol. J.* 2024. Vol. 60, № 2. P. 57–65.

Naselli-Flores L., Barone R. Green Algae. *Encyclopedia of Inland Waters*. 2009. P. 166–173.

OECD, Test No. 218: Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, OECD Series on Testing and Assessment. 2018.

OECD, Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. 2011. 17 p.

Ouki S.K., Kavannagh M. Treatment of metal-contaminated wastewaters by use of natural zeolites. *Water Sci. Technol.* 1999. Vol. 39. P. 115–122.

Leliaert F., Smith D., Moreau H. et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2012. Vol. 31, №. 1. P. 1–46.

Ré A., Rodrigues A. M., Quintino V. Acute toxicity testing with the European estuarine amphipod *Corophium multisetosum*. *Hydrobiologia*. 2007. Vol. 587, № 1. P. 89–99.

Romanenko V.D., Goncharova M.T., Konovets I.M., Kipnis L.S., Krot Yu.G. Method of complex assessment of the bottom sediments toxicity using benthic and planktonic organisms. *Hydrobiol. J.* 2012. Vol. 48, no. 2. P. 30–39.

Romanenko V.D., Goncharova M. T. Larvae *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) as sensitive to copper test-object. *Hydrobiol. J.* 2011. Vol. 47, № 6. P. 99–103.

Romanenko V.D., Kipnis L.S., Goncharova M.T., Konovets I.M., Podrugina A.B. Toxicoresistance of invasive gammaridae (Crustacea: Amphipoda) of the littoral zone of the Dnieper reservoirs to the heavy metal ions. *Hydrobiol. J.* 2014. Vol. 50, № 2. P. 51–57.

Romanenko V.D., Lyashenko A.V., Afanasyev S.A., Konovets I.M., Kipnis L.S. et al. Comprehensive characteristics of bottom sediments of water bodies of various types in the Kiliya delta of the Danube river. *Hydrobiol. J.* 2011. Vol. 47, № 5. P. 3–20.

Romanenko V.D., Lyashenko A.V., Afanasyev S.A., Zorina-Sakharova Ye.Ye. Biological Indication of Ecological Status of the Water Bodies within Kiev City Boundaries. *Hydrobiol. J.* 2010. Vol. 46, № 4. P. 3–24.

Scarlett A., Rowland S.J., Canty M., Smith E.L., Galloway T.S. Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants using the amphipod *Corophium volutator*. *Mar. Environ. Res.* 2007. Vol. 63, № 5. P. 457–470.

Schubauer-Berigan M.K., Amato J.R., Baker S.E. et al. The behavior and identification of toxic metals in complex mixtures: examples from effluent and sediment pore water toxicity identification evaluations. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1993. Vol. 24. P. 298–306.

Tessier A., Couillard Y., Campbell P.G.C., Auclair J.C. Modeling Cd partitioning in toxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol. Oceanogr.* 1993. Vol. 38. P. 1–17.

Thompson C.F., Evenhuis N.L. Biosystematic database of world Diptera. Diptera data dissemination disk. 1999.

Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates. OCSPP 850.1735, OCSPP 850.1740.

