

УДК 574.64:[546.562:595.77]

В. Д. Романенко, М. Т. Гончарова, І. М. Коновець,
Л. С. Кіпніс

ВИБІРКОВІСТЬ МІНЕРАЛЬНИХ СУБСТРАТІВ ЛИЧИНКАМИ *CHIRONOMUS RIPARIUS*

Показано, що оптимальними для росту і розвитку личинок комарів-дзвінців *Chironomus riparius* є мулистий і дрібнопіщаний субстрати. Личинки здатні до вибору субстратів, віддаючи перевагу дрібнодисперсним і уникаючи крупнодисперсних, починаючи з середньопіщаної фракції. Вибір личинками субстрату обумовлений переважно не розміром його часток, а харчовими умовами.

Ключові слова: личинки *Chironomus riparius*, розвиток, розмір часток субстрату, вибірковість.

У зв'язку з ростом антропогенного навантаження на водні екосистеми усе частіше застосовуються біологічні методи діагностики їхнього стану, серед яких важливе місце посідають методи біотестування. Однією з переваг цієї групи методів є використання чутливих лабораторних культур гідробіонтів, що дозволяє стандартизувати умови проведення експериментів, підвищити вірогідність і відтворюваність результатів. Для оцінки токсичності донних відкладів — основного «депо» токсичних речовин у водоймі — найоптимальнішим є застосування бентосних і нектобентосних тест-організмів [11, 12], що мешкають у досліджуваному середовищі, що дозволяє врахувати всі шляхи надходження токсичних речовин до організму. Одними з найбільш перспективних для цього є комарі-дзвінці, представники роду *Chironomus*, *Chironomus tentans* та *Chironomus riparius (thummi)*, завдяки достатньо високій чутливості, можливості культивування у лабораторних умовах і короткому життєвому циклу [6, 10]. Враховуючи те, що личинки цих видів комарів-дзвінців є організмами інфауни, тобто субстратом, у якому вони мешкають, є донні відклади, для універсалізації методів біотестування важливим є встановлення їхньої толерантності до донних відкладів різного гранулометричного складу.

У природних умовах личинки *Ch. riparius* живуть у мулі і замуленому піску. Біля берегів водойм, де ґрунт зазвичай щільніший, личинки населяють його верхній мулистий шар товщиною 10 см. Зі збільшенням товщі м'якого мулу вони можуть проникати на глибину до 40 см [3]. Проте личинки комарів-дзвінців можуть жити і у досить тонкому шарі, достатньому для побу-

© В. Д. Романенко, М. Т. Гончарова, І. М. Коновець, Л. С. Кіпніс, 2017

дови домівок-трубок. За наявності їжі вони ростуть у цих умовах значно швидше, ніж у великій кількості сапропелю або торф'янистого мулу [10]. Вважається, що при культивуванні личинок роду *Chironomus* з метою отримання максимальної біомаси оптимальним є мулистий субстрат [1, 3], а для цілей біотестування — як мулистий, так і піщаний [15]. Проте при внесенні личинок *Chironomus dorsalis* у крупний пісок їх смертність на 15-й день досягала 88%, на легкому піску — 57, на піщанистому мулі — 23 і на тонкому мулі — 16% [3]. Також зазначено, що наявність грубих частинок ґрунту личинки цього виду переносять важко, особливо на ранніх стадіях розвитку, що пов'язано з характером їх живлення і руху.

Різна щільність заселення личинками комарів-дзвінців тих чи інших субстратів у природних умовах свідчить про їхню здатність до вибіркової. Явищу вибіркової у тваринних організмів присвячено низку фундаментальних робіт [13, 14], проте щодо личинок комарів-дзвінців напрацьовань вкрай мало [16, 17] і вони є суперечливими.

Метою цієї роботи було дослідження росту і розвитку личинок *Ch. riparius* на мінеральних субстратах з різним розміром часток, а також здатності цих організмів до вибору субстратів залежно від кормового навантаження.

Матеріал і методика досліджень. У дослідженнях використовували лабораторну культуру *Ch. riparius* біотехнологічного комплексу Інституту гідробіології НАН України. Для приготування субстратів були використані умовно чисті природні донні відклади, прожарені при температурі 600°C і розділені ситами на середньо-піщану (0,25—0,50 мм), дрібно-піщану (0,10—0,25 мм) та пило-мулову (< 0,1 мм) фракції [2]. Після цього субстрати різних фракцій були ретельно промиті і висушені при температурі 105°C.

Вирощування *Ch. riparius* на субстратах з різним розміром часток проводили у п'яти повторах у чашках Петрі, в які вносили по 100 личинок першої стадії. Експеримент проводили за температури 22°C. Корм Tetramin® вносили рівними порціями протягом всього експерименту з розрахунку 5 мг на одну личинку. Шар води над субстратом становив 2—3 мм. На 10-ту та 20-ту добу експерименту підраховували кількість личинок та їх вагу. Через 20 діб частину личинок переносили у спеціальні камери для вивчення вибіркової субстратів. У двох повторах личинок експонували ще 20 діб, реєстрували відсоток вильоту та стать імаго.

Експеримент з дослідження вибіркової личинками *Ch. riparius* субстратів з різним розміром часток проводили з використанням субстратів і личинок з попереднього дослідження. Для цього застосовували чашки Петрі діаметром 15 см, де субстрати розташовували у формі секторів круга. Для рівномірного заповнення секторів чашок субстратами у них вставляли радіальні перегородки. Сектори заповнювали субстратами з різним розміром часток у послідовності 0,25—0,50, 0,10—0,25, < 0,1, 0,25—0,50, 0,10—0,25 та < 0,1 мм, потім радіальні перегородки виймали і в центр камери вносили 20 личинок *Ch. riparius*. Через 48 годин у кожному секторі підраховували кількість тварин. Для цього дослідження використовували личинок, вирощених протягом 20 діб на двох крайніх за розмірними характеристиками

фракціях — середньо-піщаний (0,25—0,50 мм) і муловій (<0,1 мм). Експерименти виконували у трьох повторах за двома схемами — з внесенням корму (у кількості, описаній вище) і без.

Каталазну активність у субстратах визначали за рекомендаціями [5, 8, 9] титриметричним методом. Статистичну обробку результатів досліджень виконували згідно з [4].

Результати досліджень та їх обговорення

В експериментах по вирощуванню личинок *Ch. riparius* на субстратах з різним розміром часток за десять днів експозиції виявлено високі показники їх виживаності практично на всіх досліджуваних субстратах, що свідчить про високу толерантність личинок до цього чинника (таблиця). У той же час існує тенденція до зниження цих показників зі збільшенням розміру часток субстрату.

За 20 днів експозиції різниця у виживаності личинок у найменшій та найкрупнішій фракціях була незначною і складала близько 14%, а проте різниця біомаси становила 27%. Суттєво відрізнялась також частка вильоту імаго на 40-у добу (20%). Серед імаго, що вилетіли з дрібнопіщаного і мулистого субстрату, переважали самиці, частка яких складала близько 60%. Такий розподіл є близьким до того, що спостерігається у природних умовах [3, 10]. При вирощуванні личинок на найкрупнішому субстраті (0,25—0,50 мм) спостерігались зміни у статевій структурі у бік переважання самців.

Таким чином, оптимальними для росту і розвитку личинок *Ch. riparius* є мулистий і дрібнопіщаний субстрати з розміром часток відповідно < 0,1 мм та 0,10—0,25 мм, найбільшої біомаси личинки досягали при вирощуванні на мулистому субстраті. Однак слід зазначити, що даний вид виявився досить толерантним до різних типів мінеральних субстратів, принаймні за 10 днів ек-

Вплив розміру часток субстрату на ріст і розвиток *Chironomus riparius*, $\bar{X} \pm \sigma$, $n = 100—200$

Характеристика субстрату (розмір часток, мм)	Тривалість вирощування, днів					
	10		20		40	
	Виживання личинок, %	Вага личинки, мг	Виживання личинок, %	Вага личинки, мг	Виліт імаго, %	Частка самиць серед імаго, %
Середньопіщаний (0,25—0,50)	87,5 ± 6,4	5,5 ± 1,8	77,5 ± 4,2*	7,8 ± 0,3*	70,6 ± 2,4*	43,3 ± 3,5*
Дрібнопіщаний (0,10—0,25)	94,5 ± 0,7	5,9 ± 1,2	85,4 ± 6,2	8,5 ± 0,2	82,7 ± 3,4	63,2 ± 2,5
Мулистий (< 0,1)	96,5 ± 2,1	6,2 ± 0,7	90,6 ± 6,7	8,9 ± 0,3	88,6 ± 4,2	57,8 ± 3,6

* Різниця середніх значень відносно дослідів з використанням мулистого субстрату статистично вірогідна, $p \leq 0,05$.

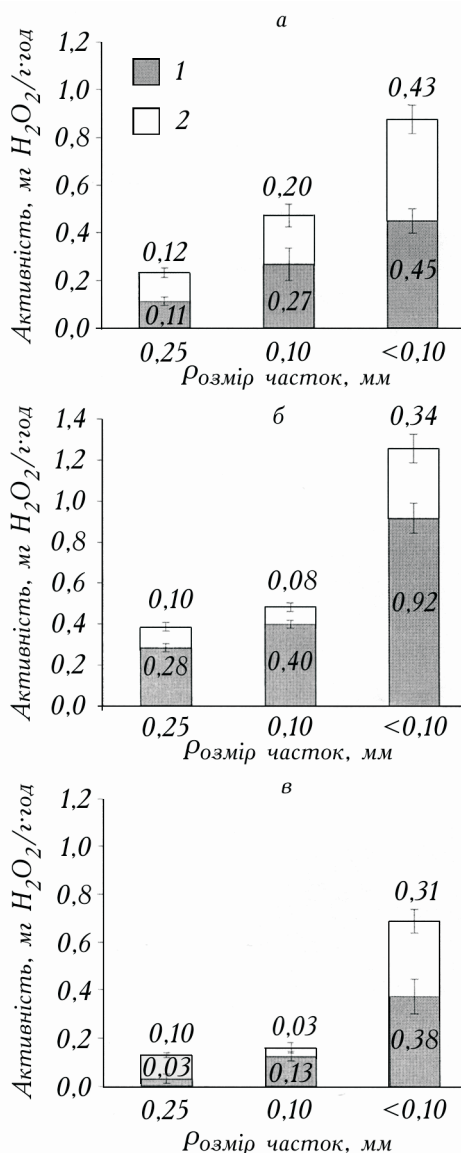
спозиції вірогідної різниці показників виживаності не виявлено, що має велике практичне значення з точки зору використання цього виду як тест-об'єкту у токсикологічних дослідженнях.

Для дослідження вибіркості було поставлено експерименти з субстратами, в яких були сформовані різні харчові умови за рахунок додавання корму. Харчові умови характеризували за значенням ферментативної каталазної активності, оскільки вона відображає процес деструкції органічних речовин та корелює з кількістю бактеріальних клітин [7].

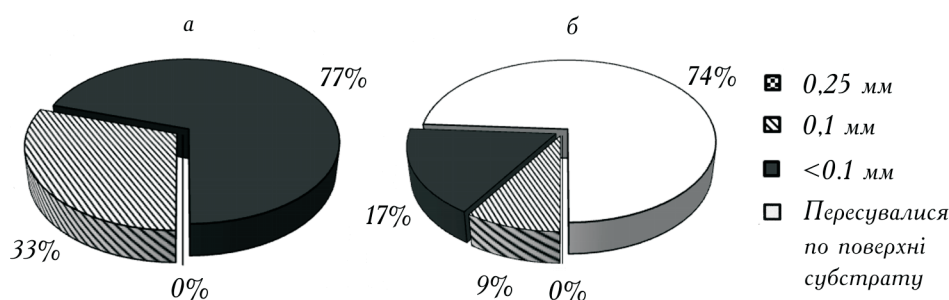
На рисунку 1, а наведено значення каталазної активності у субстратах, з яких личинки були перенесені у дослід з вивчення вибіркості. Ці ж субстрати були використані на початку цього дослідження. Значення показника через 48 год в експериментах з внесенням корму та без нього наведені на рис. 1, б і в.

Каталазна активність у різних субстратах на початковій стадії дослідження істотно розрізнялась, ферментативна складова у двох крайніх за розміром фракціях відрізнялась майже у чотири рази — відповідно 0,11 та 0,45 мг H_2O_2 /г·год. Ймовірно, це можна пояснити фізичними властивостями мінералів, що складають ці фракції. Навіть за умови однакового внесення корму у субстрати з різним розміром часток, для пило-мулової (дрібнодисперсної) фракції характерна більша заселеність мікроорганізмами через більшу поверхню та кращі сорбційні властивості.

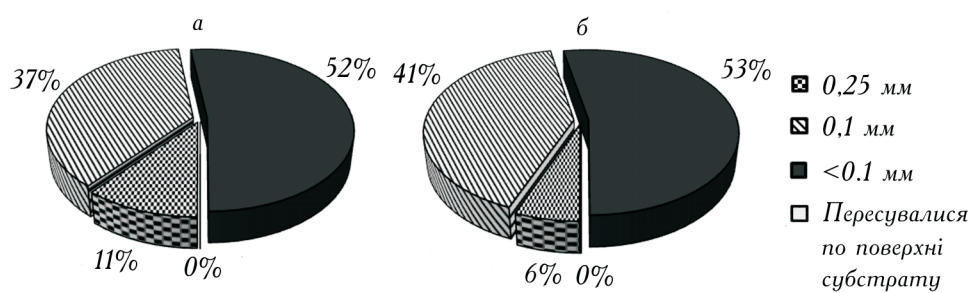
У субстратах в експерименті без внесення корму за 48 год значення ферментативної каталазної активності знизилось на 16—73%, у той час як додавання корму збільшило цей показник у 1,5—2,5 рази у порівнянні з початковими умовами.



1. Хімічна (1) та ферментативна (2) каталазна активність у субстратах з різним розміром часток: початкові умови, з яких були перенесені личинки (а); через 48 год з додаванням корму (б); через 48 год без додавання корму (в); ($\pm \sigma$, $n = 3$).



2. Вибір личинками *Chironomus riparius* субстратів з різним розміром часток в експерименті без внесення корму. Тут і на рис. 3: личинки, вирощені на середньопіщаному субстраті 0,25—0,50 мм, (а); личинки, вирощені на мулистому субстраті <math><0,1\text{ мм}</math>, (б).



3. Вибір личинками *Chironomus riparius* субстратів з різним розміром часток в експерименті з внесенням корму.

Просторова агрегація личинок *Ch. riparius* після 48 год експерименту свідчить про те, що вони здатні до вибору субстратів (рис. 2, 3).

В експерименті без корму (див. рис. 2, а) личинки, перенесені з середньопіщаного субстрату з низькою ферментативною каталазною активністю, через 48 год знаходились у двох найдрібніших фракціях (77 та 33%), в яких цей показник був вищим, ніж в умовах вирощування. В експерименті з кормом ці личинки віддавали перевагу тим же фракціям (в мулистій знаходилось 52, а у дрібнопіщаній — 37% личинок), проте 11% організмів знаходились ще і в середньопіщаній фракції (див. рис. 3, а), каталазна активність в якій була також вищою у порівнянні з умовами вирощування.

Таким чином, при виборі личинками субстратів важливе значення мали харчові умови, до яких тварини були адаптовані протягом попередніх 20 діб. Цей висновок підтверджується і при аналізі розподілу личинок *Ch. riparius*, вирощених на мулистому субстраті з високою каталазною активністю (0,45 мг $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}\cdot\text{год}$). В експерименті з додаванням корму 94% личинок майже порівну знаходились у найдрібніших фракціях, уникаючи середньопіщаної (див. рис. 3, б). Проте в експерименті без корму вони у переважній більшості (74%) пересувались поверхнею субстратів і не віддавали перевагу жодному з запропонованих варіантів, а решта личинок знаходились у двох

найдрібніших фракціях (див. рис. 2, б). У збіднених харчових умовах личинки залишають укриття і здійснюють активний пошук їжі на поверхні субстрату, хоча зазвичай личинки *Ch. riparius* є факультативними седиментаторами і за нормальних харчових умов вони заглиблюються у субстрат і будують за допомогою секрету слинних залоз і часток субстрату домівки, які застосовують для седиментації зважених органічних часток [3].

Отримані результати свідчать про здатність активного вибору субстрату личинками *Ch. riparius*, при цьому вони віддавали перевагу не стільки розміру часток субстрату, скільки харчовим умовам. За нестачі корму вони знаходились у найдрібнішій фракції, за його оптимальної кількості — майже рівномірно розподілялись між всіма фракціями, окрім найкрупнішої, в якій знаходилось близько 10% личинок.

Висновки

Оптимальним для росту і розвитку личинок *Ch. riparius* у штучних умовах є мулистий субстрат з розміром часток менше 0,1 мм, а також дрібнопіщаний з розміром часток 0,25—0,1 мм, про що свідчать показники виживаності і біомаси личинок, а також відсоток вильоту та зміни співвідношення статей у статевій структурі імаго. При вирощуванні личинок з метою отримання максимальної біомаси найбільш оптимальним є мулистий субстрат.

Розвиток личинок *Ch. riparius* на різних за гранулометричним складом субстратах протягом десяти діб експерименту за показниками виживання личинок статистично вірогідно не відрізняється. Це свідчить про можливість застосування даного виду для біотестування донних відкладів з різним гранулометричним складом, проте тривалість досліджень слід обмежувати десятьма добами.

Личинки *Ch. riparius* здатні до вибору субстрату. Цей вибір більшою мірою обумовлений не гранулометричним складом, а харчовими умовами. За відсутності корму личинки вибирають найдрібніший субстрат або пересуваються поверхнею, при його достатній кількості — майже рівномірно розподіляються між всіма субстратами, окрім найкрупнішого (0,25—0,50 мм).

**

*Показано, что оптимальным для роста и развития личинок комаров-звонцов *Chironomus riparius* являются илистый и мелкопесчаный субстраты. Личинки обладают избирательностью субстратов и отдают предпочтение мелкодисперсным фракциям, избегая крупнодисперсных, начиная со среднеспесчаной. Однако выбор личинками субстрата обусловлен преимущественно не его гранулометрическим составом, а пищевыми условиями.*

**

*It was shown that the optimal substrates for growth and development of the midges *Chironomus riparius* larvae are silty and fine sandy. The larvae are capable of substrate selection and prefer fine fractions, avoiding larger-medium sandy, but substrate preference of larvae is determined rather by food conditions than particle size.*

**

1. *Ивлева И.В.* Биологические основы и методы культивирования кормовых беспозвоночных. — М.: Наука, 1969. — С. 151—169.
2. *Качинский Н.А.* Физика почвы. — М.: Высш. шк., 1965. — 323 с.
3. *Константинов А.С.* Биология хирономид и их разведение. — Саратов, 1958. — 361 с.
4. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1973. — 343 с.
5. *Петерсон Н.В., Курьяк Е.К., Франчук Е.К.* Определение активности каталазы почв // Микробиол. журн. — 1984. — Т. 46, № 2. — С. 85—87.
6. *Романенко В.Д., Гончарова М.Т.* Личинки *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) як чутливий до міді тест-об'єкт // Гидробиол. журн. — 2011. — Т. 47, № 4. — С. 107—111.
7. *Старосила Е.В.* Деструкция органического вещества и каталазная активность в донных отложениях прудов с экстремальной нагрузкой аллохтонным азотом // Там же. — 2005. — Т. 44, № 4. — С. 67—78.
8. *Тимофеева С.С.* Активность окислительных ферментов как биотест для оценки токсичности природных и сточных вод. — Л.: Гидрометеоиздат, 1987. — Вып. I. — С. 76—84.
9. *Тимофеева С.С., Беспалова В.З., Черемных Н.В.* Использование окислительно-восстановительных ферментов в биоиндикации загрязнений: Тез. докл. 5-й Всесоюз. конф. по вод. токсикологии. — М., 1988. — С. 76—77.
10. *Armitage P., Cranston P., Pinder L.* The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges. — London: Chapman and Hall, 1995. — 572 p.
11. *Biological test method: Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius).* — Ottawa, 1997. — 125 p.
12. *Hill I., Matthiessen P., Heimbach F.* Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. SETAC-Europe, 1993. — 105 p.
13. *Manly B.F.J., McDonald L.L., Thomas D.L.* Resource selection by animals: statistical design and analysis for field studies. — London: Chapman and Hall, 1993. — 511 p.
14. *Olabarria C., Underwood A.J., Chapman M.G.* Appropriate experimental design to evaluate preferences for microhabitat: an example of preferences by species of microgastropods // Oecologia. — 2002. — Vol. 132. — P. 159—166.
15. *Ristola T., Pellinen J., Ruokolainen M. et al.* Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*) // Environmental toxicology and chemistry. — 1999. — Vol. 18. — P. 756—764.
16. *Sibley P.K., Benoit D.A., Ankley G.T.* Life cycle and behavioural assessments of the influence of substrate particle size on *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in laboratory assays // Hydrobiologia. — 1998. — 361. — P. 1—9.
17. *Vos J.H., Teunissen M., Postma J.F. et al.* Particle size effect on preferential settlement and growth rate of detritivorous chironomid larvae as influenced by food level // Arch. Hydrobiol. — 2002. — Vol. 154, N 1. — P. 103—119.