

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЯ СРЕДЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЧКОВ  
*DAPHNIA MAGNA* К ТОКСИКАНТАМ**

**Т.Л. Шашкова,  
Ю.С. Григорьев, О.А. Березина\***

*Исследована зависимость выживаемости рачков *Daphnia magna* от условий проведения токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами. Показано, что токсический эффект этих веществ усиливается при улучшении условий аэрации среды, уменьшении плотности посадки рачков и снижении связующей способности культивационной воды.*

Методы биотестирования при определении острого токсического воздействия на низших ракообразных широко применяются для экологического контроля как в России, так и за рубежом [5, 7, 8, 10, 13]. Наиболее часто используемым тест-организмом являются рачки *Daphnia magna*, токсическое воздействие на которых оценивается по показателю их выживаемости или смертности в тестируемой воде [4, 6]. Среди достоинств этих методов можно указать на простоту выращивания тест-культуры рачков и выполнение токсикологиче-

---

\* © Т.Л. Шашкова, Ю.С. Григорьев, О.А. Березина, Красноярский государственный университет, 2006.

ского анализа. Показатель выживаемости рачков дает относительно стабильную и интегральную оценку качества водной среды [1, 9].

Вместе с тем, для реализации этих методов необходимо выполнить определенные требования по содержанию кислорода в тестируемой среде, а также создать равные световые и температурные условия для всех тестируемых проб. Данные требования обусловлены тем, что эти факторы могут повлиять на результаты токсикологического анализа. По данным ряда исследований [1, 8, 11, 12], дефицит кислорода и экстремальные температуры могут быть сами причиной гибели тест-организмов. На практике стандартные условия проведения токсикологических экспериментов сложно осуществить из-за отсутствия серийно выпускаемого технологического оборудования, что затрудняет получение достоверных результатов.

Для решения данной проблемы на кафедре экотоксикологии и микробиологии КрасГУ разработаны устройство УЭР-03 и климатостат Р2 для экспонирования рачковых тест-организмов во время биотестирования. Первое обеспечивает активный газообмен между воздушной и водной средами, а также равные световые и температурные условия для всех анализируемых проб. Это происходит благодаря тому, что емкости с водой и тест-организмами устанавливаются в наклонном положении во вращающуюся кассету данного устройства. Само устройство помещается в климатостат, в котором поддерживается постоянная температура и необходимый световой режим.

С целью определения возможности выполнения рачкового биотеста на этом оборудовании был исследован характер влияния особенностей содержания в нем тест-организмов на их чувствительность к токсикантам.

В качестве тест-объекта использовали ветвистоусых рачков вида *Daphnia magna straus*. Синхронизированное выращивание культуры рачков проводили согласно методике [4]. Кормление тест-организмов при выращивании и в эксперименте осуществляли суспензией водоросли *Chlorella vulgaris*. Биотестирование проводили по следующей методике. В специальные пробирки емкостью 100 см<sup>3</sup> наливали по 50 см<sup>3</sup> тестируемого раствора. В качестве контрольной воды использовали отстоянную водопроводную воду. В каждую пробирку помещали рачков дафний в возрасте 6-24 часа. Пробирки в количестве до 18 шт. устанавливали наклонно во вращающуюся кассету устройства УЭР-03 для экспонирования рачков. Устройства помещали в климатостат Р2, в котором поддерживалась температура 20±1 °С. Световое облучение создавалось встроенными люминесцентными лампами дневного света на уровне 500 – 1000 люкс с фотопериодом 12 часов день и 12 часов ночь. Токсический эффект определялся по показателю смертности тест-организмов в конце требуемого времени экспозиции в тестируемой воде.

Главной особенностью содержания рачков в наших условиях было непрерывное вращение тест-культуры во время экспонирования. Поэтому в первую очередь было изучено влияние скорости вращения кассеты устройства УЭР-03 на выживаемость тест-организмов. Исследования показали, что рачки дафний при плотности посадки до 10 особей в 50 мл культивационной воды в присутствии небольшого количества водоросли хлореллы сохраняли свою жизнеспособность в течение 96 часов при варьировании скорости вращения в диапазоне 5 - 15 оборотов в минуту. При этом рачки в этих условиях активно питались, полностью поглощая к концу экспозиции все внесенные клетки водоросли. Таким образом, фактор вращения не оказывает существенного стресс-воздействия на рачков дафний.

В то же время при экспонировании проб с тест-организмами в УЭР-03 повышалась их чувствительность к токсикантам, вероятно, из-за большей активности рачков в хорошо аэрируемых пробах (рис.1). Так, в вариантах без вращения выживаемость на уровне 50 % (LC<sub>50</sub>) наблюдалась при концентрации бихромата калия 1,5 мг/л, а при вращении пробирок значение LC<sub>50</sub> смещается в сторону меньшей концентрации этого токсиканта. Из этого следует, что вращение проб воды с тест-организмами при их экспонировании не только обеспечивает 100 %-ю выживаемость в контроле, но и повышает чувствительность биотеста к загрязняющим веществам.

Благодаря созданию активного газообмена и устранению часто возникающей проблемы недостатка кислорода в среде становится возможным использовать большее число особей в единице объема, что необходимо для повышения достоверности получаемых результатов. Однако увеличение плотности посадки оправдано только до определенных пределов, поскольку при большом количестве особей во флаконе на каждого рачка приходится меньшее количество токсиканта, что может снижать чувствительность биотеста. Справедливость данного предположения была подтверждена проведенными экспериментами, результаты которых представлены в табл. 1. Полученные данные убедительно свидетельствуют, что при увеличении числа тест-организмов на единицу объема выживаемость рачков возрастает, а смертность как показатель токсичности снижается. При этом близкие значения выживаемости рачков наблюдаются в вариантах опыта, в которых 3-кратному повышению концентрации токсиканта соответствует 3-кратное увеличение плотности посадки. Этот факт указывает на то, что в определенных условиях концентрация токсиканта и плотности посадки рачков могут рассматриваться как взаимозаменяемые факторы при установлении дозы токсического воздействия на данные тест-организмы. С учетом этих обстоятельств была принята как оптимальная плотность посадки 10 рачков на 50 см<sup>3</sup> тестируемой воды.

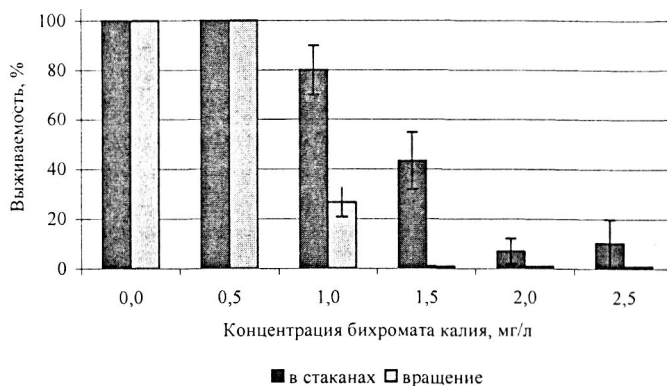


Рис. 1. Влияние бихромата калия на выживаемость дафний в неподвижно установленных стаканах и пробирках, помещенных в УЭР-03. Объем среды – 50 мл, количество рачков – по 10 шт.

Таблица 1

Влияние плотности посадки на выживаемость дафний (в %) в среде с различными концентрациями модельного токсиканта. Объем среды – 50 мл

Количество посаженных особей, шт.	Концентрация бихромата калия, мг/л		
	0,9	0,3	0,1
2	6,2	31,2	75,0
6	25,0	50,0	88,8
18	55,5	72,2	100

Кроме плотности посадки на чувствительность биотеста может оказывать влияние наличие в исследуемых растворах клеток водоросли, которые поглощают часть токсиканта из среды и делают его недоступным для рачков [2]. Проведенные исследования показали (рис. 2), что добавление хлореллы, необходимой для обеспечения жизнедеятельности рачков в ходе 96-часового эксперимента, существенно снижает чувствительность тест-организмов к токсиканту. Смертность рачков на уровне 50 % при концентрации ионов меди 0,025 мг/л в варианте без водоросли отмечается к 48-му часу экспозиции, в то время как в присутствии хлореллы этот эффект достигается только через 96 часов эксперимента. При этом в обоих случаях выживаемость рачков в контроле сохраняется на уровне 100 %. Подобный эффект наблюдался и в опытах с другими токсикантами ( $CdSO_4 \times 5H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 7H_2O$ ).

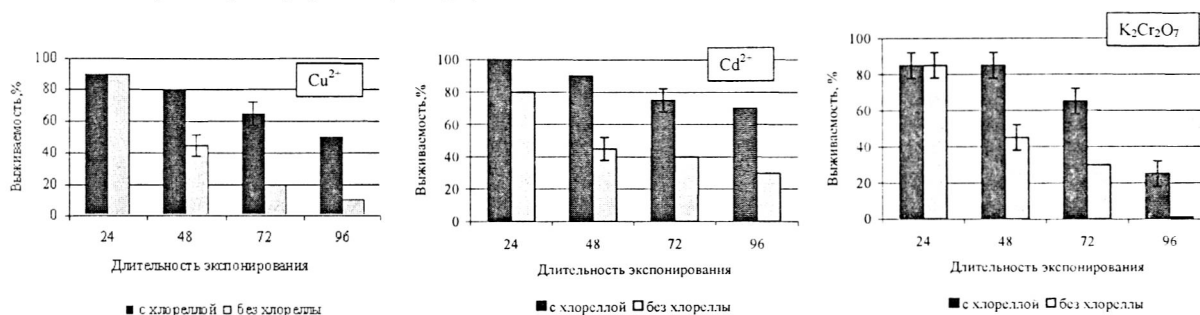


Рис. 2. Выживаемость дафний в среде с тяжелыми металлами в присутствии и отсутствие клеток водоросли хлореллы. Начальная оптическая плотность суспензии хлореллы в среде составляла 0,02 (кювета 1 см, длина волны 670 нм)

Таким образом, не вводя в тест-культуру рачков суспензию клеток водоросли, можно сократить время проведения биотестирования в 2 раза, не уменьшая при этом чувствительности метода к загрязнителям. Сокращение времени проведения эксперимента позволяет не только повысить оперативность метода, но и получить более корректный результат, благодаря снижению возможности изменения свойств исследуемой воды в период анализа ее токсических свойств [5].

Известно, что чувствительность дафний к токсическим веществам зависит от состава культивационной (разбавляющей) воды [11, 12]. В качестве таковой в России обычно рекомендуется использовать отстоянную водопроводную воду [4, 6]. Вместе с тем хорошо известно, что ее химический состав сильно варьирует в разных городах и даже в пределах одного города. В результате этого чувствительность биотеста может ока-

заться различной в воде из разных районов (городов). С этой целью нами были проведены токсикологические эксперименты с использованием водопроводной воды, взятой из разных районов города Красноярска (рис. 3). Для оценки различий ее качественного состава в каждую пробу был добавлен бихромат калия в концентрации 1 мг/л. Оказалось, что действие этого токсиканта в водах из разных районов города существенно различается. Наименьший эффект бихромат калия оказывал в водопроводной воде из Советского района, снабжаемого из инфильтрационного водозабора, а наибольший - в воде из поверхностного водозабора на р.Енисей (район КрасГУ). Это явление обусловлено тем, что природные воды содержат разнообразные вещества, способные образовывать комплексы тяжелыми металлами, в составе которых они становятся недоступными для тест-организмов. Проблема связывания токсикантов в зарубежных методиках решается путем использования искусственной солевой среды для выращивания и проведения биотестирования на рачках [13]. Однако применение такой среды требует дополнительных затрат на ее приготовление и длительной адаптации к ней культуры рачков.

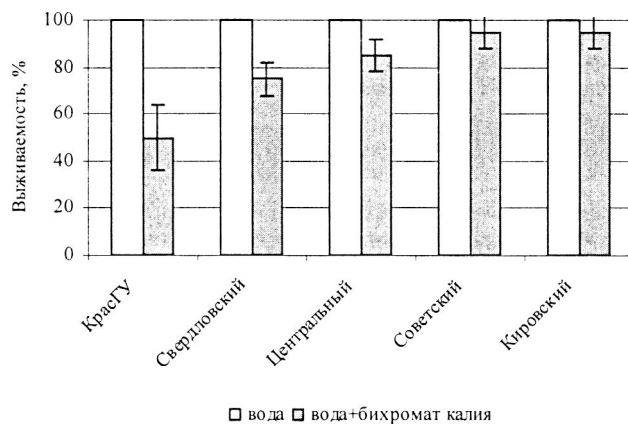


Рис. 3. Выживаемость рачков дафний в водопроводной воде, взятой из разных районов города Красноярска, до и после добавления бихромата калия (1 мг/л)

Для корректировки состава культивационной (разбавляющей) воды нами был опробован более простой способ. С целью уменьшения связывающей способности водопроводной воды она разбавляется дистиллированной водой до уровня, при котором сохраняется 100 %-я выживаемость дафний в контрольном варианте, а чувствительность к модельному токсиканту будет соответствовать установленной норме. Экспериментальная проверка показала (рис. 4), что в исходной водопроводной воде из артезианской скважины бихромат калия в концентрации 1 мг/л не оказывает какого-либо токсического эффекта на рачков дафний. При разбавлении этой воды дистиллированной действие модельного токсиканта значительно усиливается, что позволяет достигнуть требуемого уровня чувствительности биотеста. При этом во всех контрольных вариантах данного опыта выживаемость оставалась на уровне 100 %.

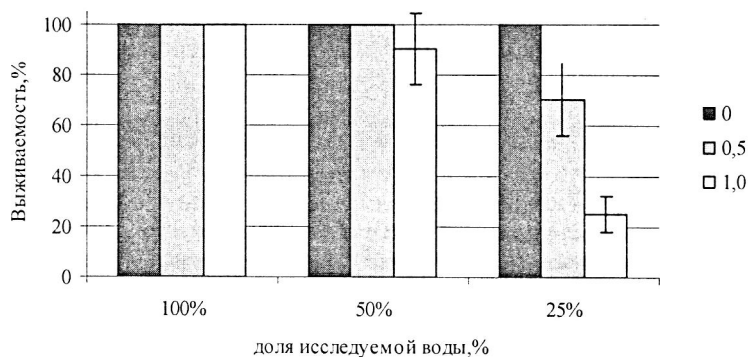


Рис. 4. Действие различных концентраций бихромата калия на выживаемость дафний в водопроводной воде, взятой из артезианской скважины, при ее разбавлении дистиллированной водой

Таким образом, проведенные исследования позволили определить характер действия основных факторов внешней среды, влияющих на результаты токсикологического эксперимента, выполняемого на рачках дафний в устройствах УЭР-03. На основе полученных результатов была разработана и аттестована новая более

оперативная методика биотестирования токсичности различных вод по показателю смертности дафний, рекомендованная для государственного экологического контроля [3].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брагинский, Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) / Л.П. Брагинский // Гидробиол. журн. - 2000. - Т. 36. - № 5. - С. 50 - 70.
2. Григорьев, Ю.С. Новые методические приемы оперативного биотестирования вод на водорослях / Ю.С. Григорьев, А.В. Рудь, А.С. Прокушкин // Труды II совещания «Экология пойм сибирских рек и Арктики», Томск, 22-26 ноября 2000 г. – Томск: STT, 2000.- С. 212-217.
3. Григорьев Ю.С., Шашкова Т.Л. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus. ПНД Ф 14.1:2:4.12-06 16.1:2.3.3.9-06 – Москва, 2006. – 48 с.
4. Жмур, Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР.1.39.2001.00283 – М.: АКВАРОС, 2001. – 48 с.,
5. Лесников, Л.А. Методики биологических исследований по водной токсикологии / Л.А. Лесников. – М.: Наука, 1971. – 245 с.
6. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИА, НИА–Природа, 2002. – 118 с.
7. Строганов, Н.С. Методика определения токсичности водной среды / Н.С. Строганов // Методики биологических исследований по водной токсикологии. - М.: Наука, 1978. - С.14-60
8. Филенко, О.Ф. Компенсаторные изменения в ответе дафний на летальные воздействия / О.Ф. Филенко, Е.Ф. Исакова // Реакции гидробионтов на загрязнение. - М.: Наука, 1983. - С. 135-140.
9. Филенко, О.Ф. Биотестирование: возможности и перспективы использования в контроле поверхностных вод / О.Ф. Филенко // Методы биоиндикации и биотестирования природных вод. – Л.: Гидрометеоздат, 1989. – С. 185-193.
10. Флеров, Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных / Б.А. Флеров. – Л.: Наука, 1989.- 144 с.
11. Barata, C. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. / C. Barata, D.J. Baird, S.J. Markich // Aquatic Toxicology, 1998 - Vol. 42.- P. 115–137
12. Kim, S.D. Physicochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* to copper/ S.D. Kim, M.B. Gu, H.E. Allen, D.K Cha / Environmental Monitoring and Assessment, 2001.- Vol. 70, P. 105-116
13. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012 - U.S. Environmental Protection Agency, 2002.

#### INFLUENCE ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON SENSITIVITY *DAPHNIA MAGNA* TO TOXIC SUBSTANCES

**T.L.Shashkova,  
J.S.Grigorjev, O.A. Berezina**

*The dependence of survival rate of *Daphnia magna* under different environmental conditions in the presence of heavy metals was investigated. It is shown, that the toxic effect of heavy metals increase under improvement of aeration conditions of cultivation medium, reduction of organisms quantity in volume and decrease of binding ability of aquatic environment.*