

УДК 574.64:595.324

## ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ СРЕД ПО ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *DAPHNIA MAGNA*

Олькова А.С., Санникова Е.А., Будина Д.В., Кутявина Т.И., Зимонина Н.М.

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, e-mail: morgan-abend@mail.ru

Предложена методика оценки интегральной токсичности водных сред по изменению двигательной активности *Daphnia magna* Straus. Экспериментально установлено, что оптимальное время учета параметра составляет 5 минут, плотность ячеек измерительной палетки – 5 мм, количество особей для одного варианта опыта – 3. Методика апробирована на модельных и нативных средах. В опытах с растворами тяжелых металлов показано, что при экспозиции 1 час выявляется токсическое действие летальных доз, через 24 часа возможно выявление нелетальных доз на уровне 0,1-1 ПДКкб. Водные вытяжки из урбаноземов, загрязненных несколькими тяжелыми металлами, угнетали двигательную активность рачков в зависимости от времени воздействия и суммарного показателя загрязнения. При апробации на природных водах, загрязненных минеральными формами азота, выявлена наиболее тесная связь между снижением двигательной активности *D. magna* и увеличением концентрации ионов аммония (по сравнению с нитрат-ионами).

Ключевые слова: биотестирование, *Daphnia magna*, тест-функция, двигательная активность, загрязнение окружающей среды.

## STUDY OF THE TOXICITY OF NATURAL AND TECHNOGENIC ENVIRONMENTS ON THE MOTOR ACTIVITY OF *DAPHNIA MAGNA*

Olkova A.S., Sannikova E.A., Budina D.V., Kutjavina T.I., Zimonina N.M.

Vyatka State University, Kirov, e-mail: morgan-abend@mail.ru

We have proposed a technique for assessing the integral toxicity of aquatic environments by changing the motor activity of *Daphnia magna* Straus. It was experimentally established that the optimal experiment time is 5 minutes, the density of the cells of the measuring tape is 5 mm, the number of individuals for one experiment variant is 3. The method was approved on model and native environments. In experiments with solutions of heavy metals it was shown that, at an exposure of 1 hour, the toxic effect of lethal doses is revealed, after 24 hours it is possible to detect non-lethal doses at the level of 0.1-1 MPCK. Water extracts from urban wastes, contaminated with several heavy metals, inhibited the motor activity of the crustaceans depending on the time of exposure and the total pollution index. When approbation on natural waters contaminated with mineral forms of nitrogen, the closest relationship between a decrease in motor activity of *D. magna* and an increase in the concentration of ammonium ions (in comparison with nitrate ions) was revealed.

Keywords: bioassay, *Daphnia magna*, test function, motor activity, environmental pollution.

Представители низших ракообразных *Daphnia magna* Straus (1820) используются как тест-организм в токсикологических исследованиях уже свыше 65 лет. Известны десятки методик, оценивающих токсическое действие тестируемой среды, по ответным реакциям этих тест-организмов [7].

В настоящее время востребованы методики биотестирования, направленные на оценку сублетальных эффектов, что позволяет выявлять действие низких доз загрязняющих веществ. У *D. magna* к тест-функциям ранней диагностики можно отнести изменение трофической активности [4], морфологические изменения органов [5], ритм сердцебиения [10], хемосигнализацию [1], колебания уровня гемоглобина в крови, содержание гормона сукцинатдегидрогеназы [6] и некоторые другие.

Одним из первых функциональных ответов на изменение качества окружающей среды, диагностируемых при прямом визуальном наблюдении за мезо-, макрогидробионтами, является изменение их двигательной активности по сравнению с поведением в незагрязненной контрольной среде. У низших ракообразных *D. magna* двигательную активность можно использовать в качестве тест-функции при биотестировании компонентов окружающей среды.

В мировой практике биотестирования уже есть успешные попытки оценки двигательной активности *D. magna*. Коллективом немецких исследователей разработан метод определения двигательной активности рачков в части их скорости передвижения, расстояния между дафниями, с подсчетом их количества и определением индекса токсичности. Для этого используется специально разработанный программный продукт [12]. Оценка траектории движения лежит в основе оценки токсичности в подходе других авторов [13].

Нами была поставлена цель разработать методику визуального определения токсичности водных сред по изменению двигательной активности низших ракообразных *D. magna*, а также апробировать её на модельных и нативных средах. Предлагаемый нами визуальный подход оценки двигательной активности наиболее простой и поэтому доступный широкому кругу исследователей.

**Материал и методы исследования.** Разрабатываемая методика определения токсичности водных сред основана на способности тест-объектов *D. magna* реагировать на присутствие в воде, водном растворе или водной вытяжке веществ, оказывающих на них токсическое действие на молекулярном, клеточном, органном и организменном уровне, что проявляется в интегральной функционально-поведенческой реакции – изменении двигательной активности.

Для регистрации двигательной активности *D. magna* было апробировано несколько вариантов выполнения измерений. При этом решались научно-практические задачи:

- определение оптимального промежутка времени для учета двигательной активности;
- определение минимально необходимого объема пробы для регистрации параметра и емкости с дном, подходящим в качестве поля зрения для визуального счета параметра;
- выбор внешнего вида палетки, на пересечении условных линий которой происходит регистрируемое событие.

В итоге количественная оценка параметра тест-реакции, характеризующего токсическое действие, производилась путем визуального подсчета количества пересечений дафнией условных линий наблюдаемого поля зрения в течение 5 минут. Были подобраны ячейки оптимальной палетки (5\*5 мм). Параметр выражается в

количестве пересечений линий (к.п.л.). В тестируемую среду объемом 15 мл поочередно помещается по 3 дафнии из каждой параллели опыта. Всего в опыте 3 параллельных определения для каждого тестируемого варианта. Используются рачки не старше 24 часов.

Полученные данные обрабатываются методами математической статистики с вычислением средних значений, стандартных отклонений и критерия Стьюдента для установления наличия математически значимой разницы с контрольными значениями.

Критерием токсического действия считали математически значимое различие показателя двигательной активности *D. magna* в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), и в анализируемой пробе (опыт).

Для апробации методики проводили три серии экспериментов: на модельных растворах с витальными и летальными дозами тяжелых металлов (ТМ), на водных вытяжках из урбаноземов, на природных водах, антропогенно загрязненных соединениями азота.

**Результаты.** В первой серии опытов тестировались растворы с добавками витальных и летальных доз ТМ. В таблице 1 представлены результаты, полученные при воздействии ионов меди. Токсикантом служил медный купорос ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), дозы выражены в предельно допустимых концентрациях (ПДК) для меди.

Таблица 1

Влияние витальных и летальных доз ионов меди на двигательную активность *D. magna*

Вариант	Двигательная активность, к.п.л.	
	1 час	24 часа
Контрольные значения для витальных концентраций	161,7±17,6	140,7±10,1
Витальные дозы	0,001 ПДКп=1 ПДКрх	164,3±16,3
	0,005 ПДКп=5 ПДКрх	172,3±20,5
	0,01 ПДКп=10 ПДКрх	172,0±28,6
Контроль для летальных концентраций	190,3±11,6	139,5±9,8
Летальные дозы	0,1 ПДКп=100 ПДКрх	176,0±23,6
	0,5 ПДКп=500 ПДКрх	149,3±17,8*
	1 ПДКп=1000 ПДКрх	153,7±4,2*
		гибель через 3-5 ч.
		гибель через 1,5-2 ч.

Примечание: ПДКп – норматив для питьевых вод; ПДКрх – норматив для водоемов рыбохозяйственного назначения; \* - достоверное уменьшение показателя по сравнению с контрольными значениями; \*\* - достоверное увеличение показателя по сравнению с контрольными значениями.

Витальные дозы меди через час экспозиции привели к недостоверной тенденции повышения двигательной активности рачков. Тяготение эффекта к стимуляции в данном диапазоне концентраций меди вполне закономерно, так как медь в микродозах является элементом, необходимым для большинства животных.

Через сутки для максимальной витальной дозы было установлено достоверное угнетение активности, то есть пробу по предлагаемой шкале можно признать слаботоксичной.

Летальные дозы, равные 0,5 и 1 ПДК для питьевых вод, оказывали достоверное угнетающее действие на дафний. Их токсичность удалось диагностировать раньше, чем по показателю гибели. Воздействие выбранных концентраций демонстрирует незначительный временной разрыв между проявлением ответной реакции «двигательная активность» и «смертность», однако это частные эффекты данного вещества в указанной концентрации. Для других веществ этот интервал времени может быть значительно больше (см. ниже). Кроме того, при тестировании реальных проб и проявлении эффектов совместного действия веществ этот интервал также может увеличиться.

Добавка, равная 0,1 ПДК меди, вызвала достоверный стимулирующий эффект в отношении двигательной активности тест-организмов, но для вынесения заключения о токсичности пробы по стимуляции показателя необходимо провести масштабные испытания методики, которые позволят выявить объективный критерий наличия токсического действия при условии стимуляции анализируемой жизненной функции.

Аналогичные испытания были проведены с использованием в качестве модельного токсиканта сульфата цинка семиводного ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (табл. 2).

Таблица 2

Влияние витальных и летальных доз ионов цинка на двигательную активность *D. magna*

Вариант		Двигательная активность, к.п.л.	
		1 час	24 часа
Контрольные значения для витальных концентраций		171,0±6,1	154,3±4,0
Витальные дозы	0,01 ПДК <sub>кб</sub> =1 ПДК <sub>рх</sub>	156,7±10,3	140,0±8,7
	0,1 ПДК <sub>кб</sub> =10 ПДК <sub>рх</sub>	153,0±25,9	114,7±9,5*
	1 ПДК <sub>кб</sub> =100 ПДК <sub>рх</sub>	147,3±11,5*	132,0±10,6*
Контроль для летальных концентраций		150,3±7,1	155,0±4,0
Летальные дозы	10 ПДК <sub>кб</sub> =1000 ПДК <sub>рх</sub>	131,3±5,7*	66,3±11,3* гибель через 30 ч.
	100 ПДК <sub>кб</sub> =10000 ПДК <sub>рх</sub>	128,7±9,5*	гибель через 15 ч.

Примечание: обозначения, как в таблице 1.

При добавке в культивационную воду наименьшей концентрации значимых отличий в двигательной активности не обнаружено, хотя результаты подтверждают общую тенденцию постепенного угнетения тест-функции. Увеличение добавки токсиканта до 0,1 ПДК<sub>кб</sub> позволило выявить отличия от контроля через сутки, а на максимальную из витальных доз

отклик был получен уже через час и сохранялся через сутки. Летальные концентрации цинка угнетали двигательную активность в еще большей степени.

Апробация методики с сульфатом цинка в качестве модельного токсиканта показала, что в определенных случаях летальное действие можно прогнозировать уже спустя час экспозиции.

Апробация методики была продолжена при исследовании интегральной токсичности урбаноземов, отобранных в районе воздействия металлургического предприятия г. Владикавказ. Пробы отличались комплексным антропогенным загрязнением ТМ. Кратность превышения ПДК для валовых форм цинка составляла от 12 до 37,5 раз, для соединений свинца от 1,2 до 92 раз [11].

Из проб урбаноземов готовились водные вытяжки с соотношением твердой и жидкой фаз 1:4. Далее проводили биотестирование полученных экстрактов (табл. 3).

Таблица 3

Двигательная активность *D. magna* в вытяжках из урбаноземов, загрязненных ТМ

Вариант	Экспозиция / двигательная активность, к.п.л.					
	1 час	3 часа	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки
К	129,13±6,92	132,77±6,92	130,88±7,09	139,96±6,74	148,33±5,71	156,07±2,25
№7	125,66±3,12	125,66±4,58	124,22±4,79	128±4,35*	128,66±5,52*	131,33±4,76*
№4	123,66±6,81	105,44±7,55*	104,77±5,76*	100,11±6,17*	101,22±8,43*	102,11±3,85*
№6	133,44±5,79	136,11±7,49	138,44±8,56	139,77±7,17	146,77±4,99	146,77±4,49*

Примечания: \* - значения достоверно отличаются от контрольных ( $p < 0,05$ ).

Статистически значимое угнетение двигательной активности в опытах с урбаноземами отмечалось для разных образцов, начиная с экспозиции 3 часа и заканчивая проявлением реакции на третьи сутки для разных проб. В любом случае, такая диагностика дает «ответ» о наличии токсичности раньше, чем 96 часов необходимой экспозиции для установления токсичности по гибели *D. magna*. Отметим также, что реакция остается стабильной в течение всего времени эксперимента по апробации: впервые зарегистрированное угнетение двигательной функции отмечается и при последующих измерениях тест-функции.

Для анализа чувствительности метода приводим таблицу 4.

Таблица 4

Проявление тест-функций смертности и двигательной активности *D. magna* в зависимости от степени загрязнения пробы

Вариант	Смертность <i>D. magna</i> , %	Первая регистрация угнетения активности	СПЗ*
Контроль	0	-	-
Проба № 4	6,7±1,5	через 3 часа	57,6 (опасное загрязнение)
Проба № 7	0	через 2 суток	16,1 (умеренно опасное)

			загрязнение)
Проба № 6	0	через 3 суток	1,1 (допустимое загрязнение)

Примечание: \* - СПЗ – суммарный показатель загрязнения, вычисленный с учетом концентраций ТМ, превышающих установленные нормативы [9].

Полученные данные свидетельствуют о том, что с помощью тест-функции смертности *D. magna* часто не удается диагностировать токсичность даже в случае высоких уровней загрязнения. В то же время двигательная активность тех же организмов позволяет сделать адекватное заключение о токсичности, причем в короткие сроки эксперимента. Особо отметим, что низкая информативность *D. magna* в случае определения смертности особей, связана не с низкой чувствительностью тест-организма в целом, а с буферными свойствами почв и природных вод. Селективная сорбция ионов загрязняющих веществ твердыми частицами почвы и органическим веществом вод, а также их связывание в процессе комплексообразования приводит к значительному снижению биодоступности многих элементов, в том числе тяжелых металлов [8]. Этот процесс, в свою очередь, приводит к занижению показателей токсичности. Поэтому разработка методов биотестирования с использованием оценки сублетальных эффектов является перспективной.

Для подтверждения эффективности методики при биотестировании природных вод были исследованы пробы из водоемов техногенных ландшафтов, сформированных вокруг г. Кирово-Чепецк (Кировская область). Приоритетными загрязняющими веществами в данных пробах являются минеральные формы азота: ионы аммония и нитрат-ионы [2].

Часть проб отличалась превышением норматива для культурно-бытовых вод по ионам аммония в сотни раз, по нитрат-ионам в десятки раз. Такие наиболее загрязненные пробы оказывали острое токсическое действие в биотесте на *D. magna* по показателю гибели. Однако были и такие пробы, в которых ПДК<sub>кб</sub> [3] для минеральных форм азота были превышены, но гибели рачков не наблюдалось. Токсичность этих проб оценивали по изменению двигательной активности *D. magna*. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Результаты исследования поверхностных вод  
техногенного ландшафта вокруг г. Кирово-Чепецка

№ пробы	Двигательная активность, количество пересечений условных линий				Содержание минеральных форм азота, мг/дм <sup>3</sup>	
	через 1 час		через 24 часа		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	контроль	опыт	контроль	опыт		
6	159,0±6,2	151,1±5,9	177,0±4,8	128,2±7,5*	5,9±1,2	8,5±1,0
3	154,6±10,0	150±5,8	179,3±3,4	128,5±5,4*	6,1±1,3	62±7
4	158,7±7,7	151,1±4,5	171,6±3,8	136,0±3,3*	3,8±0,8	3,9±0,5
12	155,5±7,3	146,8±5,2*	172,7±6,2	143,5±3,2*	0,74±0,26	29,7±3,6
7	148,8±4,1	135,5±4,3*	175,1±4,6	106,1±4,7*	10900±2300	9800±1200

11	165,8±6,1	142,3±5,2*	175,6±6,81	147,7±4,8*	43±9	111±13
9	159,5±6,1	151,6±4,3*	170,0±4,5	132±3,5*	8,4±1,8	54±6
14	162,6±8,5	141,6±5,3*	173,7±5,6	144,1±4,4*	44±9	380±50

Примечания: \* - значения достоверно отличаются от контрольных ( $p < 0,05$ ); ПДК<sub>кб</sub> для ( $\text{NH}_4^+$ ) по азоту 1,5 мг/дм<sup>3</sup>, для ( $\text{NO}_3^-$ ) – 45 [3].

По данным таблицам видим, что статистически значимое угнетение двигательной активности в большинстве проб наблюдается уже через час экспозиции. Через сутки все пробы снижают способность дафний активно двигаться. Привлекает внимание проба № 7, в которой содержание ионов аммония превышает норматив в 5646 раз, а нитрат-ионов в 218 раз. Данная проба оказывает летальное действие на *D. magna*, но после суток экспозиции. Оценка двигательной активности позволила сделать заключение о ее токсичности уже через 1 час. Для анализа полученных результатов приводим таблицу 6.

Таблица 6

Степень угнетения двигательной активности *D. magna* и зависимость между содержанием минеральных форм азота и тест-функцией

№ пробы	Угнетение двигательной активности <i>D. m.</i> через 1 час, раз	Коэффициент корреляции между содержанием минеральных форм азота и тест-функцией через 1 час		Угнетение двигательной активности <i>D. m.</i> через 24 часа, раз	Коэффициент корреляции между содержанием минеральных форм азота и тест-функцией через 24 часа	
		$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$		$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$
6	1,1	-0,74	-0,53	1,4	-0,83	-0,23
3	0			1,4		
4	1,1			1,3		
12	1,1			1,2		
7	1,1			1,7		
11	1,2			1,2		
9	1,1			1,3		
14	1,2			1,2		

Угнетение двигательной активности через 1 час воздействия оказалось минимальным, но в большинстве случаев достаточным для заключения о наличии токсического действия: критерием являлось математически достоверное отличие от контрольных значений. Через сутки экспозиции замедление движений дафний становится более весомым. Максимальное снижение показателя наблюдаем для пробы № 7, в которой высокое азотное загрязнение приводит впоследствии к 100%-ной гибели организмов.

Полученные коэффициенты корреляции Пирсона подтверждают информативность метода при исследовании вод с минеральным загрязнением. Наиболее тесная отрицательная зависимость проявилась между снижением двигательной активности и концентрацией ионов

аммония, причем коэффициент корреляции возрастает через сутки воздействия. Зависимость между оцениваемой тест-функцией и содержанием нитрат-ионов, напротив, ослабляется через сутки. Эти результаты говорят о превалирующем вкладе ионов аммония по сравнению с нитрат-ионами в формирование токсических эффектов при их совместном присутствии.

**Заключение.** Проведенные испытания показали, что тест-функция двигательной активности дафний эффективна для оценки степени токсичности водных сред, включая вытяжки из почв. Достоинством предложенной методики является её экспрессность, высокая чувствительность по сравнению с процедурами оценки токсичности по смертности рачков.

### Список литературы

1. Алексеев В.Р., Казанцева Т.И. Роль хеморецепции в формировании устойчивой популяции *Daphnia longispina* (модельные эксперименты) // Журнал общей биологии. – 2015. – Т. 76, № 5. – С. 377-389.
2. Ашихмина Т.Я. Состояние природного комплекса в зоне влияния Кирово-Чепецкого химического комбината / Т.Я. Ашихмина и др. // Вестник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – 2012. – № 3. – С. 9-15.
3. О введении в действие ГН 2.1.5.1315-03 (вместе с «ГН 2.1.5.1315-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Гигиенические нормативы»): Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 30.04.2003 N 78 (ред. от 30.08.2016) утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 27.04.2003) (Зарегистрировано в Минюсте России 19.05.2003 N 4550) [Электронный ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901862249> (дата обращения: 10.04.2017).
4. Конюхов И.В., Воробьева О.В. Определение трофической активности рачков *Daphnia magna* на флоуометре «MEGA-25» // Вода: химия и экология. – 2013. – Т. 65, № 12. – С. 79-83.
5. Лесников Л.А. Приемы биоиндикации, биотестирования при текущем надзоре за загрязненностью водных объектов и выявлении превышения их ассимилирующей способности: методические указания / Л.А. Лесников, Т.К. Мосиенко. – СПб.: ГосНИОРХ, 1992. – 79 с.
6. Лузгин В.К. Морфофизиологические изменения дафний при кратковременном воздействии солей тяжелых металлов, их обратимость и влияние на продуктивность популяции: дис. ... канд. биол. наук. – Л.: ГосНИОРХ, 1983. – С. 203.



7. Олькова А.С., Фокина А.И. *Daphnia magna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – № 4. – С. 380-389.
8. Пинский Д.Л. Экспериментальная экология / Д.Л. Пинский, В.Н. Орешкин. – М.: Наука, 1991. – С. 201-213.
9. Сает Ю.Е. Геохимия окружающей среды / Ю.Е. Сает, Б.А. Ревич, Е.П. Янин. – М.: Недра, 1990. – 335 с.
10. Усанов Д.А. Воздействие переменных магнитных полей низкой интенсивности на частоту сердцебиений дафнии волны // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – № 3. – С. 59-62.
11. Фокина А.И. Исследование токсичности проб урбаноземов, загрязненных тяжелыми металлами / А.И. Фокина, Л.И. Домрачева, А.С. Олькова и др. // Известия Самарского научного центра академии наук. – 2016. – Т. 18, № 2 (2). – С. 544-550.
12. Lechelt M. Monitoring of surface water by ultrasensitive *Daphnia* taximeter / M. Lechelt, W. Blohm, B. Kirschneit et al. // Environmental Toxicology. – 2000. - Vol. 15. – P. 390–400.
13. Shimizu N. Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay / N. Shimizu, C. Ogino, T. Kawanishi, Y. Hayashi // Environmental Toxicology. – 2002. - Vol. 17 (5). – P. 441-448.