

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВЕТВИСТОУСЫХ РАКООБРАЗНЫХ К БИХРОМАТУ КАЛИЯ

Приводятся данные о возможности введения в лабораторную культуру некоторых видов Cladocera (*Daphnia magna* Straus, 1820, *Moina macrocopa* Straus, 1820, *Scapholeberis mucronata* O.F. Muller, 1785, *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900, *Simocephalus vetulus* O.F. Muller, 1776). Для видов, введенных в культуру, получены основные токсикологические показатели по отношению к бихромату калия: LC_{50} , LC_{30} и LC_{100} . Суточные ювенисы ракообразных более чувствительны к стандартному токсиканту, чем взрослые оварийные самки.

Во второй половине XX ст. в связи с необходимостью оценки токсичности природных и сточных вод, а также некоторых химических веществ во многих странах мира стали использовать биотестирование на *Daphnia magna* Straus. Впервые *D. magna* как индикатор токсичности воды была предложена в 1929 г. [2]. В СССР начало подобных исследований связано с работами Н.С. Строганова и его школы, Е.А. Веселова и Л.А. Лесникова. Позже последователями американской школы биотестирования была предложена *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, и этот вид, наряду с *D. magna* и *D. pulex* (De Geer, 1778), был введен в руководства по биотестированию во многих странах мира.

В пресных водоемах северо-западного Причерноморья сем. Daphniidae представлено некоторыми массовыми видами. Например, в Дунае и придунайских водоемах встречаются *Ceriodaphnia quadrangula* O.F. Muller, 1785, *Moina micropthalma* Sars, 1903 и *M. macrocopa* Straus, 1820. Для дунайских плавней характерны *Scapholeberis mucronata* (O.F. Muller), *Simocephalus vetulus* O.F. Muller, 1776, *D. cucullata* Sars, 1862, *D. longispina* O.F. Muller, 1785 и некоторые другие [1].

Целью данного исследования являлось изучение пригодности массовых видов ветвистоусых ракообразных - аборигенных обитателей озер, временных водоемов, плавневых участков рек Причерноморья - для введения в культуру и использования в биотестировании, а также сравнение чувствительности видов, введенных в культуру, с классическими видами, традиционно используемыми для биотестирования.

Материал и методы. Культивирование объектов. Молодь *D. magna* была получена из покоящихся стадий (эфипиумов), поставляемых в наборах для экспрессного биотестирования "ТОХКИТ"[4]. Культура *C. affinis* является собственностью коллекции тест-объектов Отдела проблем качества водной среды ОФ ИнБЮМ. *S. mucronata* и *S. vetulus* были собраны ситом из мелководистого газа в придунайском оз. Ялпуг весной 2000 г. *M. macrocopa* получена из пробы планктона, взятой в реке Днестр весной 2001 г.

Введение в культуру *S. vetulus*, *M. macrocopa*, *C. affinis*, *S. mucronata* и *D. magna* было проведено по общей схеме. Одну партеногенетическую самку помещали в стакан с контрольной аквариумной водой, туда же ежедневно вносили корм: суспензию сухих пекарских дрожжей и смесь культур зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* Beijerinck и *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. После получения потомства взрослых самок отсаживали, а молодь помещали в аквариумы объемом 1 л для создания генетически однородной монокультуры, происходящей от одной партеногенетической самки.

Для изучения продолжительности жизни, роста и сроков созревания ракообразных в лабораторных условиях ежедневно проводили наблюдения за их выживаемостью и продолжительностью жизни, приростом, сроками появления яиц в выводковых камерах самок, количеством молоди в первом и последующих поколениях. Размеры молоди и взрослых самок измеряли на микроскопе МБС-9 при помощи окуляр-микрометра.

Чувствительность к бихромату калия. Использован стандартный токсикант бихромат калия, который продолжительное время сохраняет первоначально внесенную концентрацию, стабилен в растворах и относится к классу сильнотоксичных веществ

[6]. Для эксперимента из исходного раствора (1 г/л) была приготовлена серия разведений от 1 до 10 мг/л.

В специальные планшеты с объемом камеры 10 мл в контроль и соответствующие концентрации токсиканта были помещены ювенисы, по одному в камеру. Эксперимент выполнялся в 10 повторностях. В первый час экспозиции наблюдения за животными велись непрерывно, с 2 до 12 ч – ежечасно, далее – через 24 ч экспозиции. Фиксировали нарушения фототаксиса, характера движения, остановки движения, отсутствие реакции на прикосновение и гибель. Наблюдения за животными в течение первых часов экспозиции позволили установить пороговые концентрации, вызывающие изменения в поведении и характере движения ракообразных, а также близкие к ним LC_0 или NOEC (no observed effect concentration) – концентрации, не вызывающие токсического эффекта.

Эксперименты проводили с мая по июль в стационарных условиях при температуре 24 - 28°C и освещенности 1000 - 1500 лк. Были определены токсиметрические показатели LC_0 , LC_{50} и LC_{100} . Медианные летальные концентрации (LC_{50}) определяли методом графического анализа по [7]. Результаты экспериментов обработаны при помощи программы Statistica-99 (StatSoft, Ink.).

Результаты и обсуждение. Введение в культуру считается состоявшимся в случае, если от одной партеногенетической самки удается получить устойчиво развивающуюся лабораторную популяцию. В лабораторных условиях в культуре с невысокой плотностью посадки ракообразных, при постоянной температуре, освещенности, полноценном питании, ациклическая (без появления самцов в популяции) смена поколений партеногенетических самок может продолжаться длительное время [5]. Важным условием длительного ациклического культивирования партеногенетического поколения ветвистоусых ракообразных является создание оптимальных температурных и световых условий, режима кормления и рациона. Например, обогащение рациона *S. vetulus* процеженным детритом и присутствие в культиваторе ряски или листьев рогоза являлось необходимым условием успешного размножения самок, ведущих полуприкрепленный образ жизни. Регулярное удаление из аквариумов личинок карапаксов *D. magna*, обрастающих сидячими инфузориями и водорослями и поражающих, главным образом, взрослых самок, также создает лучшие условия культивирования.

В настоящее время получены удовлетворительные результаты лабораторного культивирования аборигенных видов - *S. vetulus*, *M. macroscopa*, *S. mucronata* и продолжено культивирование *C. affinis* и *D. magna*. В лабораторных условиях для культивируемых видов не удалось проследить описанного в литературе явления «первого максимума» плодовитости [5]. У каждого из пяти поддерживаемых в культурах видов численность молоди в первом поколении всегда была ниже, чем в последующих (см. рис.).

Для *M. macroscopa* стабильно высокая численность сохранялась в течение всей жизни. Для *C. affinis* наиболее высоким по численности было последнее поколение (F_n), для остальных видов ракообразных в последних поколениях численность молоди снижалась по сравнению со средними значениями плодовитости со второго по предпоследнее поколение ($F_2 - F_{n-1}$). Изучение плодовитости ракообразных, введенных в культуру, показало, что при равных условиях (объем сосуда, температура, освещенность, корм) наименьшая средняя плодовитость была у *S. mucronata* - в среднем 43 экз. в течение жизни самки (табл. 1).

Наибольшая плодовитость при средней продолжительности жизни 20 сут. отмечена у *M. macroscopa*, что объясняется быстрым наступлением половой зрелости рачков, ежедневным появлением молоди и высокой численностью ювенисов в каждом помете. Наиболее короткоживущей в лабораторных условиях оказалась *C. affinis*, для которой можно с уверенностью сказать, что в зимних культурах при 18 - 20°C этот вид ветвистоусых развивается лучше и продолжительность его жизни в культурах зимой повышается.

Таким образом, видно, что из пяти объектов, введенных в культуры, наиболее быстро можно получить несколько сотен синхронно родившихся ювенисов *M. macroscopa*. Этот вид ракообразных легко переносит высокую плотность культуры (до

1000 экз./л), чего нельзя сказать о *D. magna*, у которой при плотности посадки более 50 - 70 экз./л плодовитость самок снижается. По [5], число яиц у *D. magna* в летние месяцы

Таблица 1. Средние значения морфометрических показателей, продолжительности жизни и плодовитости для ветвистоусых ракообразных в лабораторных условиях

Table 1. Average value of morphometrical indexes, lifetime and fecundity for Cladocera in laboratory conditions

Тест-объект	Диапазон размеров овариальных самок, мм	Размеры ювенисов, мм	Продолжительность жизни, сут	Продолжительность репродуктивного возраста, сут	Кол-во поколений в течение жизни	Кол-во молоди у самки
<i>Daphnia magna</i>	5,0 - 6,0	0,8	25	20	4,5	134
<i>Ceriodaphnia affinis</i>	0,7 - 1,0	0,3	16	11	3,5	58
<i>Simocephalus vetulus</i>	2,5 - 3,0	0,6	35	27	5,5	93
<i>Moina macrocopa</i>	1,0 - 1,2	0,5	22	20	20,0	430
<i>Scapholeberis mucronata</i>	0,8 - 1,2	0,5	30	20	5,0	43

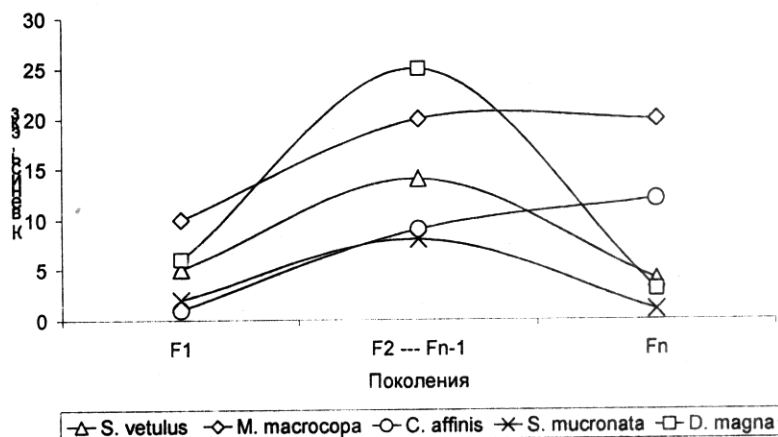


Рисунок. Изменения средней плодовитости партеногенетических самок ветвистоусых ракообразных в течение репродуктивного возраста в условиях лабораторного культивирования
Figure. The fecundity changes of parthenogenetic females of Cladocera during reproductive age in laboratory conditions

может достигать 42 экз., при 15 выметах в течение жизни. Достигается высокая плодовитость этого вида (более 1000 потомков) за счет полноценного рациона и при значительных объемах сосудов-культиваторов. В наших экспериментах таких высоких значений плодовитости добиться не удалось, по-видимому, из-за недостаточного объема культиватора и неполного рациона. Проведение в будущем исследований по изучению сезонной динамики плодовитости ракообразных в культуре позволит выяснить оптимальные световые и температурные условия культивирования введенных в культуру дафний и прогнозировать вероятные возможности прироста лабораторных популяций в различные сезоны года.

Для получения данных о сравнительной чувствительности объектов культивирования была выполнена серия экспериментов по выживаемости организмов в растворах бихромата калия. Условиями эксперимента было задано использование потомства от одной самки в третьем-четвертом поколении (без учета возраста лабораторной микропопуляции). Это позволило получить достаточное количество одновозрастного и генетически однородного материала, мало отличающегося по чувствительности к токсиканту в

пределах каждой концентрации. Следует отметить, что чем большее число партеногенетических поколений пройдено популяцией, тем более чутко популяция реагирует на отрицательные значения факторов среды. В природе в стареющей популяции при неблагоприятных условиях появляются самцы и образуются зимовальные яйца эфиппимы. В «остром» лабораторном эксперименте такое развитие событий исключено, однако изменение чувствительности тест-объектов в зависимости от возраста исходной микропопуляции нуждается в дополнительных исследованиях.

Отмечены некоторые отличия в чувствительности у различных видов ветвистоусых, а также у животных одного вида, но различного возраста (табл. 2). Этот факт является одним из общеизвестных закономерностей в токсикологии и остается справедливым как по отношению к экспериментальным животным, так и для человека [3].

Таблица 2. Токсикометрические показатели влияния бихромата калия на ювенисы (I) и овариальных самок (II) ветвистоусых ракообразных

Table 1. The toxicometrical indexes of influence of potassium dichromate on 24 hours' juvenile organisms (I) and adult females (II) of Cladocera

Тест-объект	Возраст микропопуляции, мес	Пороговая кон-ция, мг/л		LC ₀ ⁻²⁴ , мг/л		LC ₅₀ ⁻²⁴ , мг/л		LC ₁₀₀ ⁻²⁴ , мг/л	
		I	II	I	II	I	II	I	II
<i>Daphnia magna</i>	6	2,0	3,0	1,0	3,0	3,3	5,5	8,0	10,0
<i>Ceriodaphnia affinis</i>	>60	2,0	1,0	1,0	1,0	2,7	2,9	5,0	6,0
<i>Simocephalus vetulus</i>	12	2,0	4,0	2,0	3,0	2,5	4,8	5,0	7,0
<i>Moina macrocopa</i>	2	1,0	2,0	1,0	1,0	1,4	2,6	3,0	5,0
<i>Scapholeberis mucronata</i>	12	2,0	3,0	2,0	2,0	3,0	4,5	6,0	8,0

Пороговые концентрации в «остром» эксперименте для некоторых представителей дафний не отличались от величины LC₀⁻²⁴ и это понятно, т.к. в непродолжительном эксперименте до наступления гибели организма отклик на токсическое воздействие заключается в изменении поведения или подвижности.

Максимальная недействующая концентрация (LC₀⁻²⁴) в 24-часовом эксперименте для ювенальных стадий *S. vetulus* и *D. magna* ниже, чем для овариальных самок. Для всех ракообразных абсолютно летальная концентрация бихромата калия (LC₁₀₀⁻²⁴) для взрослых самок выше, чем для ювенисов.

Полученная расчетным способом по графику зависимости выживаемости ракообразных от концентрации токсиканта медианальная летальная концентрация (LC₅₀⁻²⁴), при которой погибли 50 % ракообразных за 24 ч экспозиции, также выше для взрослых особей, чем для молоди. Значения величины LC₅₀⁻²⁴ характеризуют *M. macrocopa* как наиболее чувствительный тест-объект, а близкий к моине по размерным характеристикам *S. mucronata* и наиболее крупный из ракообразных *D. magna* – как наименее чувствительные из тест-объектов. Это обстоятельство подтверждается узкой зоной токсического действия (диапазоном между LC₀ и LC₁₀₀) для моины и широким – для дафнии. В токсикологии существует мнение: чем шире зона токсического действия, тем меньшая чувствительность у объекта, и наоборот, чем уже диапазон между значениями LC₀ и LC₁₀₀, тем чувствительнее объект.

Значительных отличий по показателям чувствительности ракообразных в связи с возрастом лабораторной микропопуляции не обнаружено.

На вопрос о том, какие факторы являются определяющими в чувствительности ветвистоусых ракообразных, близких по размерам и продолжительности жизни, со сходной степенью сложности и дифференциации нервной системы, уровнем развития физиологических функций и особенностями строения покровов тела, еще только предстоит ответить. Можно предположить, что острая токсичность бихромата калия для ветвистоусых ракообразных в «остром» эксперименте связана с контактным действием токсиканта в растворе, а не с особенностями фильтрационного типа питания этих животных.

В порядке снижения чувствительности по показателю LC_{50}^{-24} ювенисы ветвистоусых ракообразных расположились следующим образом:

M. macrocopa → *S. vetulus* → *C. affinis* → *S. mucronata* → *D. magna*.

Снижение чувствительности для овариальных самок выглядело так:

M. macrocopa → *C. affinis* → *S. mucronata* → *S. vetulus* → *D. magna*.

Выводы. Полученные результаты подтверждают возможность получения в лабораторных условиях устойчивых ациклических культур аборигенных видов ветвистоусых ракообразных *S. vetulus*, *M. macrocopa*, *S. mucronata*. Минимальная средняя плодовитость партеногенетической самки в лабораторных условиях отмечена у *S. mucronata*, максимальная – у *M. macrocopa*. Наиболее чувствительной к действию бихромата калия была *M. macrocopa*, наименее – *D. magna*. Взрослые овариальные самки исследованных видов ракообразных по показателю LC_{50}^{-24} менее чувствительны к стандартному токсиканту бихромату калия, чем суточные ювенисы.

Автор благодарит сотрудников Отдела проблем качества водной среды ОФИНБЮМ за помощь и поддержку в этих исследованиях.

1. Біорізноманітність Дунайського біосферного заповідника, збереження та управління. – К.: Наук. думка, 1999. – 702 с.
2. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Гидробиол. журн. – 2000. – Т. 36, № 5. – С. 50 – 70.
3. Голубев А.А. и др. Количественная токсикология. – Л.: Медицина, 1973. – 286 с.
4. Дятлов С.Е. Микробиотесты: новый подход в оценке токсичности водной среды // Наук. зап. Тернопільського держ. педагог. університету. - Сер: Біологія. - 4 (15) Спец. випуск: Гідроекологія. – 2001. – С. 128 – 129.
5. Смирнов Н.Н. Биология ветвистоусых ракообразных / Зоология беспозвоночных – 3. – М., 1974. – 115 с. (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР).
6. Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. – М.: Колос, 1971. – 246 с.
7. Методическое руководство по биотестированию воды. РД-118-02-90. – М., 1991. – 49 с.

Одесский Национальный Университет им. И.И. Мечникова
г. Одесса

Получено 10.10.2001

Ye. S. DYATLOVA

COMPARATIVE SENSITIVITY OF DIFFERENT SPECIES OF CLADOCERA TO THE STANDARD TOXICANT POTASSIUM DICHROMATE

Summary

Data about potentialities of leading into the acyclic laboratory culture of some Cladocera species (*Daphnia magna* Straus, *Scapholeberis mucronata* (O.F. Muller), *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, *Simocephalus vetulus* O.F. Muller) are given. The main toxicological indexes (LC_0 , LC_{50} and LC_{100}) regarding potassium dichromate were found for all studied species. It is shown that the 24 hours' juvenile organisms are more sensitive regarding standard toxicant than the grown-up female.