

Избегание света как тест-реакция байкальских амфипод на токсиканты

Д. И. СТОМ^{1,2}, Г. О. ЖДАНОВА¹, М. Н. САКСОНОВ¹, А. Э. БАЛАЯН¹, М. Ю. ТОЛСТОЙ³

¹ Иркутский государственный университет
664003, Иркутск, ул. Ленина, 3
E-mail: stomd@mail.ru

² Байкальский музей ИНЦ СО РАН
664520, Листвянка, ул. Академическая, 1

³ Иркутский национальный исследовательский технический университет
664074, Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Статья поступила 22.12.2015

Принята к печати 15.06.2016

АННОТАЦИЯ

Исследована зависимость времени ухода от света *Eulimnogammarus vittatus* в присутствии в среде токсикантов. Установлено, что максимально быстрой реакцией на свет эти амфиподы обладают в чистой байкальской воде. Присутствие токсикантов замедляло переход особей *E. vittatus* в темноту. Подобный эффект наблюдали в экспериментах с тяжелыми металлами, детергентами, нефтепродуктами. Полученные материалы свидетельствуют о перспективности использования данной поведенческой реакции в качестве тест-отклика при биотестировании токсического загрязнения с помощью *E. vittatus*.

Ключевые слова: фототаксис, токсичность, *Eulimnogammarus vittatus*, биотестирование.

В подавляющем большинстве случаев оценку состояния водных объектов осуществляют, основываясь на химическом анализе их содержания и сравнении полученных результатов с нормативами ПДК [Mainali et al., 2013; Moradi et al., 2013; Zhao et al., 2013]. Однако кроме высокой стоимости и сложности, физико-химические определения не дают целостного представления о качестве окружающей среды. Это происходит из-за большого разнообразия загрязнителей и раз-

личий в биологических эффектах при их раздельном и комплексном воздействии. Причина кроется в том, что комплексное действие всех компонентов на живые системы чаще всего не представляет собой простой суммы их эффектов [Beyera et al., 2014; Varaksin et al., 2014; Arnaud et al., 2015].

В последнее время в практику мониторинга поверхностных вод суши все активнее вводятся методы биологического тестирования [Sjollem et al., 2014; Girlinga et al., 2015]. Они

основаны на регистрации реакции живых тест-объектов на неблагоприятные факторы, в том числе на содержание токсикантов в исследуемых средах. Биотестирование с помощью тест-объектов направлено на оценку интегрального токсического действия всего комплекса загрязняющих веществ, содержащихся в водной среде. Наиболее часто в качестве тест-откликов используют выживаемость организмов. Но биотесты, основанные на гибели тест-организмов, как правило, требуют больших временных затрат и характеризуются низкой чувствительностью. Для оперативного управления и регулирования процессов очистки загрязненных вод важно иметь биотесты, позволяющие оценивать качество стоков, анализировать пробы за короткий промежуток времени. Поэтому остается острая необходимость в экспрессных биопробах. Байкальские организмы весьма капризны и требуют особых условий для их культивирования. Данное обстоятельство существенно осложняет выбор тест-организмов, представительных для такого уникального водоема, как оз. Байкал. Среди байкальских гидробионтов особую роль играют амфиподы [Тахтеев, 2000]. Ранее показано, что их поведенческие реакции могут использоваться для оценки влияния на них экологических факторов [Timofeyev et al., 2001; Perrot-Minnot et al., 2012; François-Gaël Michaleca et al., 2013; Montory et al., 2014; Fedoseeva, Stom, 2015].

На основании изложенного, цель данного сообщения – проверка возможности применения реакции избегания света амфиподами для анализа токсичности водных растворов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Тест-объектом при разработке биотеста выбран *Eulimnogammarus vittatus* – эндемик оз. Байкал, обитающий в основном в Южном и Среднем Байкале. Сбор бокоплавов проводили сачками на глубинах 0,2–0,7 м в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал, около 30 км к северо-востоку от истока р. Ангары). Амфипод перед опытами адаптировали, выдерживая в течение суток при температуре, близкой к местам их отлова (около 8–10 °С) в аквариумах объемом 2–

3 дм³ с байкальской водой. Каждую особь использовали в экспериментах только один раз.

При проведении тестирования 10 взрослых особей *E. vittatus* помещали в прямоугольный микроаквариум (20 × 10 × 2 см) с 200 см³ испытуемого раствора, приготовленного на байкальской воде. Половину кюветы закрывали сверху плотной темной тканью, не пропускающей свет. Переход бокоплавов в темноту инициировали, освещая их светом 1000 лк. При помощи секундомера “L-микро” (Россия) фиксировали время ухода от света 50 и 100 % бокоплавов. Интенсивность света измеряли с помощью люксметра “ТКА-ЛЮКС”. Тестируемыми токсикантами являлись соли тяжелых металлов (хч): CdCl₂, Pb(CH₃COO)₂, HgCl₂, CuSO₄, поверхностно-активные вещества и детергенты (додецилсульфат натрия, стиральный порошок “Миф”); нефтепродукты (бензин 92, дизельное топливо – летний сорт). Диапазон концентраций исследуемых ПАВ и солей тяжелых металлов составлял 0,0005–0,5 г/дм³, нефтепродуктов – 0,0005–0,5 см³/дм³.

Параллельно исследовали влияние тестируемых токсикантов на выживаемость *E. vittatus*. В этой серии опытов экспонирование амфипод в тестируемых растворах проводили в условиях, близких к естественным (рассеянный свет, освещенность ~50 лк), в течение 48 ч. В указанный временной период фиксировали время гибели 100 % особей *E. vittatus*. Температура растворов во всех экспериментах соответствовала байкальской воде во время отлова (10 °С).

Все эксперименты проводили в 10 повторностях в четырех биологических экспериментах. Для статистической обработки полученных данных использовали пакет программ Microsoft Excel. Достоверность различия результатов определяли с помощью критерия Стьюдента. Выводы сделаны с вероятностью безошибочного прогноза $p \geq 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении экспериментов максимальную скорость избегания амфиподами света наблюдали в опытах с использованием чистой байкальской воды. При этом 50 % осо-

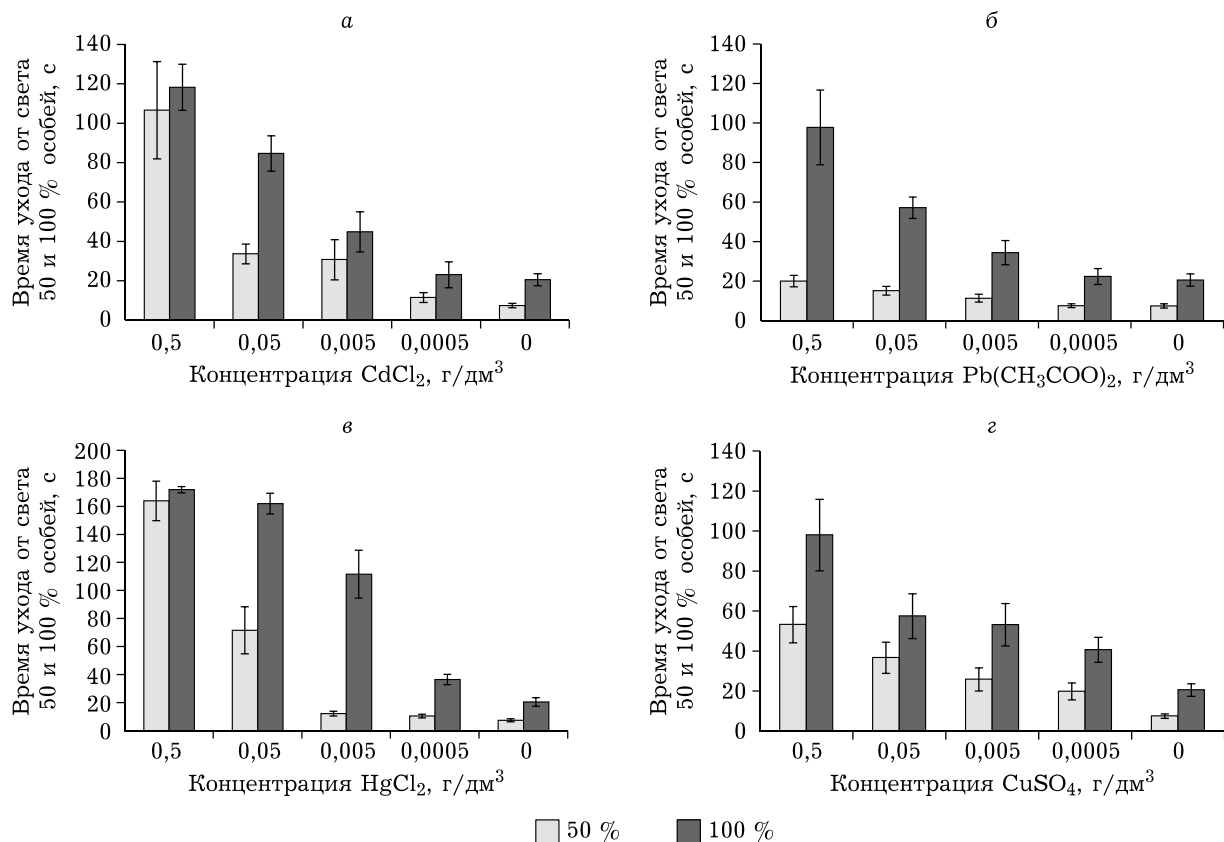


Рис. 1. Влияние хлорида кадмия (а), ацетата свинца (б), хлорида ртути (в) и сульфата меди (г) на реакцию фототаксиса *Eulimnogammarus vittatus*

бей уходило от света за $7,4 \pm 1,1$ с, а 100 % – за $20,5 \pm 3,1$ с. Добавление солей тяжелых металлов в концентрациях от 0,0005 до 0,5 г/дм³ тормозило реакцию. В присутствии 0,0005 г/дм³ HgCl₂ (рис. 1, в) и CuSO₄ (см. рис. 1, г) время ухода 100 % бокоплавов от света возрастало относительно контроля (чистая байкальская вода) в 1,8 и 2,0 раза соответственно. Негативное воздействие ацетата свинца, хлорида кадмия на эту поведенческую реакцию амфипод отмечали при более высоком содержании – от 0,005 г/дм³ и выше. Например, в присутствии 0,005 г/дм³ Pb(CH₃COO)₂ время ухода 100 % особей *E. vittatus* от света составило $34,4 \pm 6,1$ с, что в 1,6 раза больше контрольного показателя ($20,5 \pm 3,1$ с) (см. рис. 1, б). Хлорид кадмия в аналогичной концентрации увеличивал продолжительность нахождения в освещенной зоне 100 % особей с $20,5 \pm 3,1$ до $44,8 \pm 10,2$ с (см. рис. 1, а).

Хлорид натрия в диапазоне концентраций от 0,0005 до 0,5 г/дм³ не оказывал воздействия на скорость ухода амфипод от света.

Так, в присутствии 0,5 г/дм³ NaCl все 100 % особей *E. vittatus* уходило от света за $19,3 \pm 2,2$ с, что достоверно не отличалось от контроля ($20,5 \pm 3,1$ с) (рис. 2).

Параллельно проводили исследования по влиянию солей тяжелых металлов на выжи-

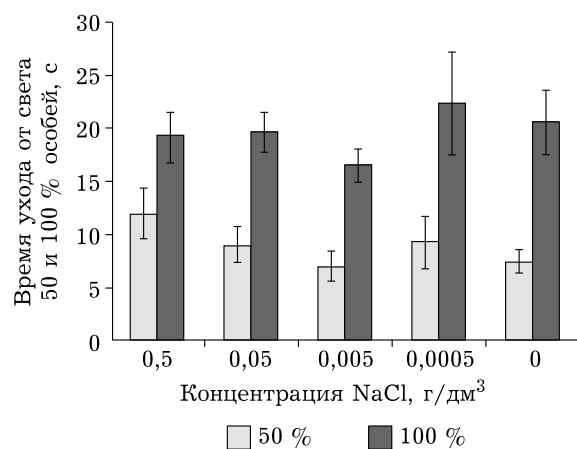


Рис. 2. Влияние NaCl на реакцию фототаксиса *Eulimnogammarus vittatus*

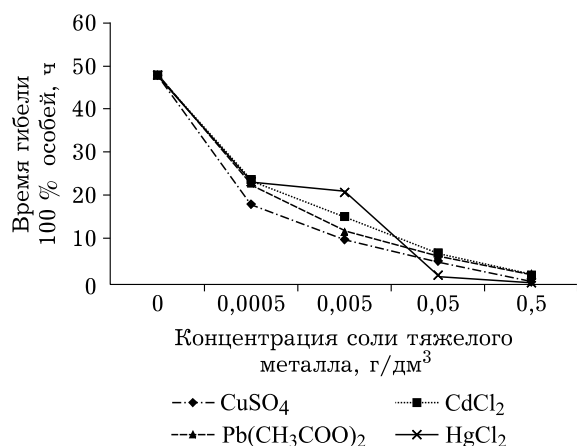


Рис. 3. Влияние хлорида кадмия, ацетата свинца, хлорида ртути и сульфата меди на выживаемость *Eulimnogammarus vittatus*

ваемость *E. vittatus*. В этих опытах повышенную токсичность проявляли хлорид ртути и сульфат меди. При концентрации названных солей 0,0005 г/дм³ отмирание 100 % особей происходило за 23,5 ± 0,1 и 18,4 ± 0,1 ч соответственно. В то же время в контроле (чистая байкальская вода) все амфиподы оставались живыми, по крайней мере в течение 2 сут. В присутствии 0,5 г/дм³ этих соединений гибель 100 % особей *E. vittatus* наблюдали за 0,3 ± 0,1 и 0,5 ± 0,1 ч соответственно (рис. 3).

При добавлении 0,0005 г/дм³ хлорида кадмия и ацетата свинца отмирание 100 % особей происходило через сутки. Повышение концентрации исследуемых солей тяжелых

металлов приводило к сокращению времени гибели *E. vittatus*. Так, при содержании 0,5 г/дм³ этих соединений отмирание всех особей происходило за 2,0 ± 0,1 ч (см. рис. 3).

Исследуемые детергенты уже в концентрации 0,0005 г/дм³ оказывали негативное влияние на фототаксис амфипод. Время ухода от света 100 % особей *E. vittatus* в присутствии 0,0005 г/дм³ додецилсульфата натрия и порошка “Миф” составляло 50,5 ± 10,2, 35,4 ± 4,2 с, а 50 % – 21,4 ± 4,2 и 14,5 ± 2,2 с соответственно. Додецилсульфат натрия в диапазоне концентраций от 0,005 до 0,5 г/дм³ повышал время ухода 50 % особей от 47,0 ± 11,6 до 137,8 ± 21,5, 100 % – от 90,1 ± 15,6 до 154,8 ± 12,1 с (рис. 4, а). В присутствии стирального порошка “Миф” в аналогичных концентрациях время ухода 50 % особей увеличивалось от 67,5 ± 17,1 до 117,3 ± 18,8 с, 100 % особей – от 92,6 ± 17,9 до 159,5 ± 12,1 с (см. рис. 4, б).

На выживаемость амфипод наибольшее негативное воздействие оказывал додецилсульфат натрия. Уже при концентрации 0,0005 г/дм³ гибель 100 % особей *E. vittatus* происходила за 11,2 ± 0,1 ч, в то время как в контроле все амфиподы оставались живыми, по крайней мере, в течение 2 сут. В растворах с аналогичным содержанием порошка “Миф” все особи оказались мертвыми через 19,7 ± 0,3 ч. При максимальной концентрации исследуемых детергентов (0,5 г/дм³) время гибели 100 % особей *E. vittatus* составляло от 1,0 ± 0,1 до 1,1 ± 0,1 ч (рис. 5).

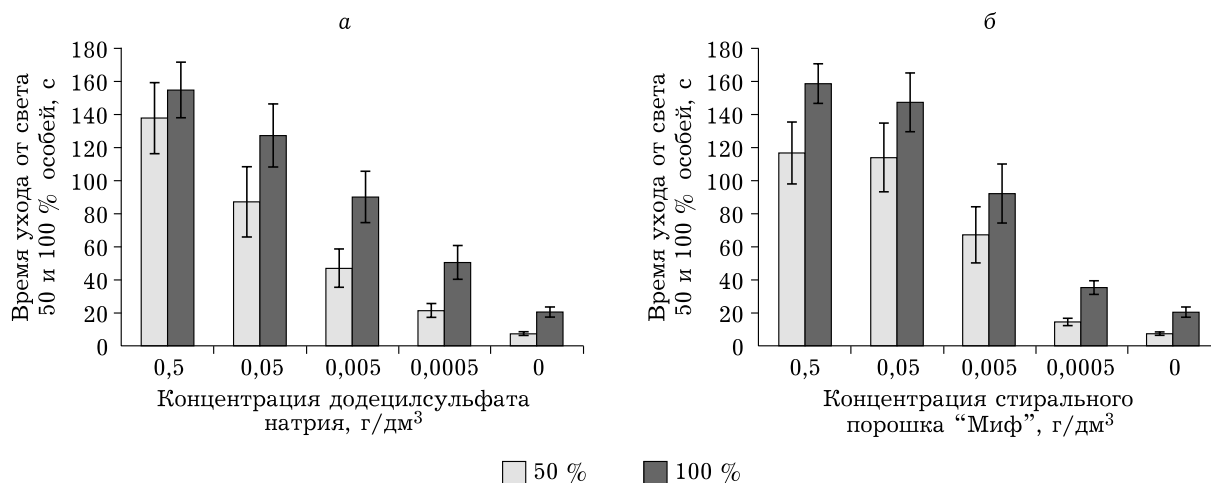


Рис. 4. Влияние додецилсульфата натрия (а) и стирального порошка “Миф” (б) на реакцию фототаксиса *Eulimnogammarus vittatus*

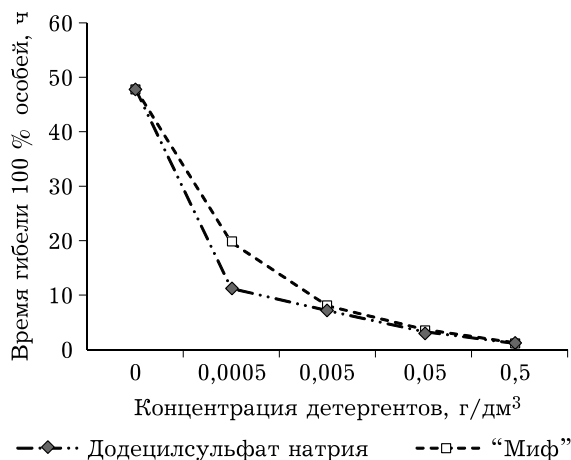


Рис. 5. Влияние додецилсульфата натрия и стирального порошка “Миф” на выживаемость *Eulimnogammarus vittatus*

Исследовали токсичность нефтепродуктов (бензин, дизельное топливо) по их воздействию на реакцию фототаксиса байкальских амфипод *E. vittatus*. Наибольшее негативное влияние на исследуемую поведенческую реакцию оказывало дизельное топливо (летний сорт). Так, при содержании в байкальской воде этого нефтепродукта в количестве $0,0005 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ время ухода 100 % особей *E. vittatus* от света резко возрастало с $20,5 \pm 3,1$ с (контроль) до $129,8 \pm 20,4$ с, а 50 % бокоплавов – с $7,4 \pm 1,1$ до $98,2 \pm 21,2$ с. При увеличении концентрации дизельного топлива до $0,5 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ время ухода амфипод от света увеличивалось до $182,1 \pm 4,0$ с (100 % особей) и $157,7 \pm 12,4$ с (50 % особей) (рис. 6, а, б).

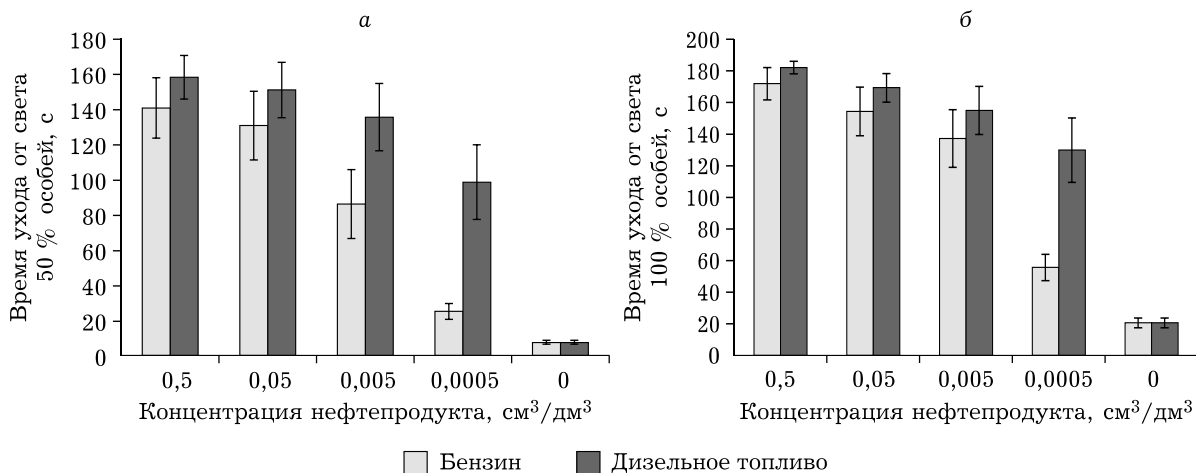


Рис. 6. Влияние бензина и дизельного топлива на реакцию фототаксиса *Eulimnogammarus vittatus*: а – время ухода от света 50 % особей, б – время ухода от света 100 % особей

В байкальской воде с добавлением $0,0005 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ бензина время перемещения *E. vittatus* в затемненную часть кюветы составляло $55,6 \pm 8,3$ (100 % особей) и $24,9 \pm 4,5$ (50 % особей) с, в то время как в контроле – $20,5 \pm 3,1$ (100 % особей) и $7,4 \pm 1,1$ (50 % особей) с. При повышении концентрации бензина до $0,5 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ происходило увеличение времени ухода 50 % особей *E. vittatus* от света до $140,3 \pm 17,1$ (см. рис. 6, а), 100 % – до $171,9 \pm 10,2$ с (см. рис. 6, б).

Оценивали также выживаемость *E. vittatus* в эмульсиях указанных выше нефтепродуктов. Как и при исследовании реакции фототаксиса, дизельное топливо оказалось более токсичным, чем бензин. Например, в воде с добавлением $0,0005 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ бензина гибель амфипод происходила за $17,2 \pm 0,1$ ч, в эмульсии дизельного топлива – за $13,4 \pm 0,1$ ч. Отмирание всех особей *E. vittatus* в эмульсиях с содержанием $0,5 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ бензина и дизельного топлива наступало через $2,1 \pm 0,1$ и $1,3 \pm 0,2$ ч соответственно, в то время как в контроле все особи оставались живыми, по крайней мере, в течение 2 сут (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ изученных материалов выявил следующее. Дизельное топливо оказалось несколько более токсичным, чем бензин, как при использовании в качестве тест-реакции выживаемости, так и фототаксиса *E. vittatus*. На основании полученных результатов иссле-

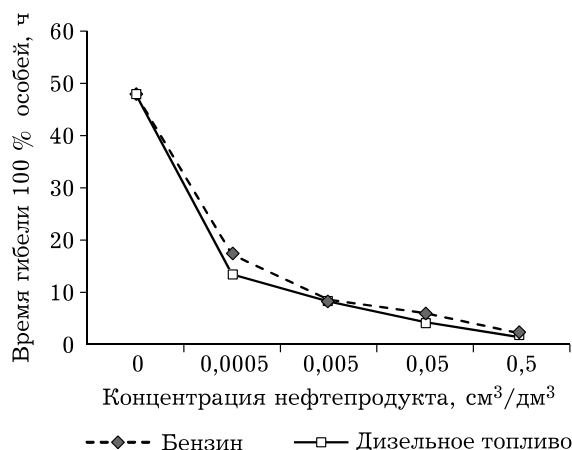


Рис. 7. Влияние бензина и дизельного топлива на выживаемость *Eulimnogammarus vittatus*

двумя солями тяжелых металлов по степени их воздействия на выживаемость байкальских амфипод можно расположить в таком порядке: $\text{CuSO}_4 \geq \text{HgCl}_2 > \text{CdCl}_2 \geq \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Установленное в работе соотношение летальных эффектов солей металлов на амфипод практически совпало с данными, опубликованными ранее [Тимофеев, 2000]. По степени угнетения реакции фототаксиса использованные соли располагались в той же очередности, что и в токсикометрических опытах по выживаемости *E. vittatus*.

ПАВ по влиянию на фототаксис *E. vittatus* дают такую последовательность: додецилсульфат натрия > стиральный порошок “Миф”. Аналогичный ряд исследуемые ПАВ формируют и по их влиянию на выживаемость *E. vittatus*. О повышенной агрессивности ПАВ сообщалось в работах [Ostroumov, 2005; Ostroumov, Solomonova, 2013].

Имеется ряд публикаций о том, что подвижность и таксис различных организмов применимы в качестве тест-реакций при биологическом анализе качества среды [Stom et al., 1986; Масюк и др., 2007; Акинина и др., 2009; Krell et al., 2013].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выше приведенные экспериментальные материалы показали полное совпадение соотношения токсичности исследуемых тяжелых металлов, ПАВ, нефтепродуктов, как по выживаемости, так и по поведенческой ре-

акции фототаксиса, и свидетельствуют о перспективности использования данной тест-реакции в качестве тест-отклика при биологическом анализе с помощью *E. vittatus* токсического загрязнения, в частности для биотестирования водных сред, содержащих испытанные загрязнители. Основными преимуществами реакции являются довольно высокая чувствительность и экспрессность, которые являются важнейшими требованиями, предъявляемыми к методам биологического контроля.

Авторы признательны Е. В. Захарову и Е. А. Иванчикову за участие в работе. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках реализации проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (Задание № 13.1263.2014/К от 11.07.2014), гранта РФФИ (тема № 14-04-31999).

ЛИТЕРАТУРА

- Акинина Е. В., Беднаржевский С. С. и др. Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий. СПб.: Питер, 2009. 102 с.
- Масюк Н. П., Посудин Ю. И., Лилицкая Г. Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (Dunaliellales, Chlorophyceae, Viridiplantae). Киев, 2007. 264 с.
- Тахтеев В. В. Очерки о боклоплавах озера Байкал: Систематика, сравнительная экология, эволюция. Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2000. 352 с.
- Тимофеев М. А. Сравнительная оценка отношения байкальских гаммарид и голарктического *Gammarus lacustris* к абиотическим факторам: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2000. 19 с.
- Arnaud F. et al. Effects of mixtures of dissolved and particulate contaminants on phototrophic biofilms: new insights from a PICT approach combining toxicity tests with passive samplers and model substances // Environ. Sci. Pollution Res. 2015. Vol. 22, N 6. P. 4025–4036.
- Beyera J. et al. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper // Marine Environ. Res. 2014. Vol. 96. P. 81–91.
- Fedoseeva E. V., Stom D. I. Preference and avoidance reactions in some Baikalian amphipods and holarctic *Gammarus lacustris* Sars, 1863 in response to a humic-containing preparation // Inland Water Biol. 2015. Vol. 8, N. 2. P. 130–135.
- François-Gaël Michaleca et. al. Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants // Aquatic Toxicol. 2013. Vol. 138–139. P. 129–138.
- Girlinga J. A. et al. A macroalgal germling bioassay to assess biocide concentrations in marine waters // Marine Pollution Bull. 2015. Vol. 91, N 1. P. 82–86.
- Krell T. et al. Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota Bioavailability of pollutants and chemotaxis // Current Opinion in Biotechnol. 2013. Vol. 24, N 3. P. 451–456.

- Mainali B., Pham T. T. N., Ngo H. H., Guo W. Maximum allowable values of the heavy metals in recycled water for household laundry // *Sci. Total Environ.* 2013. Vol. 452-453. P. 427-432.
- Montory J. A., Pechenik J. A., Diederich C. M., Chaparro O. R. Effects of Low Salinity on Adult Behavior and Larval Performance in the Intertidal Gastropod *Crepidatella peruviana* (Calypttraeidae) // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, N 7. P. 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0103820.
- Moradi A., Honarjoo N., Fallahzade J., Najafi P. Assessment of heavy metal pollution in soils and crops of industrial sites // *Isfahan, Iran. Pakistan Journ. Biol. Sci.* 2013. Vol. 16, N 2. P. 97-100.
- Ostroumov S. A. Some aspects of water filtering activity of filter-feeders // *Hydrobiology.* 2005. Vol. 542. P. 275-286.
- Ostroumov S. A., Solomonova E. A. Phytotoxicity of a surfactant-containing product towards macrophytes // *Rus. Journ. General Chem.* 2013. Vol. 83, N 13. P. 2614-2617.
- Perrot-Minnot M.-J. et al. Host manipulation revisited: no evidence for a causal link between altered photophobia and increased trophic transmission of amphipods infected with acanthocephalans // *Functional Ecol.* 2012. Vol. 26. P. 1007-1014.
- Sjollema S. B. et al. Laboratory algal bioassays using PAM fluorometry: Effects of test conditions on the determination of herbicide and field sample toxicity // *Environ. Toxicol. Chem.* 2014. Vol. 33, N 5. P. 1017-1022.
- Stom D. I., Geel T. A., Balayan A. E. Effect of individual phenolic compounds and their mixtures on limnolus bacterial. Part 4: Causes of the weakening of *o*- and *p*-diphenol toxicity by other phenols // *Acta Hydrochimical et Hydrobiola.* 1986. Vol. 14, N 6. P. 653-659.
- Timofeyev M. A., Shatilina J. M., Stom D. I. Attitude to temperature factor of some endemic amphipods from Lake Baikal and Holarctic *Gammarus lacustris* Sars, 1863: A comparative experimental study // *Arthropoda Selecta.* 2001. Vol. 10, N 2. P. 93-101.
- Varaksin A. N. et al. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: A case study of sub-chronic experimental intoxication with cadmium and lead // *Food and Chem. Toxicol.* 2014. Vol. 64. P. 144-156.
- Zhao X., Chen L., Zhang H. Nitrate and ammonia contaminations in drinking water and the affecting factors in Hailun, northeast China // *J. Environ. Health.* 2013. Vol. 75, N 7. P. 28-34.

The Bioassay of Toxicity Based on the Phototaxis of Baikalian Amphipods

D. I. STOM^{1,2}, G. O. ZHDANOVA¹, M. N. SAKSONOV¹, A. E. BALAYAN¹, M. Yu. TOLSTOY³

¹ Irkutsk State University
664003, Irkutsk, Lenin str., 3
E-mail: stomd@mail.ru

² The Baikal Museum at the ISC, SB RAS
664520, Listvyanka, Akademicheskaya str., 1

³ Irkutsk National Research Technical University
664074, Irkutsk, Lermontov str., 83

In this study, amphipods *Eulimnogammarus vittatus* were evaluated as test organisms for use in aquatic toxicity bioassays. Dependence of the time of departure of organisms from the light on presence of toxicants was studied. The most rapid response to light was established in pure Baikal water. Presence of pollutants retarded moving of *E. vittatus* individuals to the dark areas. A similar effect was observed in the experiments with heavy metals, detergents, and petroleum products. The results obtained indicate good prospects of using this test reaction of *E. vittatus* as a biological assay for toxic contamination.

Keywords: phototaxis, toxicity, *Eulimnogammarus vittatus*, bioassay.