

Действие тяжелых металлов на трофическую активность дафний в зависимости от условий питания и возраста рачков

Т. Л. ШАШКОВА, Ю. С. ГРИГОРЬЕВ

Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79
E-mail: office@sfu-kras.ru

Статья поступила 20.12.2012

АННОТАЦИЯ

Изучено влияние условий экспонирования рачков дафний на их трофическую активность и чувствительность к тяжелым металлам. Для регистрации трофической активности рачков использовали изменение интенсивности нулевого уровня быстрой флуоресценции водоросли хлорелла, используемой в качестве корма. Определены оптимальные условия (плотность посадки, возраст тест-организмов, режим их кормления и время экспонирования), при которых регистрируются высокий уровень трофической активности и чувствительность рачков к загрязнению. Предложена схема постановки эксперимента, при которой рачки сначала подвергаются воздействию токсиканта, а затем в культивационную среду вносится суспензия водоросли.

Ключевые слова: биотестирование, тяжелые металлы, *Daphnia magna* Straus, 1820, трофическая активность, *Chlorella vulgaris* Beijer, флуоресценция хлорофилла.

В настоящее время при биотестировании загрязненных вод на дафниях оценка острого токсического действия проводится по показателю смертности рачков. Влияние низкого уровня загрязнения, оказывающего сублетальный эффект, оценивается как хроническое токсическое действие и выявляется в более длительных наблюдениях за ростом и размножением тест-организмов [Арсан, 2007; Филенко, 2007; Vosyliene, 2007]. Вместе с тем первичные проявления действия токсикантов на организм могут быть обнаружены по изменению его физиологических и поведенческих функций. В связи с этим в последнее время предлагается ряд быстрых способов обнаружения токсичности водной среды на сублетальном уровне, одним из ко-

торых является оценка трофической активности низших ракообразных [Цвылев и др., 1983; Маторин и др., 1990; Bitton et al., 1996; McWilliam, Barid, 2002; Barata et al., 2008; Yi et al., 2010]. Однако широкому использованию этого методического приема в экологическом контроле препятствует отсутствие четкого регламента проведения токсикологического эксперимента. Кроме того, определенные трудности связаны с осуществлением надежной регистрации скорости потребления корма рачками в токсикологическом эксперименте.

Известно, что показатель трофической активности зависит не только от степени токсического воздействия, но и от многих факторов окружающей среды [Гутельмахер,

Алимов, 1979]. Варьирование условий проведения токсикологического эксперимента может в значительной степени влиять на воспроизводимость получаемых результатов. В связи с этим целью исследования является изучение влияния различных условий экспонирования на трофическую активность дафний и их чувствительность к тяжелым металлам, используемым в качестве модельных токсикантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выращивание и кормление культуры ветвистоусых ракообразных (*Daphnia magna* Straus, 1820) проводили по методике [Григорьев, Шашкова, 2006] и содержали в климатостате Р2 при температуре 20 ± 1 °С и фотопериодическом освещении (12 часов день, 12 часов ночь). Трофическую активность дафний определяли по степени снижения концентрации корма, зеленой одноклеточной водоросли (*Chlorella vulgaris* Beijer), в среде с рачками. Для компенсации возможного изменения концентрации клеток водоросли в результате их деления за время экспонирования в эксперимент дополнительно вводили пробирки с суспензией хлореллы в отсутствие рачков.

Уменьшение числа клеток водоросли в результате питания рачков определяли по снижению интенсивности флуоресценции водорослевой суспензии. Выбор данного показателя объясняется тем, что для оперативного определения трофической активности рачков необходимо работать с малыми концентрациями клеток водоросли. При этом надежную регистрацию таких суспензий клеток можно обеспечить измерением интенсивности флуоресценции хлорофилла клеток.

Для регистрации трофической активности рачков использовали изменение интенсивности нулевого уровня быстрой флуоресценции водоросли. Величина этого показателя напрямую связана с концентрацией клеток в среде и мало зависит от их физиологического состояния [Гольд и др., 1984]. Флуоресценцию измеряли на флуориметре “Фотон-10” при возбуждении светом с длиной волны 520 нм низкой интенсивности ($0,1 \text{ Вт/м}^2$), не способной запустить процесс фотосинтеза.

Перед началом эксперимента была исследована зависимость интенсивности флуоресценции от оптической плотности суспензии водорослей, используемой как мера содержания клеток в среде. Показано, что между величиной разбавления исходной суспензии водоросли, содержащей 0,6 млн клеток на 1 мл среды (оптическая плотность 0,04, в кювете 2 см при длине волны 560 нм, прибор ИПС-03), и интенсивностью флуоресценции существует прямо пропорциональная зависимость.

Расчет трофической активности дафний, выражаемой как доля изъятия корма рачками за установленное время, производился по формуле

$$TA = \frac{F_{\text{хл}} - F_{\text{хл+р}}}{F_{\text{хл}}},$$

где TA – трофическая активность; $F_{\text{хл}}$ – показатель флуоресценции суспензии хлореллы, экспонированной без рачков; $F_{\text{хл+р}}$ – показатель флуоресценции суспензии хлореллы, экспонированной с рачками.

В качестве модельных токсикантов при оценке чувствительности показателя трофической активности дафний к поллютантам использовались растворы солей тяжелых металлов ($\text{CdSO}_4 \times 8/3\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) в дистиллированной воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость потребления корма тест-культурой дафний зависит от концентрации клеток, объема водорослевой суспензии и количества рачков в ней. Влияние этих факторов на трофическую активность можно выразить следующей формулой [Orchard et al., 2002]:

$$F = \frac{V(C_i - C_f)}{nt},$$

где F – скорость поедания клеток водорослей одной дафнией в час; V – объем раствора; C_i – исходная концентрация клеток водоросли в растворе; C_f – конечная концентрация клеток водоросли в растворе; n – количество рачков в исследуемом растворе; t – время экспонирования (ч).

Согласно данному выражению, высокие значения трофической активности достигаются разными способами. Например, увеличи-

Зависимость трофической активности дафний от плотности их посадки и количества добавляемого корма (хлореллы)

Количество дафний во флаконе, шт.	Количество добавляемого корма, D		
	0,01	0,02	0,04
Трофическая активность, %			
5	47,6 ± 9,3	25,3 ± 6,7	8,6 ± 8,5
10	89,8 ± 3,5	52,4 ± 5,0	28,0 ± 5,7
15	98,5 ± 4,6	80,2 ± 2,1	41,0 ± 6,4

П р и м е ч а н и е. Концентрация корма выражена в величинах оптической плотности культуральной среды после внесения в нее клеток водоросли. Время экспонирования – 17 ч.

вая количество дафний, приходящееся на единицу объема, можно сократить время, необходимое для поглощения предложенного им корма, до нескольких часов. Однако, если использовать этот прием при постановке токсикологического эксперимента, то чувствительность биотеста может упасть, поскольку в этих условиях на каждую особь будет приходиться меньшее количество токсичных веществ [Шашкова, Григорьев, 2006]. Кроме того, степень воздействия токсикантов на рачков будет еще ниже в результате сокращения времени их контакта с поллютантами [Yu, Wang, 2002], поэтому уменьшение длительности эксперимента с целью получения более быстрого ответа оправдано только до определенных пределов. Наиболее оптимальным представляется вариант проведения теста на токсичность при использовании небольшого числа рачков, достаточного для получения статистически достоверного результата, и невысоком содержании корма в среде.

Исследованы различные варианты плотности посадки рачков и количества добавляемого корма. Результаты показали (см. таблицу), что количество съедаемого корма возрастает пропорционально увеличению числа рачков в единице объема. Эта закономерность наиболее четко прослеживается при помещении рачков в воду, где исходное содержание водорослевого корма соответствует более низкой оптической плотности суспензии ($D = 0,02$). Это может быть связано с тем, что при малом количестве клеток в среде и больших плотностях посадки дафний возникает дефицит корма. И наоборот, при меньшей плотности посадки (пять дафний во флаконе) и высоком содержании корма ($D = 0,04$)

доля его потребления была очень мала. При этом в условиях избытка корма нельзя исключить возможность снижения скорости питания рачков в результате переполнения у них желудочно-кишечного тракта и засорения фильтрующего аппарата [Гутельмахер, Алимов, 1979].

На основании анализа полученных данных и с учетом обстоятельств, описанных выше, для оценки токсического действия на трофическую активность дафний представляется наиболее оправданным использование варианта с плотностью посадки 10 рачков на каждую пробу воды объемом 50 мл и исходным содержанием корма в среде, эквивалентным оптической плотности $D = 0,02$. Время, необходимое рачкам для поглощения из среды большей части водоросли, находится в диапазоне 16–20 часов. Указанная длительность эксперимента обеспечивает не только достаточный период воздействия токсиканта на тест-организм, но и позволяет минимизировать возможное влияние ритмов питания дафний на результаты определения скорости потребления корма. Поскольку большая часть этого времени приходится на ночные часы, то это также позволяет максимально снизить прирост численности клеток водоросли в период проведения токсикологического эксперимента.

При исследовании действия токсикантов на функциональные показатели рачков дафний необходимо учитывать тот факт, что их чувствительность может варьировать в зависимости от возраста и размера [Stuhlbacher et al., 1993]. Так, молодые дафнии вследствие более эффективной фильтрации аккумулируют на единицу веса больше тяжелых ме-

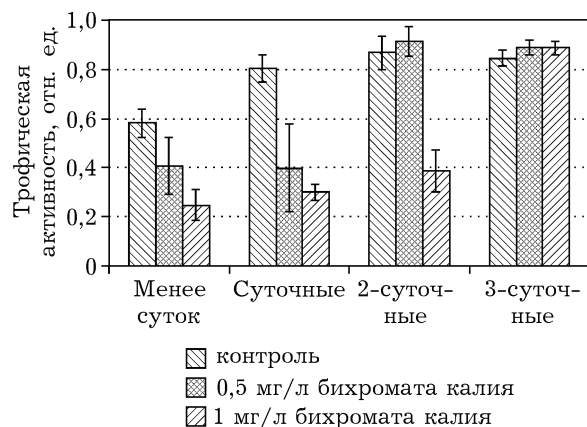


Рис. 1. Зависимость показателя трофической активности от возраста рачков дафний и концентрации токсиканта (бихромата калия) в среде

таллов по сравнению с более крупными и зрелыми особями [Брагинский, 2000; Yu, Wang, 2002]. Вместе с тем возраст тест-организмов влияет и на величину измеряемой трофической активности, поскольку количество потребляемой животным пищи напрямую зависит от его размеров: более взрослые и крупные особи за то же время съедают больше пищи [Лузгин, 1990; Hanazato, 1998].

В связи с этим представляло интерес определить возраст дафний, при котором рачки проявляют высокие уровни трофической активности и достаточную чувствительность к загрязнителям.

Результаты экспериментов, проведенных с рачками различного возраста и представленные на рис. 1, показывают, что более зрелые особи съедали больше внесенного корма. Однако при этом степень воздействия модельного токсиканта на трофическую активность дафний была существенно ниже.

Если у рачков суточного возраста уменьшение трофической активности на 50 % наблюдалось при концентрации бихромата калия 0,5 мг/л, то у двухсуточных особей такое снижение тест-функции отмечалось только при концентрации 1 мг/л токсиканта. Трехсуточные дафнии сохраняли высокую скорость потребления корма при всех концентрациях вносимого токсиканта. Таким образом, наиболее подходящей для использования в токсикологическом эксперименте можно считать возрастную группу дафний старше одних, но моложе двух суток.

Существенное влияние на величину трофической активности рачков может оказать их энергетический статус, которым они обладают на момент проведения биотеста [Гилларов, 1980]. Очевидно, что рачки, испытывавшие временное отсутствие пищи, более интенсивно потребляют корм и, возможно, более уязвимы к воздействию токсиканта. Это предположение подтверждено в экспериментах с бихроматом калия (рис. 2).

Действительно, суточные рачки дафний, выдержанные в отсутствии корма в течение двух часов, проявляли большую трофическую активность в контрольном варианте опыта, а в присутствии токсиканта наблюдалось большее снижение скорости потребления корма, чем у не голодавших рачков.

Отметим, что при одновременном внесении в среду рачков и водоросли токсикант, находящийся в воде, частично поглощается клетками хлореллы и становится не полностью доступным для рачков дафний. К тому же поглощенный клетками водоросли токсикант через воздействие на их физиологическое состояние может вызывать изменение квантового выхода флуоресценции и, как следствие, искажать результаты измерения концентрации корма в среде. В связи с этим было решено сначала экспонировать рачков в растворе токсиканта, а затем добавлять корм в среду. Тогда дафнии получают воздействие полной концентрации токсиканта, и при этом испытывают голодание. Внесенный после прямого контакта с токсикантом корм менее подвержен его влиянию, поскольку часть токсиканта поглощается рачками.

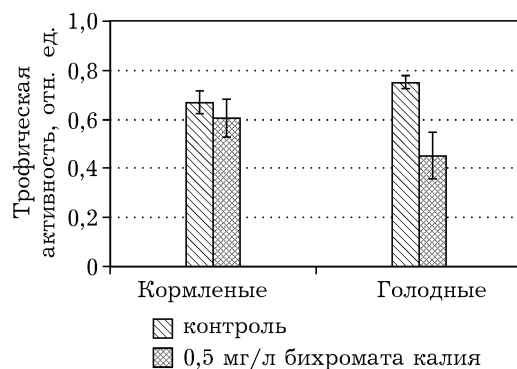


Рис. 2. Влияние предварительного голодания на трофическую активность дафний к модельному токсиканту

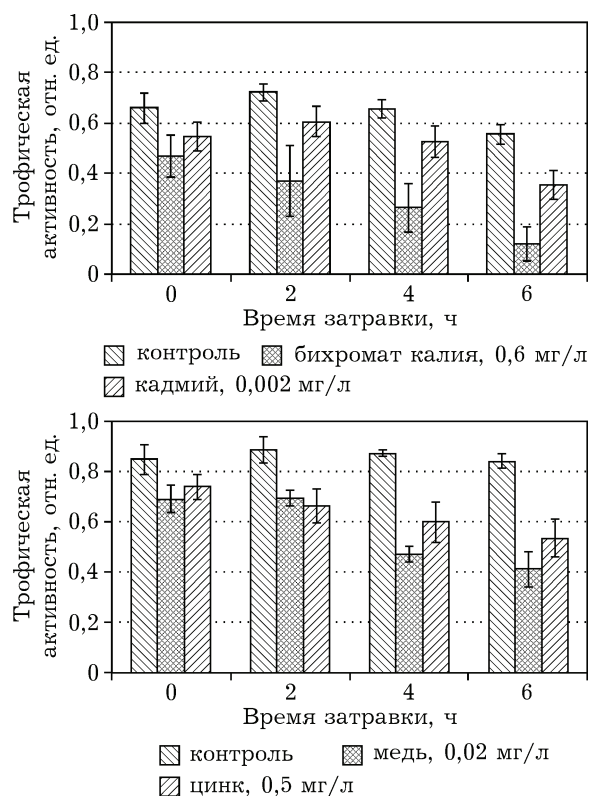


Рис. 3. Действие ионов тяжелых металлов на трофическую активность дафний при внесении корма (хлореллы) в среду с рачками после 2, 4 и 6 часов экспонирования с токсикантами

При этом сами дафнии после периода голодания более активно потребляют клетки водоросли. Вопрос состоит только в том, насколько длительным должен быть этот период?

С этой целью была проведена серия экспериментов по определению влияния нескольких тяжелых металлов на способность дафний потреблять корм после различной продолжительности предварительного контакта с этими токсикантами.

Результаты показали (рис. 3), что при увеличении длительности пребывания рачков в среде с тяжелыми металлами их токсическое действие существенно возрастает. В то же время задержка в кормлении рачков на шесть часов вызывает снижение интенсивности их питания в контрольном варианте. Кроме того, дальнейшее увеличение сроков этой фазы токсикологического эксперимента нецелесообразно, так как может усложнить саму процедуру биотестирования. Поэтому оптимальное время контакта рачков с тести-

руемой пробой воды, предшествующее внесению в нее корма, равно 5 ч.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить условия токсикологического эксперимента по изменению трофической активности дафний, при которых обеспечивается наибольшая чувствительность данной тест-функции к токсикантам.

ЛИТЕРАТУРА

- Арсан О. М. Состояние и перспективы развития водной экотоксикологии // Гидробиол. журн. 2007. Т. 43, № 6. С. 50–64.
- Брагинский Л. П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Там же. 2000. Т. 36, № 5. С. 50–70.
- Гиляров А. М. Зоология беспозвоночных: в 2 т. М.: Мир, 1980. Т. 3. Биология ветвистоусых ракообразных. 117 с.
- Гольд В. М., Гаевский Н. А., Григорьев Ю. С., Попельницкий В. А., Гехман А. В. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла: Учебное пособие // Красноярск: Изд-во КГУ, 1984. 82 с.
- Григорьев Ю. С., Шашкова Т. Л. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной, природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus (ПНД Ф 14.1:2:4.12-06 16.1:2.3.3.9-06) // М., 2006. 44 с.
- Гутельмахер Б. Л., Алимов А. Ф. Количественные закономерности фильтрационного питания водных животных // Общие основы изучения водных экосистем / под ред. Г. Г. Винберга. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1979. С. 171–193.
- Лузгин В. К. Динамика чувствительности популяции дафний на разных фазах ее развития к воздействию токсикантов // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: Изд-во Ярославск. ун-та, 1990. С. 64–68.
- Маторин Д. Н., Вавилин Д. В., Венедиктов П. С. О возможности использования флуоресцентных методов для изучения питания ракообразных // Биол. науки. 1990. № 1. С. 146–152.
- Филенко О. Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды // Экологические системы и приборы. 2007. № 6. С. 18–20.
- Цвылев О. П., Переладов М. В., Патин С. А. Авт. свид. СССР № 1029079. Кл. G 01 N 33/52. 1983.
- Шашкова Т. Л., Григорьев Ю. С., Березина О. А. Влияние условий среды на чувствительность рачков *Daphnia magna* к токсикантам // Вестн. Краснояр. ун-та. Сер. Естественные науки. 2006. № 5/1. С. 81–85.
- Barata C., Alanon P., Gutierrez-Alonso S., Riva M. C., Fernandez C., Tarazona J. V. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents // Sci. Total Environ. 2008. Vol. 405, N 1/3. P. 78–86.
- Bitton G., Rhodes K., Koopman B. Ceriofast™: an acute toxicity test based on *Ceriodaphnia dubia* feeding

- behavior // Environ. Toxicol. Chem. 1996. Vol. 15, N 2. P. 123–125.
- Hanazato T. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals // Chemosphere. 1998. Vol. 36, N 8. P. 1903–1909.
- McWilliam R. A., Barid D. J. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna* // Environ. Toxicol. Chem. 2002. Vol. 21, N 6. P. 1198–1205.
- Orchard S. J., Holdway D. A., Barata C., Van Dam R. A. A Rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical Cladoceran *Moinodaphnia macleyi* // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2002. Vol. 53. P. 12–19.
- Stuhlbacher A., Bradley M. C., Naylor C., Calow P. Variation in the development of cadmium resistance in *Daphnia magna* Straus; effect of temperature, nutrition, age and genotype // Environ. pollution. 1993. Vol. 80. P. 153–158.
- Vosyliene M. Z. Review of the methods for acute and chronic toxicity assessment of single substances, effluents and industrial waters // Acta Zoologica Lituonica. 2007. Vol. 17, N 1. P. 3–15.
- Yi X., Kang S.-W. and Jung J. Long-term evaluation of lethal and sublethal toxicity of industrial effluents using *Daphnia magna* and *Moina macrocopa* // J. of Hazardous Materials. 2010. Vol. 178. P. 982–987.
- Yu R.-Q. and Wang W.-X. Kinetic uptake of bioavailable cadmium, selenium, and zinc by *Daphnia magna* // Environ. Toxicol. Chem. 2002. Vol. 21, N 11. P. 2348–2355.

Influence of Heavy Metals on Feeding Rate of *Daphnia magna* under Different Feeding Conditions and Age of Crustaceans

T. L. SHASHKOVA, Yu .S. GRIGORIEV

Siberian Federal University
660041, Krasnoyarsk, Svobodniy ave., 79
E-mail: office@sfu-kras.ru

The influence of *Daphnia* exposure conditions on the feeding rate and sensibility to heavy metals was studied. To record the feeding rate of *Daphnia*, we used the changes of the intensity of zero level of rapid fluorescence of alga which was used as feed. The optimal conditions (stocking density, the age of test organisms, feeding schedule and exposure time) which provide the high level of feeding rate and sensibility of *Daphnia* to pollution were determined. The experiment design proposed includes at first the exposure of *Daphnia* to the toxic pollutant, and then *Chlorella* suspension is introduced into water solution.

Key words: bioassay, heavy metals, *Daphnia magna*, feeding rate, *Chlorella vulgaris*, chlorophyll fluorescence.