

УДК 595.324.2

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДАФНИЙ КАК ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЙ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРА

Авдеев С. В., Кан А. Е., Колодяжный Е. И., Шинелев М. В.

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Волгоград, Россия, e-mail: 16b1kan@bk.ru

Аннотация

Целью данной статьи является обзор литературы, характеристика биообъекта с точки зрения биологии (морфологии, цикла развития) и обсуждение использования дафнии в тестах на токсичность в контексте того, что мы понимаем о биологии данного организма. Например, был проведен тест влияние питания и голодания на чувствительность дафнии к токсиканту и на схему теста. В данном случае, отклонение данных хронических исследований может быть ошибкой, вызванной непостоянным качеством пищи, конкуренцией между особями, тестированием видов жесткой воды в мягкой воде и другими параметрами окружающей среды, которые не учитывались в эксперименте. Также в обзоре присутствуют основные требования, соблюдение которых необходимо для проведения достоверного исследования.

Ключевые слова: дафния, культивирование, строение, экотоксикология, биоиндикация

PRACTICAL APPLICATION OF DAPHNIA AS A SUBJECT OF RESEARCH AS A BIOINDICATOR

Avdeev S. V., Kan A. E., Kolodyazhny E. I., Shinelev M.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, training direction "Biology," Volgograd, Russia, e-mail: 16b1kan@bk.ru

Summary

The purpose of this article is to review the literature, characterize the bio-object from the point of view of biology (morphology, development cycle) and discuss the use of daphnia in toxicity tests in the context of what we understand about the biology of a given organism. For example, the effects of nutrition and fasting on the sensitivity of daphnia to toxicant and on the test pattern were tested. In this case, the rejection of chronic research data may be an error caused by unstable food quality, competition between individuals, testing of hard water species in soft water, and other environmental parameters that were not considered in the experiment. The review also contains basic requirements, which are necessary to carry out a reliable study.

Key words: daphnia, cultivation, structure, ecotoxicology, bioindication

Введение

В водной токсикологии в качестве тест-объектов широко применяются планктонные ветвистоусые ракообразные (*Cladocera*), в частности дафнии (лат. *Daphnia*).

Это обусловлено прежде тем, что род дафнии широко распространен в пресной воде и является ключевым звеном во многих водных пищевых цепях; благодаря прозрачности тела дафнии можно визуальнo наблюдать качество эмбрионов, скорость их созревания, скорость их размножения, а также оценивать физиологическое состояние (частота сердечных сокращений, кишечное наполнение, и т. д.) объекта, подлежащего проверке;

- можно регулярно оценивать несовершеннoлетних по их морфологическим характеристикам, а также по выживаемости поколений родитель-дочь;
- род Дафнии имеет относительно короткий жизненный цикл, что особенно важно для тестирования на фертильность;
- род Дафнии используется в качестве одного из наиболее чувствительных индикаторов (сенсоров) присутствия тяжелых металлов и фосфорорганических пестицидов в водной среде [9].

Наиболее универсальным объектом испытаний на чувствительность и адекватность реакции на различные токсиканты является вид *Daphnia* - *Daphnia magna* Straus. Он имеет короткий жизненный цикл и требуют минимального пространства и оборудования для выращивания и тестирования.

Впервые этот тип дафний в качестве тестового объекта был использован в работе Е. Наумана в 1933 году. Дафния широко используется в биологических тестах в таких странах мира, как США, Германия, Франция, Венгрия и др. Во многих из них дафния считается стандартным тест-организмом. В СССР первая работа с была связана с исследованиями Н.

С. Строгонова и его школы Е. А. Веселовой и Л. А. Лесниковой. Дафния как обязательный испытательный объект включена в программу создания ПСК для загрязняющих веществ и сточных вод в России.

Морфология

Daphnia magna Straus имеет серо-желтую или красноватую окраску (при дефиците кислорода), не превышает 2-3 мм в длину, обитает в водоёмах, прудах, озерах почти повсеместно.

Рисунок 1 Строение дафнии

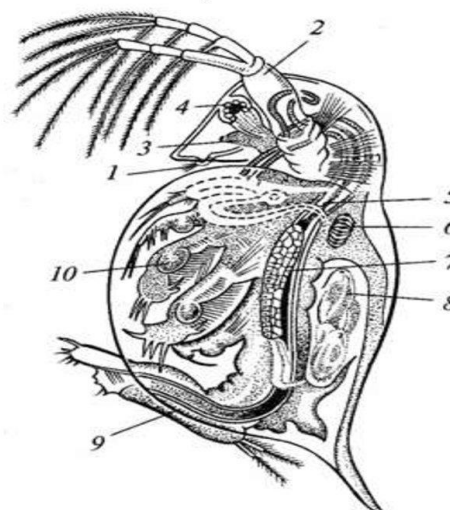
Жизненный

При

цикл

Строение дафнии

- 1-антеннула
- 2-антенна
- 3-мозг
- 4-сложный глаз
- 5-кишка
- 6-сердце
- 7-яичник
- 8-выводковая камера
- 9-щетинка
- 10-грудные ножки



благоприятных условиях лаборатории *Daphnia* размножаются большую часть года без оплодотворения, то есть партеногенетически, производя потомство, состоящее из самок. Период созревания ракообразных при температуре 20 ± 2 °С и правильном питании составляет 5-8 дней. Продолжительность эмбрионального развития обычно составляет от 3

до 4 дней. По истечении этого времени происходит вымет молодки. Партеногенетические поколения следуют одно за другим каждые 3-4 дня.



Рисунок 2 Стадии развития

Развитие ракообразных *Daphnia magna* Straus проходит три стадии: новорожденный, молодка и взрослые. При температуре 20 ° С развитие недавно вылупившихся новорожденных организмов до взрослой стадии происходит через 7 дней. Новорожденные дафнии выпускаются непосредственно из яйцевого мешка женской особью *Daphnia magna* Straus в течение 1-2 сут.

Для

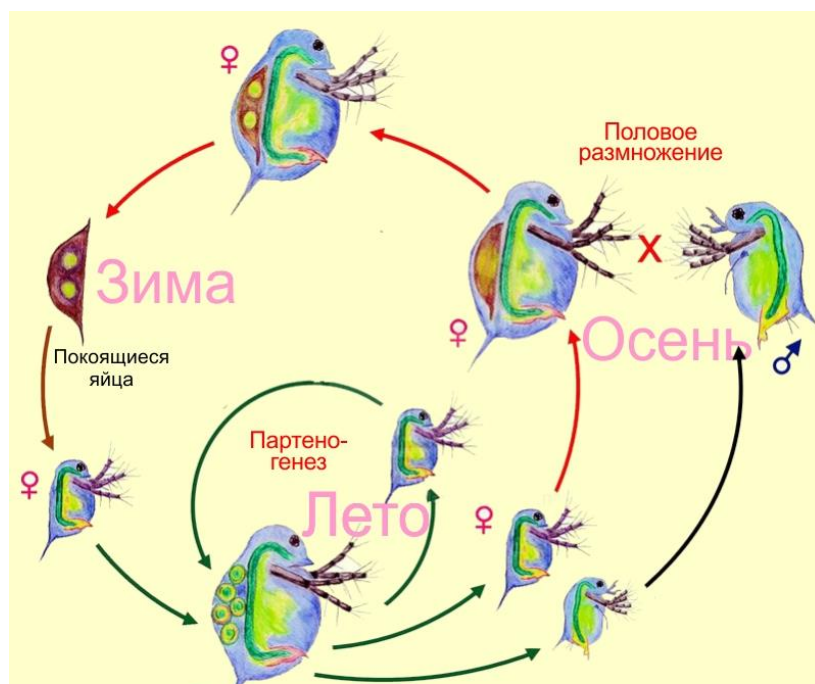


Рисунок 3 Сезонная схема размножения

культивирования дафний используется биологизированная вода из аквариума, кормом

служат зеленые водоросли (хлорелла). Культуру выращивают в специальном климостате при температуре 20 ± 2 оС и освещенности 400-600 лк при продолжительности светового дня 12-14 часов.

Моделирование биологических исследований

В токсикологических исследованиях даются различные биологические тесты (до 96 часов) и долгосрочные (до 20 дней). Краткосрочное исследование предназначено для получения экспресс-информации о состоянии тестовой формации, где показателем является выживаемость. Для того, чтобы оценить долгосрочный эффект токсинов.

Большинство методов биоанализа используют данные о смертности от воздействия загрязнителей. Современные объекты влияют на динамику их поведенческой активности. При воздействии загрязняющих веществ в дафнии наблюдается либо резкое увеличение двигательной активности, либо наоборот, замедление. Таким образом, токсичность воды может быть определена.

Стоит отметить, что было проведено несколько работ, в результате которых изменилась размерность фракционной структуры.

Основными методами биоанализа являются методы регистрации смертности от загрязняющих веществ. Токсины влияют на изменение их поведенческой активности. Сильный рост двигательной активности или наоборот, замедление. Таким образом, регистрация изменений в плавательной активности позволяет определить токсичность воды на ранней стадии.

Было проведено несколько исследований, в результате которых были идентифицированы токсичные вещества.

Биологический анализ острой токсичности проводят на начальном испытании воды или водного экстракта из почв, осадков сточных вод, отходов и нескольких их разведений. в трех параллельных сериях. В качестве контроля используются три параллельные серии с водой для культивирования.

Биотестирование проводится с соблюдением требований по продолжительности фотопериода, температуре и качеству воды для культивирования.

Биотестирование проводится в химических стаканах вместимостью 150 - 200 см³, которые заполняют 100 см³ тестируемой воды, в них помещаются десять дафний в возрасте от 6 до 24 часов. Чувствительность дафнии к токсикантам зависит от возраста ракообразных, поэтому в протоколе указывается возраст используемых молоди. Возраст определяется размером ракообразных, которые обеспечивают фильтрацию ракообразных через набор сит. Дафния добывается у культиваторов, в которых выращивается синхронизированная культура. Однолетних ракообразных высаживают в отдельный химический стакан после

фильтрации через набор сит, а затем их по одному захватывают пипеткой (с распиленным и расплавленным концом) емкостью 2 см³ с резиновой колбой. Поместите ракообразных один за другим в сетку, через которую воду сливают в отдельный химический стакан, после чего сетку дафнии вводят в стаканы с исследуемой водой.

Высадка ракообразных начинается с контрольной серии. Дафнию помещают в исследуемые растворы, начиная с больших разведений (более низкие концентрации загрязняющих веществ) до более низких разведений. После каждой посадки в испытуемые растворы сеть тщательно промывают в сосуде объемом 2 дм³ с водой для культивирования. Для работы с серией контроля должна быть отдельная сеть.

Следует избегать образования масляных капель или пленок на поверхности раствора и создать барьер для доступа ракообразных к поверхности исследуемых растворов с использованием сетки мельничного газа.

Для каждой серии тестовой воды используются 3 мензурки. Общее количество очков, использованных в экспериментах, в три раза превышает сумму всех разведений плюс 3 для исходной воды и 3 для контроля.

В экспериментах по определению острой токсичности дафнию вводят перед началом эксперимента, на следующий день, каждый день.

В экспериментах по определению острой токсичности растворы не меняются.

Учет смертности от дафнии в эксперименте и контроль проводят каждый час до конца первого дня эксперимента, а затем 2 раза в день ежедневно, пока не пройдет 96 часов.

Результаты наблюдений заносятся в рабочий журнал. Если смертность дафний в контроле превышает 10 %, результаты не учитываются.

После учета результатов эксперимента дафний отделяют, и в каждом стакане проводят измерения физико-химических показателей: рН (7,0 - 8,5), температуры, содержания растворенного кислорода (не ниже 2 мг/дм³). Все отклонения от установленных норм также вносятся в журнал и протокол результатов.

Для определения хронического токсического действия острый эксперимент продолжают с использованием контроля и серии разбавлений, в которых острое токсическое действие не проявилось. За исходную воду принимают разбавление исследуемых вод, водных вытяжек из почв, осадков, отходов, не вызвавшее острого токсического действия. Эксперимент продолжается

24

дня.

Определение токсичности каждой пробы и каждого разбавления проводят в 3-х параллельных сериях, что сопровождают одной для всех разбавлений серией контроля в 3-х стаканах.

х

Проводят процедуру приготовления растворов и посадки рачков. Биотестирование проводят с соблюдением требований по протоколам. При наличии фиксируют вынужденные нарушения требуемых условий. В экспериментах по определению хронического токсического действия кормят дафний перед началом эксперимента и в последующие дни один раз в сутки. Смена растворов на новые осуществляют через каждые пять суток из свежесобраных проб или из проб, хранящихся в холодильнике при температуре от +2,5 °С до +4 °С. Для смены растворов готовят 3 параллельных ряда испытуемых разбавлений (и контроль), куда из старых растворов выжившие дафнии переносят с помощью сачка, на который они помещаются пипеткой объемом 2 см³ в свежеприготовленные растворы. Старые растворы профильтровывают через сито из мельничного газа и на нем производят подсчеты родившейся молоди, а в растворах проводят измерения физико-химических параметров. Содержание растворенного кислорода в конце хронического эксперимента должно быть не ниже 2 мг/дм³, рН 7,0 - 8,5. Учет смертности и родившейся молоди в опыте и контроле проводят один раз в сутки ежедневно до конца хронического опыта. Кроме подсчета погибших дафний, учитывают количество молоди и абортивных яиц. Погибших дафний, абортивные яйца, молодь подсчитывают и удаляют пипеткой. Прекращают эксперимент в стаканах с погибшей самкой. Родившуюся молодь подсчитывают и выбрасывают. Результаты экспериментов заносят в рабочий журнал.

Вывод

Таким образом, о дафниях можно говорить как о широко распространенном модельном объекте для изучения биозагрязнений.

Список литературы

[Дафния](#) // [Энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона](#) : в 86 т. (82 т. и 4 доп.). — СПб., 1890—1907.

Моисеенко, Т.И. Экотоксикологический подход к оценке качества вод / Т.И. Моисеенко // Водные ресурсы. 2005. - Т. 32. - №2. - С. 184-195.

Методы биотестирования водной среды / (Текст): науч. изд. / под ред. О.Ф. Филенко. М.: Изд-во МГУ, 1989. - 124с.

Крючкова, Н.М. Трофические взаимоотношения зоопланктона и фитопланктона (Текст): науч. изд. / Н.М. Крючкова. -М.: Наука, 1989. -124 с.

Alexey A Kotov, Derek J Taylor. [Mesozoic fossils \(>145 Mya\) suggest the antiquity of the subgenera of Daphnia and their coevolution with chaoborid predators](#) // BMC Evolutionary Biology. — 2011-05-19. — Vol. 11. — P. 129.