

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Самойлова Татьяна Александровна

ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ТОКСИЧНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ  
НА СОЛОНОВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ В КУЛЬТУРЕ

03.00.18. – гидробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре гидробиологии  
Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Филенко Олег Федорович**

**Научный консультант:** кандидат биологических наук  
**Исакова Евгения Филипповна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Симаков Юрий Георгиевич**  
кандидат биологических наук  
**Ларин Владимир Евгеньевич**

**Ведущее учреждение:** ФГУП «АзНИИРХ»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г. В \_\_\_ час. на заседании  
Диссертационного совета Д 501.001.55 при Московском государственном университете  
им. М.В. Ломоносова по адресу: 119889, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, кор. 12, МГУ  
им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета

Кандидат биологических наук

Н.В. Карташева

## Общая характеристика работы

**Актуальность исследования.** Проблема исследования загрязнения морской среды приобрела актуальность в связи с расширением хозяйственной деятельности человека в прибрежных районах, а также с развитием морского транспорта и нефтедобычи на шельфе. Кроме того, за последние десятилетия увеличился объем сточных вод, содержащих промышленные и бытовые стоки. В связи с этим возникла необходимость разработки методик биотестирования для морской среды.

Методики исследования токсичности загрязняющих веществ на морских тест-организмах начали разрабатываться сравнительно недавно. В основе этих разработок лежат схемы проведения токсикологических исследований на пресноводных организмах, получившие широкое распространение благодаря большей востребованности по сравнению с морскими биотестами.

Для биотестирования морской среды в качестве тест-объектов обычно используют организмы, собранные в природных водоемах и адаптированные к лабораторным условиям. Однако предпочтительнее использование лабораторных культур гидробионтов, что позволяет проводить биотестирование независимо от доступности выборок природных тест-объектов и их состояния.

К числу немногих культивируемых солоноводных тест-объектов принадлежат коловратка *Brachionus plicatilis* Muller и жаброногий рачок *Artemia salina* L.

Способность тест-объектов переносить токсические нагрузки при загрязнении среды зависит от сопутствующих условий существования. В частности, считается признанным повышение токсичности тяжелых металлов для морских беспозвоночных при понижении солености воды, зачастую без учета экологических особенностей организма.

В связи с изложенным очевидна актуальность исследования хронического действия токсикантов различной химической природы, а также влияния факторов среды (солености) на токсический эффект тяжелых металлов для солоноводных организмов, относящихся к разным систематическим группам, *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina*.

### **Цель исследования:**

Выявить особенности хронических эффектов действия токсикантов различной химической природы на солоноводные организмы *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina* в ряду поколений и в модельных популяциях, при разных условиях токсического воздействия.

### **Задачи исследования:**

1. Исследовать закономерности развития *Artemia salina* и роста популяций *Brachionus plicatilis* в лабораторных условиях;
2. Исследовать влияние факторов среды (разной солености) на токсический эффект тяжелых металлов (хрома и меди) на *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina*;
3. Исследовать действие органических веществ (буровых препаратов и спиртов) на *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina* в остром и хроническом эксперименте;
4. Исследовать особенности токсического действия хрома на цитологические показатели тканей *Artemia salina*;
5. Исследовать отдаленные последствия кратковременного действия высоких концентраций хрома на *Artemia salina*.

### **Научная новизна работы.**

Впервые проведены исследования токсического эффекта металлов и органических веществ (используемых при нефте- и газодобыче) на серии поколений *Brachionus plicatilis*, а также отдаленных последствий хронического воздействия хрома на *Artemia salina* с учетом морфологических изменений и цитологических характеристик тканей артемии.

Установлен разный исход токсического эффекта на выборки и модельные популяции гидробионтов и исследованы возможные причины этого.

Выявлено различие влияния солености на токсическое действие тяжелых металлов на *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina*, которое объясняется, в частности, особенностями естественных условий обитания этих видов.

Показана опасность значительных экологических последствий, проявляющихся в ряду поколений после кратковременных воздействий токсических веществ, не вызывающих заметных эффектов непосредственно в период экспозиции.

### **Практическая значимость работы.**

Установлены условия, при которых *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina* могут применяться для целей биотестирования и экологического нормирования в хроническом режиме.

Разработаны методики исследования хронического действия веществ на *Brachionus plicatilis* в серии поколений и в условиях модельных популяций, на *Artemia salina* в серии поколений, а также методика оценки последствий кратковременного действия токсикантов на *Artemia salina*. Данные методики применяли при разработке ПДК препаратов, используемых при бурении.

Разработана и утверждена «Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L» ФР 1.39.2006.02505.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались на научной конференции «Водные экосистемы и организмы – 2» (Москва, 2000), на съезде токсикологов России (Москва, 2003), на Международной конференции «Современные проблемы водной токсикологии (Борок, 2005).

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано 8 печатных работ, в том числе 1 зарегистрированная методика.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка литературы. Список литературы содержит 137 источников, из которых 103 иностранных. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 49 таблицами.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает рассмотрение особенностей биотестирования в морской среде, источники поступления загрязняющих веществ в морские водоемы и различные аспекты применения солоноводных беспозвоночных в качестве тест-объектов в биотестировании морской среды, в том числе разнообразие видов беспозвоночных, применяемых в качестве тест-объектов, проблему их доступности и задачи культивирования. Рассмотрены экологические особенности *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina*. Обсуждается сравнительная чувствительность тест-объектов и влияние на нее фактора возраста организма и уровня организации тест-системы. Приводится обзор разнообразных показателей токсичности, применяемых в биотестировании. Обсуждаются факторы среды, влияющие на токсичность загрязняющих веществ в морской среде.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили коловратка *Brachionus plicatilis* Muller и жаброногий рачок *Artemia salina* L.

В работе использовали лабораторные партеногенетические популяции *Brachionus plicatilis*, адаптированные к разной солености (10, 20 и 30‰) в течение длительного времени. Исходным материалом для экспериментов на особях служили коловратки в

возрасте до 24 часов, на модельных популяциях – культура коловраток плотностью около 20-30 особей/мл, состоящая преимущественно из ювенильных особей.

Исходным материалом в опытах на *Artemia salina* служили науплии в возрасте до 24 часов, полученные в лаборатории из покоящихся яиц. Кроме того, для изучения жизненных показателей рачков, таких как сроки созревания, вели синхронную культуру артемии параллельно при солености 20 и 40‰.

Для культивирования коловраток искусственную морскую воду готовили на основе синтетической морской соли марки *Tropic marine*, для культивирования артемии - на основе *hw-Marinemix* (фирмы *Wiegandt*). Выбор соли был обусловлен специфичностью требований к среде артемий и коловраток.

В качестве корма для коловраток и артемии использовали одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella sp.*, которые культивировали на среде Гольдберга при искусственном круглосуточном освещении и аэрации. В дополнение к водорослям животных кормили суспензией пекарских дрожжей.

Исследовали действие тяжелых металлов на примере хрома (в форме бихромата калия  $K_2Cr_2O_7$ ) и меди (в форме хлорида меди  $CuCl_2$ ); органических веществ различной природы – спиртов (метанола и изопропанола) и препаратов, применяющихся при бурении, условно обозначенных АИФ, АДМ и АБФ:

АИФ – Алкоксилированный 4,4'-изопропилиден-бис-фенол,

АДМ – Алкоксилированный 1,3'-диизоционата метилбензол,

АБФ – Алкоксилированный 4-трет-бутилфенол;

Влияние условий солености на токсический эффект хрома и меди исследовали при солености 10, 20 и 30‰.

Хронические эксперименты на *Artemia salina* проводили при солености 20‰.

Исследования токсичности спиртов и буровых препаратов проводили при солености 30‰, кроме исследования действия метанола и препарата АДМ на модельные популяции *Brachionus plicatilis* и хронического действия препарата АДМ на *Artemia salina*, которые проводили при солености 20‰.

Выбранный диапазон солености служит моделью условий природных вод – от эстуарных с соленостью 7-10‰ до морских с соленостью 30-38‰.

Для решения поставленных задач были проведены острые и хронические эксперименты с *Brachionus plicatilis*, на уровне особи и популяции, и острые и хронические эксперименты с *Artemia salina*, включающие учет цитологических и морфологических показателей (схема проведенных исследований представлена в таблице 1).

Таблица 1. Общая схема и объем проведенных исследований.

Вид	Эксперимент	Уровень организации объекта	Длительность наблюдения	Показатели	Токсикант	Соленость
<i>Brachionus plicatilis</i>	Острый	выборки	48 ч	выживаемость	Хром, медь	10, 20, 30‰
					Метанол, изопропанол	30‰
					Буровые препараты АИФ, АДМ, АБФ	30‰
	хронический	выборки	1 поколение	Выживаемость, плодовитость	Хром, медь	10, 20, 30‰
					Метанол, изопропанол	30‰
			Буровые препараты АИФ, АДМ, АБФ	30‰		
			3 поколения	Выживаемость, плодовитость	Хром, медь	20‰
		Буровые препараты АИФ, АДМ, АБФ	30‰			
		популяции	8 суток	Плотность, доля размножающихся самок	Хром, медь	10, 30‰
метанол	20‰					
<i>Artemia salina</i>	Острый	выборки	72 ч	выживаемость	Хром, медь	10, 20, 30‰
					Метанол, изопропанол	30‰
					Буровые препараты АИФ, АДМ, АБФ	30‰
	Кратковременное действие токсиканта (24 ч)	выборки	2 поколения	Выживаемость, плодовитость, морфология	Хром	20‰
			-	Цитологические характеристики тканей	Хром	20‰
	хронический	выборки	1 поколение	Выживаемость, плодовитость	Хром, медь	20‰
					Буровой препарат АДМ	20‰

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Особенности биологии *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina*

#### в культуре при разных условиях

Для определения оптимальных условий лабораторного культивирования исследовали рост модельных популяций коловраток и выживаемость артемии в искусственной морской воде, приготовленной из соли двух марок: Tropic marine и hw-Marinemix, отличающейся от первой наличием органических добавок (витаминов и др.).

На рисунке 1 представлен рост модельных популяций коловраток в искусственной морской воде разного состава. В двух средах динамика плотности модельных популяций коловраток практически не отличалась. Таким образом для культивирования коловраток пригодны обе соли.

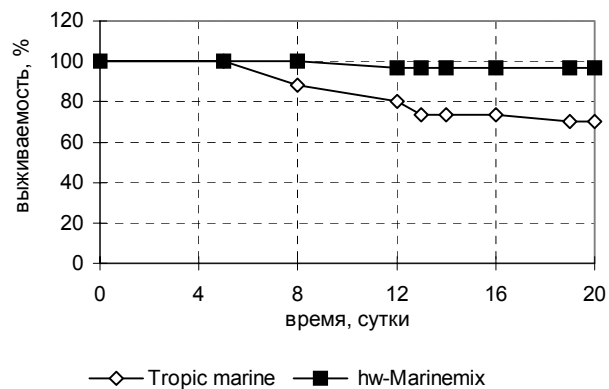
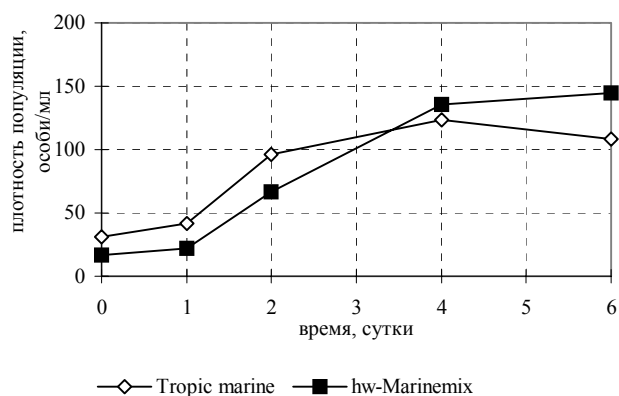


Рис. 1. Рост модельных популяций коловраток в искусственной морской воде разного состава.

Рис. 2. Выживаемость *Artemia salina* в искусственной морской воде Tropic marine и hw-Marinemix.

Выживаемость артемий в период до 4-х суток не зависела от состава среды (рис. 2), а в дальнейшем выживаемость в «Tropic marine» была значительно снижена. Рачки не достигали половозрелости, гибель составляла 30% на 20-е сутки опыта. В среде «hw-Marinemix» выживаемость рачков была высокой на протяжении всего опыта (на 20-е сутки опыта она составила 96,7%), рачки нормально росли и развивались.

Таким образом, для культивирования коловраток, а также артемий в пределах 4 суток, пригодна искусственная морская вода с минимальным набором элементов, соответствующих составу природных вод, такая как «Tropic marine». Для артемий в дальнейшем необходима среда, полностью обеспечивающая потребности рачков – такая как «hw-Marinemix», которую и использовали в дальнейших экспериментах.

При культивировании коловраток и артемий в разных условиях солености не было выявлено достоверных различий динамики плотности модельных популяций коловраток при солености 10, 20 и 30‰ (рис. 3).

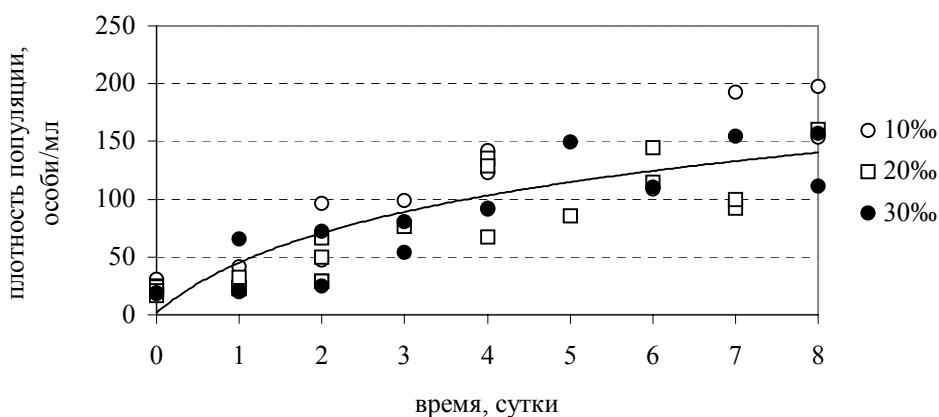


Рис. 3. Динамика плотности модельных популяций коловраток при разной солености.



Также не было выявлено различий выживаемости артемии в двух параллельных культурах при 20 и 40‰.

Исследование репродуктивных показателей в этих культурах показало, что в среднем при солености 20‰ половозрелость наступала к 39 суткам, а при 40‰ – к 28 суткам. Очевидно, это связано с тем, что *Artemia salina* является гипергалинным видом, и условия повышенной солености более комфортны для этих рачков. Такая зависимость отмечена в литературе и для природных популяций артемии.

Таким образом, полученные данные выявили высокую пластичность коловратки *Brachionus plicatilis* к осмотическим и химическим условиям среды, а также влияние солености на развитие *Artemia salina*. В связи с этим одной из поставленных задач было исследовать влияние солености на проявление токсического эффекта (на примере тяжелых металлов) на коловраток и артемий.

### Сравнение токсичности исследованных веществ

Сравнение токсичности исследованных веществ показывает, что наибольшей токсичностью для *Brachionus plicatilis* по параметру ЛК<sub>50</sub>(96) обладали тяжелые металлы; токсичность органических веществ была в несколько раз ниже (таб. 3).

Для артемий наибольшей токсичностью по параметру ЛК<sub>50</sub>(72) обладали буровые препараты; а метанол и изопропанол в исследованных концентрациях не вызывали токсического эффекта на выживаемость в остром опыте.

По показателю размножения токсичность исследованных веществ также значительно различалась для коловраток и артемий. Хром и медь были более токсичны для артемий, чем для коловраток, а препарат АДМ не вызывал репродуктивных нарушений у *A. salina*, но подавлял размножение *B. plicatilis*.

Таблица 3. Сравнение токсичности исследованных веществ для *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina*.

Вещество	<i>Brachionus plicatilis</i>		<i>Artemia salina</i>	
	ЛК <sub>50</sub> (96), мг/л (30‰)	Размножение, МДК, мг/л (30‰)	ЛК <sub>50</sub> (72), мг/л (30‰)	Размножение, МДК, мг/л (20‰)
Хром	0,001	0,3	2,6	0,035
Медь	<0,01	0,01	5,06	0,0001
Метанол	0,26	1,0	>10,0	-
Изопропанол	1,29	0,01	>10,0	-
А И Ф	0,98	0,1	0,72	-
А Д М	10,0	1,0	0,78	>2,5
А Б Ф	0,52	0,01	0,51	-

### **Сравнение токсичности хрома и меди для *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina* в остром и хроническом эксперименте**

Сравнительная токсичность хрома и меди для *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina* различалась в остром и хроническом эксперименте. Для *B. plicatilis* медь была более токсична, чем хром по показателям выживаемости и плодовитости независимо от срока наблюдения. Для *A. salina* медь была менее токсична, чем хром, в остром опыте и более токсична, чем хром, в хроническом.

Отмечено угнетающее действие меди на функцию размножения у *B. plicatilis* и *A. salina* в концентрациях, не снижающих выживаемости.

Изменение относительной чувствительности *A. salina* к тяжелым металлам в зависимости от срока наблюдения очевидно связано с тем, что медь и хром имеют разные функции - мишени, играющие определяющую роль на разных стадиях жизненного цикла и по-разному влияющие на показатели выживаемости и плодовитости. Так, в условиях хронического воздействия меди решающим фактором оказывается нарушение размножения.

### **Исследование действия токсикантов на *Brachionus plicatilis* на протяжении 3 поколений**

При действии хрома выживаемость коловраток была снижена только в F<sub>2</sub>. В концентрациях, практически не влияющих на выживаемость, хром вызывал стимуляцию плодовитости в F<sub>1</sub> (рис. 4).

Медь значительно снижала выживаемость коловраток и подавляла размножение, токсический эффект усиливался в ряду поколений. В наименьшей концентрации наблюдали восстановление величины плодовитости до уровня контроля в первом поколении с последующим ее снижением во втором поколении которое показывает, что кажущаяся адаптация коловраток к меди в концентрациях порядка 0,0001 мгCu/л сопровождается функциональными нарушениями и может привести к вырождению популяции.

Токсический эффект препарата АДМ (наиболее токсичного из трех буровых препаратов) усиливался в F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>, проявляясь в снижении выживаемости и плодовитости коловраток.

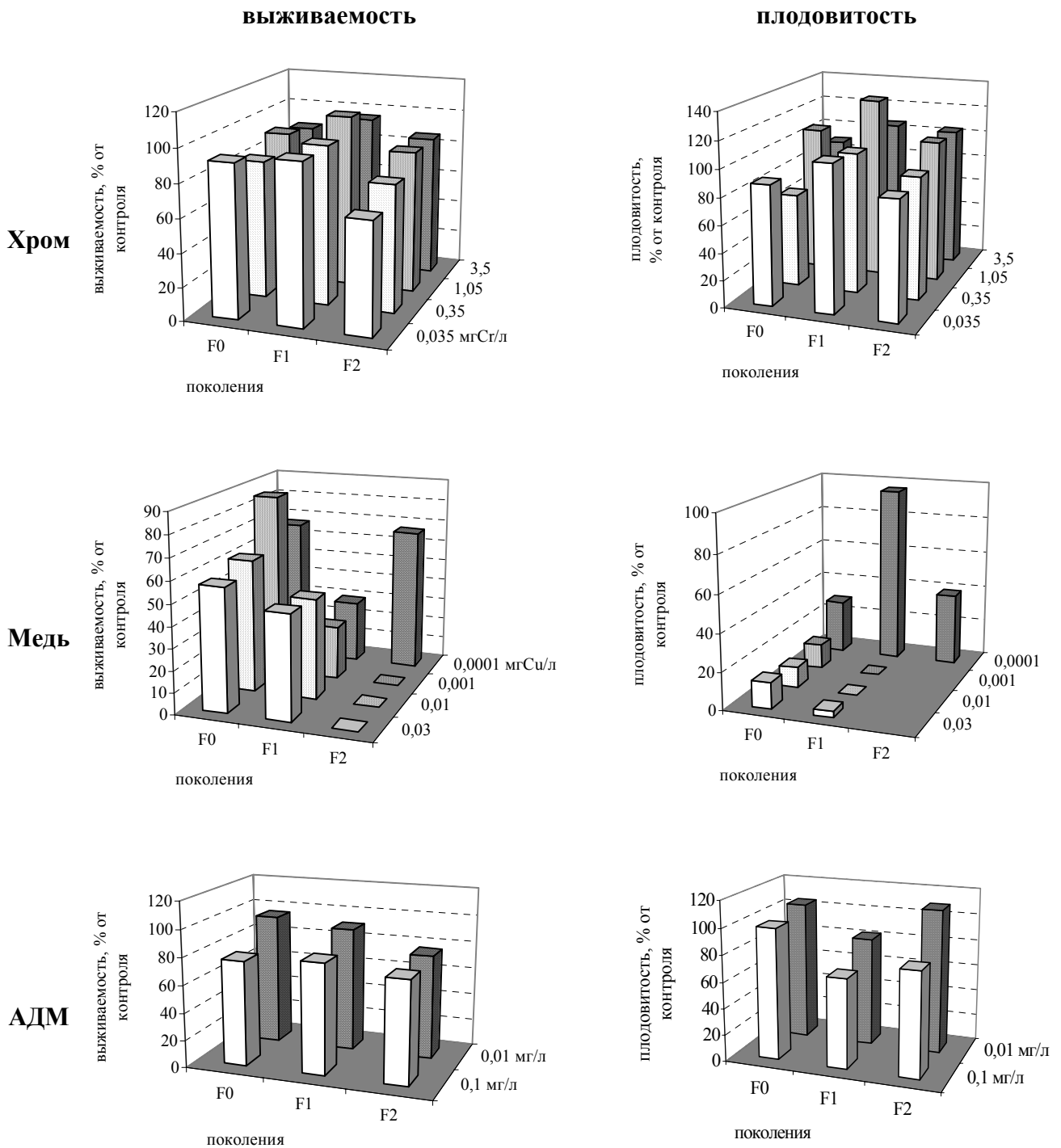


Рис. 4. Действие токсикантов на выборки *Brachionus plicatilis* в серии поколений, выживаемость и плодовитость, % от контроля.

Таким образом, выявленные эффекты усиления токсичности в ряду поколений, в том числе стимуляция с последующим угнетением при действии хрома и меди, свидетельствуют об опасности прогрессирующих нарушений в природных сообществах в условиях хронического загрязнения.

### Сравнение чувствительности коловраток на уровне особи и популяции

Сравнение данных по выживаемости, полученных на выборках за 48 часов, с данными плотности популяций за тот же срок показало, что хром в концентрациях, не действующих на популяции (0,3 мг/л), вызывает достоверное снижение выживаемости в выборках особей.

Медь в концентрациях 0,01-0,1 мг/л вызывает большее снижение выживаемости на уровне особи, чем снижение плотности популяций (в % от контроля) (таб. 4).

Таким образом, популяции коловраток более устойчивы к хрому и меди, чем выборки.

Таблица 4. Выживаемость и плотность популяций *B. plicatilis* за 48 часов, % от контроля.

Конц-ия меди, мг/л	10‰		30‰	
	выборки	популяции	выборки	популяции
0,01	91,67±11,3	101,55±6,62	62,50±19,79	99,12±1,27
0,1	83,33±15,23	79,38±8,81	0	72,32±5,25
0,5	0	0	0	0

Для объяснения этого явления было сделано предположение, что главным отличием условий в опытах на выборках и популяциях был объем среды, приходящимся на одну особь. В опытах на выборках этот объем составлял 0,3 мл (объем ячейки), а в опытах на популяциях – от 0,05 мл в начале опыта (при плотности 20 особей/мл) и затем уменьшался с увеличением плотности популяции. Соответственно различалось количество токсиканта, приходившееся на одну особь.

Расчет количества токсиканта, приходившегося на одну особь, показал, что популяции устойчивее выборок по концентрации более чем в 60 раз, а по дозе токсиканта – в 10 раз (таб. 5).

Таблица 5. Сравнение эффекта хрома (за 48 ч) на выборки и популяции *B. plicatilis* относительно концентраций и порций токсиканта (соленость 10‰).

Условия опыта	Уровень показателя, % от контроля	Концентрация хрома, мг/л	Количество хрома, мкг/особь
Выборки	54,17±20,36	20	6
Популяции	81,56±5,56	20	0,95
Выборки	79,17±16,6	0,3	0,09

Это свидетельствует о том, что различия в количестве токсиканта на одну особь в разных вариантах опыта не служит единственной причиной более высокой устойчивости популяций.

Различные условия содержания влияли и на репродуктивные показатели коловраток. В опытах на популяциях на 2-е сутки происходило увеличение плотности в 2-3 раза (в контроле) за счет рождения молоди, тогда как в опытах на выборках за этот срок коловратки не размножались.

Сравнение эффекта хрома в концентрации 20 мг/л на изменение сроков созревания и плодовитости проводили при солености 20 и 30‰ в выборках и 10‰ в популяциях.

Нарушение созревания коловраток в выборках выражалось в полном подавлении созревания и размножения, а в популяциях – в стимуляции созревания с последующим возвращением к уровню контроля. Таким образом, по этому параметру популяции оказались более устойчивыми, чем выборки.

Влияние хрома на плодовитость (рождаемость) коловраток в выборках проявлялось как в угнетении, так и в стимуляции. В популяциях, где прямая оценка рождаемости не проводилась, рассчитали рождаемость на основании соотношения численности размножающихся особей и общей плотности популяции, которая в концентрации 20 мг/л при солености 30‰ составила 1,4 особи молоди на исходную особь.

Рассчитанная величина рождаемости (плодовитости) сопоставима с ранее полученными данными о плодовитости коловраток. Кроме того, ранее была показана возможность стимуляции плодовитости под действием хрома (по данным хронического опыта на выборках). Поэтому низкая чувствительность популяций по сравнению с выборками может объясняться тем, что гибель в результате токсического воздействия компенсируется повышенной рождаемостью в результате стимуляции.

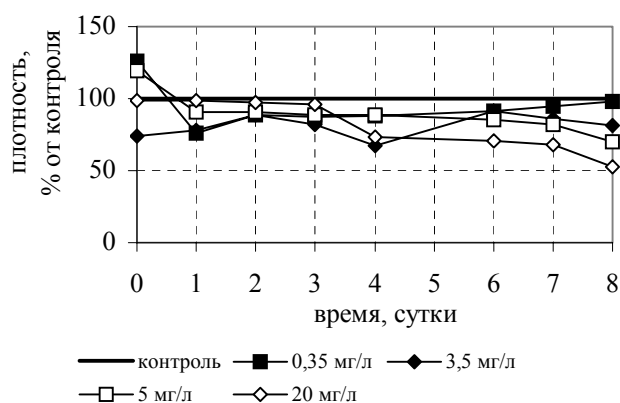
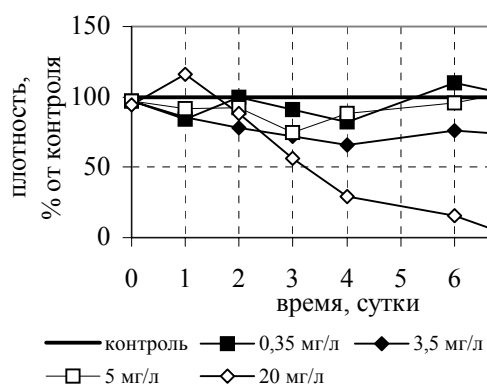
Таким образом, условия проведения эксперимента играют решающую роль в формировании ответа на токсическое воздействие на уровне особи и популяции. Условия содержания влияют на репродуктивную функцию коловраток, а плотность особей в среде определяет количество токсиканта, приходящегося на каждую особь. Результатом действия этих факторов и является пониженная чувствительность популяций коловраток по сравнению с выборками.

#### **Влияние солености на чувствительность *B. plicatilis* и *A. salina* к хрому и меди**

Влияние солености на чувствительность *B. plicatilis* и *A. salina* к хрому и меди проявлялось в следующем. Повышение солености приводило к уменьшению токсичности хрома и меди для *A. salina* и в популяциях – для *B. plicatilis*. Но в выборках *B. plicatilis* токсический эффект хрома возрастал с повышением солености воды (таб. 6, рис. 5, 6).

Таблица 6. Влияние солености на токсичность хрома и меди.

Соленость	<i>Brachionus plicatilis</i> ЛК <sub>50</sub> <sup>48</sup> , мг/л		<i>Artemia salina</i> ЛК <sub>50</sub> <sup>72</sup> , мг/л	
	Cr	Cu	Cr	Cu
10‰	53,9	7,06	1,34	1,46
20‰	0,25	0,07	2,9	6,21
30‰	0,1	0,01	2,6	5,06

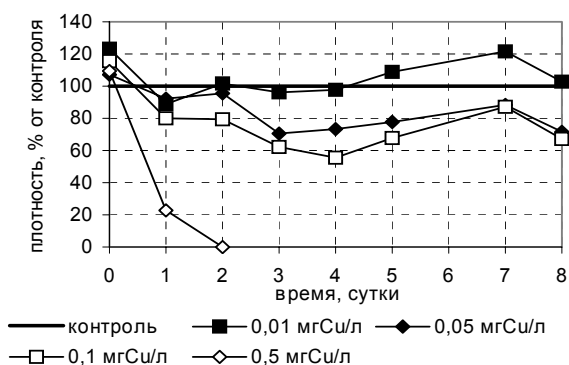


5. Эффект хрома на рост модельных популяций *Brachionus plicatilis* при солености 10‰.

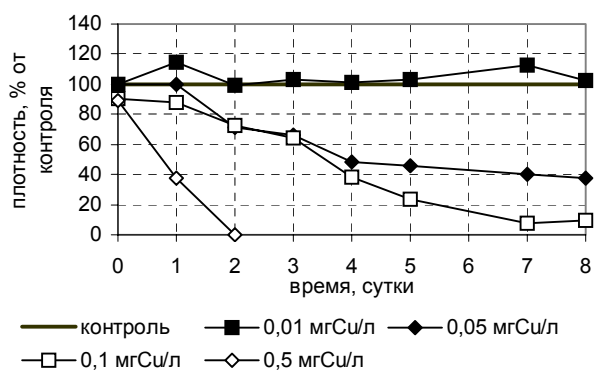
6. Эффект хрома на рост модельных популяций *Brachionus plicatilis* при солености 30‰.

Положение оптимума солености для солоноватоводного вида *B. plicatilis* относительно исследованного диапазона солености свидетельствует о том, что соленость 10‰ близка к оптимуму, а условия высокой солености (20 и 30‰) являются неблагоприятными для этого вида. Очевидно, эффекты токсической (хром) и физиологической (соленость) нагрузки, наблюдаемые в популяциях, являются суммарным результатом процессов регуляции плотности, адаптации и отбора, не учитывавшихся непосредственно, как физиологические параметры отдельных особей в выборках. Такие механизмы надорганизменного уровня обеспечивают популяции большей устойчивостью не только к токсикантам, но и к неблагоприятным условиям среды. Таким образом, фактор физиологической нагрузки (солености) больше сказывается при действии хрома на выборки коловраток, повышая токсический эффект при высокой солености, а при действии на популяции влияние солености на токсический эффект обусловлено в большей степени гидрохимическими особенностями поведения хрома в морской воде в зависимости от солености и приводит к усилению эффекта при низкой солености.

При действии меди в популяциях токсический эффект по показателю плотности усиливался при повышении солености, а по репродуктивному показателю был выявлен только при низкой солености (рис. 7-10).



7. Эффект меди на рост модельных популяций *Brachionus plicatilis* при солености 10‰.



8. Эффект меди на рост модельных популяций *Brachionus plicatilis* при солености 30‰.

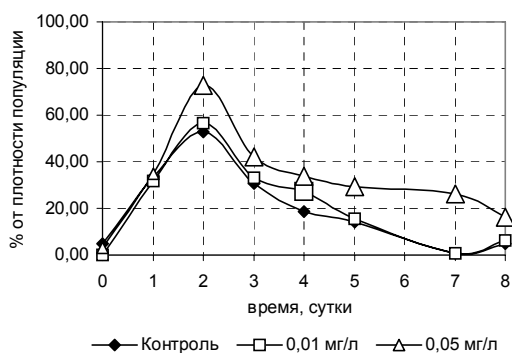


Рис. 9. Доля размножающихся особей в популяциях *Brachionus plicatilis* при действии меди (в % от общей плотности) при солености 10‰. (крупными значками отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольных)

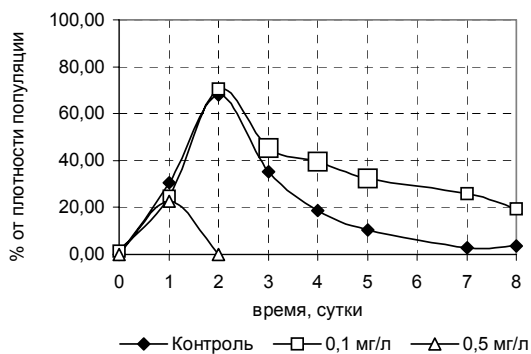


Рис. 10. Доля размножающихся особей в популяциях *Brachionus plicatilis* при действии меди (в % от общей плотности) при солености 30‰.

Так как медь была более токсичной, чем хром по показателю ЛК<sub>50</sub> и угнетала размножение коловраток значительно сильнее, при действии меди неблагоприятные условия солености сказывались не только в выборках, но и в более устойчивых популяциях. В связи с этим в экспериментах с медью коловратки находились в условиях большей экстремальной нагрузки, чем при действии хрома, поэтому сильнее проявился физиологический стресс. По репродуктивному показателю более низкая чувствительность популяций по сравнению с выборками выразилась в том, что токсический эффект меди на этот показатель в популяциях выявлен только при низкой солености.

Очевидно, у *A. salina* обнаруженная тенденция уменьшения токсичности хрома и меди с повышением солености также определяется химическими причинами и соответствует общей тенденции, отмеченной в литературе для эффекта тяжелых металлов в морской воде.

### Последствия кратковременного действия хрома на *Artemia salina*

Исследование последствий 24-часовой экспозиции хрома на *Artemia salina* показало снижение выживаемости, нарушение размножения и роста рачков в первом поколении по сравнению с исходным.

Помимо этого, в первом поколении у рачков были обнаружены морфологические отклонения строения фурки (рис. 11), которые сопровождалось замедленным ростом и нарушением созревания.



Рис. 9. Изменения формы фурки *Artemia salina* после кратковременного действия хрома

Для артемии характерна изменчивость числа щетинок фурки в нормальных условиях. Однако хром вызвал более глубокие нарушения, приведшие к недоразвитию и уродливой форме фурки.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении нарушений, вызванных хромом, в ряду поколений. Морфологические признаки, такие как отклонения в строении фурки, могут быть использованы в качестве диагностических признаков отравления популяции.

Для выявления механизмов этих нарушений исследовали цитологические показатели тканей артемии.

### Последствия кратковременного воздействия бихроматом калия на цитологические показатели тканей *Artemia salina*

Было обнаружено, что общий уровень митотической активности тканей *Artemia salina*, оцененный с помощью митотического индекса (МИ), зависит от возраста рачков (рис. 12). При этом закономерной суточной динамики МИ не установлено (рис. 13). Вероятно, в первые часы после выклева суточные ритмы не играют большой роли для науплиев артемии, и уровень МИ определяется высокой интенсивностью роста рачков.



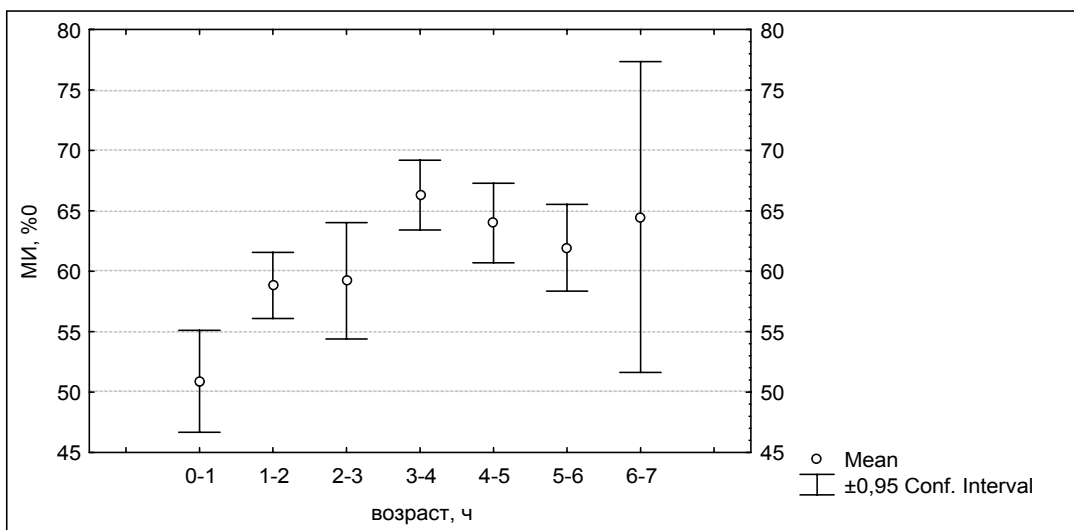


Рис. 12. Величины митотического индекса у науплиев *Artemia salina* разного возраста.

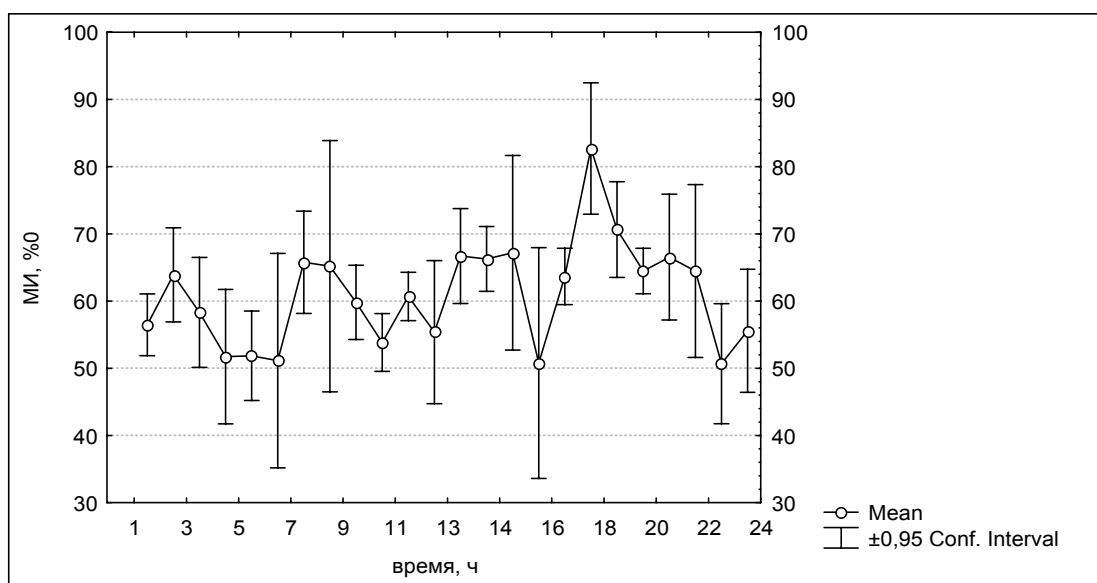


Рис. 13. Изменение митотического индекса *Artemia salina* в течение суток.

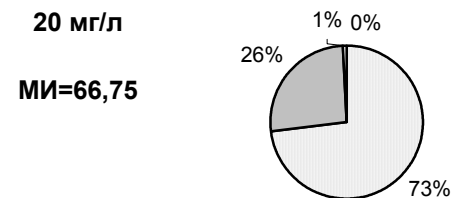
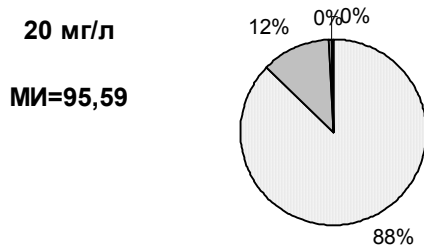
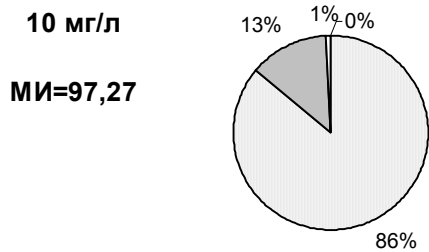
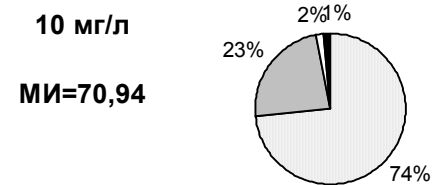
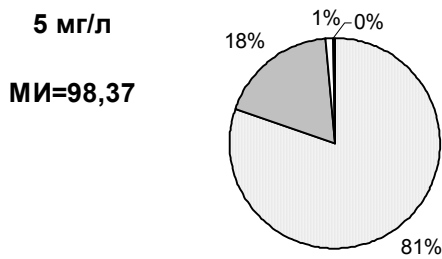
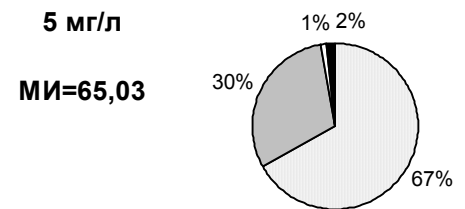
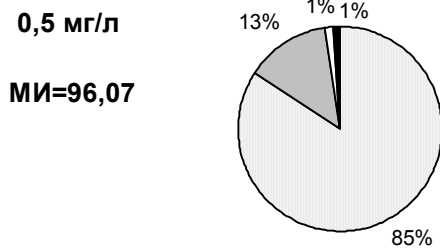
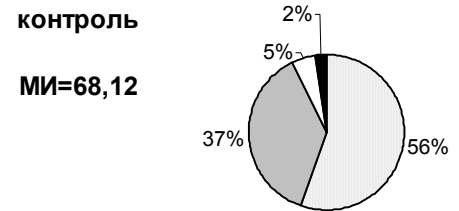
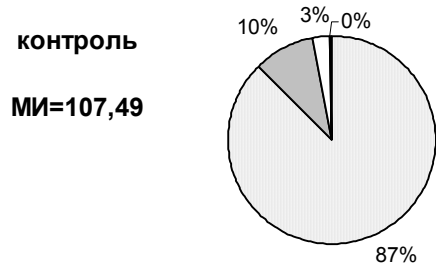
Действие хрома на митоз артемии изучали в двух экспериментах, проведенных в апреле и мае в идентичных условиях. Исследовали последствия кратковременного (24 часа) действия хрома в концентрациях 0,5, 5,0, 10,0 и 20,0 мг/л.

Митотический индекс контрольных рачков в двух опытах различался – значение МИ в первом опыте составило 107,49%, во втором – 68,12% (рис. 14).

Влияние хрома на общий уровень МИ не выявлено, величины митотического индекса были близки к контрольным во всех концентрациях хрома (отличия недостоверны).

Соотношение фаз митоза при большем МИ

Соотношение фаз митоза при меньшем МИ



□ МИ про    ■ МИ мета    □ МИ ана    ■ МИ тело

Рис. 14. Соотношение фаз митотического цикла в клетках науплиев *Artemia salina* после воздействия хрома. Условные обозначения: профазы – МИ про, метафазы – МИ мета, анафазы – МИ ана, телофазы – МИ тело.

В клетках науплиев артемии не было обнаружено хромосомных aberrаций. Действие хрома на митотический цикл у артемии проявлялось в изменении соотношения фаз митоза и зависело от общей митотической активности. На рис. 14 показано изменение относительной длительности профазы и метафазы. При меньшей митотической активности эффект хрома усиливается с повышением концентрации, при большей – проявляется только в концентрации 5 мг/л, что свидетельствует о большей устойчивости митоза к действию хрома при большей митотической активности.

В обоих случаях доля анафаз и телофаз была снижена по сравнению с контролем, однако большая вариабельность данных не позволяет считать эти различия значимыми.

Таким образом, была показана возможность обнаружения цитологических нарушений в условиях, не приводящих к гибели или физиологическим нарушениям при кратковременном воздействии хрома.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Наши исследования позволяют сделать некоторые обобщения по вопросам лабораторного культивирования и использования коловраток и артемий для оценок токсичности загрязняемой солоноводной среды. Установлены условия, при которых коловратки *Brachionus plicatilis* и рачки *Artemia salina* адаптируются к широкому диапазону солености воды, культивируются на искусственных морских средах, и могут использоваться в токсикологических исследованиях. Каждый из видов имеет собственный оптимум условий и свой ассортимент тест – реакций, по которым оценивается состояние объекта. В зависимости от условий содержания результат токсического воздействия на тест – объекты может быть также разным. Артемии более требовательны к присутствию в воде микроэлементов, ростовых веществ и витаминов, существенно влияющих на выживаемость рачков и их способность к размножению. Как свидетельствуют литературные сведения и наши наблюдения, коловратки и артемии чувствуют себя комфортно при различающихся уровнях солености.

Изменение относительной чувствительности *A. salina* к тяжелым металлам в зависимости от срока наблюдения очевидно связано с тем, что медь и хром имеют разные функции - мишени, играющие определяющую роль на разных стадиях жизненного цикла и по-разному влияющие на показатели выживаемости и плодовитости. Так, в условиях хронического воздействия меди решающим фактором оказывается нарушение размножения.

Влияние солености на чувствительность *B. plicatilis* и *A. salina* к хрому и меди проявлялось в следующем. Повышение солености приводило к уменьшению токсичности хрома и меди для *A. salina* и в популяциях – для *B. plicatilis*. Но в выборках *B. plicatilis* токсический эффект возрастал с повышением солености воды.

Очевидно, фактор физиологической нагрузки (солености) больше сказывается при действии хрома на выборки коловраток, повышая токсический эффект при высокой солености, а при действии на популяции влияние солености на токсический эффект обусловлено в большей степени гидрохимическими особенностями поведения хрома в морской воде в зависимости от солености и приводит к усилению эффекта при низкой солености.

Очевидно, у *A. salina* обнаруженная тенденция уменьшения токсичности хрома и меди с повышением солености также определяется химическими причинами и соответствует общей тенденции, отмеченной для тяжелых металлов в морской воде.

Сравнение полулетальных концентраций хрома и меди для *B. plicatilis* и *A. salina* в остром опыте показало, что относительная чувствительность этих видов также зависит от солености. При низкой солености более чувствительным видом является *A. salina*, при высокой солености - *B. plicatilis*.

Таким образом, при проведении токсикологических испытаний с использованием этих видов необходимо учитывать их экологические особенности в отношении солености. Обнаружены такие эффекты, как уменьшение сроков созревания у *A. salina* при повышении солености воды, снижение чувствительности артемий по сравнению с коловратками при повышении солености, а также разнонаправленное влияние солености на чувствительность обоих видов к тяжелым металлам. В связи с этим рекомендуется применение этих тест-объектов в условиях, приближенных к их оптимуму в отношении солености – *A. salina* для контроля загрязнения вод с высокой соленостью, а *B. plicatilis* – солоноватых вод.

Показано, что нарушения, вызванные хромом у *A. salina*, могут сохраняться в ряду поколений. Наряду с непосредственным токсическим эффектом на исходное поколение рачков, выявлено отдаленное действие хрома на потомство рачков, подвергшихся кратковременному действию токсиканта. Отдаленный эффект хрома проявлялся в снижении выживаемости, замедлении роста и развития рачков, а также в отклонениях репродуктивных и морфологических показателей. Морфологические признаки, такие как отклонения в строении фурки, могут быть использованы в качестве диагностических признаков неблагоприятного воздействия на популяцию.

При кратковременном действии хрома обнаружены изменения цитологических показателей тканей науплиев *A. salina*, при этом чувствительность к хромуму зависит от митотической активности тканей. При меньших значениях митотического индекса хром вызывает больший эффект и на более ранних стадиях, чем при большей митотической активности.

Полученные результаты подтверждают необходимость экспериментального моделирования в лабораторных условиях различных режимов поступления токсичного загрязнения в водную среду. В частности, ситуации хронического загрязнения малыми концентрациями токсиканта и залповых сбросов, то есть кратковременного действия высоких концентраций загрязняющих веществ, могут приводить к различным последствиям. Как показали эксперименты с *Artemia salina*, в первом случае есть опасность сохранения нарушений в ряду поколений рачков, а также отдаленного действия токсиканта после прекращения его непосредственного воздействия, во втором – вероятность появления цитологических изменений в тканях рачков раньше, чем проявятся физиологические и морфологические нарушения. Эти цитологические изменения могут служить диагностическим признаком для быстрого выявления токсического действия.

## ВЫВОДЫ

1. При культивировании в лабораторных условиях на искусственных морских средах рачок *Artemia salina* более требователен к составу среды, чем коловратка *Brachionus plicatilis*.

2. Сравнительная токсичность хрома (в виде бихромата калия) и меди (в виде хлорида меди) для *Artemia salina* различается в разные сроки наблюдения. В остром опыте медь менее токсична, чем хром, в хроническом – более токсична, в связи с тем, что решающим фактором в определении токсического эффекта меди в этих условиях является нарушение размножения. Для *Brachionus plicatilis* медь более токсична, чем хром независимо от срока наблюдения. Угнетающее действие меди на функцию размножения у *B. plicatilis* и *A. salina* выявлено в концентрациях, не снижающих выживаемость.

3. *Brachionus plicatilis* и *Artemia salina* обладают различной относительной чувствительностью к тяжелым металлам и органическим веществам (буровым препаратам) по показателю размножения. Артемии более чувствительны к хромуму и меди, чем коловратки. Буровой препарат Алкоксилированный 1,3'-диизоционата метилбензол не вызывает нарушений плодовитости и жизнеспособности потомства у *A. salina*, но подавляет размножение *B. plicatilis*.

4. Повышение солености воды в диапазоне 10-30‰ снижает токсичность хрома и меди для *A. salina* и для популяций *B. plicatilis* и увеличивает токсичность металлов для *B. plicatilis* в выборках, что обусловлено существованием оптимума солености для каждого из двух видов, определяющего чувствительность тест-объекта в определенном диапазоне солености. При проведении токсикологических испытаний необходимо учитывать особенности экологии этих видов, применяя *Artemia salina* для контроля загрязнения вод с высокой соленостью, а *Brachionus plicatilis* – солоноватых вод.

5. При хроническом действии на *Brachionus plicatilis* тяжелых металлов и органических веществ (буровых препаратов) на протяжении 3 поколений выявлено усиление токсического эффекта в ряду поколений, в том числе стимуляция с последующим угнетением при действии хрома и меди. Полученные данные свидетельствуют об опасности прогрессирующих нарушений в природных сообществах в условиях хронического загрязнения.

6. При кратковременном действии хрома в концентрациях 0,5-20 мгСг/л на *A. salina* на клеточном уровне выявлено нарушение соотношения фаз митоза в тканях науплиев артемии при отсутствии хромосомных aberrаций и изменений общего митотического индекса. Профазный митотический индекс может применяться в качестве теста, более чувствительного, чем выживаемость, т. к. эффект по этому показателю отмечен в концентрациях, не вызывающих гибели рачков в остром опыте.

7. Отдаленные последствия кратковременного воздействия хрома на *Artemia salina* выражаются в снижении жизнеспособности и нарушениях размножения, сохраняющихся в ряду поколений, а также морфологических изменениях, что свидетельствует о возможности значительных экологических последствий кратковременных воздействий токсических веществ, не вызывающих заметных эффектов непосредственно в период экспозиции.

8. Полученные результаты подтверждают необходимость моделирования в токсикологическом эксперименте реальных ситуаций в загрязняемых природных водоемах, в частности, хронического загрязнения малыми концентрациями токсиканта и залповых сбросов, то есть кратковременного действия высоких концентраций загрязняющих веществ.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Е. Ф. Исакова, Н. В. Карташева, Т. А. Самойлова. Влияние солености на токсикорезистентность модельных популяций солоноводных коловраток к бихромату калия. Водные экосистемы и организмы – 2: материалы научной конференции, 23-24 июня 2000 г., Москва. – М.: МАКС Пресс, 2000. С. 41.
2. Е. Ф. Исакова, О. Ф. Филенко, Е. Е. Коломенская, Т. А. Самойлова, А. В. Черномордина. Отдаленные эффекты токсического загрязнения на выборки и контролируемые популяции водных беспозвоночных. Тезисы докладов VIII съезда Гидробиологического общества РАН, 16-23 сентября 2001 г., Калининград. – Калининград, 2001, том 2. С. 133-134.
3. Филенко О.Ф., Дмитриева А. Г., Исакова Е.Ф., Ипатова В.И., Прохоцкая В.Ю., Самойлова Т.А., Черномордина А.В. О вторичных механизмах действия токсикантов на водные организмы и сообщества //Тез. Докл. 2 съезда токсикологов России 10-13 ноября 2003 г., Москва. С. 267-268.
4. Самойлова Т.А. Действие бихромата калия на модельные популяции коловраток *Brachionus plicatilis* при разной солености. // "Экологические системы и приборы" №6, 2004. С. 31-34.
5. Самойлова Т.А. Характеристики роста тканей *Artemia salina* как показатель токсичности среды. Научные труды международного биотехнологического центра МГУ им. М.В. Ломоносова. Биотехнология – охране окружающей среды. Изд. «Спорт и Культура», М. 2004. С. 145 –146.
6. Механизмы реагирования водных организмов на воздействие токсичных веществ. Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Исакова Е.Ф., Ипатова В.И., Прохоцкая В.Ю., Самойлова Т.А., Черномордина А.В. В книге: Антропогенные влияния на водные экосистемы (По материалам конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н. С. Строганова). Сборник статей. Под редакцией д.б.н. О. Ф. Филенко. М.: Т-во научных изданий КМК 2005. С.70-93.
7. Самойлова Т.А. Влияние солености на токсичность тяжелых металлов для коловратки *Brachionus plicatilis* Muller.// Тез. Докл. Международной конференции «Современные проблемы водной токсикологии», 20-24 сентября 2005 г. Борок. С. 121-122.
8. Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L. ФР 1.39.2006.02505. Москва, МГУ, 2006. 26 с.