



## Обоснование выбора потенциальных тест-объектов из числа водных ракообразных для оценки токсичности

В соответствии с положениями внедряемой в настоящее время более чем 89 странами мира Согласованной на глобальном уровне системы классификации и маркировки химических веществ (СГС) оценка токсичности химических веществ и смесей для водной среды проводится методом биологического тестирования [1]. Область применения водных биотестов распространяется также на контроль токсичности сточных вод, природной воды, тестирование вытяжек из полимерных материалов. Проведение экспериментов по оценке акватоксичности регламентируется множеством стандартных методик (руководства Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), Европейского сообщества (ЕС), Управления по охране окружающей среды США и др.) [2-6]. Допускается использование национальных методов, если они расцениваются в качестве эквивалентных и получены с использованием Руководящих принципов проведения испытаний ОЭСР либо эквивалентных правил соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. В настоящее время в Республике Беларусь отсутствует экспериментальная база для проведения оценки водной токсичности в объёме первичной токсикологической оценки.

Возможность практического использования того или иного биотеста при проведении оценки токсичности определяется его основными характеристиками. Требования к водно-оксикологическим биотестам были сформулированы в конце 70-х годов прошлого столетия временной научно-технической комиссией ГКНТ по проблемам биотестирования природных и сточных вод. Согласно этим требованиям биотесты должны быть: экспрессными, чувствительными, достаточно точными (улавливать по возможности малые колебания конденсации исследуемых токсикантов), легко доступными для исполнения, хорошо воспроизводимыми, экономичными, пригодными для инструментализации и автоматизации [7, 8].

Для биотестирования используются более

500 видов водных организмов различного уровня организации - от микроорганизмов до рыб. При выборе организмов в качестве тестобъекта для оценки токсичности основными критериями являются: чувствительность, наличие знаний о биологии, экологии, необходимо также учитывать географическое распространение вида, стабильность развития популяций, не менее важными являются методические особенности работы с организмами, в частности их способность выживать и давать потомство в искусственных условиях [9, 10].

Основным признаком, определяющим пригодность вида для использования в биотестировании, является его чувствительность к воздействию химических веществ. Она может варьировать в зависимости от видовой принадлежности организма, а также от свойств химических веществ. Часто для получения представления о чувствительности того или иного организма необходимы знания об экологии и биологии вида, например, если животное предпочитает чистые воды и обитает в олиготрофных водоемах, чувствительность его к загрязнению будет высокой, и, наоборот, если организм встречается в политрофных водах, пределы толерантности этого вида наверняка будут широкими. Как правило, чем выше чувствительность, тем уже пределы толерантности тест-объектов. Внедрению в практику того или иного тест-объекта предшествует его тщательная апробация, предполагающая изучение его чувствительности к различным группам химических веществ. Чтобы охватить весь диапазон токсического воздействия поллютантов, следует прибегать к «батареям тестов», включающим представителей разных трофических уровней и типов питания, различные жизненные формы и стадии развития [11, 12]. Для акватоксикологической оценки химических веществ и смесей общепринятым является использование батареи тестов, включающей рыб, беспозвоночных водорослей и бактерий.

Из особенностей биологии видов

необходимо принимать во внимание способ размножения (половой или ларвогенетический), скорости роста и воспроизводства потомства плодовитость, а также тип питания (как правило, хищники в тестировании практически не применяются). Ограничено использование в качестве тест-объектов животных с раздельнополым способом размножения, так как от них больше вероятность получить генетически разнородный тестируемый материал (потомство), кроме того, самцы и самки могут по-разному реагировать на действие токсиканта,

В силу малых размеров некоторых тест-объектов немаловажным обстоятельством при их применении является легкость определения таксономической принадлежности. При этом потенциальный тест-объект должен иметь надежные определительные признаки и отличаться от близкородственных видов.

Водные ракообразные используются главным образом как «датчики» сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать сам факт токсичности, независимо от того, обусловлена она наличием одного более или менее точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ, которые обычно представляют собой сточные воды, и с известной степенью приближения могут давать количественную оценки уровня токсичности или загрязнения водной среды [13].

Целью работы был поиск новых тест-объектов для оценки акватоксичности химических веществ и их смесей (в том числе в сточных водах) из класса ракообразных, обитающий в водных экосистемах Беларуси, обладающих большей чувствительностью к воздействию химических веществ и их смесей в сравнении со стандартными тест-моделями и потенциальной способностью к разведению в лабораторных условиях. В задачи входила разработка методологии проведения эксперимента с использованием выбранной тест-модели, ее характеристика по результатам экспериментальных исследований и, как результат, выработка рекомендации по ее применению для тестирования тех или иных групп химических веществ.

### **Результаты и обсуждение**

Анализ таксономической структуры класса ракообразных показал, что в водных экосистемах Беларуси встречается около 250 видов планктонных, планкто-бентических и бентических аборигенных видов ракообразных (таблица 1), Половину из них составляют представители ветвистоусых рачков отряда Cladocera. Наиболее изучены и богаты в видовом отношении три систематические группы: Cladocera, Copepoda и Ostracoda. Эти же группы часто применяются в тестировании. Однако даже в этих насыщенных видами таксонах совсем немного видов, которые применяются или могли бы рассматриваться как потенциальные тест-объекты.

Если рассматривать другие таксоны, приводимые в этой обобщенной таблице, то той или иной степени пригодными для токсикологических работ могут быть представителю отрядов Amphipoda, Isopoda и Decapoda. Другие отряды нами не рассматривались в связи с тем, что особенности биологии и экологии этих животных не позволяют включать их в число тест-объектов. Для некоторых видов и родов мы не имеем также достаточной информации (распространение, размножение, количество генераций и т.п.), что также препятствует включению в категорию тест-объектов [14].

В конечном итоге, из 29 указанных в таблице наибольшее количество потенциально пригодных для тестирования видов (14) в фауне Беларуси принадлежат к ветвистоусым ракообразным (Cladocera), на втором месте - (10 видов) веслоногие (Copepoda) и только два вида ракушковых (Ostracoda).

Исходя из таблицы 1, собственных исследований и литературных данных [14-19] составлена таблица 2, в которой даны основные биологические характеристики только некоторых из выбранных нами потенциальных тест-объектов из числа водных ракообразных. Перечень этих видов не является окончательным в том смысле, что в процессе дальнейших исследований фауны и особенностей биологии этот перечень возможно расширить. Не исключена возможность и сокращения этого списка после опыта практического применения этих видов по тем или иным причинам: трудности

культивирования или манипуляции с животными, определение чувствительности и т.п. В таблице 2 качественные показатели каждой из основных характеристик даны по пятибалльной шкале (++++), отсутствие фактических данных обозначено знаком минус (-).

Таблица 2 - Виды класса ракообразных аборигенной фауны Беларуси, как возможные тест-объекты для токсикологических исследований

### **Характеристика основных семейств ракообразных и их отдельных представителей как потенциальных тест-объектов для токсикологической оценки**

#### *Семейство Daphniidae*

Широкое применение видов семейства ветвистоусых в токсикологическом эксперименте объясняется относительно крупными размерами, легкостью ведения культуры, партеногенетическим размножением (генетическая однородность получаемого экспериментально-го поколения), высокой плодовитостью, короткими сроками развития [15]. Среди представителей данного семейства существует большая видоспецифичность откликов даже на один и тот же токсикант.

*Daphnia magna* - самый распространенный и стандартизованный тест-объект для оценки водной токсичности, применение которого в биотестировании начали еще в 30-ых годах прошлого века. Несмотря на то, что учеными разработано множество тестов на других! водных организмах, на данный момент времени биотест с *D. magna* остается одним из наиболее широко используемых для акватоксикологической оценки химических веществ, ил смесей, контроля токсичности сточных вод, природных вод, а также вытяжек из почв. Такой широкой распространенности данный тест-объект обязан следующим особенностям биологии: *D. magna* легко вводится в культуру в лабораторных условиях, размножается партеногенетически, имеет короткий жизненный цикл, позволяющий оценить хроническую токсичность веществ в достаточно краткие сроки. Однако необходимо учитывать, что данный организм не является универсальным, так как обладает умеренной чувствительностью к ряду химических соединений, например органическим

загрязнителя». Следует также отметить, что при резкой смене условий содержания, что часто встречается зимой, *D. magna* переходит и половому размножению. В естественных условиях обитает в эвтрофных водоемах прудового типа юга Республики Беларусь и, хотя развивается в массе, встречается не так часто, отмечена лишь в нескольких рыбоводных прудах, на участке р. Сож в черте г.Гомеля [14]. Этот вид широко культивируется искусственно: часто используется в учебном процессе вузов, в аквариумном рыбоводстве.

Из других видов рода наиболее массовыми и часто встречаемыми в наших водных экосистемах также являются: *Daphnia cucullata*, *D. longispina*, *D. pulex* [14]. Эти виды возможно применять для целей биотестирования, однако культивирование этих видов требует специальных навыков.

Второй широко используемый в водной токсикологии вид *Ceriodaphnia dubia* не встречается в водоемах Беларуси и соседних странах (Литва, Украина, Россия). В наших водоемах представлены другие виды этого рода — *C. affinis* (широко используется как тест-объект [16]), *C. pulchella*, *C. quadrangida*, *C. reticulata*. Недостатком ракообразных рода *Ceriodaphnia* как тест-моделей для проведения хронических экспериментов является их малая плодовитость, меньшие размеры в сравнении с предыдущими видами и сложное культивирование [13].

Из других представителей семейства *Daphniidae* потенциальными тест-объектами может быть *Simocерphalus veivulus*. Он легко культивируется и сравним по размерам (до 4мм) с дафниями, обладает высокой плодовитостью.

#### *Семейство Chydoridae*

Из представителей хидорид наиболее часто в тестах применяется *Chydorus sphaericus*. Это эврибионтный вид, встречающийся в водоемах республики повсеместно. Недостатком использования этого вида могут быть его малые размеры 0,25—0,30 мм. Низкая плодовитость этого рачка компенсируется высокими скоростями роста и быстрым созреванием. Наиболее крупный представитель семейства - *Eurycercus lammellatus*, ведет придонный образ жизни, удобен для манипуляций, но плохо культивируется.

#### *Семейство Bosminidae*

Из этого семейства в токсикологии применяется вид *Bosmina longirostris*, который в наших водах широко распространен и в больших количествах, но характеризуется малыми размерами (0,3-0,4 мм) и малой плодовитостью (одно-два яйца в выводковой камере).

#### *Семейство Moinidae*

Представители семейства в водоемах немногочисленны (три вида), населяют полисапробные водоемы типа очистных прудов и рыбоводных прудов, обладают высокой плодовитостью и имеют широкий спектр толерантности. При средних размерах возможно применение наиболее массового вида *Moina brachiata* (*rectirostris*).

Несмотря на то, что в таблицах 1 и 2 приведены и веслоногие раки (*Cooperoda*), возможность их использования в биотестировании ограничена. Обозначенные в таблице 2 виды широко распространены, относительно неплохо культивируются, однако это раздельнополые животные. Кроме того, несмотря на указания в литературе об использовании этих животных, у некоторых из них малая плодовитость и ряд других характеристик, ограничивающих их применение в токсикологических экспериментах.

Представители других отрядов - *Isopoda* (равноногие), *Decapoda* (десятиногие) и *Ampipoda* (разноногие) - более крупные животные, и они чаще всего используются в хроническом тестировании.

Как мы уже отмечали выше, при всех своих достоинствах, недостатками при использовании *Cladocera* является нарушение партеногенетического размножения при резком изменении условий культивирования, особенно в зимний период времени. В этой связи нами было обращено внимание на ракушковых рачков - остракод, у которых стабильные партеногенетические популяции развиваются в любое время года. Ракообразные отряда *Ostracoda* как потенциальные тест-объекты обладают следующими преимуществами:

- образуют наиболее стабильные популяции в любое время года;
- широко представлены в окружающей среде, являясь эвритопными и эврибионтными (обитают как в постоянных, так и временных водоемах, а также подземных водах).

Недостатком этого отряда является

придонный образ жизни, но некоторые представители имеют длинные плавательные антенны и способны долгое время проводить в толще воды.

На территории Республики Беларусь отмечено 62 вида ракушковых ракообразных, из них около 10 видов распространены достаточно широко [17]. Благодаря массовому развитию» только два из них соответствуют требованиям, предъявляемым к тест-объектам, поэтому иМ отряда *Ostracoda* в таблице нами выделены только 2 вида - *Cypridopsis vidua* (O.F.Muller, 1776) и *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808). Вид *incongruens* нами включен в список по литературным данным [18]. Молодь этого рачка использовалась как тест-объект для определения токсичности седиментов в хроническом (6 дней) тестировании, при этом определялись рост и гибель рачков. При детальном изучении особенностей биологии и последнего [19] выяснилось, что в естественном состоянии он приурочен к поверхностной пленке воды, что может быть серьезным препятствием при манипуляциях (отлов, пересадкам и ведении культуры). Кроме того, по предварительным данным этот вид обладает низкой чувствительностью в остром эксперименте, (относительно толстая раковинка). Являясь всеядным животным по особенностям биологии для использования в качестве тест-объекта для оценки острой токсичности больше подходит *Cypridopsis vidua* (O.F.Muller, 1776) - типичный представитель отряда *Ostracoda*, тело которых заключено в двустворчатую раковину длиной до 0,7 мм с латералью расположенными створками и снабжено 7 парами конечностей [19,20]. Достоинством выбранного объекта является также его эвритопность и эврибионтность - встречается во многих местах европейской части бывшего СССР, на Кавказе, в Закавказье, Сибири, Европе, Северной Америке в самых разнообразных водоемах: лужах, канавах, береговых зарослях и на дне озер, в реках и их старицах, в болотах, в подземных водах фактически круглогодично, в значительных количествах с мая по сентябрь. В природных условиях дает 2 генерации в год: одну весеннюю в апреле-мае, заканчивающую свое развитие в июле в другую - поздним летом, появляющуюся в августе и достигающую

зрелости в сентябре.

Животные данного вида нами были выделены из искусственного водоема в Минском области летом 2006 года, их систематическое положение проведено по определителям [19,В 20]. В лабораторных условиях получена генетически однородная культура, представляющая собой потомство одной самки *C. vidua* ЦГ-2 (содержится в рабочей коллекции ГУ «Респуб-1 ликанский научно-практический центр гигиены») [21].

Проведена серия сравнительных экспериментов по оценке острой водной токсичности I одноатомных спиртов, солей тяжелых металлов, хлорорганических пестицидов с использованием в качестве тест-объектов ракообразных *C. vidua* и *D. magna* (наиболее широко используемого стандартного тест-объекта ракообразных). Результаты позволяют утверждать, что культура *C. vidua* ЦГ-2 более чувствительна по сравнению с *D. magna* по отношению к I солям кадмия, пропанолу, бутанолу, линдану.

### Заключение

Таким образом, несмотря на значительное количество (около 250) видов ракообразных, зарегистрированных в водоемах Беларуси, для целей токсикологического тестирования в лучшем случае пригодны около 20. Более половины потенциальных видов относятся к ветвистоусым ракообразным, представители остальных таксонов могут иметь ограниченное использование как тест-объекты. Легко культивируемые ракушковые, несмотря на некоторые ограничения, возможно использовать в острых токсикологических экспериментах. По особенностям биологии, в том числе способности к поддержанию относительно стабильных популяций в естественных и лабораторных условиях для этих целей больше всего подходит *Cypridopsis vidua*.

Исходя из выше сказанного, мы рекомендуем использовать ракообразных *C. vidua* в качестве тест-объекта для оценки токсичности химических веществ и смесей, в частности тяжелых металлов, хлорорганических и других органических соединений и их смесей как иы-1 дивидуально, так и в батарее тестов. Это позволяет расширить арсенал тест-объектов для I проведения оценки острой водной токсичности, избежать недооценки опасности и

надежно определить токсичность. Кроме того, данная тест-модель по сравнению с существующими стандартными тест-объектами легче культивируется в лабораторных условиях и свойственна'

фауне Республики Беларусь. Это позволяет использовать *C. vidua* как тест-объект при проведении экогтоксикологической оценки новых потенциально опасных для водной среды химических веществ и их смесей, внедряемых в хозяйственную деятельность, контроле качества природных и сточных вод, установлении нетоксичной степени разбавления стоков, в природоохранной деятельности.

Abstract. Taxonomic structure analysis of crustaceans from ecosystems of our republic is considered in the paper. The species and their biological characteristics as potential test-objects are also presented. The species *Cypridopsis vidua* (O.F.Muller, 1776) Ostracoda was proposed as a test-object for toxicity assessment of chemicals and mixtures (including waste water) from crustaceans of the fauna of the Republic of Belarus. The choice was made on the base of essentiality to the Republic water ecosystems and potential for cultivation at laboratory conditions.

### Литература

1. The globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)/ United Nations. - New York; Geneva, 2003.
2. EC C.1: Acute toxicity for fish .Testing methods // European Commission, 1997.
3. EC C.14. Fish juvenile growth test//European Commission, 2001.
4. EC C.2: Acute toxicity for daphnia. Testing methods // European Commission, 1992.
5. EC C.20: Daphnia magna reproduction test//European Commission, 2001.
6. EC C.3: Algal inhibition test // European Commission, 1992.
7. Girling, A. E. // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2000. Vol. 45. P. 148.
8. Лесников, Л.А. // Вопросы методик в водной токсикологии: сб. науч. тр. ГОСНИ-ОРХ. 1979. Вып. 144.
9. Исакова, Е.Ф. Методы биотестирования качества водной среды. М.: Изд-во МГУ, 1989.
10. Строганов, Н.С. Методика биологических исследований по водной токсикологии. М.: Наука, 1971.

11. Crane, M. //Hydrobiologia. 1997. Vol. 346. P. 149.
  12. Amadeu M.V.M. Soares Progress in standartization of aquatic toxicity tests. London Publisers, 1993.
  13. Брагинский, Л.П. // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36, №5. С. 50.
  14. Вежновец В.В. Ракообразные (Cladocera, Sorperoda) в водных экосистемах Беларуси: каталог. Определительные таблицы. Минск: Бел. Наука, 2005. - 150 с
  15. Anabela, M. M. //Ecotoxicol. Environ. Safety. 2000. Vol. 47. P.27.
  16. Cheng-Hang Lan//Ecotoxicol. Environ. Safety. 2005. Vol.61. P.273.
  17. Nagorskaya L., Keyser D. // Hydrobiologia. 2005. Vol. 538. P. 167.
  18. Belgis, C, Guido, P. // Environ, toxicol. 2000. Vol. 17, №6. P. 520.
  19. Бронштейн, З.С. Фауна СССР. Ракообразные: в 2 т. Л.: Изд-во АН СССР, 1947. -Т. 2: Ostracoda Пресных вод / З.С. Бронштейн. - 1947. - 337 с.
  20. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Том 2. Ракообразные. Санкт-Петербург, 1995. - 628 с.
  21. Дроздова, Е.В. // Сахаровские чтения 2007 года: экологические проблемы XXI века; материалы 7-ймеждунар. науч. конф. Минск, 17-18 мая 2007 г. Минск, 2007. С. 128.
- ГНПО «Научно-практический центр, Поступило 20.01.09  
НАН Беларуси по биоресурсам»  
ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

В. В. Вежновец, Е. В. Дроздова

**Источник:** Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, №3(54), - 2009.-С-65-73.