

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРОФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАЧКОВ *Daphnia magna* Straus на ФЛУОРИМЕТРЕ «MEGA-25»

Описана методика токсикологического экспресс-теста на рачках *Daphnia magna* на примере действия ионов Cu^{2+} . После 6 ч инкубации в пробах с токсикантом рачков переносили во флакон с суспензией клеток водорослей и определяли трофическую активность дафний по убыванию интенсивности флуоресценции хлорофилла. Высокая плотность посадки рачков (3 особи на 4 мл) и невысокое начальное содержание клеток водорослей (300 тыс./мл) позволили сократить время измерения трофической активности до 20 мин.

Введение

Чистая вода становится в наши дни все более ценным ресурсом. Охрана заповедных и хозяйственных водоемов, очистка сточных вод предприятий и поиск новых источников воды тесно связаны с проблемой оценки их качества. Наряду с анализом химического состава воды, важным способом ее интегральной оценки является биотестирование с использованием живых организмов, выращенных в контролируемых лабораторных условиях [1].

Широкое распространение в биотестировании получил пресноводный рачок *Daphnia magna*. Он входит в число обязательных тестовых видов при установлении норм предельно-допустимых концентраций веществ [2]. Токсичность проб воды определяют по их действию на различные показатели физиологического состояния рачков, так называемые тест-функции: смертность, плодовитость, появление аномалий в потомстве, частота сердечных сокращений и пр.

Одной из наиболее экспрессных тест-функций для *Daphnia magna* является тро-

фическая активность (ТА) — скорость поглощения взвешенных в воде частиц (бактерии, микроводоросли, простейшие). Так, хронический опыт по определению выживаемости и плодовитости дафний имеет продолжительность 21 сут [2, 3], а определение ТА занимает не более 24 ч [1, 4]. ТА дафний может быть измерена по убыванию интенсивности флуоресценции хлорофилла клеток микроводорослей, добавленных в пробу с рачками [5, 6].

Способ определения ТА имеет следующие недостатки. Во-первых, токсические соединения, находящиеся в пробе, оказывают влияние не только на дафний, но и на фотосинтетический аппарат водорослей [7], изменяя величину квантового выхода флуоресценции хлорофилла и приводя к ошибкам в определении численности клеток по флуоресценции. Во-вторых, при совместном присутствии дафний и водорослей часть токсиканта адсорбируется клетками водорослей, в результате чего действие токсиканта на рачков ослабевает.

Избежать этих эффектов, теоретически, возможно при отдельном проведении инкубации дафний с токсикантом (пробой) и процедуры определения ТА. Предполагается, что в начале эксперимента (рис. 1) рачков инкубируют в течение нескольких часов в пробе с токсикантом без добавления клеток водорослей. Затем дафний переносят в нетоксичную среду, содержащую клетки водорослей (но не наоборот), и измеряют кривую снижения интенсивности флуоресценции клеток в среде (рис. 1).

Практическая сложность подобного эксперимента состоит в том, что определение ТА необходимо завершить в кратчайшие сроки (до 1 ч), поскольку дафнии, оказавшись в нетоксичной среде, способны «отмыться» от токсикантов и восстанавливать свою ТА до контрольных значений [8]. В настоящей работе описан опыт экспрессного

И.В. Конюхов*,

кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры биофизики Биологического факультета, ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

О.В. Воробьева,

аспирант кафедры гидробиологии Биологического факультета, ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*Адрес для корреспонденции: vanka.kon@gmail.com

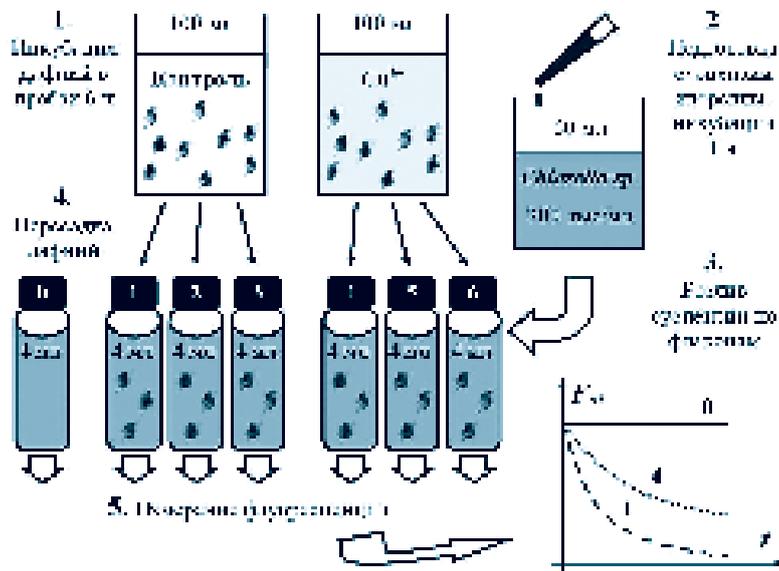


Рис. 1. Схема опыта по определению трофической активности дафний. Этапы пронумерованы в хронологическом порядке.

определения ТА дафний на примере токсического эффекта ионов меди (II).

Сократить время определения ТА можно двумя путями: уменьшением начального количества клеток водорослей в среде и увеличением плотности посадки дафний. Мы использовали обе возможности, что позволило надежно определять ТА дафний в течение 20 мин. При такой малой продолжительности эксперимента особых трудностей с увеличением плотности посадки дафний не возникает. Минимальное же начальное содержание клеток водорослей в среде ограничено чувствительностью флуориметра и фоновой флуоресценцией примесей, содержащихся в воде.

ПДК ионов Cu^{2+} , установленная в России для рыбохозяйственных водоемов, составляет 0,001 мг/л. В работе [4] показано, что двукратное уменьшение ТА дафний происходит при действии ионов Cu^{2+} в концентрации 0,02 мг/л. Данный результат был получен при инкубации рачков с токсикантом в течение 18 ч. Мы попытались обнаружить эффект Cu^{2+} в концентрации 0,02 мг/л при сокращенном времени инкубации 6 ч.

Материалы и методы исследования

Культура *Daphnia magna* была выращена при температуре 22 °С на биологизированной воде. Для её получения водопроводную воду отстаивали в течение 2 недель

в аквариуме с принудительной аэрацией. Затем воду переливали в другой аквариум с песчаным грунтом и высшими водными растениями для насыщения воды метаболитами макрофитов. Рачков кормили суспензией одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*. Для опытов были взяты 7-суточные рачки.

Культуру клеток *Chlorella vulgaris* (200 млн./мл) выращивали на среде Тамия [3] при постоянном освещении лампами накаливания ($17 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в видимой области спектра) и непрерывной аэрации.

Схема эксперимента по определению ТА рачков изображена на рис. 1. Растворы сульфата меди (II) объемом 100 мл с концентрацией меди 0,02 мг/л, 0,05 мг/л и 0,1 мг/л были приготовлены на биологизированной воде. В контрольный стакан с биологизированной водой сульфат меди не добавляли. В каждый стакан помещали 9 дафний и инкубировали их в течение 6 ч.

За 1 ч до измерений ТА готовили суспензию клеток *Chlorella vulgaris* с содержанием клеток около 300 тыс./мл. Для этого в 60 мл биологизированной воды добавляли 100 мкл концентрированной суспензии клеток, взятой из культиватора (рис. 1). Выдержка суспензии в течение 1 ч после разведения необходима для завершения адаптации клеток водорослей к новой освещенности, температуре и минеральному составу среды. Квантовый выход флуоресценции хлорофилла за это время устанавливается на некотором стабильном уровне.

Ключевые слова: трофическая активность, флуоресценция хлорофллы, *Daphnia magna*

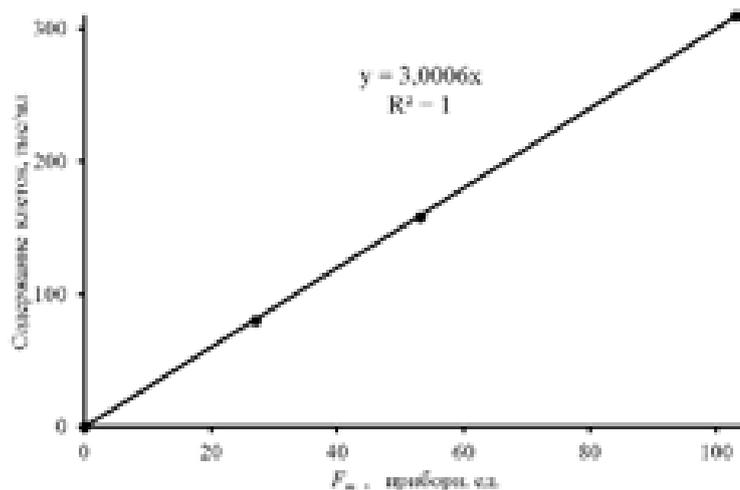


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения численности клеток *Chlorella vulgaris* на приборе «Mega-25» по интенсивности флуоресценции хлорофилла F_m .

Суспензию клеток *Chlorella vulgaris* (300 тыс./мл) разливали по флуориметрическим флаконам (рис. 1). Затем в каждый флакон пересаживали по 3 дафнии из стакана с пробой и переходили к первому измерению интенсивности флуоресценции хлорофилла. Таким образом, 9 дафний, находившихся в одном стакане с токсикантом, оказывались распределенными по 3 флаконам (3 повторности) по 3 рачка в каждом (рис. 1). Второе и каждое последующее измерение флуоресценции проводили через 20 мин в течение 2 ч. В перерывах между измерениями флаконы размещали в горизонтальном положении.

Один образец суспензии водорослей (рис. 1, флакон 0) был оставлен без дафний для оценки изменений квантового выхода флуоресценции хлорофилла в течение эксперимента.

Запаса кислорода, растворенного в воде и содержащегося в пузырьке воздуха над жидкостью, оказалось достаточно для обеспечения нормальной жизнедеятельности 3 дафний в закрытом флаконе на протяжении, по крайней мере, 12 ч. Поэтому открывать флаконы во время 2-часовых измерений флуоресценции не было необходимости.

Флуоресценцию клеток водорослей регистрировали непосредственно в 4 мл стеклянных флаконах с рачками (рис. 1), минуя операции по отбору проб и связанные с ними ошибки. Это повышает точность измерений и при большом количестве повторностей существенно экономит время.

Измерения флуоресценции были проведены на приборе «Mega-25», разработанном на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ и подробно описанном ранее [9]. Флуориметр изначально спроектирован для анализа проб природного фитопланктона и поэтому имеет большой запас чувствительности, достаточный для решения задач биотестирования. Импульс возбуждающего света (455 нм, 7500 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) имеет прямоугольную форму и продолжительность 1,5 с. В течение этого времени происходит увеличение интенсивности флуоресценции до некоторого максимального уровня F_m , а затем начинается ее спад (эффект Каутского).

В ряде работ [1, 4, 5] в качестве показателя численности клеток выбран базовый уровень флуоресценции хлорофилла F_0 . Мы использовали в этом качестве другой параметр — максимальную флуоресценцию F_m [10]. Известно, что при одном и том же количестве клеток величина F_m оказывается больше величины F_0 в 3–4,5 раза и потому может быть измерена с лучшим отношением сигнал/шум. Кроме того, фоновая флуоресценция органических примесей, содержащихся в пробе, вносит гораздо меньшую ошибку в определение параметра F_m , чем в определение F_0 .

При содержании клеток *Chlorella vulgaris* 300 тыс./мл (оптическая плотность при 670 нм 0,005, 100 нг/мл хлорофилла a) флуориметр «Mega-

25» дает соотношение сигнал/шум более 200. Для перехода от приборных единиц измерения F_m к содержанию клеток *Chlorella vulgaris* была проведена калибровка флуориметра по образцам с известным содержанием клеток в диапазоне 0–300 тыс./мл (рис. 2). Количество клеток определяли под микроскопом в счетной камере Ножотта объемом 50 мкл. С учетом калибровки (рис. 2), общее количество клеток *Chlorella vulgaris*, находящихся в 4 мл флаконе в момент времени t , может быть найдено по следующей формуле:

$$N(t) = 4 \cdot 3.0006 \cdot F_m(t) = 12 \cdot F_m(t) \text{ [тыс]},$$

где $F_m(t)$ — интенсивность флуоресценции в момент времени t , выраженная в приборных единицах.

Следует отметить, что после перемешивания, проводимого перед каждым измерением F_m (многократное переворачивание флакона), рачки рефлекторно опускаются на дно флакона и не попадают в зону возбуждения и детекции флуоресценции. Поэтому клетки водорослей, находящиеся в пищеварительном тракте дафний, не дают вклада в сигнал F_m .

Количество клеток, съеденных к моменту времени t одним рачком, равно:

$$N(t) = n(0) - n(t) \text{ [тыс]}$$

для 1 особи на флакон,

или:

$$N(t) = \frac{n(0) - n(t)}{3} \text{ [тыс]}$$

для 3-х особей на флакон.

ТА дафний в пробах характеризовали по количеству клеток, съеденных 1 рачком в течение первых 20 мин или в течение первых 60 мин:

$$TA_{20} = \frac{N(20 \text{ мин})}{20 \text{ мин}} \text{ [тыс./мин]},$$

$$TA_{60} = \frac{N(60 \text{ мин})}{60 \text{ мин}} \text{ [тыс./мин]}.$$

Результаты и их обсуждение

Кривые изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла во времени во флаконе без дафний и в трех контрольных флаконах с дафниями приведены на рис. 3. В начальный момент времени уровень F_m во флаконах с дафниями (рис. 3, флаконы 1–3) оказывается на 3–5 % ниже уровня F_m во флаконе без дафний (рис. 3, флакон 0). Это обусловлено разбавлением суспензии клеток водорослей в момент пересадки 3 дафний из стакана с пробой во флакон (рис. 1). Так, каждая дополнительная капля воды объ-

емом 40 мкл снижает концентрацию клеток в 4 мл флаконе на 1 %.

В течение 2 ч интенсивность флуоресценции во флаконе без дафний сохраняется на постоянном уровне (рис. 3, флакон 0). В остальных образцах (рис. 3, флаконы 1-3), где дафнии начинают поедать клетки водорослей, происходит постепенное уменьшение F_m . Заметный разброс контрольных кривых (рис. 3, флаконы 1-3), вероятно, является следствием индивидуальных различий в ТА рачков.

Нами был проведен эксперимент, в котором можно оценить индивидуальные различия рачков по скорости фильтрации (питания). Для этого в несколько флаконов с хлореллой было посажено только по 1 рачку. От экспериментальных кривых, описывающих уменьшение интенсивности флуоресценции во времени $F_m(t)$, мы перешли к кривым количества съеденных клеток $N(t)$ (рис. 4). По количеству клеток, съеденных за первые 20 и 40 мин (рис. 4), видно, что индивидуальная ТА в группе может варьировать не менее чем в 2 раза. В отдельные моменты у рачков наблюдается также полная остановка в потреблении пищи, связанная с линькой (особь 2 на рис. 4, с 20-й по 80-ю мин).

Такое естественное различие между особями накладывает принципиальное ограничение на минимальное количество дафний, необходимых для эксперимента. По нашему мнению, оптимальным вариантом для определения ТА является соотношение 10 дафний на 10-15 мл флакон.

Усредненные по 3 повторностям кривые $N(t)$ для контрольных дафний и для дафний, предварительно инкубированных в растворах сульфата меди (II), представлены на рис. 5.

Статистически достоверное снижение ТА дафний, вызванное ионами Cu^{2+} в концентрации 0,02 мг/л, может быть выявлено уже через 20 мин от начала измерений (рис. 5). Средние значения TA_{20} составили 10,9 тыс./мин в контроле и 2,4 тыс./мин для 0,02 мг/л Cu^{2+} .

Через 1 ч это различие, по-прежнему, сохраняется (рис. 5), однако выражено в меньшей степени за счет постепенного восстановления ТА дафний, прошедших инкубацию в растворах Cu^{2+} . Напомним, что во флаконах для измерения флуоресценции ионы меди уже отсутствуют. TA_{60} составила 5,3 тыс./мин в контроле и 3,5 тыс./мин для 0,02 мг/л Cu^{2+} .

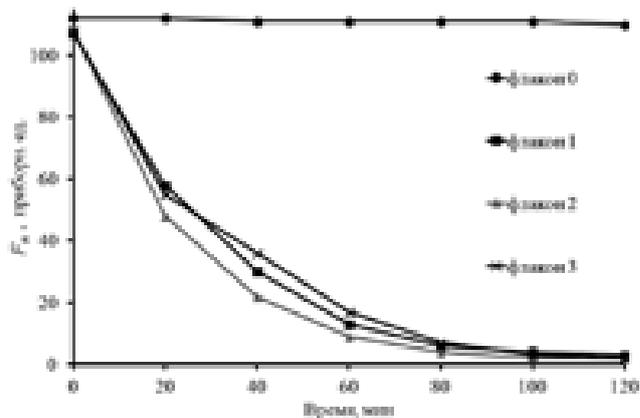


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла во времени с момента пересадки дафний во флаконы. Флакон 0 без дафний. Во флаконах 1-3 находятся по 3 рачка из контрольной группы, которая не подвергалась воздействию ионов Cu^{2+} .

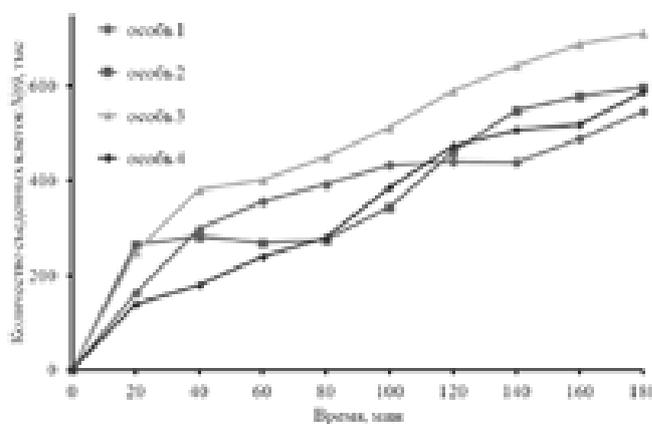


Рис. 4. Индивидуальные различия в трофической активности особей *Daphnia magna*. Кривые получены на одиночных особях, помещенных в отдельные флаконы.

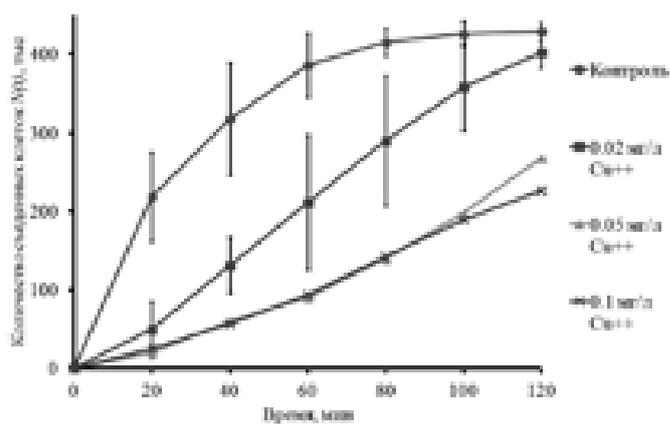


Рис. 5. Изменение количества съеденных клеток *Chlorella vulgaris* (в расчете на 1 рачка) во времени. Для контрольных дафний и для дафний, инкубированных в растворе с концентрацией Cu^{2+} 0,02 мг/л, показаны 90 % доверительные интервалы для средних значений $N(t)$.

Заключение

Таким образом, экспресс-определение ТА дафний в течение 20 мин может быть проведено на приборе «Mega-25» или аналогичных, в которых предусмотрено измерение максимальной флуоресценции хлорофилла *Fm* («Walz», Германия; «PSI», Чехия). Чувствительность метода позволяет обнаружить токсический эффект ионов Cu^{2+} в концентрации 0,02 мг/л не более чем через 6 ч инкубации дафний с токсикантом. При этом достаточно всего 9 дафний в контроле и 9 дафний в исследуемой пробе.

Пути дальнейшего увеличения чувствительности метода состоят в увеличении времени инкубации дафний в пробах до 24 ч, в проведении теста на рачках меньшего возраста (1–2-суточных) и в увеличении количества дафний, взятых для эксперимента — до 30 на пробу, как это рекомендовано в стандартных методиках (3 повторности по 10 шт.).

Литература

1. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И., Глазер В.М., Гераськин С.А., Доронин Ю.К., Киташова А.А., Киташов А.В., Козлов Ю.П., Кондратьева И.А., Коссова Г.В., Котелевцев С.В., Маторин Д.Н., Остроумов С.А., Погосян С.И., Смуров А.В., Соловых Г.Н., Степанов А.Л., Тушмалова Н.А., Цаценко Л.В. // Ред. О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева. М.: Академия. 2010. 288 с. (3-е изд. ISBN 978–5–7695–7033–9).
2. Лесников Л.А. Установление максимально допустимой концентрации для ракообразных. Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение / Л.А. Лесников, Е.Ф. Исакова. М.: ВНИРО. 1998. С. 48–65.
3. Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. 2-е изд., испр. и доп. М.: АКВАРОС, 2007. 52 с.
4. Шашкова Т.Л. Выживаемость и трофическая активность *Daphnia Magna* Straus в оперативном экологическом контроле водных сред. Дис. к-та биол. наук, Красноярск, 2011. 122 с.
5. Маторин Д.Н. О возможности использования флуоресцентных методов для изучения питания ракообразных / Д.Н. Маторин, Д.В. Вавилин, П.С. Венедиктов // Биологические науки, 1990. № 1. С. 146–152.
6. Matorin D.N., Biotesting of water toxicity according to the ratio of microalgae consumption by *Daphnia* detected with chlorophyll fluorescence / D.N. Matorin, L.B. Bratkovskaya, O.V. Yakovleva, and P.S. Venediktov. // Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2009, V. 64. № 3. P. 115–120.
7. Antal. T.K. Assessment of the effects of methylmercury and copper ions on primary processes of photosynthesis in green microalga *Chlamydomonas moewusii* by analysis of the kinetic curves of variable chlorophyll fluorescence / T.K. Antal, E. E. Graevskaya, D.N. Matorin, A. A. Volgusheva, V.A. Osipov, T.E. Krendeleva, and A.B. Rubin. // Biophysics, 2009. V. 54. № 4. P. 481–485.
8. Филенко О.Ф. Основы водной токсикологии. Учебное пособие / О.Ф. Филенко, И.В. Михеева. М.: Колос, 2007. 144 с.
9. Погосян С.И. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата / С.И. Погосян, Ю.В. Казамирко, С.В. Гальчук, И.В. Конохов, А.Б. Рубин // Вода: химия и экология. 2009. № 6. С. 34–40.
10. Strasser R.J. The F_0 and the OJIP fluorescence rise in higher plants and algae / Strasser R.J., Govindjee. // Regulation of chloroplast biogenesis (Ed. J. H. Argyroudi-Akoyunoglou), Plenum Press, New York, 1991. P. 423–426.

I.V. Konukhov, O.V. Vorobieva

IDENTIFICATION OF TROPHIC ACTIVITY OF *Daphnia magna* STRAUS USING FLUOROMETER «MEGA-25»

A method of toxicological rapid test for *Daphnia magna* maxillopods using Cu^{2+} -ions was described. After 6 hours incubation with toxicant maxillopods were added to algae suspension to determinate trophic activity of daphnids using decreasing chlorophyll fluorescence. High population density of maxillopods (3 individuals in 4 mL) and low initial content of alga cells ($3 \cdot 10^5$ in mL) allowed to shorten time of trophic activity measurement to 20 min.

Key words: trophic activity, chlorophyll fluorescence, *Daphnia magna*