

***Павлов В. И., Кулакова С. И., Климов Ю. С.**
Донбасский государственный технический университет
*E-mail: pavlow2005@rambler.ru

ЗАДАЧИ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ОДИНАКОВОЙ И ВЫСОКОЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТЕСТ-ОРГАНИЗМОВ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДЫ МАЛЫХ РЕК ВОСТОЧНОГО ДОНБАССА

Для обеспечения высокой и одинаковой физиологической чувствительности тест-организмов *Daphnia magna Straus* перед процедурой синхронизации необходимо выделение из природной популяции тест-организмов по генетическим корреляциям между комплексом признаков фенотипической реакции; необходимо также минимизировать количество культивирований синхронизированных популяций из одного исходного генотипа.

Ключевые слова: шахтная вода, тяжелые металлы, биотестирование, дафнии, природная популяция, фенотипическая реакция, генотипы, синхронизированная популяция, физиологическая чувствительность.

Финансирование: исследования выполнены за счет средств федерального бюджета (код темы: FRRU-2024-0004 в ЕГИСУ НИОКТР).

Проблема и её связь с научными и практическими задачами. С закрытием угольных шахт на территории Восточного Донбасса обозначился ряд проблем. Водность малых рек снизилась из-за прекращения работы шахтных водоотливов. В настоящее время ситуация с обмелением поверхностных водных источников усугубляется наблюдаемым засушливым периодом. Согласно климатическим математическим моделям, апробированным на территории Восточного Донбасса, период засухи может продлиться около 30 лет [1].

Атмосферные осадки вымывают в речную сеть из терриконов и складированных золовых остатков пылевые частицы, растворимые соли тяжелых металлов (ТМ) и токсических микроэлементов. Аналогичные гидрохимические процессы происходят при затоплении выработанных пространств угольных шахт [2]. Возникли риски угнетения водных экосистем поверхностных водных источников токсичными микроэлементами шахтных вод и распространения токсичности по трофической пищевой цепи вплоть до человека.

С одной стороны, для человека многие ТМ, такие как Fe, Cu, Zn, Mo, являются не-

обходимыми для нормальной работы организма, т. к. участвуют в биологических процессах. С другой стороны, накопление данных элементов в тканях организма в большом количестве может оказывать вредное воздействие, включая замедление роста, снижение репродуктивной активности и даже преждевременную смерть [3].

В течение долгого времени химический анализ был единственным методом оценки загрязнения окружающей среды. Однако он лишь констатирует наличие или отсутствие определённых химических элементов в пробе воды [4]. С помощью метода биотестирования [5, 6] с применением тест-организмов *Daphnia magna Straus* оценивается комбинированное воздействие всех токсических загрязнений в воде.

Действующий стандарт имеет следующие недостатки. Отсутствуют методики оценки биоаккумуляции (накопления) токсических веществ в тест-организме. Выявление этого признака очень важно для трофической цепи гидроэкосистемы, так как в итоге может пострадать человек, являющийся конечным звеном в этой цепи. Также отсутствуют методы оценки возможного проявления мутагенности вслед-

ствие биоаккумуляции токсических веществ, которые могут проявляться в изменении функциональных реакций: изменение наследственности; ослабление репродуктивной функции, ускорение старения. Необходимо также установить возможность биоиндикации тест-объектом находящего в анализируемой пробе конкретного токсического микроэлемента.

Постановка задачи. Совершенствовани-ем системы мониторинга качества воды в природных источниках с использованием биотестирования занимаются за рубежом и в отечественных научно-исследовательских институтах. Основополагающей проблемой биотестирования является обеспечение достаточно высокой, и главное, одинаковой физиологической чувствительности тест-организмов *Daphnia magna Straus* к токсичным водным загрязнениям.

Целью настоящей работы является обоснование методических рекомендаций по подготовке популяции тест-организмов одного генотипа с высокой физиологической чувствительностью к загрязнению поверхностных водных источников тяжелыми металлами.

Объект исследования — водный организм *Daphnia magna Straus* для биотестирования степени нарушения среды его обитания.

Предмет исследования — физиологические реакции водных организмов *Daphnia magna Straus* на изменение условий среды их обитания.

Задачи исследования:

- анализ публикаций по реакции тест-организмов *Daphnia magna Straus* на тяжелые металлы;
- анализ тест-функций при биотестировании среды обитания;
- оценка фенотипных реакций тест-популяции;
- анализ различий тест-функций по генотипам тест-организмов *Daphnia magna Straus*;
- обоснование рекомендаций по обеспечению высокой и одинаковой чувствительности тест-популяции.

Методика исследования. В качестве базового организма для биотестирования рекомендуется использовать биологический вид *Daphnia magna Straus* (далее *Daphnia magna*), который по характеру питания относится к фильтраторам, является типичным для исследуемой территории малых рек Донбасса. У рачков хорошо развиты кровеносная и нервная системы (позволяет экстраполировать результаты токсикологических исследований на других многоклеточных представителей экосистем и даже на человека) [7]. Для обоснования методических рекомендаций по подготовке популяции тест-организмов использован метод обобщения исследований по оценке физиологической реакции тест-организмов *Daphnia magna Straus* на ухудшение условий обитания.

Изложение материала. В природной среде дафнии размножаются циклически согласно сезонам года. В благоприятных условиях (например, весной при достаточном уровне кислорода и количестве пищи) размножение происходит путем партеногенеза: личинки развиваются из специальных яиц без оплодотворения. Когда условия среды ухудшаются, у самок дафнии зарождаются цистовые яйца путем оплодотворения самцами. Цистовые яйца обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям, таким как заморозки и засуха, что повышает выживаемость вида в неблагоприятных условиях [8].

В лабораторных условиях удается обеспечить одинаковую физиологическую чувствительность тестовой популяции благодаря партеногенетическому размножению и поддержанию синхронизированной культуры (особей, находящихся на одной стадии развития). Из работы [9] вытекает дополнительное требование к выращиванию тестовой синхронизированной популяции — необходимо ограничивать количество культивирований, так как оно может изменять чувствительность к токсикантам.

Необходимо подчеркнуть, что современные стандарты (ГОСТ Р 56236-2014,

РД 52.24.868-2017) устанавливают два принципиально разных, но взаимодополняющих подхода к определению токсического воздействия: метод А (летальность), где ключевым параметром служит количество выживших особей; и метод Б (иммобилизация), основанный на оценке двигательной активности тест-организмов. Летальность тест-организма является одной из самых распространенных тест-функций в биотестировании. Хотя данная тест-функция является простой в исследовании, однако и самой «грубой», так как показывает лишь крайнюю степень проявления токсического эффекта.

Плодовитость — вторая тест-функция, рекомендованная для оценки токсичности [7] в соответствии с методикой (ФР.1.39.2007.03222), допущенной для целей государственного контроля и мониторинга. Способность тест-популяции к размножению представляет особый интерес для диагностики, поскольку позволяет устанавливать наличие биоаккумуляции хронического токсического действия при биотестировании водных сред.

Большинство современных исследований с применением *Daphnia magna* направлены на изучение чувствительности тест-организма к составу воды, в частности к ТМ. Авторы исследования [10] приходят к выводу, что наибольшей токсичностью для *Daphnia magna* обладают ионы Cu. Уже при концентрации $0,03 \text{ мг/дм}^3$ они снижают репродуктивную и фильтрационную активность, вызывают гибель рачков. Интересен тот факт, что предельно допустимая концентрация Cu для водных объектов (ПДКв) составляет $0,1 \text{ мг/дм}^3$ (СанПиН 2.1.4.1074-01), т. е. в речных водоемах допускается такое содержание ионов Cu, которое подавляет жизненные функции зоопланктона. В этой же работе говорится, что ионы Zn в концентрациях ниже ПДКв ($0,1 \text{ мг/дм}^3$) угнетают репродуктивную функцию, но не вызывают гибель и не оказывают значительного воздействия на фильтрационную активность. Наименьшей

токсичностью обладают ионы Co. Их присутствие в воде мало влияет на жизнедеятельность рачка.

В работе К. Э. Бизингера и Г. М. Кристенсена [11] показано, что ионы металлов при концентрациях Cd $0,00017 \text{ мг/дм}^3$, Hg $0,0034 \text{ мг/дм}^3$, Co $0,01 \text{ мг/дм}^3$, Cu $0,022 \text{ мг/дм}^3$, Pb и Ni $0,03 \text{ мг/дм}^3$, Zn $0,07 \text{ мг/дм}^3$, Cr $0,33 \text{ мг/дм}^3$, Mn $4,1 \text{ мг/дм}^3$ не снижают выживаемость, но понижают репродуктивную функцию на 16 %, а также отрицательно влияют на вес дафний.

Изучая влияние ионов Co на организм в течение длительного времени (полный жизненный цикл) [12], было выявлено, что ионы Co при концентрациях около $0,1 \text{ мг/дм}^3$ влияют на выживаемость и линейный рост дафний, около $0,3 \text{ мг/дм}^3$ — на эмбриогенез и его синхронность с овогенезом, около $0,16 \text{ мг/дм}^3$ — на наполнение кишечника и накопление жира, около $0,01 \text{ мг/дм}^3$ — на количество выметанной молоди.

В проведенном исследовании Е. П. Жилицкой с соавторами [13] изучалось влияние тяжелых металлов на иммобилизацию организма. При концентрации ионов Cd $0,05 \text{ мг/дм}^3$ наблюдается угнетение двигательной активности. Для катионов Pb и Ni подобный эффект наблюдался при концентрациях $0,7 \text{ мг/дм}^3$ и $1,0 \text{ мг/дм}^3$ соответственно.

Некоторые элементы способны к функциональной кумуляции, т. е. к накоплению вредного вещества в организме, при котором эффект воздействия усиливается при повторных поступлениях, даже если само вещество не накапливается в тканях в значительных количествах. Например, в работе Л. П. Рыжкова с соавторами [14] экспериментально показано, что Cr способен к функциональной кумуляции, поэтому в поколениях дафний регистрировали снижение устойчивости к повреждающему воздействию Cr. Отклонения в уровне основных биологических процессов (рост, размножение) у потомства не только сохранялись, но и выявлялись по сравнению с исходными особями в менее концентрированных растворах.

В ряде исследований показано, что тяжелые металлы могут взаимодействовать друг с другом, вызывая синергетические и антагонистические эффекты при попадании в водные организмы. Так, например, при совместном влиянии пар Ni-Hg и Ni-Cu токсичное воздействие пары выше, чем каждого металла в отдельности, и, наоборот, в парах Ni-Cd, Ni-Zn совместное воздействие ниже, чем каждого металла в отдельности. Если Cd попадает в среду, где уже есть смесь Zn и Cu, то общее токсическое воздействие резко усиливается [15]. Стоит подчеркнуть, что на синергетический и антагонистический эффекты влияют и концентрации элементов в водной среде. В частности, добавление Cu к низким концентрациям Pb и Cd усиливает токсический эффект (синергизм), при высоких концентрациях этих же веществ наблюдается такое взаимодействие веществ, при котором их совместное токсическое действие оказывается слабее, чем сумма эффектов каждого вещества в отдельности (антагонизм) [16].

Токсическое действие соединений ТМ зависит и от условий водной среды (содержания органических веществ, pH и температуры). Например, в щелочной и жесткой воде Zn и Ni образуют малорастворимые карбонаты и гидроксиды, что снижает их доступность, а в кислой воде металлы переходят в свободные ионы, повышая токсичность. Содержание органических веществ уменьшает токсичность соединений металлов, так как гуминовые кислоты связывают катионы Cu, Cd и Pb [17]. Повышение температуры усиливает эффект токсических веществ, например, с ее повышением усиливается токсичность Cd на 3–4 порядка и выше, Cu и Zn — на два порядка, а Hg и Mn — мало изменяется [7].

Стоит отметить, что в процессе исследований разными учёными, могут быть получены различные результаты при анализе одних и тех же веществ. Это можно объяснить тем, что в каждой лаборатории используется вода, которая имеет свои особенности, характерные для конкретного региона. Кроме того, условия проведения эксперимента могут отличаться: например, продолжительность эксперимента и количество организмов в тестируемой среде могут быть разными. Также исследователи могут применять различные модельные вещества для оценки воздействия потенциально токсических элементов.

Научно-исследовательским институтом биологии при Иркутском государственном университете, а также Лимнологическим институтом СО РАН (г. Иркутск) исследованы корреляционные связи между количественными оценками морфологических и физиологических реакций природной популяции *Daphnia magna* на ухудшение качества среды обитания (снижение количества пищи) [18, 19]. Установлено три генотипа в одной исходной природной популяции (табл. 1). Генотипы R1 и R2 имеют противоположные тенденции в изменении морфологических и физиологических реакций. Стабильный генотип St не имел корреляционных связей между оценками аналогичных реакций. В таблице приняты следующие обозначения: Р — плодовитость; С — время созревания; В — выживаемость; st — отсутствие изменения реакции; + — увеличение реакции; +, + — значительное увеличение реакции; — — уменьшение реакции; —, — — значительное уменьшение реакции элементов.

Таблица 1

Рекомендации по оценке морфофизиологической чувствительности тест-организма *Daphnia magna*

Генотипы	Морфологические признаки		Физиологические признаки		
	длина тела	длина иглы	Р	С	В
R ₁	—	—, —	+	+, +	—
R ₂	+	+	—	—, —	+, +
S _t	st	st	st	st	st

Из таблицы следует, что для повышения чувствительности синхронизированной тест-популяции необходимо предварительное аналогичное исследование генотипов природной популяции и выделение одного генотипа с наибольшей морфофизиологической чувствительностью.

Выводы и направление дальнейших исследований. Для обеспечения высокой и одинаковой физиологической чувствительности тест-организмов *Daphnia magna* Straus при биотестировании воды на малых реках Восточного Донбасса необходимо учесть следующие научные результаты.

1. Рачки *Daphnia magna* Straus чувствительны к большинству загрязняющих веществ и имеют способность накапливать значительные количества токсических микроэлементов.

2. Необходимо разделение природной популяции на отдельные генотипы по наличию противоположных корреляционных связей между количественными оценками морфологических и физиологических

реакций природной популяции *Daphnia magna* на ухудшение качества условий среды обитания.

3. Генотип с наибольшей морфофизиологической чувствительностью принимается за основу для создания синхронизированной тест-популяции.

4. Для исключения снижения морфофизиологической чувствительности необходимо минимизировать количество культивирований синхронизированных популяций из одного исходного генотипа.

5. Для мониторинга последствий загрязнения природных водных источников для гидроекосистем методом биотестирования необходима оценка возможных биологических эффектов у тестируемых популяций: биоаккумуляции токсических микроэлементов и проявлений мутагенности в последующих поколениях тест-объектов, проявлений функциональной кумуляции, проявления синергетических и антагонистических эффектов от комбинированного воздействия микроэлементов в шахтной воде.

Список источников

1. Павлов В. И., Кусайко Н. П., Сергейчук О. В. Климатические особенности формирования стока малых рек ЛНР // *Экологический вестник Донбасса*. 2022. № 4. С. 31–40. EDN: RJIYKQ
2. Влияние угледобычи в Донбассе на подземные и поверхностные воды / Г. Ю. Складенко [и др.] // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2017. № 3-1 (195-1). С. 100–107. EDN: ZOKXMZ
3. Махниченко А. С., Пащенко А. Е. Влияние тяжелых металлов на организм человека // *Science Time*. 2016. № 2 (26). С. 395–401. EDN: VQFMLJ
4. Александрова В. В. Биотестирование как современный метод оценки токсичности природных и сточных вод : монография. Нижневартовск : Нижневартовский государственный университет, 2013. 119 с. EDN: ENAWHL
5. ГОСТ Р 56236-2014. Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных *Daphnia magna* Straus. М. : Стандартинформ, 2014. 44 с.
6. РД 52.24.868-2017. Методы биотестирования воды и донных отложений водных объектов / Росгидромет. Ростов н/Д : ФГБУ «ГХИ», 2017. 64 с.
7. Олькова А. С. Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов : дис. ... д-ра биол. наук. Киров, 2020. 359 с. : ил. EDN: IRBGXV
8. Ebert D. *Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution* // *EvoDevo*. 2022. Vol. 13. Iss. 1. Article number: 16. 13 p. DOI: 10.1186/s13227-022-00199-0. EDN: EGYEPI
9. Воробьева О. В., Самойлова Т. А., Гершкович Д. М. Пути исследования морфо-физиологических параметров лабораторных культур ветвистоусых ракообразных, применяемых для биотестирования // *Актуальные проблемы изучения ракообразных : сборник тезисов и материалов*

докладов науч.-практ. конф., посвященной 90-летию со дня рождения Н. Н. Смирнова, Борок, 17–20 мая 2018 года. Борок : ООО «Филигрань», 2018. С. 57–59. EDN: XWJVZR

10. Шилова Н. А., Рогачева С. М., Губина Т. И. Влияние биогенных металлов на жизнедеятельность *Daphnia magna* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т. 12. № 1-8. С. 1951–1953. EDN: NDYGXF

11. Biesinger K. E., Christensen G. M. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna* // Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1972. Vol. 2. No. 12. P. 1691–1700. DOI: 10.1139/j72-269

12. Лузгин В. К. Морфо-физиологические изменения дафний при кратковременном воздействии солей тяжелых металлов, их обратимость и влияние на продуктивность популяции : дис. ... канд. биол. наук. Ленинград, 1984. 203 с. : ил.

13. Характеристика токсикологических эффектов тяжелых металлов на физиологические показатели Большой Дафнии (*Daphnia Magna*) / Е. П. Живицкая [и др.] // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. 2024. № 2. С. 21–29. EDN: YRMGQL

14. Рыжков Л. П., Артемьева Н. В., Канская М. А. Токсичность хрома трехвалентного для *Daphnia magna* Straus // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2011. № 6 (119). С. 28–31. EDN: OGBUAN

15. Гуркина Л. В., Наумова И. К. Синергизм и антагонизм токсичных металлов в организме животных // Аграрная наука в условиях модернизации и инновационного развития АПК России : сб. материалов Всерос. науч.-метод. конф. с междунар. участием, посвящ. 85-летию Ивановской ГСХА им. Д. К. Беляева, Иваново, 29–30 окт. 2015 года. Иваново : Ивановская ГСХА, 2015. Т. 3. С. 18–21. EDN: VRFOYN

16. Галах А. К., Яковлева А. П. Оценка экотоксикологических эффектов тяжелых металлов с использованием *Letmatipor* и *Daphnia magna* в качестве биоиндикаторов // Молодежь XXI века: образование, наука, инновации : материалы XI междунар. конф. аспирантов и молодых ученых, Витебск, 6 декабря 2024 года. Витебск : ВГУ им. П. М. Машерова, 2024. С. 21–23. EDN: NQOTLX

17. Моисеенко Т. И. Биодоступность и экотоксичность металлов в водных системах: критические уровни загрязнения // Геохимия. 2019. Т. 64. № 7. С. 675–688. DOI: 10.31857/S0016-7525647675-688. EDN: GBYYBL

18. Генотипическая структура природной популяции дафнии по фенотипической реакции особей на изменение количества корма / Е. Л. Ермаков, С. И. Питулько, В. М. Корзун, Г. В. Гречаный // Генетика. 2010. Т. 46. № 2. С. 239–248. EDN: LOIXWL

19. Ермаков Е. Л., Питулько С. И. Анализ генетических корреляций по фенотипической реакции особей по комплексу количественных признаков на изменение количества корма в природной популяции дафнии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3-3. С. 1110–1114. EDN: RXEAFZ

© Павлов В. И., Кулакова С. И., Климов Ю. С., 2025

**Рекомендована к печати к.б.н., доц. каф. ЭиБЖД ДонГТУ Швыдченко С. С.,
начальником службы экологической безопасности и производственной санитарии
управления охраны труда и промышленной безопасности ООО «ЮГМК» Красноносом Н. Н.**

Статья поступила в редакцию 01.07.2025.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Павлов Валерий Иванович, канд. техн. наук, доцент каф. экологии и безопасности жизнедеятельности

Донбасский государственный технический университет,
г. Алчевск, Россия, e-mail: pavlow2005@rambler.ru

Кулакова Светлана Ивановна, канд. техн. наук, доцент каф. высшей математики и естественных наук
Донбасский государственный технический университет,
г. Алчевск, Россия

Климов Юрий Сергеевич, магистрант I курса каф. экологии и безопасности жизнедеятельности
Донбасский государственный технический университет,
г. Алчевск, Россия

***Pavlov V. I., Kulakova S. I., Klimov Yu. S.** (Donbass State Technical University, Alchevsk, Russia, *e-mail: pavlow2005@rambler.ru)

TASKS TO ENSURE UNIFORM AND HIGH PHYSIOLOGICAL SENSITIVITY OF THE TEST-ORGANISMS DAPHNIA MAGNA STRAUS FOR BIOASSAYING WATER IN SMALL RIVERS OF EASTERN DONBASS

To ensure high and uniform physiological sensitivity of the test-organisms Daphnia magna Straus prior to the synchronization procedure, it is essential to isolate test-organisms from the natural population based on genetic correlations between the complex traits of the phenotypic response; it is also important to minimize the number of cultivations of synchronized populations derived from a single original genotype.

Key words: mine water, high-density metals, biotesting, daphnids, natural population, phenotypical reaction, genotypes, synchronized population, physiological sensitivity.

Funding: the studies were carried out with funding from the federal budget (theme code: FRRU-2024-0004 in the Unified state information system for accounting the research, experimental and technical works).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Pavlov Valery Ivanovich, PhD in Engineering, Assistant Professor of the Department of Ecology and Life Safety
Donbass State Technical University,
Alchevsk, Russia, e-mail: pavlow2005@rambler.ru

Kulakova Svetlana Ivanovna, PhD in Engineering, Assistant Professor of the Department of Higher Mathematics and Natural Sciences
Donbass State Technical University,
Alchevsk, Russia

Klimov Yury Sergeevich, First-year Candidate for a Master's Degree of the Department of Ecology and Life Safety
Donbass State Technical University,
Alchevsk, Russia