

Влияние арсенита натрия, нитрата ртути и их смеси на *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg и *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb

© 2010. С. А. Мальцева, аспирант, м.н.с.,

Региональный центр государственного экологического контроля
и мониторинга по Кировской области,
e-mail: ecologsveta@yandex.ru

Приводятся результаты опытов по изучению острой и хронической токсичности мышьяка, ртути и их смеси. Обсуждаются особенности воздействия токсикантов на *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb и *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. Дается оценка эффективности использования традиционных биологических тест-объектов в контроле и мониторинге загрязнения гидросферы мышьяком и ртутью.

The results of experiments with acute and chronic toxicity of arsenic, mercury and their mixture are shown. The characteristics of the influence of pollutants on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb and *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg are discussed. The effect of using the traditional biological test objects for the purpose of control and monitoring of hydrosphere pollution with metals is estimated.

Ключевые слова: биотестирование, токсический эффект, острая токсичность, хроническая токсичность, тест-объект

Key words: bioassay, toxic effect, acute toxic effect, chronic toxic effect, test

Ртуть и мышьяк достаточно широко и в значительных объемах используются в производственной деятельности. В результате накопления во внешней среде эти элементы представляют серьезную опасность с точки зрения их биологической активности и токсических свойств. Несмотря на длительную историю изучения свойств соединений мышьяка и ртути, в настоящее время мало данных, которые позволили бы выявить некоторые количественные закономерности «концентрация – эффект». Известно, что арсенит натрия стимулирует рост водорослей, а его концентрация 31 мг/л при 16 ч. экспозиции токсична для *Daphnia magna* Straus [1]. Концентрация хлорида ртути 0,66 мг/л вызывает «утечку» кальция из клеток водорослей и удлинение лаг-фазы роста культуры [2]. Медианная концентрация хлорида ртути при 48 ч. экспозиции для *D. magna* составила 0,005 мг/л [3]. Ртуть неблагоприятно влияет на репродуктивную функцию этих организмов.

Проблема загрязнения водной среды мышьяком и ртутью является актуальной в Кировской области, т. к. на территории области располагается Кильмезский могильник ядохимикатов, где захоронено 590 т ртути- и мышьяксодержащих, хлорорганических и других токсичных соединений. С 2006 года начал работать объект по уничтожению химического оружия «Марадыковский».

Уничтожаются авиационные боеприпасы и боевые части ракет, снаряженные фосфорорганическими отравляющими веществами, а также смесью иприта и люизита (около 7 тыс. т) [4]. Арсенит натрия является продуктом детоксикации люизита.

Возникает вопрос об эффективности использования традиционных тест-объектов в экотоксикологическом контроле и мониторинге загрязнения гидросферы ртутью и мышьяком, а также их смесями. Цель исследования – выявить закономерности токсического эффекта мышьяка и ртути на тест-объекты *Ceriodaphnia affinis* и *Scenedesmus quadricauda*.

Материал и методика исследований

За период 2008–2009 гг. проводились сезонные опыты по установлению острого и хронического токсического действия арсенита натрия в концентрациях, пересчитанных на мышьяк (III) $5,0 \cdot 10^{-4}$, $5,0 \cdot 10^{-3}$, $5,0 \cdot 10^{-2}$, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 мг/л, и нитрата ртути в концентрациях, пересчитанных на ртуть (II) $5,0 \cdot 10^{-8}$, $6,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $6,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$, $3,0 \cdot 10^{-5}$, $6,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л на *C. affinis* и *S. quadricauda*.

Эксперименты с *C. affinis* осуществлялись по методике, предложенной Н.С. Жмур, основанной на определении смертности

и изменений плодовитости третьего поколения рачков в токсичной среде по сравнению с контрольной выборкой в чистой воде [5]. Опыты проводились в 10 параллельных сериях (10 стаканов) в двух повторностях. Молодь, возраста не более 24 ч., помещалась по одной в 15 мл исследуемой воды. Плотность суспензии водорослей *S. quadricauda*, используемой для ежедневного кормления рачков, составляла 2–3 млн. кл/мл. Тестирование проводилось при температуре 19–24 °С, освещённости 900 лк и световом периоде 16 ч. Для культивирования рачков использовалась питьевая, дехлорированная вода с содержанием кислорода не менее 4 мг/л, рН=7,0–8,5 и общей жёсткостью 2,0–4,0 мг экв./л. Методика обеспечивает получение результатов анализа с погрешностями, не превышающими значений показателя точности – 40%, предела повторяемости – 30%, показателя воспроизводимости – 20%.

При постановке 3-недельных опытов на модельных партеногенетических популяциях исходная плотность посадки молоди третьего поколения составляла 20 особей на 500 мл. Учитывали общую биомассу подопытной популяции рачков.

Методика с применением тест-объекта *S. quadricauda* основана на снижении роста численности водорослей в токсичной среде, по сравнению с контрольной культурой в чистой воде. Биотестирование осуществлялось в климатостате с постоянной температурой 25 °С, освещённостью 8 000 лк и световым периодом 24 ч. для достижения скорости роста контрольной культуры 0,7 сут⁻¹ за 72 ч. [6] или 96 ч. [7]. Использовалась культура, находящаяся в экспоненциальной стадии роста (3–5 сут после пересева), когда все клетки сохраняют высокую физиологическую активность. Опыты проводились в двух повторностях. Плотность исходного инокулята составляла 35 тыс. кл/мл. Число клеток водорослей определялось под микроскопом методом прямого счёта в камере Горяева в четырёхкратной повторности. Методика обеспечивает получение результатов анализа с погрешностями, не превышающими значений показателя точности – 32%, предела повторяемости – 30%, показателя воспроизводимости – 15%.

При статистической обработке данных рассчитывали среднее арифметическое, среднее квадратическое отклонение, ошибку среднего арифметического, показатель достоверности различий двух сравниваемых величин. Рассчитанный показатель достовер-

ности сравнивался с критерием Стьюдента (P=0,05).

Результаты исследований и их обсуждение

Мышьяк не оказал острого токсического действия (50% гибель за 48 ч.) на *C. affinis*, в том числе в экспериментах с дополнительной функциональной нагрузкой (отсутствие кормления). Установлена хроническая токсичность мышьяка для рачков в концентрации 0,8; 0,9 и 1,5 мг/л по критерию смертности (20% гибель за 7 сут). Выявлена линейная зависимость «концентрация – эффект».

Определялось отклонение плодовитости рачков по отношению к контролю, для этого ежедневно учитывалось число родившейся молоди и высчитывалось ее среднее значение на одну самку. У контрольных и подопытных рачков половозрелость наступала на 3–4 сутки, а первый вымет молоди – на 5 сутки. Однако в летнем эксперименте вымет молоди у подопытных рачков произошел на 4 сутки, а у контрольных – на 5 сутки. Статистически достоверных отклонений плодовитости по отношению к контролю не выявлено (табл. 1).

По литературным данным, хронические эффекты воздействия токсикантов с наибольшей полнотой и яркостью вырисовываются в ряду поколений гидробионтов с коротким жизненным циклом, с максимумом проявления в 4–5 поколениях [8]. Поэтому определялся хронический эффект воздействия 1,5 мг/л мышьяка на молодь 3–7 поколений рачков. Установлено снижение толерантности молоди *C. affinis* к мышьяку в ряду поколений. Мышьяк оказал влияние в большей степени на плодовитость рачков, чем на выживаемость. Если у молоди третьего поколения половозрелость наступала на 3–4 сутки и статистически достоверных отклонений в плодовитости не выявлено, то в последующих генерациях половозрелость не наступала. Концентрация 1,5 мг/л мышьяка оказала острое токсическое действие на рачков 5–7 поколений (табл. 2).

Таким образом, в ряду поколений максимальный эффект воздействия мышьяка проявился по показателю плодовитости у рачков 4–7 поколений и по показателю смертности – у рачков 5–7 поколений.

Изучался эффект функциональной кумуляции в опытах на генерациях и модельных популяциях рачков. Молодь четвертого поколения, полученную от рачков, выращенных в среде

Таблица 1

Плодовитость самок *C. affinis* в зависимости от концентраций в среде мышьяка

Концентрация мышьяка, мг/л	Среднее число родившейся молоди на одну самку, экз.						
	Время от начала опыта, сут						
	Летний эксперимент				Осенний эксперимент		
	4	5	6	7	5	6	7
0,005	1,06 ± 0,48	1,88 ± 0,40	3,06 ± 0,52	1,35 ± 0,59	0,71 ± 0,36	0,29 ± 0,21	1,73 ± 0,54
0,050	1,00 ± 0,37	1,18 ± 0,31	2,41 ± 0,51	2,81 ± 0,70	1,00 ± 0,42	0,31 ± 0,31	0,87 ± 0,34
0,500	1,22 ± 0,33	1,29 ± 0,30	3,00 ± 0,59	0,69 ± 0,29	2,67 ± 0,27	0,47 ± 0,47	4,37 ± 0,58
0,600	1,00 ± 0,23	1,06 ± 0,35	0,75 ± 0,31	1,19 ± 0,29	2,74 ± 0,29	0,42 ± 0,30	4,58 ± 0,59
0,700	0	0,79 ± 0,22	0,42 ± 0,09	2,00 ± 0,28	2,95 ± 0,37	0,11 ± 0,11	5,68 ± 0,43
0,800	0,24 ± 0,14	0,65 ± 0,24	0,92 ± 0,26	0,92 ± 0,35	2,21 ± 0,38	0	3,58 ± 0,67
0,900	1,00 ± 0,24	0,73 ± 0,25	1,08 ± 0,29	2,25 ± 0,33	1,18 ± 0,34	0,47 ± 0,28	3,71 ± 0,55
1,000	3,56 ± 0,27	0,78 ± 0,53	2,17 ± 0,35	3,29 ± 0,29	1,44 ± 0,30	0,33 ± 0,20	3,89 ± 0,55
1,500	–	–	–	–	1,56 ± 0,33	1,19 ± 0,53	1,50 ± 0,40
0 (контроль)	0	1,10 ± 0,59	2,00 ± 0,5	2,30 ± 0,76	2,33 ± 0,67	1,78 ± 1,12	3,56 ± 1,19

Примечание: – нет данных.

с мышьяком ($5,0 \cdot 10^{-4}$ мг/л), подвергали воздействию 1,5 мг/л мышьяка. Острая токсичность проявилась в пятом и седьмом поколениях, а в шестом поколении наблюдалось снижение показателя смертности (табл. 3).

Статистически достоверных отклонений биомассы подопытных модельных популяций рачков при воздействии сублетальной концентрации мышьяка не установлено.

Мышьяк не оказал острого токсического действия на *S. quadricauda*, но оказал хроническое действие в концентрации 1,5 мг/л (статистически достоверное отклонение коэффициента прироста числа подопытных клеток за 7 сут). Удельная скорость роста водорослей на 4 сут зимнего и весеннего экспериментов составила 0,7 сут⁻¹, контрольной культуры – 0,8–0,9 сут⁻¹. Установлено статистически достоверное отклонение значения биомассы подопытных водорослей при воздействии 1,5 мг/л мышьяка. Выявлена линейная зависимость «концентрация – эффект».

Установлен эффект функциональной кумуляции при воздействии сублетальной кон-

центрации мышьяка в хронических опытах на микроводоросли. Культура микроводоросли *S. quadricauda*, выращенная в среде с мышьяком ($5,0 \cdot 10^{-4}$ мг/л), испытывалась на воздействие 1,5 мг/л токсиканта. На 72 сут эксперимента отмечен острый токсический эффект (50% подавление роста культуры), обусловленный истощением адаптационных свойств микроводоросли (табл. 4).

Концентрации ртути $3,0 \cdot 10^{-5}$ и $6,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л оказали на рачков острое токсическое действие за 24 ч. В экспериментах с дополнительной функциональной нагрузкой (отсутствие кормления) острая токсичность ртути проявилась в концентрациях $6,0 \cdot 10^{-6}$ и $1,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л за 48 ч. Хроническая токсичность установлена по критерию смертности при воздействии $3,0 \cdot 10^{-6}$, $6,0 \cdot 10^{-6}$ и $1,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л ртути. Статистически достоверное отклонение плодовитости рачков как в осеннем, так и в зимнем эксперименте отмечено в концентрации $6,0 \cdot 10^{-6}$ мг/л ртути ($2,50 > 2,05$, $2,1 > 2,05$) (табл. 5). Выявлена линейная зависимость «концентрация – эффект».

Таблица 2

Смертность и плодовитость рачков в ряду поколений при действии мышьяка (1,5 мг/л)

Поколение рачков	Смертность, %	
	2 сут	7 сут
F ₃	10,0 ± 4,0	22,2 ± 8,8
F ₄	28,0 ± 11,2	94,4 ± 37,8
F ₅	100	100
F ₆	100	100
F ₇	90,0 ± 36,0	95,0 ± 38,0

Таблица 3

Смертность и плодовитость рачков в ряду поколений в условиях функциональной кумуляции мышьяка (1,5 мг/л)

Поколение рачков	Смертность, %	
	2 сут	7 сут
F ₄	44,4 ± 17,8	94,4 ± 37,8
F ₅	85,0 ± 34,0	100
F ₆	30,0 ± 12,0	72,2 ± 28,9
F ₇	100	100

Таблица 4

Показатели роста культуры микроводоросли *S. quadricauda* при действии мышьяка (1,5 мг/л)

Условия выращивания культуры <i>S. quadricauda</i>	Значение угнетения роста культуры, %			Коэффициент прироста, раз
	72 ч.	96 ч.	168 ч.	
Культура, выращенная на питательной среде Успенского	21,0	68,0	28,0	155,4±2,1*
Культура, выращенная на питательной среде Успенского с добавлением 5.0·10 ⁻⁴ мг/л мышьяка	54,0	77,0	39,0	131,9±3,3*

Примечание: * – выделены результаты с достоверным отклонением от контроля.

Установлен острый токсический эффект воздействия 6·10⁻⁶ мг/л ртути на молодь пятого и седьмого поколения рачков. В поколениях F₃ – F₅ рачков отмечалось статистически достоверное отклонение плодовитости, в шестом поколении отклонение не достоверно, а в седьмом – половозрелость рачков не наступила (табл. 6).

Таким образом, в ряду поколений наиболее ярко выражен эффект усиления воздействия ртути на плодовитость рачков.

Молодь, выращенная в среде, содержащей 6·10⁻⁸ мг/л ртути, испытывалась на действие концентрации 6·10⁻⁶ мг/л ртути. Отмечено незначительное повышение показателей смертности подопытных рачков. Молодь четвертого и седьмого поколений не достигла стадии поло-

возрелости. У подопытных рачков шестого поколения так же, как и у контрольных, отмечены недостоверные отклонения плодовитости. Статистически достоверных отклонений биомассы подопытных модельных популяций рачков при воздействии сублетальной концентрации ртути (6·10⁻⁸ мг/л) не установлено.

Двухвалентная ртуть оказала острое токсическое действие (50% подавление роста числа клеток за 96 ч.) на *S. quadricauda* в концентрациях 3·10⁻⁵ и 6·10⁻⁵ мг/л. Хроническое токсическое действие установлено в концентрации 1·10⁻⁵ мг/л. Удельная скорость роста подопытных водорослей на 4 сут эксперимента составила 0,8–0,9 сут⁻¹, а контрольной культуры – 0,9 сут⁻¹. Выявлена линейная зависимость «концентрация – эффект».

Таблица 5

Плодовитость самок *C. affinis* в зависимости от концентраций в среде ртути

Концентрация ртути, мг/л	Среднее число родившейся молоди на одну самку, экз.					
	Время от начала опыта, сут					
	Осенний эксперимент			Зимний эксперимент		
	5	6	7	5	6	7
6,0·10 ⁻⁷	1,80 ± 0,53	0,79 ± 0,29	1,84 ± 0,71	1,2 ± 0,43	2,26 ± 0,40	0,74 ± 0,41
3,0·10 ⁻⁶	0,06 ± 0,06	1,80 ± 0,34	0,41 ± 0,10	0,30 ± 0,30	2,44 ± 0,65	0,11 ± 0,11
6,0·10 ⁻⁶	0	0	0,07 ± 0,07	0	0	0,50 ± 0,50
1,0·10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0
3,0·10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0
6,0·10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0
0,0 (контроль)	2,00 ± 0,86	1,70 ± 0,60	1,90 ± 0,75	1,20 ± 0,61	2,50 ± 0,58	0,50 ± 0,50

Таблица 6

Смертность и плодовитость рачков в ряду поколений при действии ртути (6·10⁻⁶ мг/л)

Поколение рачков	Смертность, %		Отклонение плодовитости (f = 28, t _{кр} = 2,05)
	2 сут	7 сут	
F ₃	0	16,7 ± 6,7	достоверно (2,64 > 2,05)
F ₄	0	38,9 ± 15,6	достоверно (4,38 > 2,05)
F ₅	60,0 ± 24,0	81,3 ± 32,5	достоверно (2,60 > 2,05)
F ₆	45,0 ± 18,0	72,2 ± 28,9	не достоверно (0,7 < 2,05)
F ₇	60,0 ± 24,0	95,0 ± 38,0	–

Примечание: – не определялось в связи с высокой смертностью рачков в первые сутки опыта.

Таблица 7

Показатели роста культуры микроводоросли *S. quadricauda* при действии ртути ($6,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л)

Условия выращивания микроводоросли <i>S. quadricauda</i>	Значение угнетения роста культуры, %			Коэффициент прироста, раз
	72 ч.	96 ч.	168 ч.	
Культура, выращенная на питательной среде Успенского	35,0	59,7	32,3	145,4±9,8*
Культура, выращенная на питательной среде Успенского с добавлением $6,0 \cdot 10^{-8}$ мг/л ртути	73,0	83,0	41,4	125,8±7,6*

Примечание: * – выделены результаты с достоверным отклонением от контроля.

Культура микроводоросли *S. quadricauda*, выращенная в среде с ртутью ($6,0 \cdot 10^{-8}$ мг/л), испытывалась на воздействие $6,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л токсиканта. Установлены более высокие по значению и ранние по времени проявления показатели ингибирования роста *S. quadricauda*, что обусловлено материальной и функциональной кумуляцией ртути (табл. 7).

Определены абсолютно смертельные концентрации (100% гибель за 24 ч.) ртути (II) $3,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л, $6,0 \cdot 10^{-5}$ мг/л для *C. affinis*.

Комбинированное действие мышьяка и ртути на рачков проявилось в виде эффекта больше аддитивного. Установлена острая токсичность смеси $5 \cdot 10^{-6}$ мг/л ртути и 0,8 мг/л мышьяка, которые при раздельном воздействии оказывают хроническое токсическое действие.

Методики Н.С. Жмур, Т.Л. Орловой [5–7] предусматривают максимально возможное постоянство условий лабораторного культивирования и проведения токсикологических экспериментов. Тем не менее токсикорезистентность особей одной культуры меняется со временем. По мнению Е.Ф. Исаковой и М.Ю. Юклеевских, существуют определенные циклические изменения в культуре рачков в течение года, которые выражаются в изменениях плодовитости и токсикорезистентности рачков [9]. В настоящей работе отмечена повышенная чувствительность подопытных рачков к мышьяку в летний период, как по показателю смертности, так и по срокам первого вымета молоди. Осенью рачки обладали значительной толерантностью к мышьяку. Весенний эксперимент показал меньшую чувствительность микроводоросли к ртути.

Таким образом, использование *C. affinis* и *S. quadricauda* в контроле и мониторинге загрязнения водных объектов будет эффективно при постановке экспериментов на хроническую

токсичность ртути и мышьяка в ряду поколений и в условиях их функциональной кумуляции.

Литература

1. Методы биоиндикации и биотестирования природных вод. Вып. 2. Л.: Гидромет. изд., 1989. 266 с.
2. Осокина О.Б., Гапочка Л.Д., Зайдова У.Г., Дрожжина Т.С. Токсичность меди и ртути для зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* // Биол. науки. 1984. № 9. С. 61–64.
3. Biesinger K.E. & Christensen G.M. Effects of various heavy metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. // J. Fish Res. Board Can. 29. 1972. P. 1691–1700.
4. Горохов Н.Г. Реализация программы уничтожения химического оружия в Кировской области // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 2. С. 20–23.
5. Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний (ФР.1.39.2007.03221). М.: АКВАРОС, 2007. 56 с.
6. Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ФР.1.39.2007.03223). М.: АКВАРОС, 2007. 48 с.
7. Жмур Н.С. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ФР.1.39.2001.00284.). М.: АКВАРОС, 2001. 42 с.
8. Брагинский Л.П. Некоторые итоги исследований по водной токсикологии в Украине // Актуальные проблемы водной токсикологии. 2004. С. 11–32.
9. Исакова Е.Ф., Юклеевских М.Ю. Сезонные изменения резистентности лабораторной культуры *Daphnia magna* Str. к бихромату калия // Биология внутр. вод. 1998. № 3. С. 76–81.