

РОЗВИТОК КУЛЬТУРИ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* У МОДИФІКОВАНОМУ СЕРЕДОВИЩІ КУЛЬТИВУВАННЯ

Якушева А.В.

Український науково-дослідний інститут екологічних проблем
вул. Бакуліна, 6, 61166, м. Харків
yakusheva.nastasya@gmail.com

У публікації наведені результати дослідження розвитку культури *Daphnia magna* Straus у модифікованому середовищі, яке отримували шляхом додавання до відстояної (мінімум 7 діб) водопровідної води (до 7 мг-екв/л) певного об'єму дистильованої води для досягнення значення жорсткості 4,6–5,0 мг-екв/л. Визначено, що таке середовище негативно впливає на розвиток культури. *Ключові слова*: біотестування, тест-організми, штучне середовище, культивування.

Развитие культуры *Daphnia magna* Straus в модифицированной среде культивирования. Якушева А.В. В публикации представлены результаты исследования развития культуры *Daphnia magna* Straus в модифицированной среде, которую получали добавлением к отстоянной (минимум 7 дней) водопроводной воде (до 7 мг-экв/л) определенного объема дистиллированной воды для получения значения жесткости 4,6–5,0 мг-экв/л. Определено, что такая среда негативно влияет на развитие культуры. *Ключевые слова*: биотестирование, тест-организмы, модифицированная среда, культивирование.

Cultivation of *Daphnia magna* Straus in the modified culture medium. Yakusheva A. The publication presents the results of the life cycle research of the culture *Daphnia magna* Straus in modified media, which was obtained by adding a certain volume of distilled water to settled (at least 7 days) tap water (to 7 mg eqv/l) to obtain a hardness value of 4.6–5.0 mg eqv/l. We determined that this media has a negative impact on the life cycle of the culture. *Key words*: biotesting, test-organisms modified media, cultivation.

Постановка проблеми. Під час проведення процедур із біотестування хімічних речовин, які можуть становити загрозу для водної екосистеми, у світі керуються методиками з визначення гострої та хронічної токсичності на відповідних тест-організмах. Найбільш поширеними серед них є методики Організації економічного співробітництва та розвитку (OECD¹) [1; 2] та Міжнародної організації зі стандартизації (ISO²) [3]. Вони регламентують підходи до проведення процедур із визначення гострої та хронічної токсичності хімічних речовин на таких організмах, як *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Danio rerio*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Anabaena flos-aquae* тощо.

Для отримання відтворюваних результатів за допомогою цих методик використовуються стандартизовані умови культивування тест-організмів (температура, рН, концентрація розчиненого кисню, лужність, електропровідність, жорсткість тощо) та критерії достовірності проведення випробування (імобілізація тест-організмів у контрольній серії не більше 10%, чутливість тест-організмів, рівень їх плодючості в контрольній серії випробування тощо). Стандартизовані умови культивування є рекомендованими. Під цим розуміється можливість корегування середовища культивування залежно від потреб.

Актуальність дослідження. *Daphnia magna* є одним із найбільш популярних тест-організмів, які використовуються для визначення токсичності хімічних речовин. Незважаючи на те, що тест-організм є стандартизованим, умови культивування його дещо відрізняються. Відповідно до методик OECD та ISO бажано використовувати повністю синтетичне середовище ISO, Elandt M4 та Elandt M7, що є різними за хімічним складом. Вони технічно складні у приготуванні для багатьох вітчизняних лабораторій, які спеціалізуються на водній токсикології.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Аналіз літературних джерел показав, що не завжди синтетичні стандартизовані середовища є придатними для вирішення певних завдань. Їхній вибір може змінюватися залежно від фізико-хімічних властивостей хімічної речовини, для якої визначають значення гострої та хронічної токсичності [4].

Так, у роботі [5] наведено, що токсичність Cr (III) залежно від використаного середовища культивування може значно змінюватися. Авторами встановлено, що значення гострої та хронічної токсичності хімічної речовини було в діапазоні від 6 мг/л до 111 мг/л та від 0,047 мг/л до 3,4 мг/л відповідно.

Подібний результат було отримано в роботі [6], де було досліджено значення гострої токсичності

¹ OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development.

² ISO – International Organization for Standardization.

еталонної хімічної речовини $K_2Cr_2O_7$ за 48 годин у різних середовищах культивування, які мали різні значення жорсткості. Авторами було встановлено, що зі збільшенням жорсткості збільшується і значення ефективної концентрації хімічної речовини за 48 годин експозиції.

У встановленні норм якості поверхневих вод у США отримане в лабораторних умовах значення ефективної концентрації для металів корегують з урахуванням жорсткості середовища [7].

Окрім вивчення проблеми чутливості *Daphnia magna* до різних хімічних речовин у разі зміни жорсткості середовища, набувають розвитку дослідження інших параметрів середовища культивування *Daphnia magna*: рН, лужності, розчинених органічних речовин тощо [8–11].

Метою роботи є визначення придатності модифікованого середовища для культивування *Daphnia magna* в лабораторних умовах.

Виклад основного матеріалу. У ході проведення дослідження умов культивування тест-організмів *Daphnia magna* та їх придатності до проведення процедур із визначення токсичності хімічних речовин було встановлено, що важливого значення набуває показник жорсткості, оскільки від його значення залежить біодоступність хімічних речовин. Відповідно до методик ДСТУ [12; 13] *Daphnia magna* необхідно культивувати у середовищі з жорсткістю до 7 мг-екв/л, однак регламентоване значення жорсткості в методиках ISO [3] OECD [1; 2] дещо нижче – 2,8–5 мг-екв/л. Якщо такі вимоги не виконуються у разі використання відстояної водопровідної води (мінімум 7 діб), методиками ISO [3], OECD [1; 2] пропонується використовувати штучні середовища

для культивування тест-організмів (ISO, Elendt M4 та Elendt M7), які складні у приготуванні. Виходячи з цього, для регулювання жорсткості у середовищі культивування *Daphnia magna* в умовах атестованої Лабораторії еколого-токсикологічних досліджень ХНУ імені В.Н. Каразіна було зроблено таке.

Оскільки фактичне значення жорсткості необхідно було понизити на мінімум 2 мг-екв/л для досягнення значення жорсткості відповідно до методик ISO [3], OECD [1; 2], було запропоновано отримувати модифіковане середовище культивування тест-організмів шляхом додавання до відстояної водопровідної води (мінімум 7 діб) певного об'єму дистильованої води для досягнення значення жорсткості 4,6–5,0 мг-екв/л. Таким чином, було виведено окремий клон культури *Daphnia magna*, розвиток якого в модифікованому середовищі досліджували. Контроль показників якості середовища культивування тест-організмів проводили за допомоги приладу PL700AL.

Розвиток *Daphnia magna* у модифікованому середовищі порівнювали з розвитком їх у стандартному середовищі культивування згідно з методиками ДСТУ [12; 13]. Спочатку отримували третє покоління тест-організмів, таким чином період акліматизації культури склав більше 30 днів. Затримка отримання першої молоді *Daphnia magna* I, II та III покоління не спостерігалася. Однак під час подальшого культивування тест-організмів у модифікованому середовищі було визначено ознаки незадовільного стану культури, про що свідчило таке. Так, за умови нормального розвитку культура *Daphnia magna* складається з організмів жіночої статі, які розмножуються партеногенезом (розвиток нового організму відбувається

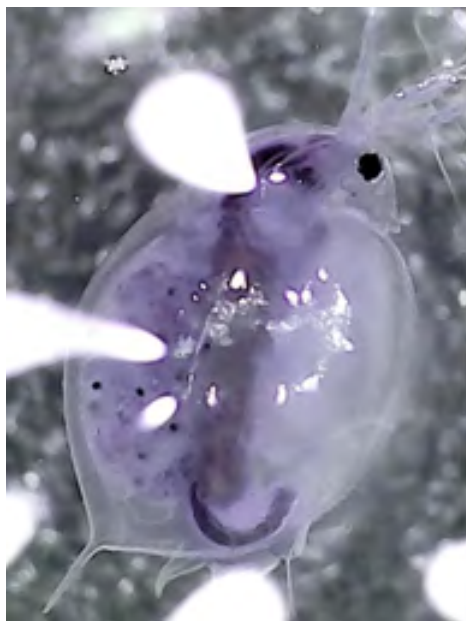


Рис. 1. *Daphnia magna* Straus за нормальних умов культивування (середовище ДСТУ) – зліва; *Daphnia magna* Straus за несприятливих умов культивування (модифіковане середовище) – справа

із незаплідненої яйцеклітини), що і спостерігали під час культивування тест-організмів в умовах середовища відповідно до ДСТУ (рис. 1).

Якщо параметри середовища культивування несприятливі для розвитку *Daphnia magna*, у культурі з'являються організми чоловічої статі, тож партеногенез змінюється на статеве розмноження, що спостерігали в культурі *Daphnia magna*, отриманій у модифікованому середовищі культивування. Про це явище свідчить утворення ефіпіумів – латентних яєць (рис. 1).

Головні висновки. На основі проведеного дослідження було доведено, що культивування

Daphnia magna Straus у модифікованому середовищі, яке отримується шляхом додавання до відстояної водопровідної води (мінімум 7 діб) певного об'єму дистильованої води для досягнення значення жорсткості 4,6–5,0 мг-екв/л, не рекомендується. Для проведення випробувань із визначення токсичності хімічних речовин на *Daphnia magna* необхідно використовувати стандартизовані умови культивування відповідно до методик ДСТУ або ISO, OECD. У разі переходу на синтетичні середовища культивування *Daphnia magna* необхідно дотримуватися періоду акліматизації строком більше одного місяця.

Література

1. OECD 2004. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guideline for the testing of chemicals, Guideline 202.
2. OECD 2012. *Daphnia magna* Reproduction test, OECD Guideline for the testing of chemicals, Guideline 211.
3. ISO 6341:2012 Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.
4. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions / Vera Terekhova et al. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 2018. № 419 (32). P. 14. DOI: 10.1051/kmae/2018015.
5. How reliable are data for the ecotoxicity of trivalent chromium to *Daphnia magna*? / B. Ponti et al. *Environmental Toxicology*. 2014. Vol. 33 (10). P. 2280–2287. DOI: 10.1002/etc.2672.
6. Changes in aquatic toxicity of potassium dichromate as a function of water quality parameters / M. Kikuchi et al. *Chemosphere*. 2017. Vol. 170. P. 113–117. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.158.
7. National Recommended Water Quality Criteria. EPA. 2004. URL: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/nrwqc-2004.pdf> (дата звернення 29.01.2019).
8. Effects of silver nanoparticle properties, media pH and dissolved organic matter on toxicity to *Daphnia magna* / F. Seitz et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015. Vol. 111. P. 263–270. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.031.
9. Ecotoxicology and Environmental Safety / Eunhye Bae et al. 2016. Vol. 132. P. 366–371. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.034.
10. Akira Okamoto, Masumi Yamamuro, Norihisa Tatarazako. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*: Acute toxicity of 50 metals to *D. magna*. *Journal of Applied Toxicology*. 2014. Vol. 35 (7). P. 824–830. DOI: 10.1002/jat.3078.
11. Elizabeth M. Traudt, James F. Ranville, Joseph S. Meyer. Effect of age on acute toxicity of cadmium, copper, nickel, and zinc in individual metal exposures to *Daphnia magna* neonates. *Environmental Toxicology*. 2017. Vol. 36 (1). P. 113–119. DOI: 10.1002/etc.3507.
12. ДСТУ 4174-2003. Якість води. Визначання сублетальної та хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 1076:2000, MOD).
13. ДСТУ 4173-2003. Якість води. Визначання гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD).