

УДК 574.64+ 574.24

doi:10.23968/2305-3488.2017.19.1.63-82

А. С. Олькова

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И МНОГООБРАЗИЕ ТЕСТ-ФУНКЦИЙ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* ПРИ БИОТЕСТИРОВАНИИ

UDC 628.161.2:546.24, 546.14

doi:10.23968/2305-3488.2017.19.1.63-82

Olkova A. S.

THE CONDITIONS OF CULTIVATION AND THE VARIETY OF TEST FUNCTIONS OF *DAPHNIA MAGNA STRAUS* IN BIOASSAY**Аннотация**

Введение: ветвистоусые ракообразные *Daphnia magna Straus* являются одними из первых тест-организмов, которые стали применяться для оценки степени токсичности водных сред. В современном контроле качества природных и сточных вод биотесты с использованием *Daphnia magna* являются наиболее распространенными. **Цель исследования:** анализ особенностей и преимуществ лабораторной культуры *Daphnia magna Straus* для биотестирования водных сред, а также апробация спектра тест-функций для оценки тестируемых сред. **Результаты:** определено влияния на ответные реакции рачков таких факторов как плотность модельных групп, температурные условия содержания, химический состав культивационных вод и их значения для чувствительности тест-организмов к токсикантам. Проведен анализ разнообразия методов биотестирования с использованием тест-организма *Daphnia magna* в результате чего выявлено, что наиболее распространены методики, предполагающие учет гибели рачков в модельных группах. В опытах с модельными водными растворами и природными водами показано, что при реа-

Abstract

Introduction: The branching crustaceans *Daphnia magna Straus* are among the first test organisms to be used to assess the degree of toxicity of aquatic environments. In modern control of the quality of natural and waste water, Bioassay using *Daphnia magna* are the most common. **Purpose:** To analyze the features and advantages of the laboratory culture of *Daphnia magna Straus* for bioassay aqueous media, and to test the spectrum of test functions for the evaluation of test media. **Results:** The impact of such factors as the density of model groups, the temperature conditions of the contents, the chemical composition of the cultivation waters and their values for the sensitivity of test organisms to toxicants have been determined on the responses of crustaceans. An analysis of the diversity of bioassay methods using the *Daphnia magna* test organism has been carried out, which has revealed that the most common methods are those involving the death of crustaceans in model groups. In experiments with model aqueous solutions and natural waters, it was shown that in the implementation of this approach, situations of unauthorized



лизации такого подхода возможны ситуации неправомерного признания пробы безвредной. Например, при воздействии на организмы дозы тяжелых металлов, меньше средне-летальной концентрации, упускаются важные с экологической точки зрения эффекты, в том числе отсроченные во времени. В этом случае необходимо оценивать сублетальные эффекты *Daphnia magna*: частота сердечных сокращений, изменение биохимических параметров, линейных размеров тела, биомассы модельных популяций. В серии наших исследований показаны эффекты, диагностируемые в условиях хронического эксперимента. Нами предлагается количественно оценивать набор тест-функций, доступных для учета без специального оборудования, и следовательно, легко внедряемых в практику многих природоохранных лабораторий: смертность и плодовитость взрослых особей *Daphnia magna*, время созревания особей, количество абортивных яиц, количество мертворожденной молодежи. Для наиболее подробного исследования действия отдельных веществ или их сочетаний предложен подход биотестирования, основанный на оценке эффектов у нескольких последовательных поколений *Daphnia magna*. Это позволяет установить совместимость уровня химического загрязнения с долговременным существованием популяции, что особенно важно при экстраполяции результатов биотестирования на естественные экосистемы.

Ключевые слова: биотестирование, *Daphnia magna* Straus, тест-функция, смертность, плодовитость, токсические эффекты, загрязняющие вещества, природные воды.

Наши авторы

Олькова Анна Сергеевна

Кандидат техн. наук, доцент кафедры экологии и природопользования

recognition of a harmless sample are possible. For example, when exposure to organisms of a dose of heavy metals is less than the mean lethal concentration, important environmental effects are missed, including those delayed in time. In this case, it is necessary to evaluate sublethal effects of *Daphnia magna*: heart rate, biochemical parameters, linear body size, biomass of model populations. In a series of our studies, the effects diagnosed under the conditions of a chronic experiment are shown. We propose to quantify the set of test functions available for accounting without special equipment, and therefore easily implemented in the practice of many environmental laboratories: the mortality and fertility of adults of *Daphnia magna*, the time of maturation of individuals, the number of abortive eggs, the number of stillborn young. For the most detailed study of the effect of individual substances or their combinations, a bioassay approach based on the evaluation of effects in several consecutive generations of *Daphnia magna* is proposed. This makes it possible to establish the compatibility of the level of chemical contamination with the long-term existence of the population, which is especially important when extrapolating the results of bioassay to natural ecosystems.

Keywords: Bioassay, *Daphnia Magna* Straus, Test-Function, Mortality, Fertility, Toxic Effects, Contaminants, Natural Waters.

Authors:

Olkova Anna Sergeevna

PhD, Tech, Associate Professor, Department of Ecology and Nature Management,

Вятского государственного университета,
610007, г. Киров, ул. Ленина 198
Тел.: +7 (8332) 33- 11-96
Эл. адрес: morgana-abend@mail.ru

Vyatka State University,
Lenina Str., 198, Kirov, 610007, Russian
Federation
Tel.: +7(8332) 33-11-96,
E-mail: morgana-abend@mail.ru

Введение

В настоящее время для диагностики состояния окружающей среды недостаточно использовать только химические методы и систему нормирования содержания загрязняющих веществ в компонентах среды. В природоохранную практику активно внедряются методы биодиагностики для оценки совместимости сложившегося уровня загрязнения с возможностью сохранения жизнеспособности организмов и устойчивости экологических систем.

До 1980-х годов во всем мире превалировал гидрохимический мониторинг качества вод, однако в настоящее время зарубежными и российскими специалистами признана недостаточность химического контроля в части предоставления полной информации о качестве водных систем [1]. В системе водопользования биотестирование применяют для определения интегральной токсичности сточных вод, безвредной кратности их разбавления, а также для оценки эффективности мероприятий по снижению их токсичности, например, использования прудов-отстойников, выполняющих роль механической и биологической очистки [2–4]. Определение токсичности сточных вод экспериментальным путем является необходимым, поскольку их многокомпонентный и изменяющийся во времени состав не позволяет выявлять весь перечень загрязняющих веществ, а, следовательно, принимать обоснованные природоохранные решения. Например, в странах Западной Европы и Скандинавии, несмотря на постоянно растущее число химических веществ, используемых в производственных циклах и, соответственно, попадающих в поверхностные воды со сточными водами, регулярно контролируется только 30-40 показателей химического загрязнения [5].

Среди методов биодиагностики состояния окружающей среды биотестирование представлено группой методик, допущенных для целей государственного экологического контроля и мониторинга во многих странах. Биотестирование определяют как оценку качества компонента окружающей среды по ответным реакциям стандартизированных тест-организмов, содержащихся в лабораторных условиях [6]. Также биотестирование – это классический экспериментальный методический прием, используемый в токсикометрии для разработки нормативов содержания химических веществ в окружающей среде [7].

Токсикологические исследования активно начали проводиться в начале XIX века, что было связано с массовым развитием химических технологий и, соответственно, с появлением ряда веществ с неизвестными свойствами. Возникла необходимость оценивать последствия индустриализации. Биотестирование включили в оперативный контроль загрязнения вод в США и в европейских странах [8].



В настоящее время научно-исследовательская практика биотестирования представлена широким спектром методик и используемых тест-организмов. Тест-объекты (тест-организмы), по определению Л. П. Брагинского – «датчики» сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) среды, независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитического вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ [9].

Наиболее распространенными тест-организмами являются гидробионты – представители различных трофических уровней водных экосистем: ракообразные (дафнии, цериодафнии), водоросли (хлорелла, сценедесмус), макрофиты, простейшие (инфузории разных видов), коловратки, рыбы, личинки водных насекомых (хинономиды) и некоторые другие. Причем для каждого тест-организма предлагается оценивать разные тест-функции.

Целью данной работы является анализ особенностей и преимуществ *Daphnia magna* Straus (*D. magna*) в – качестве лабораторных тест-организмов для биотестирования, а также представление спектра тест-функций для оценки качества водных сред.

Объект исследований – стандартизированная лабораторная культура *Daphnia magna* Straus. Маточная и синхронизированная культура содержалась в климатостате при 12-ти часовом светопериоде с освещением 600 лк и температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Биотестирование проводили с использованием молоди *D. magna* (возраст не более 24 ч), полученной от синхронизированной по возрасту культуры за счет партеногенетического размножения материнской самки *D. magna*. Эксперименты проводились в условиях климатостатирования. Количество параллельных определений в опытах по установлению острого токсического действия 3, в опытах на установление хронического токсического действия – 4. Кормление дафний осуществлялось ежедневно суспензией зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. В долговременных экспериментах после достижения рачками зрелости 2 раза в неделю к основному рациону добавляли хлебопекарные дрожжи.

Математическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов, вычисляя среднее арифметическое M , его ошибку m и стандартное отклонение S . Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента с учетом уровней значимости p , вычисленных для двух сравниваемых значений. Для расчетов использовали программу Microsoft Excel.

В статье приведены данные, полученные при биотестировании природных поверхностных и подземных вод, пробы которых отбирались в Кировской области (Россия), а также модельных водных растворов с добавками различных токсикантов.

Исследования проводились на базе аккредитованной научно-исследовательской лаборатории Вятского государственного университета (г. Киров, Россия).

Тест-культура *D. magna* в исследованиях российских и зарубежных ученых

Представители низших ракообразных *D. magna* используются как тест-объект в токсикологических исследованиях уже свыше 65 лет. Основу для такого широкого ее применения заложил еще в 1933 г. Э. Науманн в классической работе «*D. magna* Straus als Versuchstiere» [10]. Более ранние зарубежные исследования касаются биологии и экологии дафний [11]. В России первые работы по биотестированию с помощью *D. magna* были представлены в трудах Н. С. Строганова и его учеников, а также Л. А. Лесникова [12, 13].

Преимущества этих рачков как тест-организмов обусловлены биологическими особенностями *D. magna* [14] и заключаются в следующем:

- удобство и относительная простота культивирования, включающего содержание культуры в чистой природной воде, ежедневное отсаживание молоди от взрослых самок, кормление;
- использование генетически однородной молоди в биотестировании, что обеспечивается партеногенетическим размножением и поддержанием синхронизированной культуры, которой считается группа особей, находящихся на одной стадии развития;
- быстрое созревание рачков: при оптимальной температуре ($+20\pm 2^\circ\text{C}$) и хорошем питании — 5-8 суток, длительность эмбрионального развития 3-4 дня;
- регулярное (каждые 3-4 дня) и многочисленное появление молоди (количество молоди у молодых самок — 10-15, у зрелых до 40 особей);
- достаточно высокий уровень организации (что особенно важно - наличие кровеносной и нервной систем), позволяющий экстраполировать токсикологические результаты на других многоклеточных представителей экосистем и даже человека;
- крупные размеры особей, дающие возможность проводить визуальные наблюдения за многими ответными реакциями без использования специальных средств измерений;
- чувствительность дафний к широкому спектру загрязняющих веществ;
- сравнительная простота выполнения эксперимента, не требующая высокой квалификации исполнителя.

Основываясь на достоинствах культуры *D. magna* были разработаны десятки методик биотестирования, в разной степени востребованных в оценке состояния водных сред.

Одной из самых распространенных тест-функций в биотестировании является гибель организма. Например, наиболее распространенная в России методика определения острой токсичности [15]. Несмотря на то, что тест-функция гибели является самой «грубой», крайней степенью проявления токсического эффекта, использование показателя оправдано в экологическом нормировании и природоохранной практике. Например, для сточных вод и водных вытяжек из отходов важнейшей характеристикой является безвредная кратность разбавления (БКР), то есть степень необходимого разбавления, устраняющая острую токсичность про-



бы. В зависимости от БКР водного экстракта отхода, его относят к одному из классов опасности [16]. БКР традиционно определяется с помощью *D. magna*, хотя для этого пригодны и другие методики биотестирования.

Плодовитость — вторая тест-функция, рекомендованная для оценки токсичности в соответствии с методикой, допущенной для целей государственного контроля и мониторинга. Ответная реакция, заключающаяся в способности организмов к размножению, представляет особый интерес для диагностики, поскольку позволяет устанавливать наличие хронического токсического действия при биотестировании природных и техногенных водных сред.

Актуальным является вопрос об условной норме плодовитости партеногенетических особей *D. magna*, содержащихся в оптимальных условиях. При анализе данных различных авторов этот показатель варьирует в широких пределах. В некоторых работах сообщают о суммарной плодовитости в расчете на одну самку от 30,3 до 74,6 особей [17]. В экспериментах Г. Н. Мисейко с соавторами [18] плодовитость варьировала от 17 до 67 экзemplяров молоди на одну самку. В обоих случаях плодовитость *D. magna* определяли в оптимальных для культуры условиях, при этом различия результатов объяснялись разными условиями проведения экспериментов. Согласно первой методике [17], в процессе культивирования помещали по 5 особей в 250 мл воды, тогда как по второй методике [18]-дафнии содержались индивидуально в 150 мл воды. Отметим, что специалисты природоохранных лабораторий не могут ориентироваться на эти значения, так как алгоритм аттестованной методики [15] требует размещения 10 рачков в 100 мл воды. Такая плотность модельной популяции, по нашим наблюдениям, приводит к снижению плодовитости до 26 ± 11 особей за 24 дня хронического эксперимента в зависимости от сезона года (приведены данные за двухлетний период наблюдений).

Несоответствие контрольных значений плодовитости (по данным разных авторов) всегда нивелируется при переходе от абсолютных данных к относительным, когда учитывается процентное отклонение показателя от контрольных данных. Например, в модельных экспериментах, выполненных в разное время года, абсолютные значения показателя плодовитости существенно отличались, однако результаты, представленные в относительных единицах, оказались очень близкими (табл. 1).

Одновременно с количественным учетом погибших особей и плодовитостью живых, во многих авторских методиках предусмотрена оценка морфологических признаков и физиологических показателей рачков. «Качественно-количественный биотест на *D. magna* в течение 10 суток» [13] позволяет оценивать загрязненность водных объектов по целому ряду токсических эффектов. Авторами методики разработаны шкалы и таблицы тест-функций, приведены возможные причины появления токсических эффектов. Например, помутнение плазмы клеток, начиная с жаберных отростков абдоминальных ножек, обычно происходит под влиянием соединений тяжелых металлов (ТМ), кислот и щелочей. Деформация раковины свидетельствует о нарушении водного обмена, поскольку тургор у дафний поддерживается за счет активного водообмена, когда за минуту замещается до 80% воды

Таблица 1.

Варьирование показателя плодовитость *D. magna* в зависимости от сезона года в модельном эксперименте

Table 1.

Variety of *D. magna* fertility indicator in dependence with the season in a model experiment

Вариант	Плодовитость весной		Плодовитость осенью	
	Абсолютные значения, шт./1 взрослую особь	Относительные, %	Абсолютные значения, шт./1 взрослую особь	Относительные, %
Контроль	21,5±1,8	100	10,5±1,4	100
Добавка 5 ПДК р.х (Al ³⁺)/ 1 дм ³	17,7±2,0	82,3	8,9±2,6	84,8

организма. Описываются возможные окраски дафний, нарушения в процессе формирования яиц и молоди и т. д. В итоге методика позволяет установить острое летальное, хроническое летальное и сублетальное действия, а также предположить уровень сапробности водоема и причину наблюдаемых эффектов. Несмотря на относительную сложность учета «симптомов действия анализируемой пробы» и выражение их в виде специфических формул состояния особей, данная работа [13] послужила основой для дальнейшего изучения информативных тест-функций *D. magna*.

Количественному учету подлежат такие морфологические параметры *D. magna* как линейные размеры тела, биомасса модельных популяций, а также патологические отклонения – количество абортных яиц, мертворожденной и уродливой молоди. Показано, что в растворах с концентрацией ионов хрома 0,1 мг/л у рачков наблюдаются достоверные уменьшения размеров на 5 %; биомасса популяций дафний оказалась чувствительной к действию хрома в растворах с концентрациями 0,035 и 0,17 мг/л, но эффект начинал проявляться только с 17-х суток [19].

Среди функциональных показателей ряд исследователей в качестве тест-функции предлагает оценивать трофическую, или фильтрационную, активность, то есть величину поглощенного дафниями корма за определенный промежуток времени. Для регистрации трофической активности рачков используют изменение интенсивности нулевого уровня быстрой флуоресценции водоросли хлорелла, используемой в качестве корма [20]. Трофическую активность предлагается также оценивать по разности между оптической плотностью тестируемой среды непосредственно после кормления и перед следующим кормлением. В проведенных нами экспериментах с этой целью использовался специализированный прибор ИПС-03 - измеритель плотности суспензии, разработанный Ю. С. Григорьевым [21], в других случаях использовался «Флюорат-02-Панорама» [22] - данная тест-функция позволяет определить сублетальные концентрации загрязняющих веществ.

Высокая скорость ответной реакции тест-организма описана в методиках, основанных на оценке физиологического параметра дафний – изменения частоты



сердечных сокращений [23, 24]. По данным А. Д. Усанова [25] эта тест-функция является чувствительной не только к химическим факторам, но и физическим – к переменному магнитному и электрическому полю. К. В. Кулагиной [26] на примере пестицидов показана классическая картина развития токсикологического стресса: первоначальная стимуляция частоты сердечных сокращений (ЧСС) даже при летальных концентрациях, а затем резкое снижение значений показателя.

В зарубежной практике биотестирования в последнее время активно изучаются последствия действия токсикантов на генетический аппарат клетки. Показано, что такие эффекты имеют место и у *D. magna* [27].

Влияние плотности популяции *D. magna* и температуры культивирования на естественную смертность и плодовитость особей

В литературе встречаются различные сведения о естественной плодовитости, продолжительности жизни и смертности рачков *Daphna magna*. Чаще всего варьирование показателей связано с действием биогенных и абиогенных факторов на модельную популяцию. Влияние на оцениваемые параметры таких факторов как плотность популяции и температурные условия культивирования изучались нами в эксперименте.

Из молоди *D. magna* (возраст не более 24 ч.) были сформированы три варианта опытных групп с разной плотностью посадки: 1, 5 и 10 особей на 100 мл воды. Опытные популяции содержались при разной постоянно поддерживаемой температуре: (+21°C), (+24°C) и при повышенной температуре (+ 27°C). Повышенная температура создавалась за счет нагрева платформы встряхивающего устройства (шейкер ЛАБ-ПУ-01).

Модельные популяции ежедневно кормили: поочередно суспензией водорослей *Chlorella vulgaris* и хлебопекарными дрожжами. Учет погибших особей и отсадка родившейся молоди проводились ежедневно. Через каждые пять суток осуществлялась смена культивационной воды.

Условия культивирования значительно отражались на плодовитости и смертности дафний в течение эксперимента. В таблице 2 отражены оцениваемые показатели по двум периодам: на 24-й и на 45-й дни эксперимента (табл. 2).

Повышение температуры способствовало более быстрому созреванию дафний: при температуре 21°C первое потомство появилось на 11 день опыта, а при температуре водной среды 27°C на 4 дня раньше. При повышении температуры содержания от 21 до 24°C наблюдалось достоверное повышение плодовитости ($p < 0,05$), различия сохранялись до 45 дня эксперимента. Полученные данные согласуются с результатами других ученых: благоприятные температурные условия в пределах экологического оптимума вызывают увеличение количества потомства *D. magna* [28]. Дальнейшее повышение температуры до 27°C, напротив, вызывало снижение фертильности особей до наименьших результатов в эксперименте. Кроме того, в таких условиях к концу эксперимента (45 день) при плотности посадки 5 особей на 100 мл воды зафиксировали максимальную гибель особей 25%. Данные эффекты закономерны, поскольку значение 27°C не входит в диапазон тем-

Таблица 2.

Смертность и плодовитость *Daphnia magna* в зависимости от плотности культуры и температуры содержания

Table 2.

Mortality and fertility of *Daphnia magna* in dependence with culture density and housing temperature

Варианты		Время созревания		Смертность (24-й день), %	Плодовитость (24-й день), шт./самку	Смертность (45-й день), %	Плодовитость (45-й день), шт./самку
Условия содержания	Плотность посадки, шт./100 мл	1*	2**				
+21°C	1	7	11	0	56,5+24,2	0	125+30,6
	5	6	9	5	16,9+1,66	15	33,825+5,9
	10	6	8	7,5	12,95+2,74	20	26,37+7,5
+24°C	1	6	10	0	70,5+20,04	0	147,75+26,7
	5	5	8	0	27,325+4,8	10	53,75+0,7
	10	5	8	2,5	14,45+1,7	7,5	25,26+3,5
+27°C	5	5	7	5	21,6+1,76	20	38,66+5
	10	5	7	12,5	10,3+0,89	25	22+5

Примечание: * - день эксперимента, в который отмечено появление яиц в выводковых камерах, ** - день эксперимента, в который появился первый приплод.

пературного оптимума *D. magna*. Высокая температура явилась функциональной нагрузкой для рачков, в первые дни эксперимента повышение температуры стимулировало их созревание, а в дальнейшем - вызывало температурный стресс.

Плотность посадки также значительно влияла на результаты эксперимента. Максимальное количество потомства получили в варианте, где содержалась всего одна дафния. При этом стандартные отклонения от средних значений высокие, что, по-видимому, связано с минимальной выборкой. Несмотря на использование молодежи, полученной от синхронизированной культуры (от биологических клонов), индивидуальные различия особей оказывали слишком большое влияние на итоговые результаты.

При сравнении плотности посадки 5 и 10 рачков на 100 мл водной среды, наблюдали закономерное увеличение плодовитости в разреженной популяции.

Полученные данные подтверждают необходимость стандартизации условий культивирования тест-организмов и проведения токсикологических экспериментов. Проведение экспериментов с посадкой 1 особи в тестируемую среду не рекомендуется. Повышение температуры можно использовать в качестве дополнительной функциональной нагрузки при оценке качества различных вод. Плотность посадки 5 и 10 особей на 100 мл используется в зависимости от задач эксперимента.

Влияние сезона года на чувствительность *D. magna*

Несмотря на длительное содержание в стандартизированных оптимальных условиях, лабораторные тест-культуры имеют биологические ритмы, накладыва-



ющие свой отпечаток на результат проводимых экспериментов. В частности, модельные эксперименты по установлению чувствительности *D. magna* к стандартному токсиканту двуххромовокиислому калию ($K_2Cr_2O_7$), позволили нам установить значение времени (сезона) проведения эксперимента на его результат.

Чувствительность культуры устанавливали в разные сезоны года. Эксперимент проводили по аттестованной методике (ссылка). Острая токсичность модельных растворов устанавливалась при возрастающих концентрациях в растворах двуххромовокиислому калию ($K_2Cr_2O_7$). Диапазон концентраций от 0,5 до 2,5 мг/дм³. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Результаты определения чувствительности *D. magna* к модельному токсиканту-калию двуххромовокиислому

Table 3.

Results of defining of *D. magna* sensitivity to model toxicant-potassium dichromate

Проба/ концентрация, мг/дм ³	Смертность дафний к контролю, %*			
	Весна	Лето	Осень	Зима
Контроль	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
0,9	3,3	0,0	3,3	26,7
1,0	10,0	10,0	3,3	10,0
1,5	56,7	60,0	73,3	80,0
2,0	100,0	96,7	86,7	100,0
2,5	100,0	100,0	100	100,0
Среднелетальная концентрация, (мг/ дм ³)				
Концентрация токсиканта, мг/дм ³	1,43	1,36	1,44	1,22

Примечание: * - стандартное отклонение не более 20% от среднего.

В течение всех четырех сезонов года чувствительность дафний соответствовала пределам, установленным аттестованной методикой (0,9-2,0 мг/дм³). Однако в зимний период чувствительность рачков повысилась: в растворе с концентрацией 0,9 мг/дм³ токсиканта погибло более 25% особей, тогда как летом в аналогичном растворе гибели не наблюдалось. В итоге среднелетальная концентрация токсиканта, соответствующая гибели 50% особей, для зимнего периода оказалась наименьшей. Такое повышение чувствительности можно объяснить общим ослаблением дафний в зимний период, который в природе является периодом покоя организмов.

Эксперимент показал влияние сезонных ритмов на чувствительность низших ракообразных. Этот факт необходимо учитывать при планировании исследований и интерпретации результатов.

Влияние химического состава культивационной воды на результат биотестирования

Качество культивационной водной среды для содержания *D. magna* имеет особое значение для получения объективных результатов биотестирования. Химический состав природной воды, используемой для культивирования тест-организмов, влияет на общее состояние биообъектов, их чувствительность и устойчивость к различным соединениям. Состав природных вод в разных регионах значительно отличается.

При содержании культуры *D. magna* в одинаковых условиях, но с использованием культивационных вод различного происхождения и химического состава, выявили следующие особенности. Обе водные среды были представлены артезианскими водами питьевого качества, при этом отличались по количеству минеральных солей и, соответственно, электропроводности (примерно в 2 раза). В процессе калибровки чувствительности двух культур *D. magna* установили, что среднелетальная концентрация (LD₅₀) калия двуххромовокислого для них различалась: в экспериментах с более минерализованными водами, воздействие модельного токсиканта проявлялось слабее (табл. 4). Содержание организмов и периодическую калибровку проводили в течение двух лет, поэтому LD₅₀ в таблице 4 представлена интервалом значений.

Полученные данные подтверждают то, что химический состав культивационных вод влияет на реакции *D. magna*. Влияние ионного состава природных вод на их токсичность отражено в работе [29]. Отметим, что культивационная вода используется для приготовления серий разбавлений тестируемой среды, и, таким образом, влияет на итоговое заключение о токсичности пробы.

Ответные реакции *D. magna* в острых и хронических экспериментах

При оценке качества компонентов среды чаще всего ориентируются на наличие или отсутствие токсичности в экспериментах по установлению острой токсич-

Таблица 4.

Table 4.

Влияние состава культивационной воды на чувствительность *D. magna*

Influence of cultivation water composition on *D. magna* sensitivity

Характеристика культивационной воды	Содержание ионов, мг/л				Электропроводность, мкСм/см	LD ₅₀ , мг/л KCr ₂ O ₇
	катионы		анионы			
Артезианская вода централизованного водоснабжения (Кировская обл.)	Na ⁺	42,8±6,4	Cl ⁻	19,9±2,0	610	1,2 - 1,8
	K ⁺	0,74±0,1	NO ₃ ⁻	21,8±3,3		
	Mg ⁺	28,7±2,9	PO ₄ ³⁻	<0,2		
	Ca ⁺	29,1±2,9	SO ₄ ²⁻	22,2±2,2		
Артезианская вода торговой марки «Ключ здоровья» (г. Киров)	Na ⁺	12,8±1,9	Cl ⁻	22,7±2,3	320	0,9 - 1,3
	K ⁺	<0,1	NO ₃ ⁻	6,6±1,0		
	Mg ⁺	7,5±0,7	PO ₄ ³⁻	<0,2		
	Ca ⁺	25±2,5	SO ₄ ²⁻	3,9±0,4		



ности. При этом упускаются токсические эффекты, которые проявляются только в долговременных экспериментах и позволяют подробнее охарактеризовать исследуемое воздействие на водный объект или тестируемое вещество.

Например, при очистке питьевой воды во многих городах в качестве коагулянта используется сульфат алюминия. Его остаточные количества в воде централизованного водоснабжения (по данным Водоканала г. Кирова) могут достигать 5-7 ПДК (для питьевых вод). Нами были проведены модельные эксперименты для сравнения информативности тест-функций гибели и плодовитости.

Эксперимент состоял из двух вариантов: в воду добавляли алюминий (5 и 10 ПДК) в виде сульфата алюминия. Контролем служила питьевая вода без добавок, содержание алюминия в ней было ниже предела обнаружения [15].

За период острого опыта (4 дня) гибели организмов не наблюдалось — пробы не оказывали токсического действия. Продлевая эксперимент для установления хронического воздействия, выявлено увеличение гибели дафний, достоверное снижение плодовитости по сравнению с контрольными значениями (табл. 5).

Через 24 дня эксперимента действие токсиканта проявилось в угнетении плодовитости рачков. Кроме того, были отмечены и морфологические признаки негативного воздействия: уменьшение линейных размеров тела, бледность покровов, снижение трофической активности. Следовательно, при относительно невысоком загрязнении возрастает вероятность необоснованного признания пробы безвредной на основе анализа самой «грубой тест-функции» для дафний — гибели.

Аналогичный эффект выявлен в опытах с природными подземными водами, пробы которых были отобраны из эксплуатируемых скважин. По большинству показателей вода соответствовала требованиям, предъявляемым к качеству питьевой воды, однако было выявлено превышение содержания бора от 2,6 до 11 ПДК (для питьевых вод). Эти воды также не оказывали острого токсического действия на дафний, более того и за 24 дня эксперимента смертность не превышала допустимых методикой 20 %. Но плодовитость организмов угнеталась (табл. 6).

На примере этого опыта видим, что у *D. magna* кроме гибели и плодовитости без дополнительных приспособлений диагностируется время созревания особей по первому приплоду в модельной популяции. Выявлено, что рачки в контрольной воде созревали раньше, чем в загрязненных пробах. Дни первого появления

Таблица 5.

Ответные реакции *D. magna*
на сульфат алюминия

Table 5.

Response reactions of *D. magna*
on aluminum sulfate

Вариант	Смертность* за 4 дня, %	Смертность* за 24 дня, %	Плодовитость**, шт./1 взрослую особь
Контроль	0	0	10,76±0,91
5 ПДК (Al ³⁺)	0	20	8,86±1,00
10 ПДК (Al ³⁺)	0	56,6	8,80±2,32

Примечание: * - стандартное отклонение не более 20% от среднего; ** - все опытные значения достоверно отличаются от контрольных (p<0,05).

Таблица 6.

Результаты определения хронической токсичности проб подземных вод, загрязненных бором

Table 6.

Results of defining of chronic toxicity of underground water samples contaminated with boron

№ Пробы	Кратность ПДК бора	День первого появления молоди	Плодовитость*, шт./1 взрослую особь	Смертность**, %
Контроль	-	9	7,3±0,7	0
1	2,6	12	4,4±0,1	3,3
2	2,6	15-18	2,7±0,3	13,3
3	7,8	15	4,6±0,4	0
4	10,4	12	5,4±0,5	13,3
5	11,0	12	4,9±0,6	0

Примечания: * - все опытные значения достоверно отличаются от контрольных; ** - стандартное отклонение не более 20% от среднего.

молоди в пробах заметно отличались от контроля, в котором первое потомство отмечено уже на 9 сутки, тогда как в пробах с повышенной концентрацией бора на 12 и даже на 15-18 сутки. Таким образом, день первого вымета молоди может служить информативным показателем состояния тест-организмов.

Описанные эксперименты на модельных и природных водах показали, что при относительно невысоком загрязнении необходимо ориентироваться на данные, получаемые в хронических опытах. Это положение необходимо учесть при разработке санитарных требований к качеству питьевых вод [30].

Анализ результатов многолетней работы с *D. magna* при биотестировании различных водных сред, особенно установлении хронического токсического действия, показал, что фиксация сублетальных эффектов способствует объективной интерпретации комплекса токсикологических и химических исследований.

Для количественной оценки летальных и сублетальных эффектов и установления их диагностической ценности, проводили биотестирование природной воды, загрязненной соединениями стронция (модельный эксперимент). Эффекты оценивали в трех поколениях *D. magna*. Первым поколением считали тех особей, которые были получены от синхронизированной культуры *D. magna* и помещены в контрольную и опытные пробы (повторность четырехкратная). Второе и третье поколение — это молодь от соответствующего предыдущего поколения, полученная уже в эксперименте. Использовали один из первых массовых приплодов. Эксперимент проводился в климатостате, смену тестируемых растворов осуществляли на каждые 5-е сутки. Время эксперимента с каждым поколением рачков не ограничивали 24 сутками, рекомендованными методикой, а продлили до 75 суток, что позволило выявить динамику гибели взрослых особей и их плодовитости.

В качестве модельного токсиканта использовали хлорид стронция. Стронций согласно гигиеническому нормативу качества воды водных объектов рыбохозяйственного назначения относится к веществам II класса опасности, ПДК составля-



ет всего 0,4 мг/дм³ [31]. Нерадиоактивный стронций является спутником кальция, поэтому загрязнение им природных вод наблюдается близ гипсоносных отложений, доломитов, известняков [32]. Он может выщелачиваться из сырья и отходов химических производств, включаясь в комплексное загрязнение промышленных районов. Доказано негативное влияния стронция на организм человека [33]. Есть сведения о его токсичном действии на растения, в частности блокирование K⁺-каналов клеток корня [34].

Тестировались растворы хлорида стронция, содержащие 2,5 и 5 ПДК иона стронция. Вещество вводилось в артезианскую воду питьевого качества, контролем служила эта же вода без добавок. Результаты представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7.
Влияние хлорида стронция
на смертность и патологические
явления у *D. magna*

Table 7.
Influence of strontium chloride
on mortality and pathological phenomena
of *D. magna*

Вариант	Поклоение	Смертность взрослых особей*, %			Количество абортивных яиц**	Количество мертвой молоди**
		25 день	50 день	75 день		
Контроль	F1	0	2,5	80,0	0	0
	F2	0	5	86,7	2	0
	F3	0	3,3	83,5	1	0
2,5 ПДК	F1	12,5	32,5	92,5	39	8
	F2	15	62,5	92,5	54	4
	F3	25	82,5	90,0	97	9
5 ПДК	F1	10,0	46,7	100	14	8
	F2	6,7	46,7	90,0	28	6
	F3	16,7	73,3	95,0	37	5

Примечание: * - стандартное отклонение не более 20% от среднего; ** - количество abortивных яиц и мертвой молодежи приведено как сумма для четырех параллельных определений.

В кратковременных экспериментах (4 дня) загрязнение воды стронцием на уровне 2,5 и 5 ПДК не оказывали влияния на рачков. Долговременные эксперименты позволили выявить ряд токсических эффектов. Смертность взрослых особей на 25 день во всех опытных вариантах, кроме одного, не выходила за пределы критических 20%, рекомендованных аттестованной методикой как критерий хронической токсичности, но в сравнении с контрольными показателями негативное влияние токсиканта уже проявилось. Тенденция переходит в математически значимую на 50 день опыта. Причем каждое последующее поколение все менее жизнеспособно.

В течение опыта во всех вариантах с воздействием стронция отмечали появление мертвой молодежи. Даже невысокие значения этого показателя являются признаком хронического токсического действия тестируемой пробы [35].

Известно, что патологические изменения развития партеногенетических яиц могут являться диагностическими признаками негативного влияния на дафний [36]. В нашем эксперименте абортивные яйца в контрольных вариантах единичны, тогда как в опытных их количество варьирует от 14 до 97 (в сумме на 4 параллельных определения). Отторгаемых яиц больше при добавке 2,5 ПДК, чем 5 ПДК. Это объясняется тем, что в менее загрязненной пробе к середине опыта оставалось больше живых рачков. Они и обеспечили этот показатель. Мертворожденная молодь также регулярно появлялась при воздействии стронция, в отличие от контроля.

На фоне общего угнетения особей и описанных негативных явлений, плодовитость рачков оказалась достоверно ниже контрольных значений (табл. 8). Приведена плодовитость по 50 день, так как после гибели в эксперименте более 50% особей, расчет на одну самку дает завышенные показатели.

Таблица 8.

Table 8.

Влияние хлорида стронция на плодовитость *D. magna*

Influence of strontium chloride on *D. magna* fertility

Вариант	Поколение	Плодовитость, количество особей на 1 взрослую самку		Плодовитость, % от контрольного значения за 50 суток
		1 – 24 сутки	25 – 50 сутки	
Контроль	F1	13,4±2,3	15,4±2,9	-
	F2	10,2±1,5	15,8±1,3	-
	F3	11,3±0,5	14,9±1,8	-
2,5 ПДК	F1	9,4±0,6	7,0±0,4	56,9
	F2	7,8±1,1	6,2±0,9	53,8
	F3	2,5±0,5	2,6±0,4	19,5
5 ПДК	F1	9,4±0,6	7,2±1,1	57,6
	F2	8,4±1,2	7,8±2,0	62,3
	F3	2,3±0,5	0	8,8

Плодовитость контрольных модельных популяций варьировала от 10,2±1,5 до 13,4±2,3 до 24 дня эксперимента включительно. В следующем оцениваемом периоде наблюдалось постепенное возрастание способности к размножению до 15,8±1,3 особей на 1 взрослую самку, что закономерно связано с наступлением пика жизненного цикла рачков. Достоверных различий в показателях плодовитости контрольных вариантов трех поколений выявлено не было. Это говорит о равномерном развитии каждого следующего поколения и возможности длительного существования модельных популяций *D. magna* в созданных условиях.

Плодовитость дафний во всех опытных вариантах оказалась достоверно угнетена по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0,05$). При этом в опытных вариантах показатель снижался в поколениях, достигая в третьем поколении варианта 5 ПДК всего около 9% от контрольного показателя (различия достоверны, $p = 0,03$), что свидетельствует о несовместимости исследуемого уровня загрязне-



ния стронцием с жизнеспособностью популяции *D. magna*. Различия в количестве потомства у первого поколения рачков и второго, находящихся под воздействием стронция, в большинстве случаев не достоверны. Сравнивая фертильность первого и третьего поколения, тенденция снижения плодовитости достигает математически значимого уровня.

Заключение

Таким образом, эксперименты по установлению хронического токсического действия, продленные длительный период всей жизни тест-организма, а также выполненные в нескольких поколениях, являются высокоинформативными для подробного исследования действия веществ. Такие опыты позволяют исследовать динамику гибели взрослых особей, продолжительность жизни, в том числе в сериях поколений, количество abortивных яиц.

Кроме рассмотренных показателей как в острых, так и в хронических токсикологических экспериментах, есть возможность оценивать другие функциональные отклонения от нормы, например, изменения трофической и двигательной активностей *D. magna*. В настоящее время нами оптимизируются методики оценки этих тест-функций, вошедших в международные стандарты [37], в частности в аспекте метрологических составляющих методик. Тест-функция трофической активности также привлекла внимание зарубежных ученых в качестве показателя ранней диагностики загрязнения [38].

Безусловно, все тест-функции организмов тесно взаимосвязаны между собой: действие токсиканта на клеточные биохимические процессы может привести к угнетению трофической активности, что затем в процессе онтогенеза неизбежно повлияет на снижение плодовитости рачков, а также отразится на морфофункциональном состоянии каждой особи, в крайнем случае приводя к гибели. Учет максимального количества тест-функций *D. magna* позволяет наиболее эффективно использовать данный тест-организм при биотестировании водных сред.

При сопоставлении результатов исследований разных авторов, возникают проблемы в силу множества модификаций постановки аналогичных опытов. В это связи унификация данных методов и разработка строгой системы метрологического обеспечения методов биотестирования с использованием *D. magna* остаются актуальными научно-практическими исследованиями.

Перспективы развития биотестирования с применением *D. magna* относятся к поиску ещё более чувствительных тест-функций, разработке экспрессных методов установления токсичности, и, безусловно, автоматизации наблюдений за тест-организмами.

Литература

1. Van Loon, W. V. G. M., Hermens, L. M. (1995), «Monitoring Water Quality in the Future», *Mixture toxicity parameters*, no. 2. pp. 116–118.
2. Мичукова, М. В., Канарский, А. В., Канарская, З. А. (2006), «Изучение токсичности сточных вод целлюлозно-бумажного производства методом биотестирования на *Daphnia magna* Str.», *Вестник Казанского технологического университета*, № 1. С. 95–102.

3. Пушкарёв, В. Я., Щеголькова, Н. М., Козлов, М. Н., Данилович, Д. А. (2006), «Биотестирование биологических объектов сточных вод», *Экология и промышленность России*, № 4, С. 29–31.
4. Кондратьев, С. А. (2007), «Оценка токсичности сточных вод крупных металлургических предприятий методом биотестирования», *Водные ресурсы*, т. 34, № 1. С. 97–103.
5. Жмур, Н. С. (1997), *Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России*. М.: Издательство Международный Дом Сотрудничества. С. 6–19.
6. Вавилова, М. В., Терехова, В. А. (2008), *Технологии биотестирования: Экотоксикологическая оценка объектов окружающей среды*. М.: Издательство МГУ, 82 с.
7. Никаноров, А. М., Трунов, Н. М. (1999), *Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод*. С-Пб.: Издательство Гидрометеиздат, 150 с.
8. Escobichon, D. J. (1992), *The Basis of Toxicity Testing*. Fl.: CRC Press, p. 329.
9. Брагинский, Л. П. (2000), «Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* St. и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор)», *Гидробиологический журнал*, т. 36, № 5. С. 50–70.
10. Naumann, E. (1933), «*Daphnia magna* Straus als Versuchstiere», *Kgl. Fysiog. Saliskap, Lund forhunde*, no. 2, pp. 1–49.
11. Brown, I. A. (1929), «The Natural History of Cladocerans in Relation to Temperature. Temperature Coefficient for Development», *Amer. Nat.*, no. 63, pp. 346–352.
12. Строганов, Н. С., Исакова, Е. Ф., Колосова, Л. В. (1989), «Метод биотестирования качества вод с использованием дафний», *Методы биоиндикации и биотестирования природных вод*: сб. тр., Вып. 1, 78 с.
13. Лесников, Л. А., Мосиенко, Т. К. (1992), *Приемы биоиндикации, биотестирования при текущем надзоре за загрязненностью водных объектов и выявлении превышения их ассимилирующей способности. Методические указания*. С.-Пб.: Издательство ГосНИОРХ, 79 с.
14. Олькова, А. С., Фокина, А. И. (2015), «*Daphnia magna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред», *Успехи современной биологии*, т. 135, № 4. С. 380–389.
15. ФР.1.39.2007.03222 (2007), «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний». М.: Издательство: Акварос, 52 с.
16. (2015), «Об утверждении Критериев отнесения отходов к I - V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду», Приказ Минприроды России № 536.
17. Воробьева, О. В., Филленко, О. Ф., Исакова, Е. Ф. (2013), «Изменения плодовитости лабораторной культуры *D. magna*», *Перспективы науки*, № 9 (48). С. 11–14.
18. Мисейко, Г. Н., Тушкова Г., И., Цхай И., В. (2001) «*Daphnia magna* (Crustacea Cladocera) как тест-объект в оптимальных условиях лабораторного культивирования», *Известия Алтайского государственного университета*, № 3. С. 83–86.
19. Филленко, О. Ф., Исакова, Е. Ф., Черномордина, А. В. (2004), «Особенности действия бихромата калия на генерации и модельные популяции низших ракообразных», *Актуальные проблемы водной токсикологии*: сб. статей. Борок: Издательство Института биологии внутренних вод РАН. С. 176–194.
20. Шашкова, Т. Л., Григорьев, Ю. С. (2013), «Действие тяжелых металлов на трофическую активность дафний в зависимости от условий питания и возраста рачков», *Сибирский экологический журнал*, т. 20, № 6. С. 885.
21. Олькова, А. С. (2013), «Поиск информативных тест-функций *Daphnia magna* при биотестировании компонентов окружающей среды», *Биосистема: от теории к практике*: сб. тр. Пушино. С. 92–94.
22. Маторин, Д. Н., Венедиктов, П. С. (2009), «Биотестирование токсичности вод по скорости поглощения дафниями микроводорослей, регистрируемых с помощью флуоресценции хлорофилла», *Вестник Московского университета. Сер.16. Биология*, № 3. С. 28–33.
23. Подосиновикова, Н. П., Ежов, Н. Ф., Сайкина, Н. А. (2008), «Частота сердечных сокращений у *Daphnia magna* как функциональный тест оценки действия химических соединений», *Экспериментальная и клиническая фармакология*, т. 73, № 3. С. 54–56.
24. Meijering, M. P. D. (1999), «Herzfrequenz und Lebensablauf von *Daphnia magna* Straus», *Zs. wiss. Zool*, pp. 3–4.



25. Усанов, А. Д. (2004), «Исследование влияния переменного магнитного и электрического полей на живые организмы и водную среду с использованием дафнии в качестве биоиндикатора», дис. канд. физ.-мат. наук, 03.00.02, Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, РФ.
26. Кулагина, К. В. (2011), «Исследование зависимости частоты сердечных сокращений *Daphnia magna* от концентрации пестицидов», *Фундаментальные исследования*, № 3. С. 191–197.
27. Atienzar, F. A., Cheung, V. V., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2001), «Fitness Parameters and DNA effects are Sensitive Indicators of Copper-Induced Toxicity in *Daphnia magna*», *Toxicological sciences*, vol. 59, pp. 241–250.
28. Rinke, K., Petzoldt, T. (2003), «Modeling the effects of Temperature and Food on Individual Growth and Reproduction of *Daphnia* and their Consequences on the Population Level», *Limnologica*, no. 33, pp. 293–304.
29. Никаноров, А. М., Жулидов, А. В. (1991), *Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах*. С-Пб.: Издательство Гидрометеоздат, 312 с.
30. СанПиН 2.1.4.1074-01 (2010), «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».
31. ГН 2.1.5.1315-03 (2003), «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования».
32. Перельман, А. И. (1989), *Геохимия*. М.: Издательство: Высш. шк., 528 с.
33. Полякова, Е. В. (2012), «Стронций в источниках водоснабжения Архангельской области и его влияние на организм человека», *Экология человека*, № 2. С. 9–14.
34. Ивашкина, Н. В., Соколов, О. А. (2006), «Блокирование калиевых каналов клеток корня тяжелыми металлами и стронцием», *Агрохимия*, № 12. С. 47–53.
35. Hanazato, T. (1998), «Growth analysis of *Daphnia* early Juvenile Stages as an Alternative Method to test the Chronic Effect of Chemicals», *Chemosphere*, vol. 36, № 8, pp. 1903–1909.
36. Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A., Goncalves, F., Ribeiro, R. (2001), «In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*?», *Ecotox. Environ*, no. 50, pp. 174–179.
37. ISO 6341 (1996), «Water quality determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - acute toxicity test».
38. Allen, Y. A., Calow, P., Barid, D. J. (1995), «Mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*», *Environment Toxicology and Chemistry*, vol. 14, № 9, pp. 1625–1630.

References

1. Van Loon, W. V. G. M., Hermens, L. M. (1995), «Monitoring Water Quality in the Future», *Mixture toxicity parameters*, no. 2. pp. 116–118.
2. Michukova, M. V., Kanarskij, A. V., Kanarskaya, Z. A. (2006), «Study of the Toxicity of Waste Water from Pulp and Paper Production using the Biotesting Method at *Daphnia magna* Str.», *Bulletin of Kazan Technological University*, № 1, pp. 95–102 (in Russian).
3. Pushkar', V. YA., Shchegol'kova, N. M., Kozlov, M. N., Danilovich, D. A. (2006), «Biotesting of Biologically Purified Waste Water», *Ecology and Industry of Russia*, №. 4, pp. 29–31 (in Russian).
4. Kondrat'ev, S. A. (2007), «Evaluation of Sewage Toxicity of Large Metallurgical Enterprises by the method of Biotesting», *Water resources*, vol. 34, № 1, pp. 97–103 (in Russian).
5. Zhmur, N. S. (1997), *Gosudarstvennyj i proizvodstvennyj kontrol' toksichnosti vod metodami biotestirovaniya v Rossii* [State and Industrial Control of Water Toxicity by methods of Biotesting in Russia], Izdatel'stvo Mezhdunarodnyj dom sotrudnichestva. M., pp. 6–19 (in Russian).
6. Vavilova, M. V., Terekhova, V. A. (2008), *Tekhnologii biotestirovaniya: EHkotoksikologicheskaya ocenka obektov okruzhayushchej sredy* [Biotesting technologies: Ecotoxicological assessment of environmental conditions], Izdatel'stvo MGU. M., p. 82 (in Russian).
7. Nikanorov, A. M., Trunov, N. M. (1999), *Vnutrivodoemnye processy i kontrol' kachestva prirodnyh vod* [Intra-water processes and Quality Control of Natural Waters], Izdatel'stvo Gidrometeoizdat. S-Pb., p. 150 (in Russian).
8. Ecobichon, D. J. (1992), *The Basis of Toxicity Testing*. Fl.: CRC Press, p. 329.

9. Braginskij, L. P. (2000), «Methodological aspects of Toxicological Biotesting at *Daphnia magna* St. and other Branching Crustaceans (critical review)», *Hydrobiological Journal*, vol. 36, №. 5, pp. 50–70 (in 10. Naumann, E. (1933), «*Daphnia magna* Straus als Versuchstiere», *Kgl. Fysiog. Saliskap, Lund forhunde*, № 2, pp. 1–49.
11. Brown, I. A. (1929), «The natural history of Cladocerans in relation to Temperature. Temperature coefficient for development», *Amer. Nat.*, № 63, pp. 346–352.
12. Stroganov, N. S., Isakova, E. F., Kolosova, L. V. (1989), «Method for biotesting water quality using *Daphnia*», *Metody bioindikacii i biotestirovaniya prirodnyh vod: sb.tr.*, №. 1, p. 78 (in Russian).
13. Lesnikov, L. A., Mosienko, T. K. (1992) Priemy bioindikacii, biotestirovaniya pri tekushchem nadzore za zagryaznennost'yu vodnyh obektov i vyyavlenii prevysheniya ih assimiliruyushchej sposobnosti. Metodicheskie ukazaniya. [Methods of bioindication, biotesting with current surveillance of the contamination of water bodies and detection of excess of their assimilating capacity. Methodical instructions], Izdatel'stvo GosNIORH. S.-Pb., p. 79 (in Russian).
14. Ol'kova, A. S., Fokina, A. I. (2015) «*Daphnia magna* Straus in the biotesting of natural and man-made environments», *Advances in modern biology*, vol. 135, №. 4, pp. 380–389 (in Russian).
15. FR.1.39.2007.03222 (2007), *Metodika opredeleniya toksichnosti vody i vodnyh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod, othodov po smertnosti i izmeneniyu plodovitosti dafnij* [The methodology for determining the Toxicity of water and Water Extracts from Soils, Sewage Sludge, Waste by Mortality and the change in the Fertility of *Daphnia*], Izdatel'stvo: Akvaros. M, p. 52 (in Russian).
16. (2015), «*Ob utverzhdenii Kriteriev otneseniya othodov k I - V klassam opasnosti po stepeni negativnogo vozdeystviya na okruzhayushchuyu sredu*» [On Approval of the Criteria for the Recognition of Waste to I - V Classes of Danger according to the degree of negative impact on the environment], Prikaz Minprirody Rossii № 536 (in Russian).
17. Vorobeva, O. V., Filenko, O. F., Isakova, E. F. (2013), «Changes in the Fertility of Laboratory Culture *D. magna*», *Perspectives of Science*, №. 9 (48), pp. 11–14 (in Russian).
18. Misejko, G. N., Tushkova G., I., Ckhaj I., V. (2001), «*Daphnia magna* (Crustacea Cladocera) as a test object under optimal Conditions of Laboratory Cultivation», *Bulletin of Altai State University*, №. 3, pp. 19. Filenko, O. F., Isakova, E. F., Chernomordina, A. V. (2004), «Peculiarities of Potassium Dichromate on generation and Model Populations of Inferior Crustaceans», *Aktual'nye problemy vodnoj toksikologii: sb statej*, Izdatel'stvo Instituta biologii vnutrennih vod RAN. Borok, pp. 176–194 (in Russian).
20. Shashkova, T. L., Grigor'ev, Yu. S. (2013), «The Action of Heavy Metals on the Trophic Activity of *Daphnia*, Depending on the Feeding Conditions and the age of the Crustaceans», *Siberian Ecological Journal*, vol. 20, №. 6, p. 885 (in Russian).
21. Ol'kova, A. S. (2013), «Search of Informative Test-Functions *Daphnia magna* at Biotesting of Components of an Environment», *Biosistema: ot teorii k praktike: sb. tr.* Pushchino, pp. 92–94 (in Russian).
22. Matorin, D. N., Venediktov, P. S. (2009), «Biotesting of Water Toxicity on the rate of Absorption by *Daphnia Microalgae* Recorded with the help of Fluorescence of Chlorophyll», *Bulletin of Moscow University, Ser. 16, Biology*, № 3, pp. 28–33 (in Russian).
23. Podosinikovova, N. P., Ezhov, N. F., Sajkina, N. A. (2008), «Heart rate in *Daphnia magna* as a Functional Test for the Evaluation of the effect of Chemical Compounds», *Experimental and Clinical Pharmacology*, vol. 73, №. 3, pp. 54–56 (in Russian).
24. Meijering, M. P. D. (1999), «Herzfequenz und Lebensablauf von *Daphnia magna* Straus», *Zs. wiss. Zool*, pp. 3–4.
25. Usanov, A. D. (2004), «Investigation of the effect of alternating magnetic and electric fields on living organisms and the aquatic environment using *daphnia* as a bioindicator», Abstract of PhD thesis, Biophysics, N. G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, RU.
26. Kulagina, K. V. (2011), «Investigation of the dependence of the Heart Rate of *Daphnia magna* on the Concentration of Pesticides», *Fundamental research*, № 3, pp. 191–197 (in Russian).
27. Atienzar, F. A., Cheung, V. V., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2001), «Fitness paramaters and DNA effects are Sensitive Indicators of Copper-Induced Toxicity in *Daphnia magna*», *Toxicological sciences*, vol. 59, pp. 241–250.
28. Rinke, K., Petzoldt, T. (2003), «Modeling the effects of temperature and food on individual growth and reproduction of *Daphnia* and their consequences on the population level», *Limnologica*. no. 33. pp. 293–304.



29. Nikanorov, A. M., ZHulidov, A.V. (1991), *Biomonitoring metallo v presnovodnyh ehkositsema* [Biomonitoring of Metals in Freshwater Ecosystems], Izdatel'stvo Gidrometeoizdat. S-Pb., p. 312 (in Russian).
30. SanPiN 2.1.4.1074-01 (2010) «*Pit'evaya voda. Gigienicheskie trebovaniya k kachestvu vody centralizovannyh sistem pit'evogo vodosnabzheniya. Kontrol' kachestva*» [Drinking water. Hygienic Requirements for Water Quality of Centralized Drinking Water Supply Systems. Quality control] (in Russian).
31. GN 2.1.5.1315-03 (2003) «*Predel'no-dopustimye koncentracii (PDK) himicheskikh veshchestv v vode vodnykh ob'ektov hozyajstvenno-pit'evogo i kul'turno-bytovogo vodopol'zovaniya*» [Maximum Permissible Concentration (MPC) of Chemical Substances in water of Water Objects of Domestic-drinking and Cultural -domestic water use] (in Russian).
32. Perel'man, A. I. (1989), *Geokhimiya* [Geochemistry]. Izdatel'stvo: Vyssh. shk. M., p. 528 (in Russian).
33. Polyakova, E. V. (2012), «Strontium in the sources of Water Supply in the Arkhangelsk region and its impact on the Human Body», *Ecology of man*, №. 2, pp. 9–14 (in Russian).
34. Ivashkina, N. V., Sokolov, O. A. (2006), «Blocking potassium channels of root cells with heavy metals and strontium», *Agrochemistry*, № 12, pp. 47–53 (in Russian).
35. Hanazato, T. (1998), «Growth analysis of Daphnia early Juvenile Stages as an Alternative Method to test the Chronic Effect of Chemicals», *Chemosphere*, vol. 36, № 8, pp. 1903–1909.
36. Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A., Goncalves, F., Ribeiro, R. (2001), «In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*?», *Ecotox. Environ*, no. 50, pp. 174–179.
37. ISO 6341 (1996), «*Water quality determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - acute toxicity test*».
38. Allen, Y. A., Calow, P., Barid, D. J. (1995), «Mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*», *Environment Toxicology and Chemistry*, vol. 14, № 9, pp. 1625–1630.