

КОНТРОЛЬ ЗДОРОВЬЯ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *DAPHNIA MAGNA STRAUS*

Олькова А. С.

HEALTH MONITORING OF *DAPHNIA MAGNA STRAUS* TEST CULTURE

Olkova A. S.

Аннотация

Введение. Состояние тест-культуры — один из основных факторов получения достоверных и воспроизводимых результатов биотестирования. Лабораторные популяции одного биологического вида могут со временем накапливать внутривидовые изменения. Кроме того, для большинства тест-организмов допустимо использовать разные культивационные воды, физико-химические параметры которых регламентированы в довольно широких пределах. Для стандартизации тест-культуры становится недостаточно контроля ее чувствительности к эталонному токсиканту. Поэтому в статье вводится понятие «здоровье тест-культуры», наблюдение за которым рассматривается на примере *Daphnia magna*. **Методы и материалы.** Методом анкетирования выявлены отклонения от условной нормы в здоровье *D. magna*, которые встречаются в 10 лабораториях, не обменивающихся культурами. В лабораториях с наиболее и наименее благополучными культурами проведен эксперимент для сравнения предлагаемых параметров здоровья *D. magna*: день появления первой молодежи, день первого массового приплода, средняя и максимальная продолжительность жизни, плодовитость в расчете на одну самку, количество абортных яиц. Также обобщены рекомендуемые визуальные наблюдения за особями *D. magna* и результаты модельных экспериментов для калибровки чувствительности рачков за 4 года. **Результаты.** Контроль здоровья *D. magna* предложено вести по трем направлениям: визуальные наблюдения за морфологическими, физиологическими и поведенческими характеристиками особей в культуре, учет количественных параметров и калибровка чувствительности синхронизированной молодежи *D. magna* по сезонам года. Оперативный контроль пригодности культуры *D. magna* к биотестированию нужно проводить по показателю «день первого приплода». Один раз в полугодие рекомендуется отслеживать показатели за полный жизненный цикл одновозрастных дафний в модельных группах 25 особей на 1 л среды. Показано, что культура *D. magna* при содержании в климатостате сохраняет биологические ритмы, отражающиеся на ее чувствительности по сезонам года. Особенности сезонной динамики рекомендуется выявлять в каждой лаборатории индивидуально, поскольку она видоизменяется в ответ на другие факторы, например, химический состав культивационной воды. **Заключение.** Результаты и рекомендации, представленные в статье, могут служить основой для разработки процедур по внутреннему контролю качества работ в области биотестирования.

Ключевые слова: биотестирование, тест-культура, *Daphnia magna*, стандартизация, здоровье тест-культуры, условия испытаний.

Abstract

Introduction. The test-culture state is one of the important factors for obtaining reliable and reproducible bioassay results. Laboratory populations of a single species can accumulate intraspecific changes over time. Moreover, for most test organisms, it is acceptable to use different cultivated waters, the physical and chemical parameters of which are specified within rather wide limits. To ensure test-culture standardization, it is not sufficient to perform tests for sensitivity to a reference toxicant. Therefore, the authors introduce the concept of “test-culture health”, which is analyzed using *Daphnia magna* as an example. **Methods and materials.** Using the questionnaire method, the authors revealed deviations from the conventional norm in the health of *D. magna* in 10 laboratories not exchanging cultures. In laboratories with the most and least successful test cultures, an experiment was conducted to compare the suggested health parameters of *D. magna*: the day of the appearance of the first juveniles, the day of the first mass offspring, the average and maximum life expectancy, fertility per female, and the number of aborted eggs. The authors also summarized results of the recommended visual observations of *D. magna* and results of model experiments to calibrate the sensitivity of crustaceans over four years. **Results.** It is proposed to monitor *D. magna* health in three areas: to perform visual observations of morphological, physiological and behavioral characteristics of crustaceans, account for quantitative parameters, and calibrate the sensitivity of synchronized *D. magna* juveniles by seasons. Suitability of the *D. magna* culture for bioassay shall be monitored according to the “day of the first offspring” indicator. The authors recommend monitoring the indicators per a full life cycle of even-aged crustaceans once in six months, conducting model experiments in groups of 25 crustaceans per one liter of medium. It is shown that the *D. magna* culture, when kept in a climatic chamber, retains biological rhythms, which affect its sensitivity by seasons. It is recommended to identify the specifics of seasonal dynamics in each laboratory individually since it changes in response to other factors, e.g. the chemical composition of the cultivated water. **Conclusion.** Results and recommendations presented in the paper can serve as a basis for the development of procedures for internal quality control of bioassay performance.

Keywords: bioassay, test culture, *Daphnia magna*, standardization, test-culture health, test conditions.

Введение

Стандартизация тест-культур связана с трудностями, исходящими из сути работ с живыми организмами, которые своей генетической изменчивостью, наличием биоритмов и других факторов чувствительности к химическим веществам, неминуемо создают некоторую вариативность. Например, при сравнении культур одинакового биологического вида у двух лабораторий можно обнаружить, по меньшей мере, морфологические отличия особей данных искусственных популяциях. Известно, что внутривидовая чувствительность к химическим веществам формируется генетическими и генетически необусловленными причинами [2]. Вполне закономерно, что искусственные популяции тест-организмов, длительное время развивающиеся в разных лабораториях, приобретают свои особенности.

Отметим, что такие важные характеристики тест-культур как продолжительность жизни и уровень плодовитости не регламентированы ни для одного тест-организма. Этот факт объясним множеством факторов, способных повлиять на характеристики тест-культуры, в результате чего может проявиться модификационная изменчивость в пределах нормы реакции вида на условия существования. Также не введены другие возможные критерии пригодности тест-культур для целей биотестирования, кроме соответствия их чувствительности к модельному токсиканту в установленном методиками диапазоне.

Проблему обеспечения лабораторий биотестирования стандартизированными тест-культурами ученые Московского государственного университета предлагают решить через формирование единого национального банка тест-культур, который гарантировал бы соответствие тест-культуры заданным критериям [19]. Однако в качестве возможного недостатка вследствие реализации этой идеи можно отметить неминуемое повышение стоимости условного биотеста.

Нами предлагается дополнить критерий пригодности тест-культуры к биотестированию — чувствительность к эталонному токсиканту — параметрами состояния лабораторных организмов, которые можно объединить понятием здоровье.

Изначально понятие «здоровье» широко употреблялось в медицинских и фармакологических аспектах, то есть в основном применительно к человеку. Еще в 1988 году П. И. Калью в своей обзорной работе приводит 79 определений здоровья [4]. В настоящее время можно встретить понятия «здоровье почвы», «здоровье окружающей среды», «здоровье биосферы», а также применение термина здоровье по отношению к определенной экосистеме [10, 13]. Под здоровьем культуры тест-организмов мы предлагаем понимать ее способность длительно существовать в качестве модельной популяции в созданных оптимальных условиях, стандартизированных абиотических и биотических факторах искусственной среды обитания со стабильной продолжительностью жизни особей, сохранением способности к самовоспроизводству, а также удовлетворением общепринятых требований по чувствительности культуры к эталонному токсиканту.

В представленной работе предлагаются варианты контроля здоровья тест-культуры *Daphnia magna* Straus. Данный тест-организм используется для биотестирования во всем мире. На основе учета разнообразных тест-функций дафний, проявляющихся от биохимического до поведенческого уровня, разработаны как протоколы биотестов, утвержденные национальными или международными органами по стандартизации [1, 14, 20], так и авторские методы оценки токсичности различных сред [6, 8]. Столь широкое распространение и востребованность «дафниевых» тестов актуализирует поставленную проблему отсутствия контроля пригодности именно этих лабораторных культур к использованию в биотестировании. Очевидно, что результаты, полученные с помощью тест-организмов, различающихся своей жизнеспособностью и здоровьем, окажутся несопоставимы.

Методы и материалы

В работе использованы методы анкетирования, а также методы культивирования *D. magna*, описанные в аттестованной методике «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний» [1]. Объектом исследования была синхронизированная культура *D. magna* — это одновозрастная культура, полученная от одной самки путем аци-

клического партеногенеза в третьем поколении [1].

Для апробации предлагаемых параметров здоровья тест-культуры *D. magna* проведен эксперимент в соответствии с общенаучными принципами. В двух лабораториях из синхронизированной молодежи были сформированы модельные популяции *D. magna* с плотностью посадки 25 особей на 1 л культивационной воды в трех повторностях. Модельные группы дафний формировались из культур, содержащихся в двух разных лабораториях — базах опытных работ. В каждой лаборатории в качестве культивационной воды использовали подземную артезианскую воду питьевого качества, однако источники вод были разные. В эксперименте намеренно не использовали одинаковую воду, так как качество воды могло быть одной из причин различного состояния тест-культур. На момент постановки эксперимента обе культуры *D. magna* соответствовали требованиям по чувствительности к дихромату калия.

Опытные группы дафний содержали в соответствии с методикой [1]: ежедневная отсадка молодежи, обновление культивационной воды, кормление водорослево-дрожжевое. Наблюдения велись до момента гибели всех особей. Результаты обрабатывались общепринятыми методами с вычислением среднего арифметического и стандартного отклонения.

Результаты исследований

Анализ ситуации методом опроса

Для подтверждения того, что при использовании любой тест-культуры, в частности *D. magna*, могут периодически возникать некоторые про-

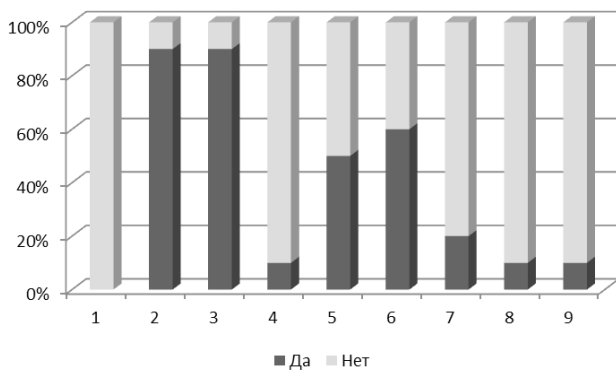


Рис. 1. Проблемы, возникающие при культивировании *D. magna*

блемы, например, несоответствие чувствительности заданному методикой диапазону, наличие сезонной динамики чувствительности организмов, периодическое снижение плодовитости культуры, был проведен опрос специалистов. В опросе участвовало 10 сотрудников лабораторий, проводящих биотестирование различных сред: 9 лабораторий имеют статус аккредитованных, 1 — аттестованная региональной метрологической службой. Распределение ответов на заданные вопросы отражено на рис. 1.

Примечание: цифры означают:

1 — стабильное снижение плодовитости синхронизированной и маточной культур;

2 — периодическое (сезонное) снижение плодовитости культуры;

3 — морфофизиологические отклонения у дафний в культуре (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное);

4 — регулярное наличие abortивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры;

5 — периодическое наличие abortивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры;

6 — снижение пищевой активности рачков в культуре, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления;

7 — гибель молодежи в культуре;

8 — массовая гибель взрослых особей в культуре;

9 — появление самцов.

Утвердительные ответы («да») считаются негативными, свидетельствующими о наличии определенных проблемных ситуаций. Сотрудники лабораторий биотестирования на 4 вопроса из 9 ответили утвердительно в 50 % случаев и более, что говорит о периодическом ослаблении культуры дафний. Отдельно был задан вопрос о соответствии чувствительности молодежи *D. magna* к модельному токсиканту: 9 из 10 респондентов признают, что это требование выполняется не всегда.

Результаты опроса по фактическому состоянию 10 различных тест-культур *D. magna* подтвердили, что в большинстве лабораторий периодически наблюдается ухудшение их здоровья. Часто эти признаки проявляются задолго

до того, как культура перестает удовлетворять требованиям чувствительности к модельному токсиканту или возникают между контрольными процедурами. Поэтому введение в практику биотестирования дополнительных параметров здоровья тест-культур будет превентивной мерой для сохранения пригодности тест-организмов к анализам и получения в итоге достоверных и воспроизводимых результатов.

Визуальные наблюдения

Здоровье дафний, как и любых других организмов, диагностируется прежде всего визуально. Ниже обобщены признаки, которые согласно определителям беспозвоночных [5, 9], работе Лесникова Л. А. [6], а также нашим наблюдениям [8, 17] будут свидетельствовать о здоровье культуры. Благодаря внимательному наблюдению за состоянием маточной и синхронизированной культур *D. magna* можно предотвратить ряд негативных изменений, влияющих на дальнейшее качество анализов.

В норме половозрелые дафнии отличаются овальной формой тела с хорошо различимым темно-зеленым пищеводом, желто-коричневыми покровами. Даже яловые самки и ювенильные особи не должны иметь стекловидно-прозрачное тело. Такими могут быть только очень ослабленные или находящиеся в конце жизненного цикла особи (рис. 2).

Желтоватость окраски демонстрирует накопление капель жира у ракообразных, что говорит об их благополучии (рис. 3). Красный, розоватый или красно-бурый оттенок — признак хронического недостатка кислорода, в этом случае в ка-



Рис. 2. Внешний вид дафнии со стекловидно-прозрачной окраской

честве компенсации синтезируется повышенное количество гемоглобина, придающего такую окраску (рис. 3).

Одновременное уменьшение размера и бледный цвет дафний свидетельствуют об отклонении абиотических или биотических факторов содержания от оптимальных значений. Это может быть недостаточность питания, неподходящий состав культивационной воды, содержание вне климатостата, присутствие в воздухе лаборатории токсических веществ (например, при ремонте помещения).

К тревожным признакам ухудшения состояния культуры, которые могут быть замечены в процессе ухода за культурой («отмывание»), относится также появление абортивных яиц и мертвой молоди. Абортивные яйца выглядят как черные или темно-зеленые сферы, также их можно сравнить с крупными песчинками (рис. 4). Они довольно мелкие, в диаметре 0,1–0,2 мм, тем не менее различимые невооруженным глазом. Регулярное их появление, а также мертвая молодь (даже единичные особи) чаще всего свидетельствуют об ухудшении качества культивационной воды или резкой смене ее химического состава.

Дафнии могут проявить реакцию выброса абортивных яиц даже при полной замене «старой» культивационной воды на свежую. Именно поэтому мы не рекомендуем менять раз в неделю полный объем культивационных вод, как предложено в методике [1].

Следующее наблюдение, которое необходимо проводить при ежедневном уходе за маточной и синхронизированной культурой *D. magna*, это оценка движений и расположения рачков в пространстве. В дневное время в норме дафнии распределены в культивационной ёмкости либо равномерно, либо их расположение несколько смещено в сторону дна. Такое смещение без массовой концентрации у самого дна и полегания рачков на дне является следствием пищевого поведения: клетки водорослей или дрожжей тяжелее воды, поэтому постепенно в течение дня оседают. Вслед за ними и перемещаются дафнии.

Если установлено, что большая часть рачков плавает у кромки воды, то вероятны две причины. Во-первых, это происходит из-за недостатка кислорода в культивационной воде. Он может расходоваться на окисление органических веществ

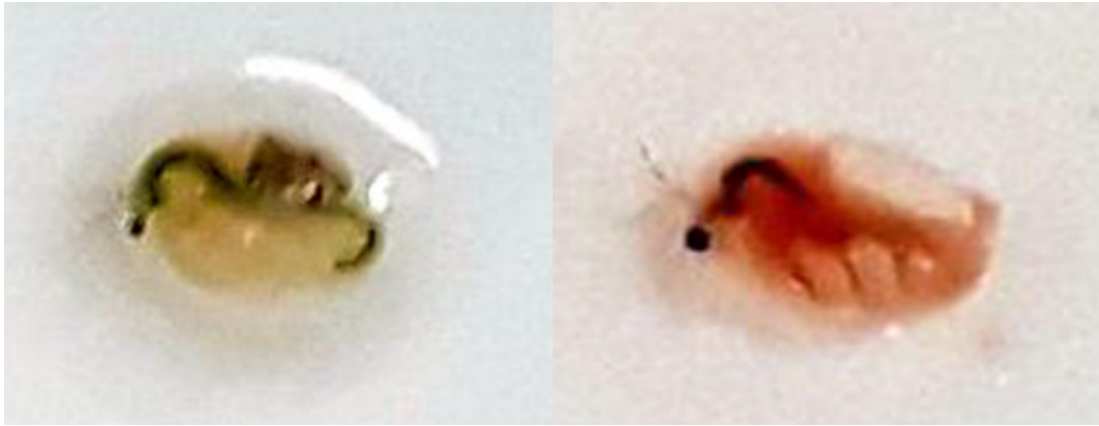


Рис. 3. Слева: внешний вид дафнии с желто-коричневой окраской (норма) Справа: внешний вид дафнии с красной окраской — признак кислородного голодания

самой культивационной воды (если источник — поверхностный водный объект) или тех органических веществ, которые выделяются в результате жизнедеятельности рачков, например, если культура вынужденно долго не отмывалась (выходные, праздники). Вторая вероятная причина — это токсические действие загрязняющих веществ, которые могут случайно попасть даже в качественную культивационную воду. При этом часто происходит «прилипание» дафний к поверхности воды, по которой она движется кругами или хаотично. Ослабленная дафния не может справиться с поверхностным натяжением воды.



Рис. 4. Появление абортивных яиц в культуре *D. magna*

Такой эффект можно наблюдать в эксперименте с модельным токсикантом.

Дафнии реагируют на свет и в дневное время, поскольку имеют непарный орган зрения (фасеточный глаз), поэтому лабораторная культура часто концентрируется у источника света.

Характер движений дафний, находящихся в оптимальных условиях, довольно медленный с недлинными скачками за счет взмахов плавательными конечностями. Часть дафний может не иметь определенной траектории движения, а парить в водной толще. Отклонением от нормы можно считать слишком резкие спонтанные движения, длительные вращательные движения у поверхности воды, движения «на боку», полежание культуры в дневное время суток. В ночное время для дафний характерен сон около дна или даже на его поверхности.

Кроме перечисленного стоит обращать внимание на волны размножения дафний. Обычно каждая партеногенетическая самка приносит потомство 1 раз в 3–4 дня и формируются характерные всплески рождаемости [15]. Несмотря на то что для синхронизации формируется клональная группа особей, через некоторое время начинают проявляться индивидуальные особенности каждой особи. В результате наблюдаются пики размножения (1–2 раза в неделю), спады количества молоди и дни, когда молодь в культивационной емкости отсутствует. Если молоди не обнаружено, то культура также отмывается с целью ухода, удаления органических отложений и обновления воды. В эти дни необходимо обратить внимание

на то, сформированы ли выводковые камеры дафний. Если большинство из них имеют наполненные камеры, то скоро проявится очередной пик размножения.

Однако отсутствие пика размножения неделю или более, если большинство наблюдаемых особей яловые, является тревожным признаком. Подобная ситуация может быть вызвана, во-первых, значительным возрастом культуры — чем старше дафнии, тем реже случаются пики размножения. В таком случае замена этой части культуры на более молодую эффективно решит проблему. Вторая причина — несоответствие условий содержания оптимальным: изменение качества культивационной воды, нарушение режима пересадки, недостаток или избыток корма, повышенная плотность посадки (особенно в маточной культуре). Методом исключения эти причины необходимо устранить.

Последнее предлагаемое визуальное наблюдение касается достаточности кормления. Избыток корма легко диагностируется по зеленому осадку из водорослей. Его допускать нельзя, так как дафнии не могут контролировать количество съеденного корма, являясь фильтраторами.

Схема на рис. 5 обобщает признаки, за которыми необходимо наблюдать при культивировании дафний.

Данная схема может быть основой документированных процедур, которые сейчас активно внедряются в аккредитованных лабораториях, разрабатываемых для внутреннего аудита и контроля качества лабораторных работ.

Количественные параметры

Часть параметров, приведенных на рис. 5, можно измерить количественно (размер, плодовитость, двигательная активность и другие), однако такие манипуляции трудоемки и требуют изымать часть особей из модельных популяций (маточных или синхронизированных), что также нежелательно. В то же время несложен учет таких параметров, как день появления первой молоди, день первого массового приплода, средняя и максимальная продолжительность жизни, плодовитость в расчете на одну самку, количество abortивных яиц. Нет необходимости вести такую статистику у всех одновозрастных групп дафний постоянно. Для контроля здоровья культуры достаточно у каждой новой группы *D. magna* для

получения синхронизированного потомства фиксировать день появления первой молоди и один раз в полугодие наблюдать за полным жизненным циклом трех модельных популяций для оценки остальных указанных показателей здоровья тест-культуры.

День первого приплода отмечается, когда в культивационном сосуде отмечена хотя бы одна дафния, родившаяся в этот день. День первого массового приплода фиксируется, когда обнаружено количество молоди в два и более раз больше, чем плодящихся самок. Суть учета других параметров ясна, исходя из их названия.

В качестве апробации описанного подхода мы сравнили тест-культуры двух аккредитованных лабораторий по предложенным параметрам. Среди лабораторий, участвовавших в опросе, были выбраны те, которые отмечали наибольшее и наименьшее количество проблем, возникающих в процессе культивирования дафний и использования их для биотестирования. Оперативный контроль качества культур по показателю «день первого приплода», калибровка чувствительности синхронизированной молоди и визуальная оценка дафний подтвердили, что состояние культуры в одной из лабораторий (№ 1) лучше, чем в другой (№ 2). На этом основании считали культуру лаборатории № 1 условно эталонной. Выявленные таким образом показатели здоровья *D. magna* в двух лабораториях отражены в таблице.

Полученные результаты показали, что развитие дафний в культуре лаборатории № 2 происходит с задержкой. Средняя и максимальная продолжительность жизни снижены в 1,7 и 1,5 раза соответственно по сравнению с показателями

Показатели здоровья двух лабораторных культур *D. magna*

Показатели	Лаборатории	
	№ 1	№ 2
День первого приплода	10±2	17±2
День первого массового приплода	18±2	27±3
Средняя продолжительность жизни, дни	79,7±1,0	46,6±2,3
Максимальная продолжительность жизни, дни	114,0±1,7	74,0±2,1
Средняя плодовитость шт./1 взрослую самку	74,3±2,4	21,4±3,5
Количество abortивных яиц, шт.	0	3±1

Признаки здоровья *D. magna*

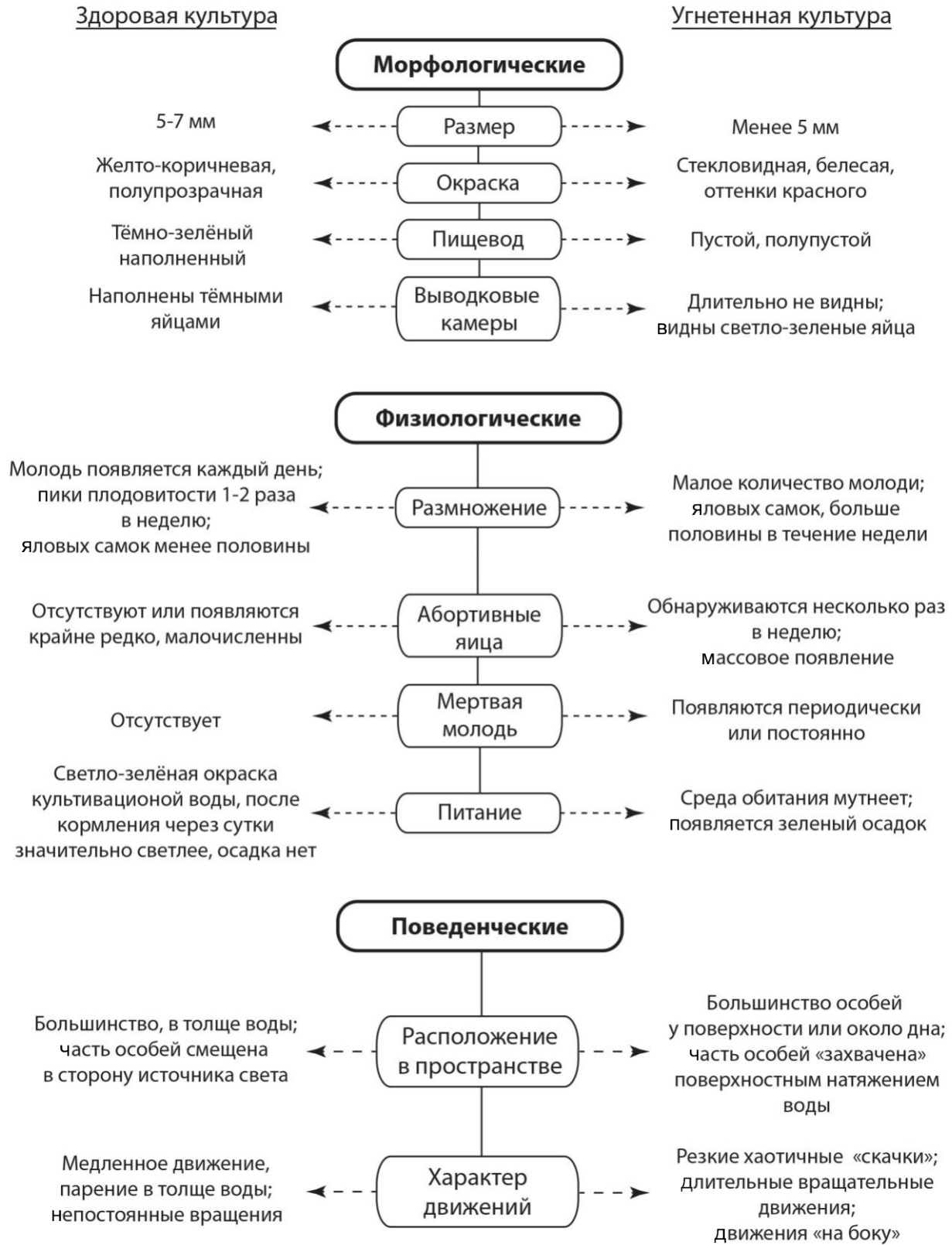


Рис. 5. Схема визуальных наблюдений за *D. magna* при лабораторном культивировании

у рачков в лаборатории № 1. Значительно снижена средняя плодовитость рачков. Это приводит к заниженным результатам учета плодовитости в контрольных вариантах экспериментов, что подтверждают сотрудники лаборатории № 2.

Тем не менее, полученные на базе лаборатории № 1 показатели здоровья *D. magna* не могут быть рекомендованы в качестве эталона, это лишь ориентир. Плодовитость *D. magna*, по данным разных авторов, существенно варьирует. Исследователи из МГУ им. М. В. Ломоносова сообщают о суммарной плодовитости от 30,3 до 74,6 особей в расчете на одну самку при посадке по 5 особей в 250 мл воды [3]. В экспериментах Г. Н. Мисейко с соавторами [7] плодовитость варьировала от 17 до 67 экземпляров молоди на одну самку при индивидуальной посадке. Следовательно, такие различия объясняются неодинаковыми условиями проведения экспериментов. В методиках биотестирования встречаются следующие рекомендации по плотности посадки *D. magna*: 10 особей на 1 л культивационной воды [18], 20 особей на 1,6 л [20], 20–25 особей на 1 л воды [1, 14]. При этом в обзоре [16] подчеркивается, что абиотические факторы (температура, свет, pH, химический состав воды), а также биотические условия (кормление, штамм подопытного организма) оказывают существенное влияние на результаты испытаний с помощью дафний. Установление нормы для показателей продолжительности жизни и плодовитости осложняются также тем, что каждая лаборатория использует свою культивационную воду, обладающую уникальными свойствами. В обзоре [19] рассматривается важность качества культивационной воды для тест-организмов, чаще всего это основной фактор формирования здоровья лабораторных гидробионтов.

В этой ситуации приемлемым выходом является наблюдение за культурами *D. magna* в созданных для них условиях в рамках рекомендуемых и накопление данных о состоянии их здоровья. Таким образом, в лабораториях будут накапливаться собственные средние значения наиболее важных показателей состояния культуры, с которыми можно будет вести сравнение. Такой подход уже применяется за рубежом, например, при отслеживании чувствительности к модельному токсиканту [12]. Как правило, отклонение

биологического показателя от исторического значения на 20 % свидетельствует о качественных изменениях состояния организмов. В начале внедрения систематического наблюдения за здоровьем *D. magna* рекомендуется ориентироваться на время появления первой молоди, первого массового приплода и количество абортивных яиц. Согласно литературным данным первое появление потомства у *D. magna* должно происходить с 7 по 12 сутки жизни особей [1, 11, 17]. Разброс связан с сезонностью в созревании дафний. Первый массовый приплод обычно наступает в течение следующих 5 дней за счет пиков плодовитости у единичных особей [15]. Наличие абортивных яиц при содержании дафний является нежелательным явлением. Их количество свыше 20% от суммарного количества молоди будет свидетельствовать о резком ухудшении здоровья лабораторной популяции.

Контроль чувствительности к модельному токсиканту

Лабораторные тест-культуры несмотря на длительное содержание в стандартизированных оптимальных условиях имеют биологические ритмы, накладывающие свой отпечаток на результат проводимых экспериментов.

Чувствительность лабораторной культуры *D. magna* к стандартным токсикантам — одна из важнейших ее характеристик. В соответствии с наиболее распространенной в нашей стране российской методикой биотестирования [1] калибровка чувствительности *D. magna* проводится каждый квартал календарного года. В качестве эталонного токсиканта используется двуххромовокислый калий ($K_2Cr_2O_7$) в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5 мг/л.

Для выявления наличия у *D. magna* биологических ритмов, влияющих на их чувствительность к токсическому воздействию нами были проанализированы результаты ежеквартальных опытов по определению LD_{50} дафний в ответ на двуххромовокислый калий. Также учитывались результаты за 4 года (2013–2016 гг.), в которые культура *D. magna* содержалась на культивационной воде из одного и того же артезианского источника. В течение всех четырех сезонов года чувствительность дафний соответствовала пределам, установленным государственной методикой (0,9–2,0 мг/л). Однако в зимний период

чувствительность рачков повышается. За анализируемый период с 2013 по 2016 г. смертность дафний была выше зимой, чем в остальные сезоны. Такая тенденция каждый год выражалась в минимальных значениях среднелетальной концентрации в зимний период и максимальных летом. Показатель LD_{50} и его колебания в течение 4 лет отражены на рис. 6.

Максимальные различия между показателями LD_{50} наблюдаются зимой и весной ($p = 0,02$). Различия чувствительности *D. magna* в другие сезоны оказались не достоверны. Повышение чувствительности рачков в зимний период можно объяснить наступлением периода относительно покоя, свойственного для животных континентального климата. Дафнии, лишённые естественных колебаний температурного фактора, сохраняют биоритмы, вероятно, за счет естественного освещения, дополняющего искусственный свет климатической камеры.

Таким образом, эксперимент показал влияние сезонных ритмов на чувствительность дафний. Этот факт необходимо учитывать при планировании исследований и интерпретации результатов. Кроме того, не следует спешить менять культивационную воду или культуру даже в случае выхода чувствительности организмов за требуемый диапазон, поскольку это может быть связано с сезонными явлениями: как биоритмами дафний, так и возможными сезонными колебаниями химического состава культивационной воды. Отметим, что выявленная закономерность может не соблюдаться в других лабораториях в силу сово-

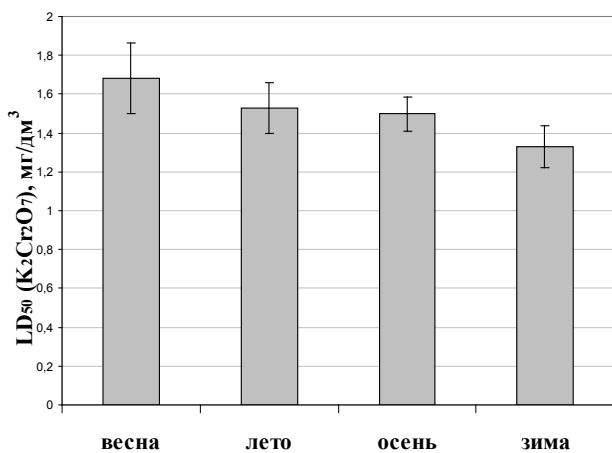


Рис. 6. Чувствительность *D. magna* к модельному токсиканту $K_2Cr_2O_7$ по сезонам года

купности многих факторов, поэтому желательно в каждой лаборатории иметь представление о сезонной динамике чувствительности собственной культуры.

Заключение

В каждой лаборатории внутренний контроль качества работ должен идти по пути совершенствования. В области биотестирования одним из важнейших направлений, требующих внедрения дополнительных механизмов контроля, является состояние тест-культуры, ее пригодность к биотестам. Проведенные работы и ряд обобщений, представленных в статье, были направлены на выявление показателей здоровья *D. magna*. Краткие рекомендации для контроля здоровья этой тест-культуры таковы:

- простейшим уровнем отслеживания изменений состояния тест-культуры *D. magna* могут быть комплексные наблюдения за качественными параметрами здоровья дафний, диагностируемые визуально;

- оперативным критерием здоровья одновозрастных партеногенетических самок для дальнейшего получения синхронизированной молодки можно считать день появления первого приплода. Он должен наступать на 7–12 сутки жизни рачков. Такой разброс зависит от сезона года. Однако отклонение показателя от среднего значения более чем на 5 дней будет свидетельствовать о проблемах с воспроизводством культуры и снижением надежности тест-функции «плодовитость»;

- установление сезонной динамики чувствительности рачков к модельному токсиканту позволит отличать истинные ухудшения здоровья культуры *D. magna* от сезонных явлений.

Литература

1. Акварос (2007). ФР 1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.: Акварос, 51 с.
2. Альберт, А. (1989). Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии. В 2 томах. Т. 1. М.: Медицина, 400 с.
3. Воробьева, О. В., Филенко, О. Ф. и Исакова, Е. Ф. (2013). Изменения плодовитости лабораторной культуры *Daphnia magna*. Перспективы науки, № 9 (48), сс. 11–14.
4. Калью, П. И. (1988). Сущностная характеристика понятия «здоровье» и некоторые вопросы перестройки здравоохранения: обзорная информация. М.: ВНИИМИ, 66 с.

5. Кутикова, Л. А. и Старобогатов, Я. И. (ред.) (1977). Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР. Л.: Гидрометеиздат, 511 с.
6. Лесников, Л. А. и Мосиенко, Т. К. (1992). Приемы биоиндикации и биотестирования при текущем надзоре за загрязненностью водных объектов и выявлении превышения их ассимилирующей способности: методические указания. СПб.: ГосНИОРХ, ГНИПБиТ, 29 с.
7. Мисейко, Г. Н., Тушкова, Г. И. и Цхай, И. В. (2001). *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) как тест-объект в оптимальных условиях лабораторного культивирования. Известия Алтайского государственного университета, № 3 (21), сс. 83–86.
8. Олькова, А. С. (2017). Условия культивирования и многообразие тест-функций *Daphnia magna* Straus при биотестировании. Вода и экология: проблемы и решения, № 1, сс. 63–82. DOI: 10.23968/2305-3488.2017.19.1.63-82.
9. Цалолыхин, С. Я. (ред.) (1995). Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 2. Ракообразные. СПб: Наука, 628 с.
10. Arnberger, A., Eder, R., Alex, B., Hutter, H.-P., Wallner, P., Bauer, N., Zaller, J. G. and Frank, T. (2018). Perceived health benefits of managed and unmanaged meadows in a mountain biosphere reserve — an experimental study in the Austrian Alps. *Journal on Protected Mountain Areas Research and Management*, Vol. 10, No. 1, pp. 5–14. DOI: 10.1553/eco.mont-10-1s5.
11. Brown, L. A. (1929). The natural history of Cladocerans in relation to temperature. II. Temperature coefficients for development. *The American Naturalist*, Vol. 63, No. 687, pp. 346–352. DOI: 10.1086/280267.
12. Environment Canada (1990). Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Environmental Protection Series. Report EPS 1/RM/12. Ottawa: Environment Canada, 77 p.
13. Fleischer, P. and Koreň, M. (1995). Forest health conditions in the Tatra Biosphere Reserve. *Ecology (Bratislava)*, Vol. 14, Issue 4, pp. 445–457.
14. International Organization for Standardization (2012). ISO 6341:2012. Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Geneva: International Organization for Standardization, 22 p.
15. Isakova, E. F. (1980). Seasonal changes in the actual fertility of *Daphnia magna* in laboratory culture. *Hydrobiological Journal*, Vol. 16, Issue 4, pp. 86–89.
16. Jonczyk, E and Gilron, G. (2005). Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia* sp. In: Blaise, C., Féraud, J.-F. (eds.). Small-scale freshwater toxicity investigations. Vol. 1. Toxicity test methods. Dordrecht: Springer, pp 337–393. DOI: 10.1007/1-4020-3120-3_11.
17. Olkova, A. S., Kantor, G. Y., Kutyavina, T. I. and Ashikhmina, T. Y. (2018). The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 37, Issue 2, pp. 376–384. DOI: 10.1002/etc.3956.
18. Poirier, D. G., Westlake, G. F. and Abernethy, S. G. (1988). *Daphnia magna* acute lethality toxicity test protocol. Ontario: Ontario Ministry Environment, Queen's Printer for Ontario, 27 p.
19. Terekhova, V. A., Wadhia, K., Fedoseeva, E. V. and Uchanov, P. V. (2018). Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, No. 419, Article 32. DOI: 10.1051/kmae/2018015.
20. US Environmental Protection Agency (1987). User's guide: procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays. EPA 600/8-87/011. Las Vegas: US Environmental Protection Agency, 57 p.

References

1. Akvaros (2007). FR 1.39.2007.03222. Federal Register FR 1.39.2007.03222. Methodology for determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, and waste by mortality and changes in fertility of daphnias. Moscow: Akvaros, 51 p.
2. Albert, A. (1989). Selective toxicity. The physico-chemical basis of therapy. In 2 Vol.s. Vol. 1. Moscow: Meditsina, 400 p.
3. Vorobyeva, O. V., Filenko, O. F. and Isakova, E. F. (2013). Changes in fertility of laboratory culture *Daphnia magna*. *Science Prospects*, No. 9 (48), pp. 11–14.
4. Kalyu, P. I. (1988). Essential features of the “health” concept and some issues of healthcare restructuring: an overview. Moscow: All-Union Research Institute of Medical and Medical-Technical Information (VNIIMI), 66 p.
5. Kutikova, L. A. and Starobogatov, Ya. I. (eds.) (1977). Identification guide of freshwater invertebrates in the European part of the USSR. Leningrad: Gidrometeoizdat, 511 p.
6. Lesnikov, L. A. and Mosienko, T. K. (1992). Methods of bioindication and bioassay under the current supervision over pollution of water bodies and identification of excess in their assimilation capacity: methodological guidelines. Saint Petersburg: State Research Institute of Lake and River Fisheries, State Research Enterprise for Biomonitoring and Toxicology, 29 p.
7. Misejko, G. N., Tuschkova, G. I. and Zhai, I. V. (2001). *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as test-object in optimum conditions of laboratory cultivation. *Izvestiya of Altai State University Journal*, No. 3 (21), pp. 83–86.
8. Olkova, A. S. (2017). The conditions of cultivation and the variety of test functions of *Daphnia magna* Straus in bioassay. *Water and Ecology*, No. 1, pp. 63–82. DOI: 10.23968/2305-3488.2017.19.1.63-82.
9. Tsalolikhin, S. J. (ed.) (1995). Key to freshwater invertebrates of Russia and adjacent lands. Vol. 2. Crustaceans. Saint Petersburg: Nauka, 628 p.
10. Arnberger, A., Eder, R., Alex, B., Hutter, H.-P., Wallner, P., Bauer, N., Zaller, J. G. and Frank, T. (2018). Perceived health benefits of managed and unmanaged meadows in a mountain biosphere reserve — an experimental study in the Austrian Alps. *Journal on Protected Mountain Areas Research and Management*, Vol. 10, No. 1, pp. 5–14. DOI: 10.1553/eco.mont-10-1s5.
11. Brown, L. A. (1929). The natural history of Cladocerans in relation to temperature. II. Temperature coefficients for development. *The American Naturalist*, Vol. 63, No. 687, pp. 346–352. DOI: 10.1086/280267.

12. Environment Canada (1990). Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Environmental Protection Series. Report EPS 1/RM/12. Ottawa: Environment Canada, 77 p.
13. Fleischer, P. and Koreň, M. (1995). Forest health conditions in the Tatra Biosphere Reserve. *Ecology (Bratislava)*, Vol. 14, Issue 4, pp. 445–457.
14. International Organization for Standardization (2012). ISO 6341:2012. Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Geneva: International Organization for Standardization, 22 p.
15. Isakova, E F. (1980). Seasonal changes in the actual fertility of *Daphnia magna* in laboratory culture. *Hydrobiological Journal*, Vol. 16, Issue 4, pp. 86–89.
16. Jonczyk, E and Gilron, G. (2005). Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia* sp. In: Blaise, C., Féraud, J.-F. (eds.). Small-scale freshwater toxicity investigations. Vol. 1. Toxicity test methods. Dordrecht: Springer, pp 337–393. DOI: 10.1007/1-4020-3120-3_11.
17. Olkova, A. S., Kantor, G. Y., Kutavina, T. I. and Ashikhmina, T. Y. (2018). The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 37, Issue 2, pp. 376–384. DOI: 10.1002/etc.3956.
18. Poirier, D. G., Westlake, G. F. and Abernethy, S. G. (1988). *Daphnia magna* acute lethality toxicity test protocol. Ontario: Ontario Ministry Environment, Queen's Printer for Ontario, 27 p.
19. Terekhova, V. A., Wadhia, K., Fedoseeva, E. V. and Uchanov, P. V. (2018). Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, No. 419, Article 32. DOI: 10.1051/kmae/2018015.
20. US Environmental Protection Agency (1987). User's guide: procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays. EPA 600/8-87/011. Las Vegas: US Environmental Protection Agency, 57 p.

Автор

Анна Сергеевна Олькова, канд. техн. наук, доцент
Вятский государственный университет, г. Киров, Россия
E-mail: morgan-abend@mail.ru

Author

Anna Sergeevna Olkova, Dr. of Engineering,
Associate Professor
Vyatka State University
E-mail: morgan-abend@mail.ru