

# БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

DOI: <https://doi.org/10.32839/2304-5809/2020-6-82-38>

УДК 504.4.06(477.54):665.66

Крайнюков О.М., Кривицька І.А., Карпенко О.Р.  
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

## УДОСКОНАЛЕННЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ РАКОПОДІБНИХ CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG

**Анотація.** Методики досліджень водних об'єктів шляхом проведення біотестування на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* включають у себе експерименти з вивчення та аналізу репродуктивних функцій тест-об'єктів, їх чутливості до зовнішніх подразників, які здатні призвести до порушенні різних функціональних процесів, передчасної загибелі особин. Залежно від вибору мети експерименту існує ряд різнопланових методик, які за своєю концепцією дають змогу визначити потрібний показник. В ході проведеного наукового експерименту було досліджено репродуктивну здатність *Ceriodaphnia affinis* при культивуванні в різних за жорсткістю середовищах (день отримання першої молоді, кількість молоді на 1 самку, виживаність в днях тощо). За результатами виконаного дослідження було зроблено висновок, що модифіковане середовище, яке пропонується для культивування в пропорції «відстояна водна/дистильована вода – 1:2» не несе негативного впливу на репродуктивність ракоподібних. Використання дистильованої води під час розведення відстояної води до допустимих меж сприяє зниженню жорсткості у середовищі культивування і не спричиняє негативної дії на тест-об'єкт. Також можна додати, що урізноманітнення харчового раціону тест-об'єктів водоростями позитивно впливає на народжуваність організмів. Було досліджено чутливість ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* до еталонної речовини  $K_2Cr_2O_7$  (дихромат калію) в стандартних та модифікованих умовах культивування. Модифіковане середовище (1:2) за 24 години більш стабільне по відношенню до інших модифікованих середовищ і сходиться за результатами зі стандартними умовами. Тобто, штучно створене середовище також підходить для досліджень з еталонними хімічними сполуками. Під час виконаних за 48 годин тестування досліджень, було попередньо встановлено, що модифіковане середовище (1:2) найбільше підходить до використання даного тест-об'єкту. Модифіковане середовище існування, яке було створене у ході експериментів, показало ряд переваг над середовищем, виготовленим згідно стандартних методик ДСТУ: була зменшена початкова жорсткість води, збільшена її живильна якість, що позитивно сказалося на продуктивності тест-об'єктів, покращена репродуктивна здатність представників ракоподібних. Усе це доводить той факт, що стандартні методики культивування тест-об'єктів не є оптимізованими та уніфікованими для різного роду експериментів, маючи в собі явні прогалини та шляхи подальшої модифікації. Відповідно цих фактів було доведено, що вдосконалення середовища існування організмів є перспективним шляхом розвитку технологій біотестування, так як у деяких випадках удосконалене модифіковане середовище культивування є зручнішим для використання в експериментальному плані, аніж стандартне синтетичне.

**Ключові слова:** середовище культивування, ракоподібні, жорсткість, токсикант, гідробіонти.

Krainiukov Oleksii, Krivicka Ivetta, Karpenko Olena  
V.N. Karazin Kharkiv National University

## IMPROVEMENT OF CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG CANCER CULTIVATION CONDITIONS

**Summary.** Methods of research of water bodies by conducting biotesting on crustaceans *Ceriodaphnia affinis* include experiments to study and analyze the reproductive functions of test objects, their sensitivity to external stimuli, which can lead to disruption of various functional processes, premature death of individuals. Depending on the choice of the purpose of the experiment, there are a number of different methods, which according to their concept allow to determine the desired indicator. In the course of the conducted scientific experiment the reproductive ability of *Ceriodaphnia affinis* was studied when cultivated in different hardness environments (day of receiving the first young, number of young per 1 female, survival in days, etc.). According to the results of the experiment, it was concluded that the modified medium, which is proposed for cultivation in the proportion "settled water: distilled water – 1: 2" does not have a negative impact on the reproduction of crustaceans. The use of distilled water when diluting the settled water to acceptable limits helps to reduce the hardness in the culture medium and does not cause adverse effects on the test object. It can also be added that the diversification of the diet of test objects with algae has a positive effect on the fertility of organisms. The sensitivity of crustaceans *Ceriodaphnia affinis* to the reference substance  $K_2Cr_2O_7$  (potassium dichromate) under standard and modified culture conditions was investigated. The modified medium (1: 2) in 24 hours is more stable in relation to other modified media and converges the results with standard conditions. That is, the artificial environment is also suitable for research with reference chemical compounds. During the 48 hours of testing, it was previously determined that the modified medium (1: 2) is the most suitable for the use of this test object. The modified habitat, which was created during the experiments, showed a number of advantages over the environment made according to standard DSTU methods: the initial hardness of water was reduced, its nutritional quality was increased, which had a positive effect on the productivity of test objects, improved reproductive capacity of crustaceans. All this is proved by the fact that standard methods of cultivating test objects are not optimized and unified for different kinds of experiments, with obvious gaps and ways of further modification. According to these facts, it has been proved that the improvement of the habitat of organisms is a promising way to develop biotesting technologies, as in some cases an improved modified culture medium is more convenient to use experimentally than a standard synthetic one.

**Keywords:** cultivation medium, crustaceans, hardness, toxicant, aquatic organisms.

**Постановка проблеми.** Сучасні реалії індустріального та промислового розвитку породили величезну кількість небезпечних викидів у водне середовище. Якісними характеристиками інколи складно дослідити забруднення гідрологічного простору і можливий вплив безпосередньо на організм людини. Одним із методів оцінки якості води на її придатність до споживання та використання людством і досі залишається біотестування – спосіб дослідження, який безпосередньо описує вплив зміни концентрації тієї чи іншої речовини у воді та імпаکتну дію такого вимушеного симбіозу. Зважаючи на це, для експериментів з водою водних об'єктів, забрудненою небезпечними речовинами краще використовувати як тест-об'єкт найчутливіші види гідробіонтів, такі як *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg.

Ракоподібні *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg уже десятки років служать тим самим першим рубежем (перша стадія перевірки) біотестування, який стає основою до подальших екологічних експериментів для виявлення можливих факторів, які можуть призвести до негативних наслідків у функціонуванні водних організмів. Значущий етап таких досліджень – культивування гідробіонтів та забезпечення унікальної точності результатів, незалежно від кількості вимірів. Саме процес культивування і отримання тест-об'єктів ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg придатних до біотестування є найважливішим, а тому і найвідповідальнішим у експерименті. Якість виконання цього етапу і є фундаментом до отримання найбільш точних результатів.

Невпинний ріст об'єму та кількості небезпечних речовин, що вносяться у водне середовище антропогенними джерелами забруднення змушують людство шукати нові та вдосконалювати існуючі методи оцінки якості природних вод. Багаторічні дослідження науковців показують, що велика кількість ксенобіотиків, які знаходяться у ареалі існування гідробіонтів, здатні накопичуватися у організмах живих істот.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Процедура біотестування описана у великій кількості відповідних міжнародних стандартів. Найбільш поширені стандартні методики підготовлені Організацією економічного співробітництва та розвитку (OECD) і Міжнародною організацією зі стандартизації (ISO). Поряд з цим стандартні методи також регламентовані такими організаціями як Американський центр по випробуванню матеріалів (ASTM), Міністерство екології та змін клімату Канади (EC), Британський інститут стандартів (BSI) і Німецький інститут по стандартизації (DIN).

Прийнятність біотестів як ефективних аналітичних інструментів гарантується їх стандартизацією і відповідністю метрологічних характеристик [1; 2]. Згідно з методичними посібникам OECD [3–6], основними умовами біотестування, які повинні бути стандартизовані, є: а) способи підготовки вихідних проб і випробуваних розчинів; б) характеристика і склад культивувальної води і води для розведення проб; в) умови експозиції (температура, режим і інтенсивність освітленості, рівень розчиненого кисню, рН та ін.). В українській практиці, на жаль, вимоги до стандартизації умов не завжди строго витримуються, оскільки

багато лабораторії не оснащені обладнанням для забезпечення клімат-контролю при культивуванні тест-організмів і проведенні біотестування [7]. Виняткова важливість якості води, використовуваної для культивування тест-культур і розведення проб, підкреслюється в багатьох нормативних документах і науковій літературі [3–9].

Зарубіжними стандартами [3–6; 8; 10] допускається використання кількох варіантів отримання водних середовищ, придатних для культивування організмів і розведення проб: природна вода (поверхнева або підземна), дехлорірована водопровідна вода і синтетичні середовища. Природна і водопровідна вода в англійському варіанті об'єднуються під назвами receiving water або acceptable water (далі в тексті «вода прийнятної якості»). Рекомендується застосування однієї і той же води для культивування і розведення проб.

**Мета статті** – визначення найбільш сприятливих умов культивування ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* шляхом оптимізації жорсткості середовища культивування.

**Виклад основного матеріалу.** Експериментальні дослідження проводились за стандартних умов культивування відповідно до методики [11]. Дійшовши до висновку, що у методиках біотестування, які використовуються в різних країнах світу, умови культивування ракоподібних відрізняються між собою (хоч і незначними відмінностями), було розпочато розроблення модифікованого середовища, яке могло б бути їм альтернативним. Саме через те, що результат біотестування на пряму залежить від якості культури та в яких умовах вона була отримана, основною прерогативою була зміна жорсткості середовища.

Таким чином нами була запропонована наступна гіпотеза, яка в результаті проведених досліджень перевірялась: отримання середовища шляхом змішування відстоюної води з дистильованою водою призведе до зниження жорсткості води, яка використовується для культивування ракоподібних, до встановлених нормативних вимог (1,3-2,0 мг екв/л) та буде відповідати встановленим вимогам для їх культивування (зменшення загальної жорсткості середовища та рН) відповідно до вимог міжнародних методик. Співвідношення «відстоюна вода/дистильована вода» виглядає у досліді наступним чином:

1. Відстоюна вода – 350 ppm (6,9–7 мг екв/л), не розбавляється.
2. 1:1 (відстоюна вода: дистильована вода) – сер. значення 190 ppm (3,8–3,9 мг екв/л).
3. 1:2 (відстоюна вода: дистильована вода) – сер. значення 127 ppm (2,5–2,6 мг екв/л).
4. 1:3 (відстоюна вода: дистильована вода) – сер. значення 98 ppm (2–2,1 мг екв/л).

Еталонною речовиною, яку вибрали для даного дослідження, став калій дихромовокислий ( $K_2Cr_2O_7$ ). Дана рідина дуже стабільна, погано розкладається, тому його і використовують як еталон. Було зроблено серію розчинів на різних випробувальних середовищах з концентраціями  $K_2Cr_2O_7$  від 0,5 до 4,0 мг/дм<sup>3</sup>. Розчинами наповнювали пробірки (по 15 см<sup>3</sup>), в які потім поміщували тест-об'єкти – *Ceriodaphnia affinis* у віці до 24 год. Повторність – 10-кратна. Під час проведення дослідження ракоподібних не годували. Через 24 години фіксували виживаність дослід-

жуваних тест-об'єктів, на основі чого знаходили ЛК<sub>50-24</sub> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Якщо отримане значення ЛК<sub>50-24</sub> перебуває від 0,9-3,3 мг/дм<sup>3</sup>, то це означає, що дані умови, в яких знаходиться культура *Ceriodaphnia affinis*, підходящі для біотестування. Проте, якщо отримане значення ЛК<sub>50-24</sub> (сполуки K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) не входить у встановлений діапазон реагування, потрібно перевірити культуру та з'ясувати причини такого результату.

На рисунках 1–4 наведено залежність гибелі періодафній від концентрації K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> за 24 години у різних умовах жорсткості.

У таблиці 1 наведено вплив еталонної речовини K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> на *Ceriodaphnia affinis* при викорис-

танні модифікованого середовища та стандартного за 24 години. В таблиці 2 наведений той самий експеримент, але за 48 годин.

Там, де середня летальна концентрація становить більший показник, організми більше стійкі до еталонної речовини K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Модифіковане середовище (1:2) більш стабільне по відношенню до інших модифікованих середовищ і сходиться за результатами зі стандартними умовами. Тобто, штучно створене середовище також підходить для досліджень з еталонними хімічними сполуками.

На рисунках 5–8 наведено залежність гибелі періодафній від концентрації K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> за 48 години у різних умовах жорсткості.

Таблиця 1

**Вплив еталонної речовини K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> на *Ceriodaphnia affinis* при використанні у досліді різних середовищ за 24 години**

Назва	Стандартне середовище	Модифіковане середовище (1:1)	Модифіковане середовище (1:2)	Модифіковане середовище (1:3)
Середня летальна концентрація, мг/л	3,18	2,34	2,86	1,76

Джерело: розроблено автором

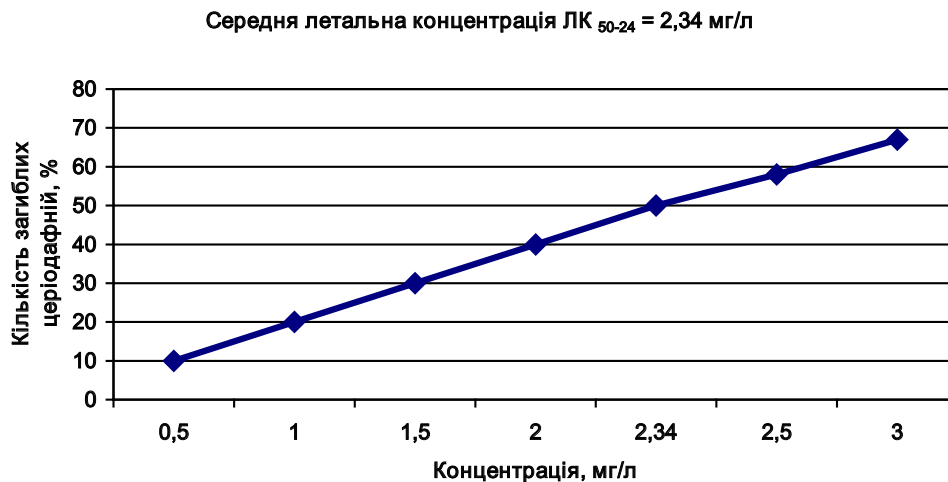


Рис. 1. Залежність загибелі періодафній за 24 години від концентрації K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> у стандартному середовищі

Джерело: розроблено автором



Рис. 2. Залежність загибелі періодафній за 24 години від концентрації K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> у модифікованому середовищі (1:1)

Джерело: розроблено автором

Вплив еталонної речовини  $K_2Cr_2O_7$  на *Ceriodaphnia affinis* при використанні у досліді різних середовищ за 48 годин

Назва	Стандартне середовище	Модифіковане середовище (1:1)	Модифіковане середовище (1:2)	Модифіковане середовище (1:3)
Середня летальна концентрація, мг/л	1,25	0,96	1,1	0,91

Джерело: розроблено автором

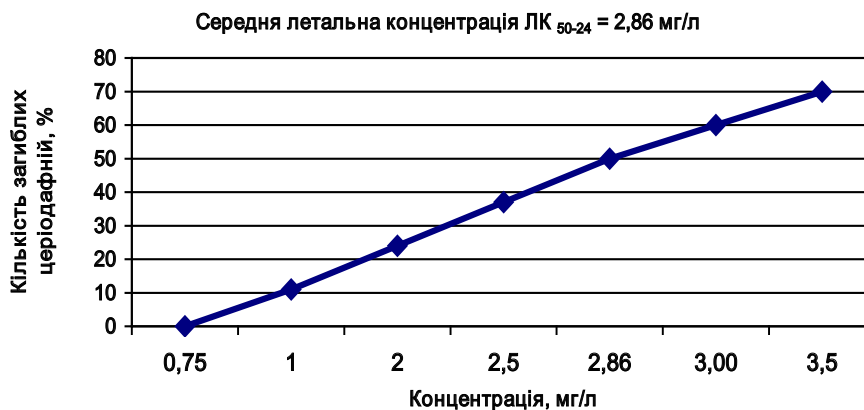


Рис. 3. Залежність загибелі церіодафній за 24 години від концентрації  $K_2Cr_2O_7$  у модифікованому середовищі (1:2)

Джерело: розроблено автором

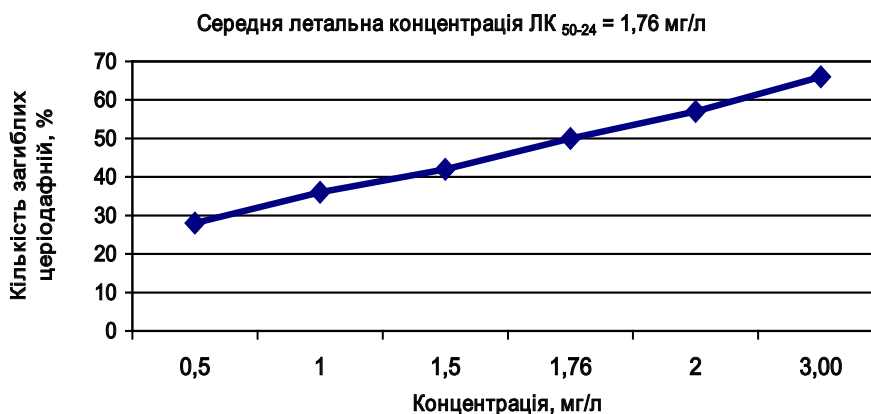


Рис. 4. Залежність загибелі церіодафній за 24 години від концентрації  $K_2Cr_2O_7$  у модифікованому середовищі (1:3)

Джерело: розроблено автором

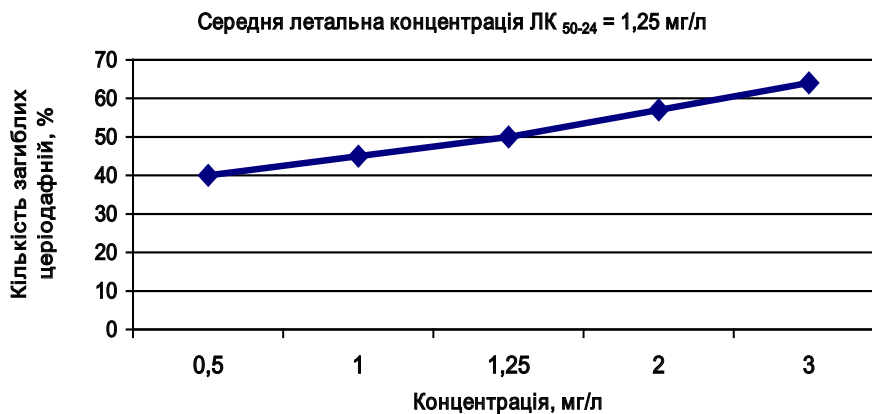


Рис. 5. Залежність загибелі церіодафній за 24 години від концентрації  $K_2Cr_2O_7$  у стандартному середовищі

Джерело: розроблено автором

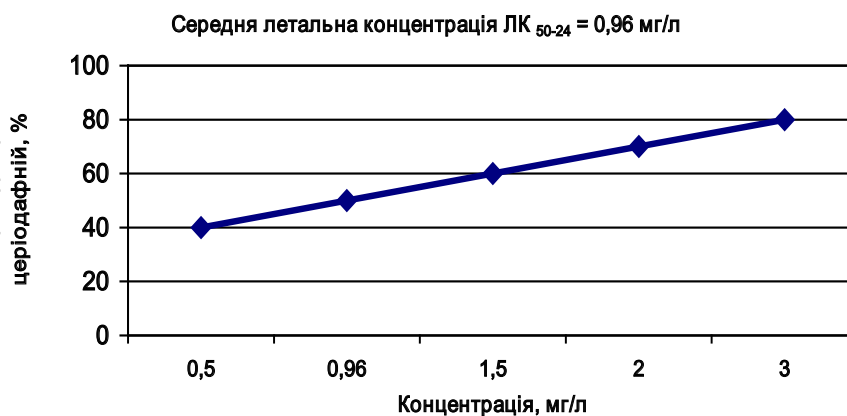


Рис. 6. Залежність загибелі периодафній за 24 години від концентрації  $K_2Cr_2O_7$  у модифікованому середовищі (1:1)

Джерело: розроблено автором

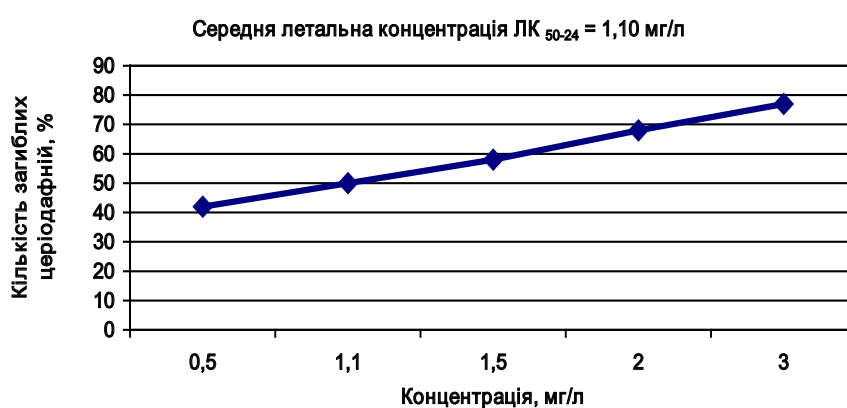


Рис. 7. Залежність загибелі периодафній за 24 години від концентрації  $K_2Cr_2O_7$  у модифікованому середовищі (1:2)

Джерело: розроблено автором

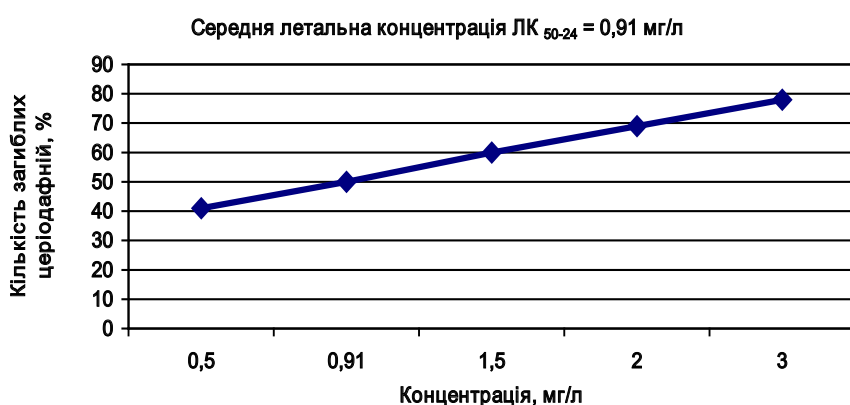


Рис. 8. Залежність загибелі периодафній за 24 години від концентрації  $K_2Cr_2O_7$  у модифікованому середовищі (1:3)

Джерело: розроблено автором

За результатами виконаних за 48 годин тестування досліджень, було попередньо встановлено, що модифіковане середовище (1:2) найбільше підходить до використання даного тест-об'єкту. Жорсткість оновленого середовища (1:2) становить 2,6 мг екв/л, а стандарті умови становлять 7 мг екв/л.

Отже, порівнявши здатність до плодючості та виживаності у експериментах з різними по-

казниками жорсткості та вмісту еталонної речовини  $K_2Cr_2O_7$ , можна зробити висновок, що модифікація середовища існування організмів є перспективним шляхом розвитку технологій біотестування, так як у деяких випадках удосконалене модифіковане середовище культивування є зручнішим для використання в експериментальному плані, аніж стандартне [12].

**Висновки.** Модифіковане середовище існування, яке було створене у ході експериментів, показало ряд переваг над середовищем, виготовленим згідно стандартних методик ДСТУ: була зменшена початкова жорсткість води, збільшена її живильна якість, що позитивно сказалося на продуктивності тест-об'єктів, покращена репродуктивна здатність представників ракоподібних. Усе це доводить той факт, що стандартні методики культивування тест-об'єктів не є оптимізова-

ними та уніфікованими для різного роду експериментів, маючи в собі явні прогалини та шляхи подальшої модифікації. Відповідно цих фактів було доведено, що вдосконалення середовища існування організмів є перспективним шляхом розвитку технологій біотестування, так як у деяких випадках удосконалене модифіковане середовище культивування є зручнішим для використання в експериментальному плані, аніж стандартне синтетичне.

### Список літератури:

1. Ratte H.T., Hammers-Wirtz M., Cleuvers M. (2003) Ecotoxicity testing / Bioindicators and biomonitors (B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, ed.), Chapter 7. *Elsevier Science Ltd.*, pp. 221–256.
2. Hernando M.D., Malato O., Farré M., FernandezAlba A.R., Barceló D. (2006) Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. *Talanta*, V. 69. I. 2, pp. 370–376.
3. OECD. Guideline for the testing of chemicals 202: *Daphnia sp.*, acute immobilisation test. Adopted 13 April 2004, Paris (FR), 12 p.
4. OECD. Guideline for the testing of chemicals 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Adopted 28 July 2011, Paris (FR), 25 p.
5. OECD. Guideline for the testing of chemicals 211: *Daphnia magna* reproduction test. Adopted 02 Oct 2012, Paris (FR), 20 p.
6. OECD. Guideline for the testing of chemicals 235: *Chironomus sp.*, acute immobilisation test. Adopted 28 July 2011, Paris (FR), 16 p.
7. Григорьев Ю.С., Шашкова Т.Л., Стравинскене Е.С. Биотестирование в системе экологического мониторинга качества вод: решаемые задачи и условия, обеспечивающие получение воспроизводимых результатов / Матер. Всерос. конф. по водной экотоксикологии: *Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы (Борок, 28 октября – 1 ноября 2014 г.)*. 2014. Т. 1. С. 130–132.
8. US EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th Edition. EPA/600/4-90/027F, 1994, 28 p.
9. Федосеева Е.В., Сапункова Н.Ю., Терехова В.А. Практическая экотоксикология: оценка чувствительности биотест-культур : Учебное пособие / Под ред. В.А. Тереховой. Москва : ГЕОС, 2016. С. 54.
10. ISO 6341:2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). – Acute toxicity test. – 22 p.
11. ДСТУ 4174:2003 Якість води. Визначення хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 10706:2000, MOD). [Чинний від 2004-07-01]. Вид. офіц. Київ : Держспоживстандарт України, 2004.
12. Крайнюков О.М., Якушева А.В. Етапи встановлення екологічних стандартів якості в країнах ЄС : зб. наук. стат. (м. Харків, 12 квіт. 2018 р.). Харків, 2018. С. 90–91.

### References:

1. Ratte, H.T., Hammers-Wirtz, M., Cleuvers, M. (2003). Ecotoxicity testing / Bioindicators and biomonitors (B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, ed.), Chapter 7. – *Elsevier Science Ltd.*, pp. 221–256.
2. Hernando, M.D., Malato, O., Farré, M., FernandezAlba, A.R., Barceló, D. (2006). Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. *Talanta*, V. 69. I. 2, pp. 370–376.
3. OECD. Guideline for the testing of chemicals 202: *Daphnia sp.*, acute immobilisation test. Adopted 13 April 2004, Paris (FR), 12 p.
4. OECD. Guideline for the testing of chemicals 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Adopted 28 July 2011, Paris (FR), 25 p.
5. OECD. Guideline for the testing of chemicals 211: *Daphnia magna* reproduction test. Adopted 02 Oct 2012, Paris (FR), 20 p.
6. OECD. Guideline for the testing of chemicals 235: *Chironomus sp.*, acute immobilisation test. Adopted 28 July 2011, Paris (FR), 16 p.
7. Grigoryev, Yu.S., Shashkova, T.L., & Stravinskene, E.S. (2014). Biotestirovaniye v sisteme ekologicheskogo monitoringa kachestva vod: reshayemye zadachi i usloviya, obespechivayushchiye polucheniye vosproizvodimyykh rezul'tatov [Biotesting in the system of environmental monitoring of water quality: solvable tasks and conditions ensuring reproducible results] Mater. Vseros. conf. on aquatic ecotoxicology: *Anthropogenic impact on aquatic organisms and ecosystems* (Borok, October 28 – November 1, 2014). T. 1, pp. 130–132. (in Russian)
8. US EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th Edition. EPA/600/4-90/027F, 1994, 28 p.
9. Fedoseeva, E.V., Sapunkova, N.Yu., & Terekhova, V.A. (2016). Prakticheskaya ekotoksikologiya: otsenka chuvstvitel'nosti biotest-kul'tur [Practical ecotoxicology: assessment of the sensitivity of biotest cultures] Textbook / Ed. V.A. Terekhova. Moskva: GEOS, p. 54. (in Russian)
10. ISO 6341:2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). – Acute toxicity test, 22 p.
11. DSTU 4174: 2003 Yakist' vody. Vyznachennya khronichnoyi toksychnosti khimichnykh rehovyn ta vody na *Daphnia magna* Straus ta *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) [Water quality. Determination of chronic toxicity of chemicals and water on *Daphnia magna* Straus and *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg] (Cladocera, Crustacea) (ISO 10706: 2000, MOD). [Valid from 2004-07-01]. View. ofits. Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy, 2004. (in Ukrainian)
12. Krainyukov, O.M., & Yakusheva, A.V. (2018). Etapy vstanovlennya ekolohichnykh standartiv yakosti v krayinakh ES [Stages of establishing environmental quality standards in EU countries]. Coll. Science. stat. (Kharkiv, April 12, 2018). Kharkiv, pp. 90–91. (in Ukrainian)