

УДК 574.64

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *DAPHNIA MAGNA* К ДЕЙСТВИЮ ПЕСТИЦИДОВ БИОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ IN VIVO

Кулагина К.В., Коровина Е.В., Шроль О.Ю., Пантелеев С.В.

ГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, e-mail: puankare1@yandex.ru

Проведено исследование токсичности современных пестицидов биогенного происхождения «Лепидоцид» (д.в. кристаллообразующая бактерия *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), «Фитоспорин-М» (д.в. живые клетки и споры природной бактериальной культуры *Bacillus subtilis*) и «Фитоверм» (д.в. концентрат аверсектина С) для модельного объекта водной токсикологии *Daphnia magna* методом биотестирования. Определение токсиметрических показателей с помощью пробит-анализа позволило составить их сравнительную характеристику по безразмерным коэффициентам летального и безопасного разбавления.

**Ключевые слова:** токсичность, биологические препараты, *Daphnia magna*

## SENSITIVITY *DAPHNIA MAGNA* TO ACTION PESTICIDES BIOGENIC IN VIVO

Kulagina K.V., Korovina E.V., Shrol O.Y., Panteleev S.V.

Ulyanovsk state university, Ulyanovsk, e-mail: puankare1@yandex.ru

The research of the toxicity of modern biogenic pesticides «Lepidocid» (active substance is crystal bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*), «Fitosporin-M (active substance is living cells and spores of the natural bacterial culture of *Bacillus subtilis*) and «Fitoverm» (active substance is concentrate of aversektin C) for modeling test-object of aqua toxicology *Daphnia magna* by bioassay method. Determination of toxicmetric indicators using probit analysis allowed to make their comparative characteristics by the dimensionless coefficients of the lethal and safe dilution.

**Keywords:** toxicity, biological preparations, *Daphnia magna*

Применяемые на сегодняшний день биологические препараты производятся преимущественно на основе целых микроорганизмов и содержат помимо действующего начала примесь спор, вегетативных клеток и токсинов [2].

«Лепидоцид» представляет собой биологический инсектицидный препарат кишечного действия, действующей основой которого является кристаллообразующая бактерия *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, активный ингредиент – бактериальные споры и белковые кристаллы (дельта-эндотоксин).

«Фитоспорин-М» – бактериальный препарат нового поколения, используемый для защиты растений от бактериальных и грибных болезней, действующим веществом являются живые клетки и споры природной бактериальной культуры *Bacillus subtilis*.

«Фитоверм» представляет собой 0,2%-й эмульгирующийся концентрат аверсектина С, который является природной смесью авермектинов, соединений макролидной природы, продуцируемые почвенными микроорганизмами *Streptomyces avermectilis*.

### Материалы и методы исследования

Биопрепараты исследовали в опытах острой летальной токсичности с *Daphnia magna* по общепринятой методике водной токсикологии биотестирования [3]. Для опытов использовали молодь рачков, непосредственно вышедших от материнской особи как наиболее чувствительную стадию развития и при необходимости двухдневных особей. Эксперимент проводили на отстоянной воде, жесткость  $5,57 \pm 0,02$  мг экв/дм<sup>3</sup>, рН  $7,49 \pm 0,02$ , содержание

кислорода  $9,2 \pm 0,1$  мг/дм<sup>3</sup> (перед проведением опытов отстоянную воду процеживали и насыщали воздухом с помощью аквариумного микрокомпрессора). Все исследования осуществлялись в температурном диапазоне  $20 \pm 2$  °С.

При определении острой токсичности исследуемых пестицидов для *Daphnia magna* был использован метод пробит-анализа, позволяющий рассчитывать основные токсиметрические характеристики токсикантов по проценту гибели (показателю выживаемости) тест-организмов.

### Результаты исследования и их обсуждение

Частота возникновения определенного эффекта *Daphnia magna* в ответ на воздействие пестицидов представлена на графиках «концентрация-эффект». При преобразовании зависимости в «логарифм концентрации – эффект» график представляет собой S-образную кривую log-нормального распределения, симметричную относительно средней точки. Данная зависимость может быть преобразована в линейную путем ее построения в координатах log – пробит (концентрация токсиканта представляется в логарифмах, выраженность ответной реакции – в пробитах).

На рис. 1 представлена кумулята гибели *Daphnia magna* при разной концентрации биологического препарата «Лепидоцид» по истечении острых 96-часовых опытов.

При концентрации 3 г/л биологического препарата у новорожденных особей *Daphnia magna* 100%-я иммобилизация наступала через 72 часа. В течение данной

экспозиции особи не могли подняться в толщу растворов, хотя были довольно активны. Наблюдалось нарушение координации движения. При концентрации препарата 2 г/л обездвиживание новорожденных особей *Daphnia magna* наблюдалось через 96 часов. Пробит-анализ кривых летальности показал, что медианная концентра-

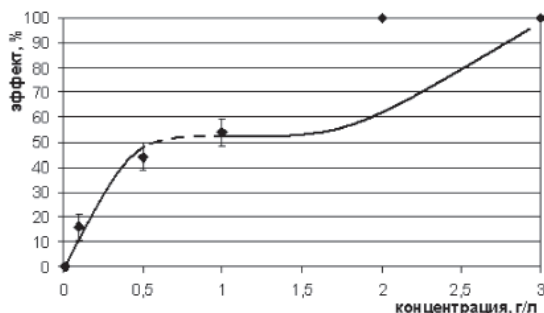


Рис. 1. Зависимость параметра гибели особей *Daphnia magna* от концентрации препарата «Лепидоцид». Каждая точка на графике получена путем регистрации эффектов, полученных у 50 особей

В промежутке концентраций 0,1–0,01 г/л не отмечено острого токсического действия биопрепарата на новорожденных особей *Daphnia magna*.

Оценка степени токсичности пестицидов произведена путем установления верхней и нижней границ диапазона их токсического действия, т.е. испытывались концентрации, приводящие к гибели 100% особей *Daphnia magna* ( $LC_{100}$ ), а также концентрации, не вызывающие иммобилизацию ни одного тест-организма в опытной группе ( $LC_0$ ).

В табл. 1 приведены значения витальных, летальных и медианных концентраций биологического препарата «Лепидоцид» для молодежи *Daphnia magna*. Данные показатели используются в сравнительно-токсикологических экспериментах для расшифровки механизмов действия токсических веществ и экстраполяции полученных данных на природные популяции подопытных организмов [1].

Результаты исследований острой токсичности пестицида «Фитоверм» показали, что при рабочей концентрации 2 мл/л 100%-я иммобилизация *Daphnia magna* наступала через 48–52 часа. В течение данной экспозиции особи не поднимались в толщу растворов, находились на дне сосудов. При концентрации препарата 1 мл/л 100%-я смертность особей *Daphnia magna* наступала через 72 часа.

На рис. 3 представлена кумулята гибели *Daphnia magna* при разной концентрации

препарата по результатам 96-часовых опытов составляет  $0,477 \pm 0,228$  г/л (диапазон 0,083–1,079 г/л). Пробит-анализ позволяет расчетным методом определить токсикологические характеристики пестицидов, отражающие колебания индивидуальной чувствительности тест-организмов (рис. 2).

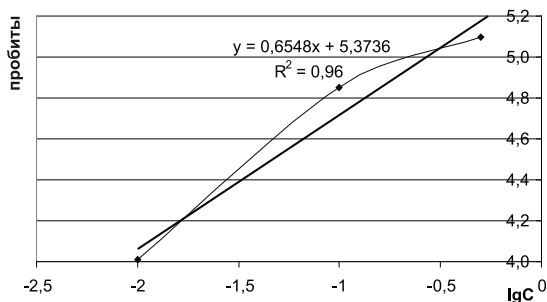


Рис. 2. Зависимость «пробит эффекта – логарифм концентрации» п.ф. пестицида «Лепидоцид» для *Daphnia magna* в остром опыте, уровень значимости 0,05

биологического препарата «Фитоверм» по истечении острых 96-часовых опытов.

Таблица 1

Показатели острой токсичности препарата «Лепидоцид» для молодежи *Daphnia magna*, г/л

Экспозиция, часы	$LC_0$	$LC_{16}$	$LC_{84}$	$LC_{50}$	$LC_{100}$
24	<0,01	1,40	2,72	2,0	$\geq 3,0$
48	<0,01	0,98	2,46	1,35	$\geq 3,0$
72	<0,01	0,68	1,88	1,0	$\geq 2,0$
96	<0,01	0,15	1,48	0,477	1,98

Согласно пробит-анализу кривых летальности (рис. 4) медианная концентрация препарата по результатам 96-часовых опытов составляет  $0,0004 \pm 0,0011$  мл/л (максимальное значение может достигать 0,0039 мл/л). Концентрацию 0,000001 мл/л можно отнести к витальной, не вызывающей нарушения жизнедеятельности *Daphnia magna* на протяжении опыта.

В табл. 2 приведены значения витальных, летальных и медианных концентраций биологического препарата «Фитоверм» для молодежи *Daphnia magna*.

Отмечено, что  $LC_{50}$  препарата самая высокая через 24 часа экспозиции, при таких концентрациях особи находились на дне сосудов в сильно угнетенном состоянии. С удлинением длительности воздействия токсического фактора  $LC_{100}$  и  $LC_{50}$  значительно снижались.

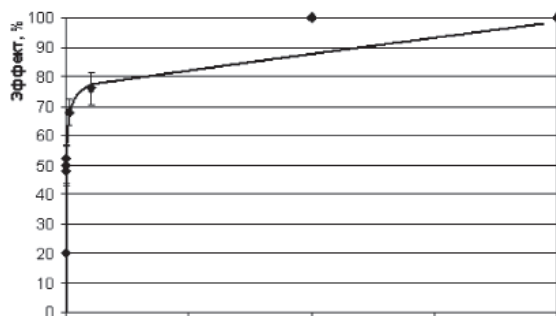


Рис. 3. Зависимость параметра гибели особей *Daphnia magna* от концентрации препарата «Фитоверм»

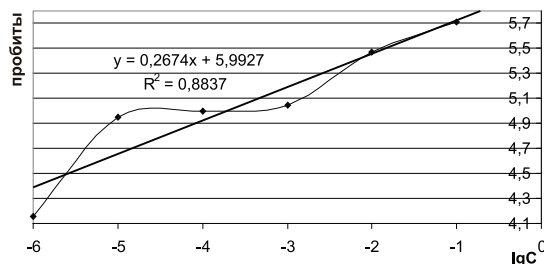


Рис. 4. Зависимость «пробит эффекта – логарифм концентрации» п.ф. пестицида «Фитоверм» для *Daphnia magna* в остром опыте, уровень значимости 0,05

Таблица 2

Показатели острой токсичности препарата «Фитоверм» для молоди *Daphnia magna*, мл/л

Экспозиция, часы	LC <sub>0</sub>	LC <sub>16</sub>	LC <sub>84</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>100</sub>
24	< 0,00001	> 10 <sup>-5</sup>	1,6	1,25	≥ 2,0
48	< 0,00001	> 10 <sup>-6</sup>	0,8	0,25	≥ 1,0
72	< 0,00001	> 10 <sup>-7</sup>	0,25	0,001	≥ 1,0
96	< 0,00001	2,74·10 <sup>-7</sup>	0,056	0,0004	0,084

Исследования биологического препарата «Фитоспорин-М» показали, что он является менее токсичным для *Daphnia magna* по сравнению с пиретроидной группой. При рабочей концентрации 3 г/л наблюдалась 100%-я иммобилизация особей по истечении 96 часов в 5 опытах. При концентрации 2 г/л изредка отмечалось судорожное подергивание антенн и кауды, во всех 5 повторностях смертность не достигала 100%. Начиная от концентрации 1 г/л, острый токсический эффект отсутствовал.

На рис. 5 представлена кумулята гибели *Daphnia magna* при разной концентрации

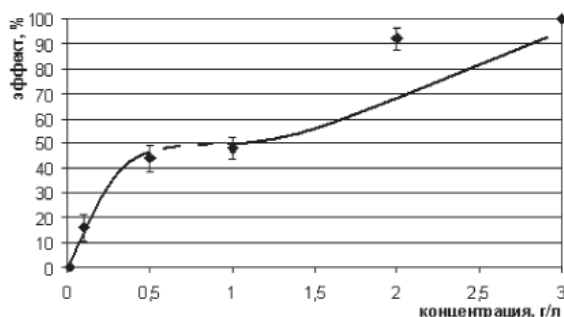


Рис. 5. Зависимость параметра гибели особей *Daphnia magna* от концентрации препарата «Фитоспорин-М»

биопрепарата «Фитоспорин-М» по истечении острых 96-часовых опытов.

Согласно пробит-анализу кривых летальности (рис. 6), медианная концентрация препарата по результатам 96-часовых опытов составляет  $0,531 \pm 0,217$  г/л (диапазон колебаний от 0,128 до 1,163 г/л). Концентрация 0,01 г/л не вызывает каких-либо нарушений жизнедеятельности *Daphnia magna* на протяжении опыта и является витальной.

В табл. 3 приведены значения витальных, летальных и медианных концентраций биологического препарата «Фитоспорин-М» для молоди *Daphnia magna*.

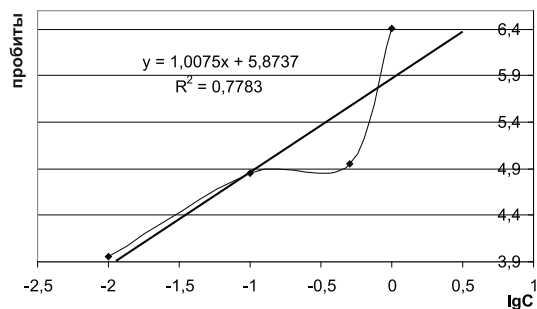


Рис. 6. Зависимость «пробит эффекта – логарифм концентрации» п.ф. пестицида «Фитоспорин-М» для *Daphnia magna* в остром опыте, уровень значимости 0,05

Таблица 3

Показатели острой токсичности биологического препарата «Фитоспорин-М» для молоди *Daphnia magna*

Экспозиция, часы	LC <sub>0</sub>	LC <sub>16</sub>	LC <sub>84</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>100</sub>
24	< 0,01	1,0	3,4	3,0	≥ 3,50
48	< 0,01	0,7	2,85	2,5	≥ 3,0
72	< 0,01	0,5	2,2	1,15	≥ 2,75
96	< 0,01	0,15	1,84	0,531	2,50

Анализ зависимости «концентрация – эффект» показал наличие на всех графиках участков замедления роста функции, указанные пунктирной линией. В данном случае, имея градацию концентраций, различающихся на несколько порядков, можно сделать вывод о наличии кумулятивного эффекта, который впоследствии служит предпосылкой нарушения физиологических процессов.

Для сравнительной эколого-токсикологической характеристики исследуемых пестицидов графическим методом определены безразмерные показатели средней летальной кратности разбавления (ЛКР<sub>50-96</sub>) и безвредной кратности разбавления (БКР<sub>10-96</sub>). Данные значения указывают, во сколько раз разбавлен исследуемый раствор пестицида, способный вызвать гибель 50 или 10% тест-объекта соответственно. Данные представлены в сводной табл. 4.

Таблица 4

Показатели ЛКР<sub>50-96</sub> и БКР<sub>10-96</sub> для исследуемых пестицидов

Наименование препарата	ЛКР <sub>50-96</sub>	БКР <sub>10-96</sub>
«Лепидоцид»	6,28	19,63
«Фитоверм»	0,5·10 <sup>4</sup>	0,72·10 <sup>6</sup>
«Фитоспорин-М»	5,64	19,50

По безразмерным величинам разбавления ЛКР<sub>50-96</sub> и БКР<sub>10-96</sub> можно сделать вывод о степени токсичности исследуемых пестицидов, используя следующую схему (от менее токсичного к более): «Фитоспорин-М» < «Лепидоцид» < «Фитоверм».

Приведенные токсикометрические показатели свидетельствуют о том, что *Daphnia magna* обладает невысокой устойчивостью к биологическому препарату «Фитоверм». Тест-объект оказался более устойчив к микробиологическим препара-

там «Фитоспорин-М» на основе *Bacillus subtilis* и «Лепидоцид» на основе *Bacillus thuringiensis*.

Анализ полученных материалов позволяет провести градацию по степени устойчивости *Daphnia magna* к исследованным пестицидам (по показателю LC<sub>100</sub>, диапазон – от экспериментально установленной до рекомендуемой рабочей концентрации), представленной следующей схемой: «Фитоверм» (≥ 2,0–0,8 мл/л) → «Лепидоцид» (≥ 3,0–1,98 г/л) → «Фитоспорин-М» (≥ 3,5–2,5 г/л). Полученные данные свидетельствуют о недопустимости применения рекомендуемых производителем концентраций препаративных форм пестицида «Фитоверм» вблизи расположения водных экосистем.

#### Список литературы

1. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* и других ветвистоусых ракообразных // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т.36, № 5. – С. 50–70.
2. Лунев М.И. Мониторинг пестицидов в окружающей среде и продукции: эколого-токсикологические и аналитические аспекты // Российский химический журнал. – 2005. – Т. XLIX, №3. – С. 64–70.
3. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИА НИА-ПРИРОДА, 2002. – 60 с.

#### Рецензенты:

Красноперова Ю.Ю., д.б.н., профессор, и.о. зав. кафедрой ботаники ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск;

Васильев Д.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 19.07.2011.