

УДК 574.64

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ЧАСТОТЫ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ *DAPHNIA MAGNA* ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕСТИЦИДОВ

Кулагина К.В.

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

Проведено исследование зависимости частоты сердечных сокращений модельного тест-объекта водной токсикологии *Daphnia magna* от концентрации современных микробиологических пестицидов. Обнаруженная зависимость позволяет расчетным способом определять характер биоцидного действия пестицидов препаративной формы на сердечную деятельность, что может быть использовано для создания автоматизированной тест-системы контроля качества воды, основанной на оптическом методе регистрации частоты биоритмов водных организмов.

**Ключевые слова:** частота сердечных сокращений, микробиологические пестициды, *Daphnia magna*

**Введение.** Методология определения токсикометрических характеристик пестицидов длительна по времени и представляет собой трудоемкий процесс [3, 4]. В связи с этим актуальным становится совершенствование существующих на сегодняшний день биотестовых методов до методов измерительного уровня, используя при этом в качестве чувствительных элементов биологические объекты [6]. Данная система применима для оценки биологической активности и токсичности пестицидов. Ключевая роль при этом отводится поиску оптимального физиологического параметра тест-объекта, который позволял бы в короткие сроки прогнозировать воздействие химических веществ на живые организмы [1, 2]. В связи с этим целью исследования явилось обоснование выбора биопараметра частоты сердечных сокращений как наиболее оптимального и показательного для оценки действия химических веществ с помощью классического объекта водной токсикологии *Daphnia magna*.

### Материалы и методы

Исследование проводилось по модифицированной методике, предложенной А.Д. Усановым [5]. Данная методика пред-

назначена для определения частоты сердцебиения *Daphnia magna* в условиях токсического воздействия пестицидов и установления зависимости данного физиологического параметра тест-объекта от концентрации токсикантов. Исследования проводились на молоди, полученной от одной самки на модифицированной экспериментальной установке (рис. 1).

Программная часть системы содержит специализированную программу Windows Movie Maker, позволяющую анализировать введенное в компьютер видеоизображение колеблющегося сердца *Daphnia magna* и осуществляющую автоматический подсчет частоты сердцебиений *Daphnia magna*.

Эксперимент проводили на свежеприготовленных растворах пестицидов различной концентрации – от летальной до витальной. Особей переносили пипеткой в каплю воды в специальную камеру, зафиксированную на предметном стекле. Оценка результатов эксперимента по влиянию растворов исследуемых веществ различной концентрации на сердечный ритм *Daphnia magna* проводилась на основании средних величин из 5 параллельных опытов и контролей, рассчитанных на 10 особей. Продолжительность подсчета средних

показателей осуществлялась в экспозиции 10 минут каждые 6–12 часов в течение 2 суток.

Исследуемые пестициды являются микробиологическими препаратами для защиты растений: «Фитоспорин-М» (д.в. являются живые клетки и споры природной бактериальной культуры *Bacillus*

*subtilis*.); «Фитоверм» (0,2 %-й эмульгирующийся концентрат аверсектина, продуцируемого почвенными микроорганизмами *Streptomyces avermectilis*); «Лепидоцид» (действующей основой является кристаллообразующая бактерия *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, активным ингредиентом – споро-кристаллический комплекс).

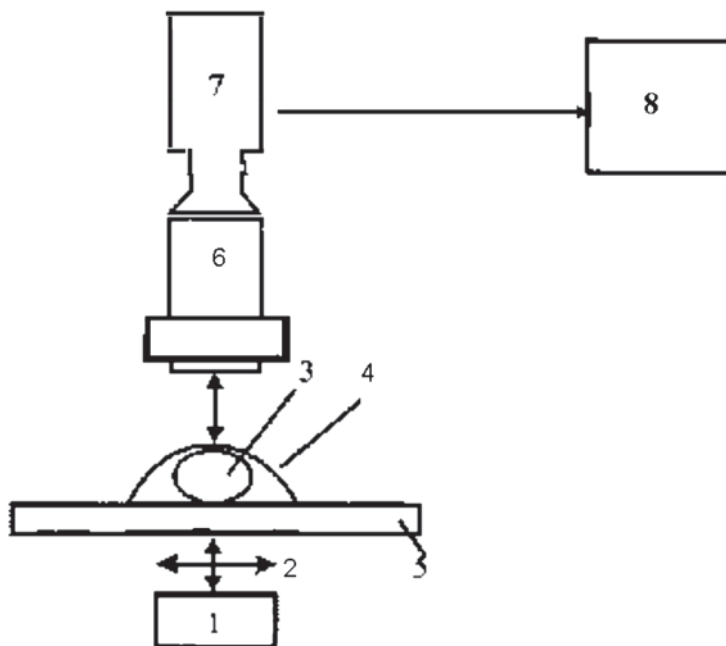


Рис. 1. Схема установки:

1 – источник света; 2 – линза; 3 – особь *Daphnia magna*; 4 – камера для *Daphnia magna*; 5 – стол; 6 – объектив микроскопа; 7 – видеоокуляр; 8 – компьютер

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты определения влияния микробиологического пестицида «Лепидоцид» на сердцебиение *Daphnia magna* представлены на рис. 2. Эксперимент показал, что при помещении особей *Daphnia magna* в растворы исследуемого пестицида летальных концентраций частота сердцебиений в начальный период экспозиции составляла в среднем  $290,0 \pm 1,6 - 262,3 \pm 1,8$  ударов в минуту и таким образом была достоверно выше контроля на 19,12–31,95 %. Виталь-

ные концентрации вызывали незначительное повышение частоты, а через некоторое время адаптации к токсиканту практически не отличались от контрольных значений.

Процесс угнетения сердечной деятельности *Daphnia magna* под действием токсичных растворов пестицидов изучен с построением математических моделей криволинейной зависимости, описанной аналитически соответствующими корреляционными уравнениями, частоты сердцебиений от концентрации исследуемых препаратов.

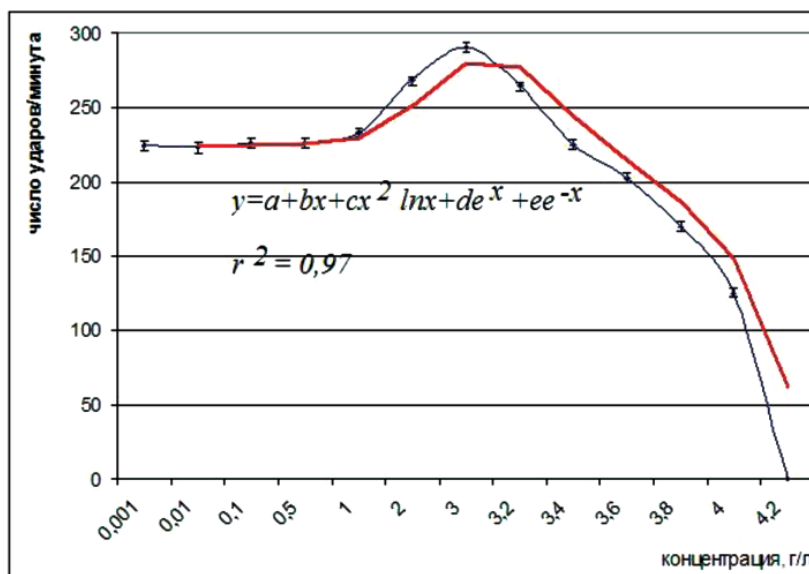


Рис. 2. Зависимость распределения частоты сердечных сокращений *Daphnia magna* от концентрации микробиологического пестицида «Лепидоцид»

Аппроксимируя экспериментальные средние данные изменения частоты сердечбиения во времени в условиях влияния ле-

тальных концентраций препарата «Лепидоцид», получена зависимость, представленная следующим образом:

$$y = a + bx + cx^2 \ln x + de^x + ee^{-x},$$

где  $a = 190,61$ ,  $b = 59,84$ ,  $c = 14,78$ ,  $d = -12,05$ ,  $e = 45,83$ ;  $r^2 = 0,97$ ,  $F_{st} = 92,64$ .

ческого процесса – глубокое угнетение жизнедеятельности особей (сердечной функции и дыхания). В данном случае это локальный экстремум аппроксимирующей функции, приравненный к нулю:

При достижении *Daphnia magna* максимального значения частоты сердечных сокращений начинается IV фаза токсикологи-

$$\frac{dy}{dx} = b + 2cx \cdot \ln x + cx + de^x - ee^{-x} = 0.$$

С этого момента наступает необратимая фаза патологии жизнедеятельности особей *Daphnia magna*, которая четко прослеживается на графике линейной зависимости частоты сердечбиений от времени экспозиции в летальных концентрациях исследуемых пестицидов.

Характер изменения средних частот сердечбиений *Daphnia magna* в течение 6-часовой экспозиции «Фитоверма» представлен на рис. 4.

При экспозиции *Daphnia magna* в растворах летальных концентраций микробиологического препарата «Фитоверм» отмечено, что частота сердечбиений особей достоверно превышает контрольные показатели на 32,0–48,0 %. В диапазоне concentra-

ций 0,0001–0,000001 мл/л экспериментальные показатели на всем протяжении опыта незначительно отличались от контрольных. Снижение показателей наблюдалось уже через 3–4 часа и составляло 76,5–85,8 % от исходных.

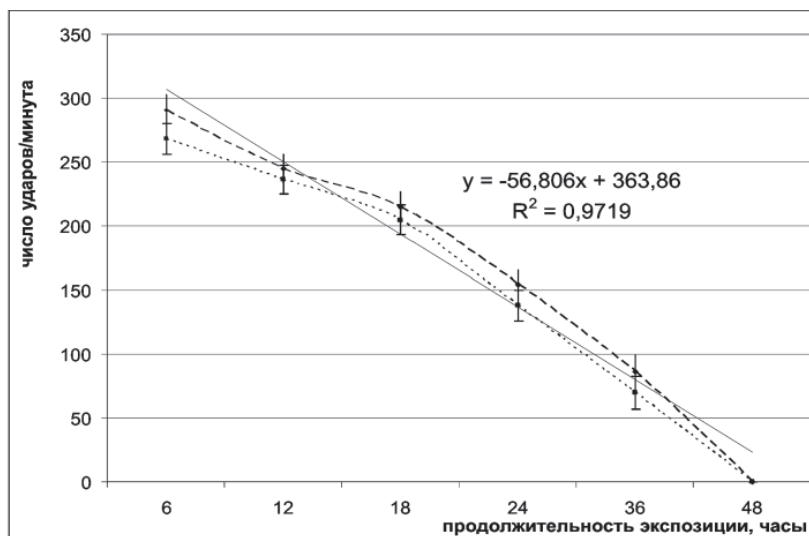


Рис. 3. Влияние летальных концентраций биологического препарата «Лепидоцид» на сердечную функцию *Daphnia magna* во времени (48 часов)

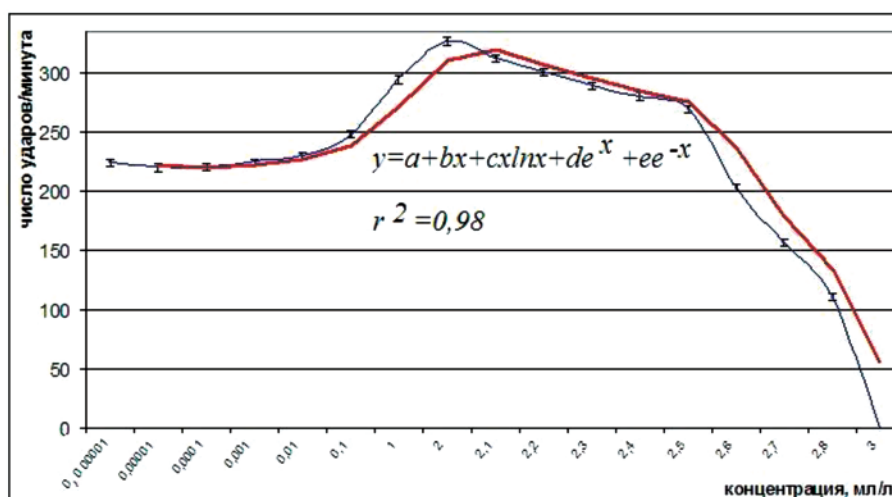


Рис. 4. Зависимость распределения частоты сердечных сокращений *Daphnia magna* от концентрации биологического пестицида «Фитоверм»

Аппроксимируя экспериментальные данные средних частот сердцебиения *Daphnia magna* во времени под влия-

нием летальных концентраций препарата «Фитоверм», получена следующая зависимость:

$$y = a + bx + cx \ln x + de^x + ee^{-x},$$

где  $a = -787,09$ ,  $b = 828,06$ ,  $c = -219,82$ ,  $d = -51,26$ ,  $e = 1060,49$ ;  $r^2 = 0,98$ ,  $F_{st} = 250,8$ .

Максимальное значение частоты сердечных сокращений *Daphnia*

*magna* в экспозиции пестицида «Фитоверм» определяется следующим образом:

$$\frac{dy}{dx} = b + c + cx \cdot \ln x + de^x - ee^{-x} = 0.$$

На рис. 5 представлена линейная зависимость частоты сердцебиений от времени экспозиции в летальных концентрациях биологического пестицида «Фитоверм».

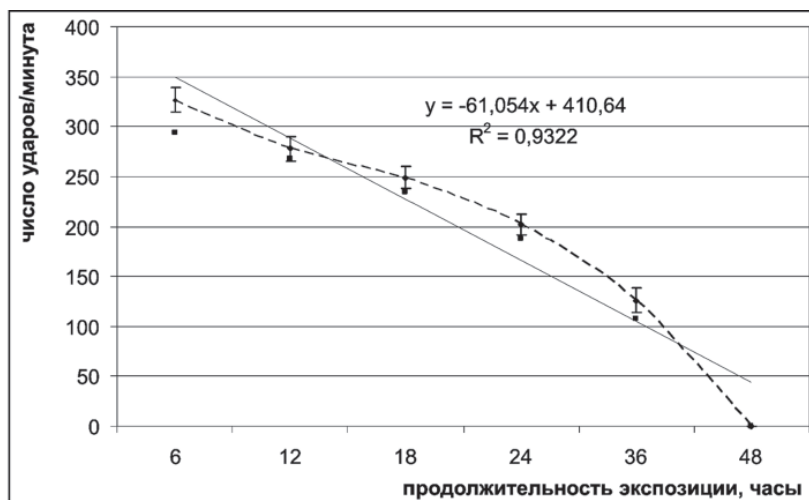


Рис. 5. Влияние летальных концентраций микробиологического препарата «Фитоверм» на сердечную функцию *Daphnia magna* во времени (48 часов)

Анализ результатов сердцебиений *Daphnia magna* под влиянием биопрепарата «Фитоспорин-М» представлен на рис. 6. При помещении особей в растворы летальных концентраций исследуемого пестицида частота сердцебиений в начальный период экспозиции составляла в среднем

$280,54 \pm 1,5 - 252,3 \pm 1,7$  ударов в минуту и таким образом была достоверно выше контроля на 14,26–27,05 %. Витальные концентрации препарата вызывали незначительное повышение частоты, а через 6 часов экспозиции практически не отличались от контрольных показаний.

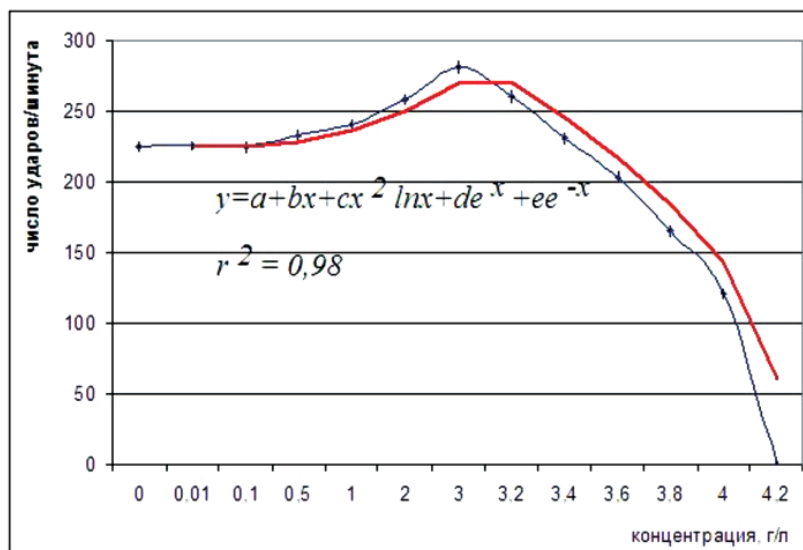


Рис. 6. Зависимость распределения частоты сердечных сокращений *Daphnia magna* от концентрации биологического пестицида «Фитоспорин-М»

Аппроксимация экспериментальных данных усредненных частот сердцебиения во времени в условиях влияния летальных концентраций препарата «Фитоспорин-М» позволила получить аналогичную зависимость:

$$y = a + bx + cx^2 \ln x + de^x + ee^{-x},$$

где  $a = 286,14$ ,  $b = 7,97$ ,  $c = 24,6$ ,  $d = -13,97$ ;  $r^2 = 0,98$ ,  $F_{st} = 157,36$ .

Максимальное значение частоты сердечных сокращений *Daphnia magna*, указы-

вающее на необратимые функциональные изменения в организме тест-объекта, в условиях влияния пестицида «Фитоспорин-М», определяется следующим образом:

$$\frac{dy}{dx} = b + 2cx \cdot \ln x + cx + de^x - ee^{-x} = 0.$$

На рис. 7 представлена линейная зависимость частоты сердцебиений от времени экс-

позиции в летальных концентрациях биологического пестицида «Фитоспорин-М».

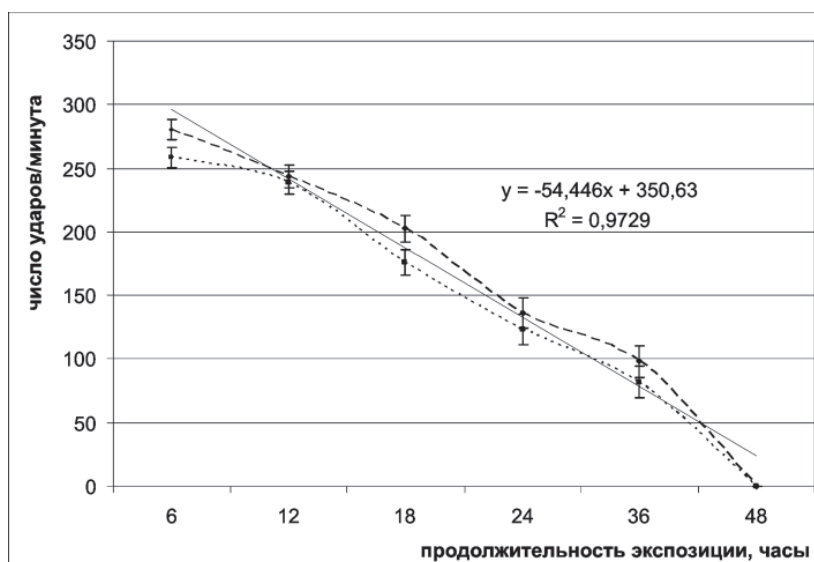


Рис. 7. Влияние летальных концентраций биологического препарата «Фитоспорин-М» на сердечную функцию *Daphnia magna* во времени (48 часов)

**Выводы.** Установлено, что зависимость частоты сердечных сокращений *Daphnia magna* от концентраций исследованных препаратов имеет вид кривой, описываемой функциями типа  $y = a + bx + cx^2 \ln x + de^x + ee^{-x}$  и  $y = a + bx^2 \ln x + cx^3 + de^{-x}$ . Витальные же концентрации незначительно изменяют характер сердцебиения на первом этапе экспозиции, возвращая значения в состояние нормы путем адаптации к токсичной среде.

Достижение максимального значения частоты сердечных сокращений *Daphnia*

*magna*, определяемое дифференциалом указанных функций, может служить маркером угнетения сердечной деятельности и, как следствие, сигналом к гибели популяции *Daphnia magna*, что можно рассматривать как возможность установления предельно допустимых концентраций смесевых веществ.

Обнаруженная зависимость позволяет расчетным способом определять характер биоцидного действия пестицидов п.ф. на сердечную деятельность *Daphnia magna*, что может быть использовано как функциональный экспресс-тест. Эта же зависимость

может быть использована для создания автоматизированной тест-системы контроля качества воды, основанной на оптическом методе регистрации частоты биоритмов водных организмов.

Использование зависимости частоты сердечных сокращений от концентрации как наиболее оптимального параметра для оценки действия пестицидов позволит правильно спланировать эксперимент, обоснованно выбирать концентрации веществ для постановки токсикологических опытов, уменьшая при этом их стоимость и сводя к минимуму вероятность ошибки ввиду использования оптического метода и новейших цифровых технологий. Аппроксимация количественных зависимостей «частота сердечных сокращений – концентрация химических веществ» может стать альтернативным методом установления предельно допустимых концентраций пестицидов препаративной формы или смесевых веществ.

#### Список литературы

1. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* S. и других ветвистоусых ракообразных // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т.36, №5. – С. 50–70.
2. Козлов А.Т, Тушманова Н.А. Структура и механизмы поведения беспозвоночных. – Воронеж: Квадрат, 1995. – 280 с.
3. Колупаев Б.И., Андреев А.А., Самойленко Ю.А. Оптический метод регистрации сердечного ритма у дафний // Гидробиологический журнал. – 1977. – 13, №3. – С. 93–94
4. Частота сердечных сокращений у *Daphnia magna* как функциональный тест оценки действия химических соединений / Н.П. Подосиновикова, Н.Ф. Ежов, Н.А. Сайкина, В.А. Беляев, В.Б. Долго-Сабуров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 73, № 3. – С. 54–56.
5. Усанов А.Д. Исследование влияния переменного магнитного и электрического полей на живые организмы и водную среду с использованием дафнии в качестве биоиндикатора: дис. ... канд. физ.-мат. наук. – Саратов, 2004. – 103 л.
6. Cairns J.Jr. Restoration Ecology and Ecotoxicology // Handbook of Ecotoxicology / J.Jr. Cairns. – N.Y.: Levis publishers Ltd, 2005. – P. 1015–1029.

#### Рецензенты:

Благовещенская Нина Васильевна, д.б.н., доцент, директор Ульяновского областного детского экологического центра;

Назаренко Людмила Дмитриевна, д.п.н., профессор, зав. кафедрой анатомии, физиологии и гигиены человека Ульяновского государственного педагогического университета им. И.Н. Ульянова.

## THE DEPENDENCE OF HEART RATE *DAPHNIA MAGNA* TO THE CONCENTRATION OF PESTICIDES

**Kulagina K.V.**

*Ulyanovsk state university, Ulyanovsk,*

*e-mail: puankarel@yandex.ru*

The research of the dependence of heart rate of modeling test-object of aqua toxicology *Daphnia magna* to concentrations of modern microbiological pesticides. Found dependence allows to define the nature of biocidal action of preparative form pesticides to cardiac activity by calculated method that could be used to creature of automated test-system of quality of water based on the optical method of registration of biorhythm water organisms rate.

**Keywords:** heart rate, microbiological pesticides, *Daphnia magna*