

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДИК ОЧИЩЕНИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ ДЛЯ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА EISENIA FETIDA (SAVIGNY, 1826)

Резниченко И.С.

*ГОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет»,
Омск, e-mail: science_siberia@mail.ru*

Проведен анализ методов очищения пищеварительной системы дождевых червей посредством выдерживания люмбрицид на различных субстратах, таких как агар с концентрацией 2, 3, 4, 5 г/л, измельченной и увлажненной фильтровальной бумаге. Данные методы основаны на замещении остаточных включений на используемый субстрат. Также использовался метод сатурированной фильтровальной бумаги, основанный на естественном процессе очищения кишечника без поступления новых порций субстрата. В конце эксперимента особи вскрывались и велся количественный учет остаточных частиц в желудочно-кишечном тракте. Лучшие результаты по наименьшему содержанию остаточных частиц показали опыты с использованием агара с концентрацией от 3 до 4 г/л в качестве субстрата и метод сатурированной фильтровальной бумаги. При увеличении концентрации агара увеличивается вязкость субстрата, из-за чего перемещение люмбрицид, а соответственно поглощение и замещение субстрата на остаточные частицы уменьшается, при этом при уменьшении концентрации наблюдается гибель люмбрицид на субстрате, что приводит к невозможности завершения эксперимента. Использование метода сатурированной фильтровальной бумаги в серии опытов показало отличный результат по остаточному содержанию частиц в пищеварительном тракте люмбрицид, но неудовлетворительный по общему состоянию животных и может быть рекомендован в тех случаях, когда требуется предварительное обезвоживание образцов. В серии опытов на увлажненной смеси фильтровальной бумаги результат оказался средним, при этом наилучшим по выживаемости и общей активности люмбрицид и может быть применим для специфических исследований, где требуется долгое выдерживание животных на субстрате.

Ключевые слова: метод, люмбрициды, субстрат, экотоксикология, агар

COMPARATIVE ANALYSIS OF TECHNIQUES CLEANSING DIGESTIVE TRACT EARTHWORMS FOR AN EXAMPLE ECOTOXICOLOGICAL STUDIES EISENIA FETIDA (SAVIGNY, 1826)

Reznichenko I.S.

Omsk State Pedagogical University, Omsk, e-mail: science_siberia@mail.ru

We have done the analysis of the methods of cleansing of the earthworms digestive system by maturing lumbritsid on various substrates such as agar concentration of 2, 3, 4, 5 g/l and moistened saturated filter paper. These methods are based on the substitution of the residual impurities in the usable substrate. The method of saturated filter paper based on the natural process of the bowel cleansing without the infusion of new substrate portions was applied either. At the end of the test specimens dissected and was conducted quantitative calculation of residual particles in the gastrointestinal tract. The best results that indicate the least content of residual particles were shown in the experiments with using of the agar concentration of 3 to 4 g/L as the substrate and the method of saturated filter paper. When the concentration of the agar increases the substrate viscosity increases causing of displacement the lumbritsid, and therefore the absorption and replacement of the substrate on the residual particles decreases, while the reduction in concentration the deaths of lumbritsid on the substrate is observed, that makes it impossible to complete the experiment. The use of saturated filter paper in a series of experiments demonstrated excellent results of the residual particles content in the digestive tract of lumbritsid, but this method is insufficient in the general status of animals and can be recommended for experiments with preliminary dehydration of the samples. In the series of experiments with use of the moistened filter paper the result of the number of residual impurities was average but the best in the survival and total activity of lumbritsid and can be applied for the specific methods, which require a long exposure of the animals on the substrate.

Keywords: method, lumbricids, ecotoxicology, substrate, agar

Биотестирование является одним из важных методов выявления чистоты среды обитания организмов. Для биотестирования почвенных образцов чаще всего применяют олигохет и различных насекомых. Тесты с использованием живых организмов проводят для определения интегральной токсичности почвы с целью проверки соответствия качества почвы нормативным требованиям [1]. На реакции люмбрицид к токсикантам основаны следующие тесты, закрепленные в стандартах ISO: тест

на острую токсичность (acutetoxicity), репродуктивный тест (reproduction), тест на биомассу (biomass) [2, 3, 4]. Любая пробоподготовка является очень важным этапом в биотестировании, особенно при качественном и количественном анализе на накопленные в тканях организмов вещества, чаще всего ионы тяжелых металлов. Именно от пробоподготовки зависит точность и воспроизводимость результатов в серии опытов. При использовании дождевых червей в качестве биотестов для определения

накопленных в их тканях веществ многие исследователи сталкиваются с проблемой очищения желудочно-кишечного тракта дождевых червей, т.к. его содержимое (капролиты) вносит дополнительные, а часто и значимые изменения концентрации измеряемых веществ. К тому же не существует единой стандартизированной методики очищения желудочно-кишечного тракта люмбрицид, которая бы подходила под выполнение наибольшего числа критериев для выполнения задач, стоящих перед исследователем.

Исходя из этого, целью данного исследования является сравнительный анализ наиболее употребительных методов очищения пищеварительного тракта дождевых червей с использованием *Eisenia fetida* (Savigny, 1826).

Материал и методы исследования

Материалом для настоящего исследования послужили дождевые черви *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), на которых проверялась эффективность нижеприведенных методов. Наиболее употребительными являются методы очистки кишечника, приведенные в методическом руководстве по исследованию структуры, функционированию и разнообразию детритных пищевых сетей под редакцией А.Д. Покаржевского, К.Б. Гонгальского и А.С. Зайцева [5]. В ходе эксперимента были использованы следующие методы.

1. Метод сатурированной фильтровальной бумаги.

В чашки Петри закладывается фильтровальная бумага, которая пропитывается водой до полного насыщения. Избыток воды удаляется. Животное помещается в чашки Петри. Дождевых червей перед посадкой споласкивают в воде. Выдерживаются животные в течение 2–3 дней при температуре 16–20 °С. Далби (Dalbi et al., 1996) отмечает, что выдерживание животных на субстрате в течении трех суток достаточно для полного освобождения кишечника дождевых червей [7].

2. Метод эвакуации содержимого желудка дождевых червей с помощью агар-агара (по Pokarzhevskii et al., 2000) [9].

Отвешивается 2 г агар-агара и заливается 200 мл воды. Емкость со смесью ставится в микроволновую печь на среднюю мощность на 2 мин. Расплавленный агар заливается в чашки Петри или пластиковые стаканы, после отверждения на поверхности агара проделываются отверстия ножом или препаровальной иглой. Помещаются черви и выдерживаются при температуре 20 °С в течении 4 суток. Покржевский [9] отмечает, что оптимальной средой является 1 % агар. Меньшая концентрация ведет иногда к гибели животных. На 4 сутки копролиты червей практически полностью состоят из агара. На 1 % агаре можно выдерживать и других животных для эвакуации содержимого кишечника. При этом агар не протыкают иглой или ножом. Для данной серии опытов использовалась смесь полисахаридов агарозы и агаропектина – микробиологический агар-агар с разной концентрацией, в расчете 2, 3, 4, 5 г сухого вещества на 1 л дистиллированной воды. Использование меньших концентраций агара считаем нецелесообразным, т.к. не происходит процесса затвердевания приготовлен-

ной массы (зависит от качества используемого сухого вещества).

3. Метод эвакуации содержимого желудка дождевых червей с помощью измельченной целлюлозы.

Метод разработан нами. Измельченная фильтровальная бумага помещается в чашки Петри, увлажняется до образования густой кашеобразной массы без образования свободной воды на дне чашки, далее в чашки помещаются исследуемые животные. После чего емкость покрывается х/б тканью, которая фиксируется резинками во избежание выползания люмбрицид. Выдерживается при температуре 20 °С в течении 4 суток.

Поскольку люмбрициды обладают отрицательным фототаксисом [6], чашки Петри с животными выдерживались в темном месте. В основе последних двух методов лежит замещение содержимого пищеварительного тракта на химически чистый субстрат. Принципиально отличается от них метод сатурированной фильтровальной бумаги, который заключается в «сухой» эвакуации содержимого пищеварительной системы люмбрицид, основанной на том, что в организм люмбрицид не поступают новые порции субстрата при продолжении естественного процесса опорожнения кишечника особей. Метод со вскрытием и ручной очисткой пищеварительного тракта червей не рассматривался, т.к. это довольно трудоемкий процесс, к тому же при дифференциальном исследовании тканей их можно повредить. Для экспериментов был выбран вид дождевых червей *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), который является наиболее подходящим и часто используемым видом в лабораторных условиях [8]. Перед закладкой эксперимента люмбрициды выдерживались 3 суток на типичном для них субстрате, тем самым создавались стандартные условия по содержанию включений в желудочно-кишечном тракте организмов для всех повторностей. Каждая серия опытов состояла из 5 повторностей, в каждую емкость помещалось по 5 половозрелых особей. Контролем послужили экспериментальные данные по содержанию остаточных включений в пищеварительной системе 50 особей *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), которые не использовались в методиках очистки, а непосредственно вскрывались после выдерживания на типичном субстрате. Всего в ходе эксперимента использовалось 150 особей. Ежедневно емкости осматривались с целью удаления погибших особей. По истечению 4-х суток каждая особь вынималась из контейнера, проводилась фиксация с последующим вскрытием пищеварительного тракта люмбрицид и количественно учитывалось наличие остаточных включений в кишечнике. В данном исследовании остаточными включениями считались комки субстрата размером 1–3 мм. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программного обеспечения Statistica 6.

Результаты исследования и их обсуждение

На контроле содержание частиц составляет $26 \pm 8,3$ ед. ($P < 0,05$). Содержание частиц на субстрате с использованием агара с концентрацией сухого вещества от 3 до 4 г на литр однородно и составляет от $1,2 \pm 0,5$ до $1,3 \pm 0,5$ ед. При увеличении концентрации агара до 5 г/л наблюдается увеличение количества остаточных

частиц в полости люмбрицид до $3,9 \pm 1,2$ ($P < 0,05$) единиц, что может быть связано с повышением густоты полученной смеси и затруднением перемещения червей во всем объеме субстрата. На измельченной и увлажненной фильтровальной бумаге показатель составил $2,3 \pm 1,1$ ед. ($P < 0,05$). Содержание остаточных включений является стабильным, но недостаточно удовлетворительным по количеству включений, к тому же необходимо уделить большее

внимание чистоте субстрата. На насыщенно-фильтровальной бумаге содержание остаточных частиц равно $1,2 \pm 0,2$ ед. ($P < 0,05$). Содержание остаточных частиц практически не различалось в эксперименте на насыщенно-фильтровальной бумаге и на среде с концентрациями агара 3 и 4 г/л.

Результаты по содержанию включений в пищеварительной системе *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) представлены на рис. 1.

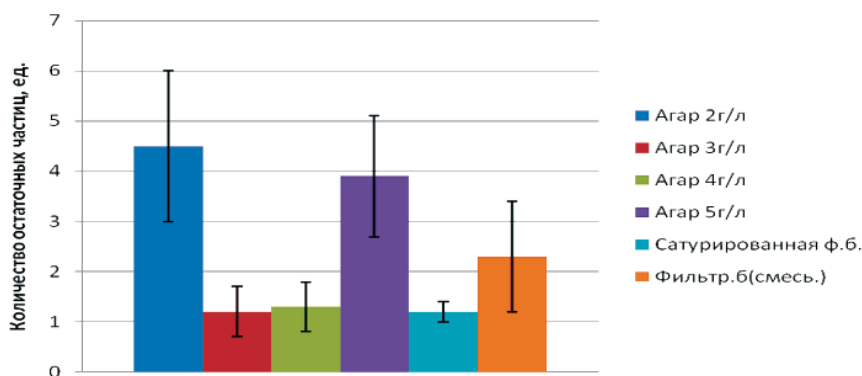


Рис. 1. Содержание включений в пищеварительной системе *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)(ед.)

Также важным показателем при оценке методик подобного рода является выживаемость люмбрицид на субстрате (рис. 2).

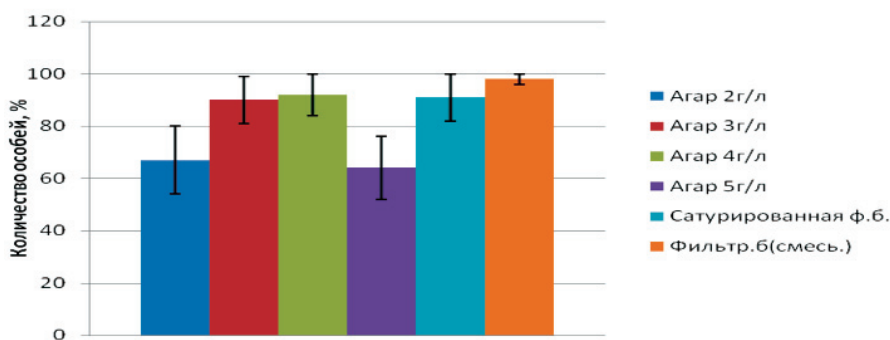


Рис. 2. Выживаемость *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)(%)

На агаре с концентрацией 2 г/л выживаемость люмбрицид составляла $67 \pm 13\%$ ($P < 0,05$). Из-за жидкого состояния агара субстрат проходил через желудочно-кишечный тракт неравномерно, местами задерживая большое количество остаточных частиц. При концентрации агара 3–4 г/л наблюдалась хорошая выживаемость люмбрицид и составляла $90 \pm 9\%$ и $92 \pm 8\%$ ($P < 0,05$) соответственно. При увеличении концентрации агара до 5 г/л проникновение в субстрат становится более затруднительным, что приводит к гибели люмбрицид, особенно ослабленных токсическим действием исследуемых веществ. Процент выживаемости составляет $64 \pm 12\%$ ($P < 0,05$). Очень важным в данном случае

является конечная вязкость полученного субстрата. Необходимо обращать внимание на назначение используемого сухого вещества (типа агара-агара). Для достижения наилучших результатов по минимизации содержания частиц в пищеварительной системе дождевых червей с последующим анализом на тяжелые металлы лучше всего использовать микробиологический агар. Если пробоподготовка не требует химической чистоты, то можно использовать пищевой агар и т.п. Также важны условия хранения и фирма-производитель вещества. Таким образом, при приготовлении субстрата концентрацию сухого вещества можно менять, добиваясь такого состояния субстрата, чтобы люмбрициды могли с лег-

костью передвигаться в его толще. На сатурированной фильтровальной бумаге выживаемость люмбрицид является отличной и составляет $91 \pm 9\%$ ($P < 0,05$), но к концу эксперимента дождевые черви выглядят очень ослабленными с низкой двигательной активностью. В данном методе главным является оптимальное увлажнение, во избежание обезвоживания животных. Метод с использованием увлажненной целлюлозы оказался самым наилучшим по выживаемости люмбрицид $98 \pm 2\%$ ($P < 0,01$). К концу эксперимента визуально дождевые черви проявляли высокую двигательную активность, были обнаружены 2 кокона, что свидетельствует о наиболее соответствующем физиологическим требованиям червей субстрате. В ситуациях, когда требуется долгая выдержка люмбрицид на чистом субстрате, этот метод наиболее приемлем.

Заключение

1. Лучшие результаты при исследованиях на содержание остаточных частиц в пищеварительном тракте *Eisenia fetida* получены в опытах с использованием агара с концентрацией от 3–4 г/л и методом сатурированной фильтровальной бумаги в качестве субстрата.

2. При увеличении концентрации агара с 5 г/л увеличивается вязкость субстрата, из-за чего перемещение люмбрицид, а соответственно поглощение и замещение субстрата на остаточные частицы снижается, при этом при уменьшении концентрации агара наблюдается гибель люмбрицид на субстрате, что приводит к невозможности завершения эксперимента.

3. Использование сатурированной фильтровальной бумаги показало отличный результат по остаточному содержанию частиц в пищеварительном тракте люмбрицид, но неудовлетворительный по общему состоянию животных и может быть рекомендовано в тех случаях, когда требуется предварительное обезвоживание образцов.

4. В серии опытов на увлажненной смеси фильтровальной бумаги результат по количеству остаточных включений оказался удовлетворительным, однако наилучшим по выживаемости и общей активности люмбрицид. Этот метод может быть применим для специфических исследований, где требуется долгое выдерживание животных на субстрате.

Список литературы

1. Долгов В.А. Лавина А., Фролова И.А. Проблемы повышения информативности биотестового анализа // Проблемы санитарии, гигиены и экологии (дезинфекция, дезинсекция, дератизация): тез. докл. Межд. научной конф. – М., 1999. – С. 173–174.

2. Определение загрязнения по острой летальной токсичности у земляных червей: международный стандарт ИСО 11268-1.

3. Определение загрязнения по подавлению репродуктивности у земляных червей: международный стандарт ИСО 11268-2.

4. Определение загрязнения по острой летальной токсичности у земляных червей в полевых условиях: международный стандарт ИСО 11268-3.

5. Методы оценки структуры, функционирования и разнообразия детритных пищевых сетей. Методическое руководство / под ред. А.Д. Покаржевского, К.Б. Гонгальского, А.С. Зайцева – М.: Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 2003. – С 70–71.

6. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология в 3 томах. Т. 2; под ред. Р. Сопера. – М.: Мир, 2004. – 436 с. – С. 139.

7. Dalby P.R., Baker G.H., Smith S.E. «Filter paper method» to remove soil from earthworm intestines and to standardize the water content of earthworms // Soil Biology and Biochemistry. – 1996. – Vol. 28. – P. 685–687.

8. Lee K.E. Earthworms: Their ecology and relationships with soil and land use. Sydney etc. // Academic Press. – 1985. – P. 411.

9. Pokarzhevskii A.D., van Straalen N.M., Semenov A.M. Agar as a medium for removing soil from earthworms guts // Soil biology and Biochemistry. – 2000. – Vol. 32. – № 8–9. – P. 1315–1317.

References

1. Dolgov V.A. Lavina A., Frolova I.A. Problemy povysheniya informativnosti biotestovogo analiza // Tez. dokl. Mezhd. nauchnoj konf. «Problemy sanitarii, gigieny i jekologii (dezinfekcija, dezinspekcija, deratizacija) [The problems of informativity increase analysis of bioassays // Proc. Reports. Int. conference. «The problems of sanitation, hygiene and ecology]. M. 1999. pp. 173–174.

2. Mezhdunarodnyj standart ISO 11268-1 «Opredelenie zagraznenija po ostroj letal'noj toksichnosti u zemljanyh chervej» [International Standard ISO 11268-1 «Determination of contamination of the acute lethal toxicity to earthworms»].

3. Mezhdunarodnyj standart ISO 11268-2 «Opredelenie zagraznenija po podavleniju reproductivnosti u zemljanyh chervej» [International Standard ISO 11268-2 «Determination of contamination on the suppression of reproduction in earthworms»].

4. Mezhdunarodnyj standart ISO 11268-3 «Opredelenie zagraznenija po ostroj letal'noj toksichnosti u zemljanyh chervej v polevyh uslovijah» [International Standard ISO 11268-3 «Determination of contamination of the acute lethal toxicity to earthworms in field conditions»].

5. Metody ocenki struktury, funkcionirovanija i raznobrazija detritnyh pishhevnyh setej. Metodicheskoe rukovodstvo / pod redakciej A.D. Pokarzhevskogo, K.B. Gongal'skogo, A.S. Zajceva [Methods for assessing the structure, functioning and diversity of detrital food webs.] M.: Institut problem jekologii i jevoljucii im. A.N. Severcova RAN, M. 2003. pp. 70–71.

6. Tejlor D., Grin N., Staut U. Biologija v 3 tomah. Tom 2. Pod redakciej Sopera R. [Biology] M.: Mir, 2004. 436 p. pp. 139.

7. Dalby P.R., Baker G.H., Smith S.E. «Filter paper method» to remove soil from earthworm intestines and to standardize the water content of earthworms // Soil Biology and Biochemistry. 1996. Vol. 28. pp. 685–687.

8. Lee K.E. Earthworms: Their ecology and relationships with soil and land use. Sydney etc.: Academic Press., 1985. pp. 411.

9. Pokarzhevskii A.D., van Straalen N.M., Semenov A.M. Agar as a medium for removing soil from earthworms guts // Soil biology and Biochemistry. 2000. Vol. 32. no. 8–9. pp. 1315–1317.

Рецензенты:

Сидоров Г.Н., д.б.н., профессор кафедры биологии, ФБГОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», г. Омск;

Андреева С.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой биологии, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», г. Омск.

Работа поступила в редакцию 16.05.2013.