

УДК 574.64 + 57.084.1

А. В. Присный<sup>1</sup>, Ю. Л. Волынкин<sup>1</sup>, Н. Н. Кампос<sup>1</sup>,  
Е. В. Кичигин<sup>2</sup>

### ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *STYLONYCHIA MYTILUS* К ФЛОТОРЕАГЕНТУ РА-14

Инфузория *Stylonychia mytilus* обнаруживает повышенную чувствительность к низким (0,00005—0,001 мг/дм<sup>3</sup>) и высоким (от 0,50 мг/дм<sup>3</sup>) концентрациям аминоксодержащего флотореагента РА-14. Относительная устойчивость к средним (0,01—0,40 мг/дм<sup>3</sup>) концентрациям объясняется адаптацией к токсичным природным аминам, содержание которых в открытых водоёмах находится в тех же пределах. Полученные результаты могут служить основанием для пересмотра установленной ПДК для РА-14 (0,03 мг/дм<sup>3</sup>) и методологии расчета ПДК в целом.

**Ключевые слова:** *Stylonychia mytilus*, флотореагент РА-14, чувствительность.

Синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ) представляют собой обширную группу различных по своей структуре химических соединений. Эти вещества способны адсорбироваться на поверхностях раздела фаз и понижать вследствие этого их поверхностное натяжение.

За последнее время химическая промышленность выпустила целые серии разнообразных СПАВ, хотя до конца еще не известно, как они действуют на живые организмы и, прежде всего, на гидробионтов.

Попадая в водоемы, СПАВ оказывают значительное влияние на их физико-химическое состояние, ухудшая кислородный режим и органолептические свойства воды, и сохраняются там долгое время, так как разлагаются очень медленно [1]. Эти вещества не считаются высокотоксичными, но многие факты свидетельствуют о прямом и косвенном их воздействии на обитателей водоемов.

Некоторые СПАВ используются в горнорудном производстве в качестве флотореагентов для обогащения руды. Исследуемый флотореагент — коммерческая марка РА-14 (изодецилоксипропиламинацетат) — относится к аминоксодержащим СПАВ. Известно, что амины — большая группа природных и искусственно синтезированных соединений. Концентрация природных аминов в воде рек, водохранилищ, озер, атмосферных осадках колеблется в пределах 0,01—0,20 мг/дм<sup>3</sup> [1]. Предельно допустимая концентрация вредного вещества (ПДК), при которой в водоеме не возникают последст-

© Присный А. В., Волынкин Ю. Л., Кампос Н. Н., Кичигин Е. В., 2011

вия, снижающие его рыбохозяйственную ценность, устанавливается экспериментально по наиболее чувствительному звену трофической цепи водоема [3]. Для большинства изученных видов аминов ПДК составляет от 0,01 до 170 мг/дм<sup>3</sup>. Аминосодержащие флотореагенты, как правило, токсичнее [2—4].

Более того, токсичные, например для личинок сигов и радужной форели, растворы флотореагентов ОП-4 и моноэтаноламида (амиды карбоновых кислот) со временем значительно увеличивают свои токсические свойства [5]. Флотореагент ОИБ ИБС нарушает окислительно-восстановительные процессы в клетках крови и других тканей млекопитающих [6].

Флотореагент РА-14 отличается от других аминосодержащих СПАВ не только химическими характеристиками (не окисляется кислородом воздуха и не разлагается со временем). Его ПДК установлено на уровне 0,03 мг/дм<sup>3</sup>. В то же время сведений о влиянии данного реагента на живые объекты ни в публикациях, ни в описании коммерческой марки нет. Существующие методы определения концентрации этого флотореагента в водных объектах ориентированы на амины. Они не позволяют дифференцировать содержание в воде изучаемого флотореагента, других аминосодержащих СПАВ и природных аминов и не рассчитаны на концентрации менее 0,01 мг/дм<sup>3</sup>.

Токсичность веществ, выраженная через ПДК, не в полной мере характеризует их опасность для живых организмов. Интегральную оценку воздействия всех присутствующих в среде токсикантов, с учетом их синергизма и антагонизма, собственных превращений, дают биологические методы, в т. ч. биотестирование [7].

Наиболее часто в качестве тест-объектов используются бактерии и инфузории из-за их чувствительности к токсическим веществам разной природы. В экспериментах в испытанных концентрациях СПАВ от 0,1 до 10,0 мг/дм<sup>3</sup> в конце первых суток выживаемость составляла 61—99% у *Paramecium caudatum* и 80—100% — у *Tetrahymena pyriformis* [8]. Чувствительность этих организмов и достоверность результатов биотестирования во многом зависят от условий их культивирования и подготовки к исследованию. В стандартных биотестах на инфузориях регистрируется подвижность, гибель и скорость размножения [9].

В 2007—2009 гг. нами было предпринято изучение влияния флотореагента РА-14 на компоненты естественных гидробиоценозов, включая различные виды бактерий, водорослей, сосудистых растений и беспозвоночных животных. Серия экспериментов в 2008—2009 гг. проведена на широко распространенной и часто встречающейся в открытых природных водоемах инфузории *Stylonychia mytilus* Ehrenberg, 1838.

**Материал и методика исследований.** Исходный материал выделен из проб воды, отобранной в реках Песочной (окр. г. Железногорска, март 2008 г.), Оскол (старица) (окр. с. Приосколье, апрель 2008 г.) и Везелке (г. Белгород, май 2008 г.). Смешанную культуру инфузорий содержали в чашках Петри в среде Лозина-Лозинского при периодической подкормке

сухими пекарскими дрожжами. Пересев культуры производили ежемесячно.

Опыты проводили при температуре 18—20°C. Каплю культуры после подсчета живых инфузорий смешивали с каплей раствора флотореагента. Состояние инфузорий регистрировали через 30, 60, 90, 120 и 180 мин. Отмечали изменения в количестве живых особей, их подвижности, форме тела. Растворы флотореагента требуемой концентрации готовили его последовательным разбавлением и обновляли через 3 мес.

Всего в опытах использованы инфузории стилонихии в количестве 912 ос., в том числе: контроль — восемь повторностей, 101 ос.; концентрация флотореагента 0,00001 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 13 ос.; 0,00005 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 83 ос.; 0,0001 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 96 ос.; 0,0005 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 83 ос.; 0,001 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 121 ос.; 0,003 мг/дм<sup>3</sup> — шесть повторностей, 88 ос.; 0,01 мг/дм<sup>3</sup> — шесть повторностей, 99 ос.; 0,04 мг/дм<sup>3</sup> — шесть повторностей, 88 ос.; 0,2 мг/дм<sup>3</sup> — четыре повторности, 62 ос.; 0,4 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 17 ос.; 0,5 мг/дм<sup>3</sup> — две повторности, 46 ос.; 1,0 мг/дм<sup>3</sup> — три повторности, 17 ос.

При обработке результатов использовали метод сравнения выборочных долей вариант и  $X$ -критерий Ван-дер-Вардена, критерии сравнения средних значений  $t$ -Стьюдента и дисперсий  $F$ -Фишера [10]. При этом данные контроля (статистически равнозначные при всех испытанных концентрациях флотореагента) из сравнения опускали. Для построения диаграмм использовали данные по гибели животных в опытах.

### *Результаты исследований и их обсуждение*

При сравнении выборочных долей в повторностях контроля реакция инфузорий оказывается идентичной — почти полная выживаемость. Следовательно, выборки можно объединить. При сравнении выборочных долей между повторностями в вариантах с концентрациями флотореагента 0,00001, 0,00005, 0,0001, 0,0005, 0,001 мг/дм<sup>3</sup> выявляется идентичность реакции инфузорий, следовательно, данные отдельных повторностей по вариантам можно объединить. При сравнении повторностей в варианте концентрации флотореагента 0,003 мг/дм<sup>3</sup> выявляются достоверные отличия реакции инфузорий: в трех повторностях животные в основном погибают, а в других трех повторностях опыта они остаются относительно резистентными. Поэтому эти две группы данных далее обрабатываются отдельно. При концентрации флотореагента 0,01 мг/дм<sup>3</sup> в одной из шести повторностей опыта инфузории в основном погибли (группа 0,01А), а в пяти повторностях (между ними нет достоверных отличий) оказались относительно резистентными (группа 0,01Б).

При возрастающих концентрациях флотореагента 0,04, 0,2, 0,4, 0,5, 1,0 мг/дм<sup>3</sup> в реакции инфузорий по вариантам между отдельными повторностями опытов нет различий (за исключением одной повторности с концентрацией яда 0,2 мг/дм<sup>3</sup>: в этом опыте большинство инфузорий погибли, и данные были исключены из обработки).

Сравнение средних значений по вариантам показало следующее. В контроле при самой низкой концентрации флотореагента  $0,00001 \text{ мг/дм}^3$  отличия средних значений и их дисперсии в пределах длительности опыта до 180 мин отсутствуют (рисунок). Первый диапазон резистентности инфузорий лежит в пределах концентраций менее  $0,00005 \text{ мг/дм}^3$ .

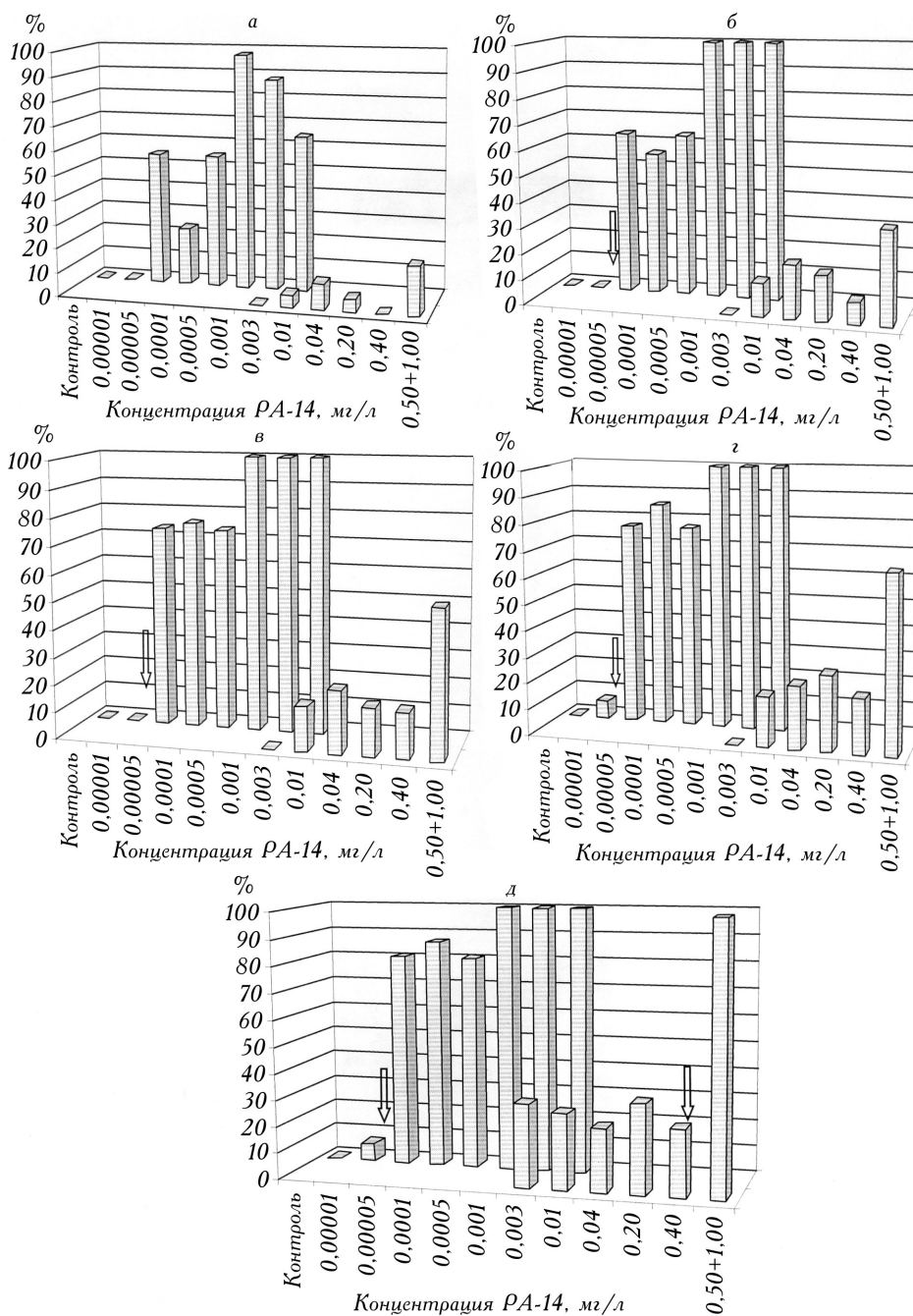
Повышение концентрации флотореагента до  $0,00005 \text{ мг/дм}^3$  через 60 мин от начала опыта инфузории достоверно вызывает гибель части особей (см. рисунок, б). При увеличении концентрации флотореагента до  $0,0001$ ,  $0,0005$ ,  $0,001 \text{ мг/дм}^3$  реакция инфузорий не меняется: достоверных отличий средних значений и дисперсий не отмечено.

При статистическом сравнении данных опытов с концентрацией яда  $0,00005$  и  $0,001 \text{ мг/дм}^3$ , так же, как и между испытаниями с концентрациями флотореагента внутри этого промежутка, достоверных отличий реакции инфузорий в течение времени опыта не отмечается. То есть, с увеличением концентрации яда происходит монотонное увеличение числа погибших животных, входящее в разряд случайных изменений. Следовательно, первый диапазон повреждающих концентраций флотореагента для инфузорий стилихий лежит в пределах от  $0,00005$  до  $0,001 \text{ мг/дм}^3$ .

Реакция инфузорий на действие флотореагента в концентрации  $0,003 \text{ мг/дм}^3$  не однозначна, как показано выше. В одной группе опытов ( $0,003\text{А}$ ) гибель происходит быстро и через 60 мин достигает 100%, причем при сравнении с реакцией на ближайшую более низкую концентрацию —  $0,001 \text{ мг/дм}^3$  — достоверные отличия средних значений и их дисперсии не выявляются. В другой части опытов с концентрацией флотореагента  $0,003 \text{ мг/дм}^3$  (инфузории группы  $0,003\text{Б}$ ) животные оказываются резистентными к действию яда. Они обнаруживают достоверные различия средних значений и их дисперсий при сравнении данных как с низшей концентрацией флотореагента —  $0,001 \text{ мг/дм}^3$ , так и с группой  $0,003\text{А}$ . Примерно у половины инфузорий выявляется второй интервал относительной резистентности инфузорий к яду РА-14, или второй уровень адаптации. Отличия реакции инфузорий при концентрации яда  $0,003$  (группа  $0,003\text{Б}$ ) и  $0,01 \text{ мг/дм}^3$  отсутствуют. В обоих случаях инфузории относительно резистентны. При увеличении концентрации флотореагента с  $0,01$  до  $0,04 \text{ мг/дм}^3$  достоверных отличий реакции инфузорий нет.

При дальнейшем повышении концентрации реагента с  $0,04$  до  $0,20 \text{ мг/дм}^3$  достоверные отличия отсутствуют. Происходит незначительное (недостоверное) увеличение доли погибших животных. При увеличении концентрации реагента с  $0,20$  до  $0,40 \text{ мг/дм}^3$  достоверных отличий реакции инфузорий нет, доля погибших даже несколько снижается.

При сравнении крайних средних значений концентрации второго уровня адаптации (группа  $0,003\text{Б}$ ) и  $0,40 \text{ мг/дм}^3$  по уровню гибели инфузорий достоверных отличий нет. И только при самых высоких концентрациях  $0,50 + 1,00 \text{ мг/дм}^3$ , по сравнению с данными по инфузориям группы  $0,003\text{Б}$ , происходит качественное изменение реакции животных. Достоверные различия появляются через 120 и 180 мин после начала опыта.



Реакция инфузорий (доля погибших, %) на присутствие в воде флотореагента РА-14 через 30 мин (а), 60 (б), 90 (в), 120 (г) и 180 мин (д) от начала опыта. Стрелками обозначены достоверные отличия соседних средних значений.

При статистическом сравнении реакции инфузорий в крайних границах интервала концентраций яда от 0,01 до 0,40 мг/дм<sup>3</sup> (как и внутри интервала)

достоверных отличий за время опыта не обнаружено. Таким образом, второй диапазон резистентности инфузорий к флотореагенту РА-14 лежит в пределах 0,01—0,40 мг/дм<sup>3</sup>.

Между данными по гибели инфузорий под действием флотореагента в максимальных концентрациях 0,5 и 1,0 мг/дм<sup>3</sup> достоверных отличий не отмечено, поэтому мы сочли возможным объединить эти две выборки. При увеличении концентрации флотореагента с 0,40 мг/дм<sup>3</sup> до самой большой (0,50 + 1,00 мг/дм<sup>3</sup>, объединенная выборка) достоверные отличия, заключающиеся в увеличении доли погибших инфузорий, отмечаются только через 180 мин опыта. Таким образом, второй диапазон повреждающих инфузорий концентраций флотореагента начинается с 0,5 мг/дм<sup>3</sup>.

Суммируя все результаты эксперимента, мы можем констатировать, что в диапазоне испытанных концентраций флотореагента РА-14 от (0) 0,00001 мг/дм<sup>3</sup> до 1,0 мг/дм<sup>3</sup> инфузория *Stylonychia mytilus* проявляет повышенную чувствительность к его концентрациям значительно меньшим (0,00005—0,001 мг/дм<sup>3</sup>) и значительно большим (от 0,50 мг/дм<sup>3</sup>), чем установленная для этого СПАВ ПДК (0,03 мг/дм<sup>3</sup>) (см. рисунок). Чувствительность к низким концентрациям токсиканта известна под названием «парадоксальный эффект» и является универсальным феноменом, в основе которого «... лежат фундаментальные свойства клетки» [11: с. 80]. Это заставляет по-новому взглянуть на установленные значения ПДК не только изучаемого флотореагента, но и многих других токсических веществ.

Относительная устойчивость стилонихии к средним концентрациям аминокислотосодержащего СПАВ (0,01—0,40 мг/дм<sup>3</sup>) может объясняться эволюционно сложившейся адаптацией к содержанию в водоемах аминов естественного происхождения.

### Заключение

Концентрации флотореагента РА-14 0—0,00001 мг/дм<sup>3</sup> не оказывают выявляемого действия на *Stylonychia mytilus*. К концентрациям флотореагента РА-14 0,01—0,40 мг/дм<sup>3</sup> инфузории стилонихии оказываются относительно устойчивыми, возможно, вследствие наличия у них адаптационных механизмов невосприимчивости к природным аминам. В диапазонах концентраций от 0,00005—0,0001 мг/дм<sup>3</sup>, а также более 0,50 мг/дм<sup>3</sup> наблюдается существенное негативное воздействие яда на инфузорий, приводящее их к гибели. Установленная по аналогам величина ПДК для флотореагента РА-14 — 0,03 мг/дм<sup>3</sup> должна быть пересмотрена.

\*\*

*Инфузорія Stylonychia mytilus виявляє підвищену чутливість до низьких (0,00005—0,001 мг/дм<sup>3</sup>) і високих (від 0,50 мг/дм<sup>3</sup>) концентрацій аміновмісного флотореагента РА-14. Відносна стійкість до середніх (0,01—0,40 мг/дм<sup>3</sup>) концентрацій пояснюється адаптацією до токсичних природних амінів, вміст яких у відкритих водоймах знаходиться в тих самих межах. Отримані результати можуть служити підставою для перегляду встановленої ГДК для РА-14 (0,03 мг/дм<sup>3</sup>) і методології розрахунку ГДК в цілому.*



\*\*

*Infusoria Stylonychia mytilus finds out the raised sensitivity to low (0,00005—0,001 mg/l) and high (from 0,50 mg/l) concentration of the amine-contained flotoreagent PA-14. The relative stability to intermediate (0,01—0,40 mg/l) concentration is explained by adaptation to toxic natural amines, which contents in open reservoirs is in the same limits. The received results can form the basis to reconsideration established LAC (limiting allowable concentration) for PA-14 (0,003 mg/l) and methodology of account of LAC as a whole.*

\*\*

1. Справочник по гидрохимии. — <http://biology.krc.karelia.ru/misc/hydro/index.html>.
2. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования // Гигиенические нормативы ГН 2.1.5.1315-03. II. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. — Москва. Минздрав России. Постановление № 79 от 30 апреля 2003 г. Введ. 15.06.2003.
3. Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды, водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. — М.: ВНИРО, 1989. — 304 с.
4. Дополнение № 1 к Санитарным правилам и нормам охраны поверхностных вод от загрязнения (СанПиН) от 4.07.1988 № 4630-88 Ориентировочные допустимые уровни (ОДУ) вредных веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Утв. Зам. Главного сан. врача СССР от 28.12.1990 № 5311-90.
5. Лукин А.А. Токсичность некоторых СПАВ после разложения их в воде // Вторая Всесоюз. конф. по рыбохоз. токсикологии, посвященная 100-летию проблемы качества воды в России: ноябрь 1991 г., Санкт-Петербург: Тез. докл. — СПб., 1991. — Т. 1. — С. 340.
6. Сиренко Е.В. Влияние флотореагента «ОИБ ИБС» на состояние окислительно-восстановительных процессов у теплокровных животных // Вісн. Харк. ун-ту. Сер. Медицина. — 2004. — № 617, вип. 8. — С. 19—22.
7. Пикуленко С.О. Применение биологического тестирования природных и сточных вод в экологических исследованиях // Зап. о-ва геоэколог. — 2008. — № 1. (Эл. ресурс. <http://www.ccssu.crimea.ua/internet/Education/geoecology/index>).
8. Щёткина Т.Н. Использование автоматизированной биотехнической системы и простейших одноклеточных организмов для биотестирования объектов окружающей среды: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Калуга, 2007. — 24 с.
9. Черемных Е.Г., Симбирева Е.И. Инфузории пробуют пищу // Химия и жизнь. — 2009. — № 1. — С. 28—31.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия: Уч. пособие для биол. специальностей ВУЗов. — 4-е изд., переработ. и доп. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

11. *Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Исакова Е.Ф. и др.* Механизмы реагирования водных организмов на воздействие токсичных веществ // Антропогенные влияния на водные экосистемы (по материалам конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. проф. Н. С. Строганова): Сб. статей / Под ред. О. Ф. Филенко. — М.: Т-во науч. изданий КМК, 2005. — С. 70—93.

<sup>1</sup> Белгородский государственный университет

<sup>2</sup> Белгородский государственный технологический университет

Поступила 04.01.10