

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи



Оськина Наталия Александровна

**ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА
ПОКОЯЩИЕСЯ ЯЙЦА ПРЕСНОВОДНОГО РАЧКА *MOINA MACROSCOPA***

Специальность 03.02.10 – Гидробиология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
Кандидат биологических наук
Задереев Егор Сергеевич

Красноярск – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1. Биотестирование и биоиндикация природных вод и донных отложений	16
1.2. Общие закономерности влияния тяжелых металлов на живые организмы в воде и донных отложениях.....	22
1.3. Общие закономерности влияния ионизирующего излучения на живые организмы в воде и донных отложениях.....	27
1.4. Действие токсикантов различной природы на покоящиеся яйца ракообразных.....	31
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Объект исследования	37
2.2. Условия проведения экспериментов.....	39
2.3. Оценка устойчивости рачков и покоящихся яиц <i>Moina macroscopa</i> к воздействию тяжелых металлов	45
2.3.1. Определение полулетальных (за 24 и 48 часов) концентраций тяжелых металлов для рачков <i>M. macroscopa</i>	47
2.3.3. Воздействие водных растворов тяжелых металлов на покоящиеся яйца <i>M. macroscopa</i>	48
2.3.4. Воздействие тяжелых металлов в искусственных донных отложениях на покоящиеся яйца <i>M. macroscopa</i>.....	50
2.3.5. Оценка биодоступности тяжелых металлов в искусственных донных отложениях	52
2.6. Гамма-облучение покоящихся яиц <i>M. macroscopa</i> в состоянии глубокой диапаузы.....	56
2.7. Облучение покоящихся яиц <i>M. macroscopa</i> в период реактивации	59
2.8 Статистическая обработка данных.....	60

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Определение полулетальных концентраций тяжелых металлов для ювенильных самок <i>M. macroscopa</i> в острых опытах на токсичность.....	61
3.2. Влияние хронического воздействия тяжелых металлов на параметры жизненного цикла самок <i>M. macroscopa</i>.....	65
3.3. Влияние нахождения покоящихся яиц <i>M. macroscopa</i> в водных растворах тяжелых металлов на их способность к реактивации и параметры жизненного цикла вылупившихся рачков.....	69
3.4. Влияние длительного контакта покоящихся яиц <i>M. macroscopa</i> с тяжелыми металлами в искусственных донных отложениях на их способность к реактивации и параметры жизненного цикла вылупившихся рачков	73
3.5. Влияние гамма-излучения на рачков <i>Moina macroscopa</i> в период глубокой диапаузы.....	81
3.6. Влияние гамма-излучения на покоящиеся яйца в период реактивации	91
ВЫВОДЫ.....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	102

ВВЕДЕНИЕ

Пресноводные планктонные ракообразные распространены повсеместно, обитают в заводях, лужах, озерах, прудах, неглубоких водохранилищах. Являясь фильтраторами по типу питания, рачки участвуют в процессах самоочищения водоемов. Поедая одноклеточные водоросли, планктонные ракообразные сдерживают цветение вод. Благодаря маленькому размеру и большому количеству питательных веществ в теле, планктонные рачки занимают большую долю в стартовых кормах для большинства видов рыб.

Многие виды планктонных рачков, в частности среди ветвистоусых ракообразных, чередуют в своей жизни два типа размножения – партеногенетический, во время которого самки отрождают живых потомков, и гаметогенетический, при котором образуют покоящиеся яйца. Экологический смысл такой особенности жизненного цикла предельно понятен. В благоприятных условиях из покоящихся яиц вылупляются самки, которые размножаются партеногенетически, при этом в каждой кладке самка отрождает несколько потомков. Это приводит к тому, что популяция рачков, быстро занимает свою экологическую нишу, выедая доступный корм и осваивая пространство. Далее, при ухудшении условий среды обитания, (недостаточное количество корма, снижение уровня воды, похолодание, уменьшение длины светового дня, или накопление продуктов жизнедеятельности) среди партеногенетических потомков рождаются не только самки, но и самцы, рачки приступают к половому размножению, и производят покоящиеся яйца. Полученные в результате полового размножения покоящиеся яйца позволяют сохранить локальную популяцию рачков при возникновении неблагоприятных условий окружающей среды, даже таких, как пересыхание водоема или его промерзание (Alekseev et al, 2007). Когда вновь наступят благоприятные условия, из яиц вылупятся самки и цикл повторится.

Часть покоящихся яиц всплывает к поверхностной пленке водоема, что способствует расселению рачков в другие водоемы ветром, на лапах водоплавающих птиц и в шерсти животных (Изюмова, Жаров, 2016). Другая часть покоящихся яиц оседает на дно водоема и накапливается в донных отложениях,

образуя так называемые банки яиц, которые служат для восстановления популяции при наступлении благоприятных условий. Покоящиеся яйца могут сохранять жизнеспособность десятки лет (Brendonck, Meester, 2003). Поскольку реактивация покоящихся яиц может быть растянута во времени, банки яиц формируются с сильным перекрытием поколений, что приводит к увеличению генетического разнообразия популяции (Brendonck, Meester, 2003). Таким образом, банки покоящихся яиц играют важную экологическую и эволюционную роль в жизни популяций планктонных ракообразных.

Благодаря широкой распространенности, экологической значимости и особенностям жизненного цикла пресноводные кладоцеры являются модельным объектом для различных биологических и экологических исследований. Большое количество работ посвящено изучению особенностей жизненного цикла кладоцер (Lopatina, Zadereev, 2012; Kotov, Voikova, 2001; Schwartz, Hebert, 1987), отклика рачков на токсичность среды (Халилова и др., 2010; Алиева и др., 2010; Шашкова, Григорьев, 2013; Qu et al., 2013), изменчивости поведения животных при воздействии различных физических и химических факторов (Лопатина, Задереев, 2015; Sarapultseva, Dubrova, 2016; Алексеев, Хозяйкин, 2009) и других фундаментальных и прикладных вопросов.

Одним из основных направлений водной экологии является исследование сезонной изменчивости планктона. В международном научном сообществе сформировался определенный консенсус о стандартном сценарии сезонного развития фито- и зоопланктона в озерной экосистеме, который был сформулирован членами группы по планктонной экологии (plankton ecology group) международного общества лимнологии (SIL) в виде так называемой модели PEG (PEG model, Sommer et al., 1986). В ходе дальнейших исследований авторы выявили некоторые факторы, слабо учтенные в модели. Среди них зимовка зоопланктонных организмов в покоящейся стадии. Количество жизнеспособных покоящихся яиц весной и вылупившихся из них животных может значительно повлиять на сценарий развития планктонного сообщества, спровоцировав или, наоборот, сдержав цветение водоема. В связи с этим, авторы отмечают, что судьба покоящихся стадий

на дне водоема заслуживает большего внимания, чем в изначальной модели PEG (Sommer et al., 2012).

Современные проблемы состояния водных экосистем, связанные с антропогенными загрязнениями, приводят к необходимости оценки состояния водных объектов при попадании загрязнителей в среду. Помимо оценки состояния водоемов необходимы и прогнозы состояния экосистем при возникновении чрезвычайных ситуаций. Загрязнения в водоемы и водотоки могут попадать с ливневыми стоками с полей и городских территорий, смывами вод после аварий на объектах коммунального водоотведения и очистных сооружениях, выпадать с осадками после техногенных аварий и катастроф.

Большое количество биологических тестов позволяет оценивать качество воды. Для донных отложений методик оценки качества меньше. В основном для этих целей применяется методика, основанная на смертности дафний, помещенных в водные вытяжки из исследуемых донных отложений. Однако, при приготовлении водной вытяжки, токсичные вещества могут изменять свое состояние и токсичность, а для нерастворимых токсикантов требуются контактные способы биотестирования (Терехова, 2011). Таким образом, очевидна, необходимость поиска новых объектов и методов биотестирования или биоиндикации качества донных отложений.

Одними из наиболее серьезных загрязнителей окружающей среды, попадающих в водоемы в результате деятельности человека, являются тяжелые металлы и радиоактивные вещества. Как показано на активных стадиях живых организмов, радиоактивные вещества могут влиять на биоту, вызывая генетические мутации (Медведева и др., 2014). Тяжелые металлы могут не только вызывать гибель водных организмов, но и, мигрируя по трофическим цепям (Анищенко и др., 2009), на верхних уровнях при употреблении человеком и негативно влиять на его здоровье. В загрязненных водных экосистемах тяжелые металлы и радиоактивные компоненты присутствуют в водной толще, а также скапливаются и концентрируются в донных отложениях (Зотина и др., 2014; Никаноров, Страдомская, 2007; Болсуновский и др., 2016). В донных отложениях находятся и

банки покоящихся яиц зоопланктона. Как было отмечено выше покоящиеся стадии позволяют выжить организмам в экстремальных условиях, которые возникают как в ходе естественных природных явлений, так и в результате деятельности человека. Но действие антропогенных загрязнителей на покоящиеся стадии изучено недостаточно.

Актуальность выбранной темы

Многие пресноводные планктонные ветвистоусые ракообразные формируют банки покоящихся яиц, которые играют важную роль в поддержании стабильности экосистем. Для многих антропогенных токсикантов характерно накопление в донных отложениях. Это дает повод задуматься о влиянии антропогенных токсикантов, таких как тяжелые металлы и радиоактивные вещества, на жизнеспособность банков покоящихся яиц и на состояние вылупившихся из них животных. Поскольку покоящиеся яйца могут храниться в донных отложениях длительное время, важно выяснить отличие между кратковременным воздействием токсиканта и продолжительным, для того чтоб понимать последствия для популяции. Знания о влиянии тяжелых металлов и радиоактивных веществ на банки покоящихся яиц зоопланктона позволят оценить устойчивость водных экосистем к воздействию различных загрязняющих веществ, сделать прогноз уровней загрязнения после которых возможно восстановление экосистемы, оценить эффективность мероприятий, направленных на очистку экосистемы от тяжелых металлов и радионуклидов, внесенных в водоем в результате деятельности человека.

Степень разработанности темы

Работ исследующих влияние радиоактивных излучений и тяжелых металлов на зоопланктонные организмы не мало (Fuller et al., 2015; Alonzo et al., 2006; Alonzo et al., 2008; Sarapultseva, Gorski 2013; Sarapultseva, Dubrova 2016; Sounrapandian, Venkataraman 1990; Wang et al., 2009; Won, Lee, 2014; Wong, Pak, 2004; Wong, 1993; Zou, Bu 1994), но в них, в основном, оценивается действие стрессовых

антропогенных факторов на активные стадии рачков. Как показано выше, покоящиеся стадии играют важную роль в зоопланктонных сообществах. Исследования влияния гамма-излучения и тяжелых металлов на покоящиеся стадии немногочисленны (Novikova et al., 2011; Iwasaki 1964; Rogalski, 2015). При этом в работах по оценке влияния тяжелых металлов и гамма-излучения на покоящиеся яйца не отслеживается дальнейшая судьба рачков, вылупившихся из яиц, подвергнутых воздействию токсикантов. Хорошим примером оценки влияния токсиканта на покоящиеся яйца являются труды Навис с соавторами (2013, 2015), где исследовано влияние органических пестицидов на покоящиеся яйца дафний и оценены последствия токсического воздействия во время покоя для вылупившихся рачков. Подобных работ с тяжелыми металлами или гамма-излучением не проводилось.

Научная новизна

Впервые исследована чувствительность покоящихся яиц модельного вида планктонных ракообразных к действию тяжелых металлов и гамма-излучения в широком диапазоне концентраций и доз облучения и определены критические уровни воздействия этих антропогенных факторов.

Выявлены существенные различия между последствиями воздействия тяжелых металлов и гамма-излучения на покоящиеся яйца, проявляющиеся на уровне изменений параметров жизненного цикла вылупившихся рачков.

Результаты исследования обогащают научную концепцию об устойчивости покоящихся стадий зоопланктона и раскрывают необходимость учета прямых и отложенных эффектов воздействия антропогенных факторов на покоящиеся стадии для понимания закономерностей сезонного развития планктонных сообществ.

Методы исследования

В работе применяли следующие методы: индивидуальное и проточно-накопительное популяционное культивирование рачков, индивидуальные

эксперименты с рачками по исследованию параметров жизненного цикла, острые и хронические тесты на токсичность, инкубацию покоящихся яиц рачков в растворах и искусственных донных отложениях с добавкой солей тяжелых металлов, облучение покоящихся яиц источниками гамма-излучения, статистическую обработку данных.

Все исследования проводили в лабораторных условиях. Объектом исследования был пресноводный планктонный рачок *Moina macroscopa*. Покоящиеся яйца получали в лабораторных условиях в накопительном режиме культивирования. Хранили покоящиеся яйца в темноте при температуре 4°C. Активных рачков содержали в климатическом боксе, при температуре 26°C, с фотопериодом 16 часов света и 8 часов темноты. Кормили рачков одноклеточной зеленой водорослью *Chlorella vulgaris*. В качестве водной среды применяли отстоянную, аэрированную водопроводную воду.

Оценивали острое и хроническое действие солей тяжелых металлов ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2) на ювенильных рачков *M. macroscopa*. Определяли полулетальные и полуэффективные дозы солей тяжелых металлов. Концентрации солей тяжелых металлов в экспериментах с покоящимися яйцами находились в диапазоне от полулетальных доз для активных животных до насыщенных растворов. Инкубацию покоящихся яиц в водных растворах солей тяжелых металлов, проводили в течение 1 месяца. В искусственных донных отложениях с добавкой солей тяжелых металлов покоящиеся яйца выдерживали 6-8 месяцев. Покоящиеся яйца промывали и реактивировали. Оценивали количество вылупившихся рачков и индивидуальные параметры их жизненного цикла. Дополнительно, проводили оценку биодоступности тяжелых металлов в искусственных донных отложениях, при помощи водных вытяжек (OECD, 1993). Полученные данные использовали для оценки концентрации биодоступных металлов в искусственных донных отложениях, используемых в экспериментах с покоящимися яйцами.

Облучение проводили при помощи трех источников: частиц ^{137}Cs с активностями $12.4 \cdot 10^6$ и $1.12 \cdot 10^{10}$ Бк и промышленным ускорителем электронов

ИЛУ-6 (Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск). После облучения яйца реактивировали и оценивали количество и индивидуальные параметры жизненного цикла вылупившихся рачков. Популяционные эксперименты для оценки состояния популяций рачков, развивавшихся из облученных яиц, проводили в режиме накопительного культивирования с постоянным протоком среды.

Статистическую обработку данных проводили в программах Excel, R, STATISTICA 8.0 параметрическим и непараметрическим методами анализа данных (дисперсионный анализ, регрессионный анализ, пробит-анализ, тест Краскела-Уоллиса, пакет drc для R).

Теоретическое и практическое значение

Определение критических значений концентраций тяжелых металлов и доз гамма-облучения для реактивации покоящихся стадий рачков важно для выяснения пределов выживания обитателей водных экосистем. Результаты оценки устойчивости покоящихся яиц планктонных ракообразных и качества вылупившихся из них животных могут применяться для прогнозов состояния экосистем в случае чрезвычайных ситуаций, сопровождаемых поступлением тяжелых металлов и радионуклидов в водоемы. Определение доли яиц, способных к реактивации после загрязнения исследуемыми токсикантами, важно для понимания общих закономерностей развития планктонных сообществ в водоемах и направлено на уточнение особенностей сезонного развития планктонных сообществ в водных экосистемах. Оценка устойчивости покоящихся яиц к кратковременному и долговременному воздействию тяжелых металлов позволит определить эффективность мероприятий по очистке водных экосистем от загрязнения тяжелыми металлами. На основе анализа чувствительности покоящихся яиц к тяжелым металлам и радиоактивному загрязнению возможна разработка нового способа биоиндикации качества воды и донных отложений. Результаты исследования могут применяться в учебном процессе при подготовке студентов биологических специальностей.

Цель работы – оценить прямые и отложенные последствия воздействия ряда тяжелых металлов и гамма-излучения на покоящиеся яйца пресноводного планктонного рачка *Moina macroscopa*.

Задачи работы:

1. Определить влияние широкого диапазона доз гамма-облучения на способность покоящихся яиц *M. macroscopa* к реактивации. Оценить изменчивость параметров жизненного цикла и популяционных характеристик рачков *M. macroscopa*, вылупившихся из облученных яиц.

2. Сравнить чувствительность покоящихся яиц *M. macroscopa* к действию гамма-излучения в период глубокой диапаузы и во время реактивации.

3. Определить полулетальные и полуэффективные концентрации тяжелых металлов в острых и хронических тестах на токсичность с рачками *M. macroscopa*.

4. Определить последствия длительного нахождения покоящихся яиц *M. macroscopa* в растворах и искусственных донных отложениях с добавкой тяжелых металлов в широком диапазоне концентраций на их способность к реактивации. Оценить изменчивость параметров жизненного цикла рачков, вылупившихся из яиц, после длительного контакта с тяжелыми металлами.

5. Сравнить критические концентрации тяжелых металлов для покоящихся яиц с ПДК и ЛК₅₀ для активных стадий рачков. Сравнить критические дозы гамма-облучения для покоящихся яиц *M. macroscopa* с таковыми для активных стадий зоопланктона и покоящихся стадий других живых организмов.

6. Сравнить последствия воздействия тяжелых металлов и гамма-облучения на покоящиеся яйца и вылупившихся из них рачков.

Основные защищаемые положения

1. Покоящиеся яйца ветвистоусого рачка *Moina macroscopa* обладают высокой устойчивостью к действию гамма-излучения и тяжелых металлов. Реактивация яиц подавляется лишь при дозах облучения выше 100 Гр и концентрациях металлов уровня десятков г/л, крайне редко встречающихся в природных экосистемах.

2. При действии гамма-излучения на покоящиеся яйца *Moina macroscopa* наблюдаются не только прямые (подавление реактивации), но и отложенные эффекты. Относительно низкие дозы облучения, не снижающие эффективность реактивации покоящихся яиц, оказывают негативное воздействие на репродуктивные параметры и численность популяции рачков, вылупившихся из облученных яиц.

3. Концентрации тяжелых металлов, не влияющие на реактивацию покоящихся яиц, также не оказывают отложенного воздействия на параметры жизненного цикла вышедших из яиц рачков.

Апробация

Основные результаты исследования были представлены на десяти международных, всероссийских и региональных научных конференциях, посвященных гидробиологии и экологии в целом и исследованию ракообразных в частности.

1. 10-ый Симпозиум по ветвистоусым ракообразным, Леднице, Чехия, 28 сентября – 3 октября 2014 года.

2. Четвертая международная конференция, посвященная Н.В. Тимофееву-Ресовскому и его научной школе «Современные проблемы Генетики, Радиобиологии, Радиоэкологии и Эволюции», Санкт-Петербург, 2-6 июня 2015 года.

3. 5-й Международной конференции, посвященной памяти выдающегося гидробиолога Г.Г. Винберга, Санкт-Петербург, Россия, 12-17 октября 2015 года.

4. XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 11-15 апреля 2016 года.
5. 33-ий Конгресс Международного общества лимнологии. Торино, Италия, 31 июля – 5 августа 2016 года.
6. Конкурс-конференция научных работ молодых ученых ИБФ СО РАН, Красноярск, Красноярский край, Россия, 28 марта 2017 года.
7. Международная научная конференция «Ракообразные: разнообразие, экология, эволюция» ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия, 30 октября – 2 ноября 2017 года.
8. Конкурс конференция научных работ молодых ученых ИБФ СО РАН, Красноярск, Красноярский край, Россия, 28 марта 2018 года.
9. Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы изучения ракообразных» посвященная 90-летию Николая Николаевича Смирнова, ИББВ им. А.П. Папанина РАН, п. Борок, Ярославской области, Россия, 17-20 мая 2018 года.
10. XXII Международная научная школа-конференция студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий», ХГУ им. Н.Ф.Катанова, Абакан, республика Хакасия, Россия, 14-16 ноября 2018 года.

По теме диссертации опубликовано пять статей в рецензируемых журналах и одна глава в коллективной монографии.

Статьи в изданиях из перечня ВАК РФ:

1. Задереев Е.С., Лопатина Т.С., Зотина Т.А., Оськина Н.А., Дементьев Д.В., Петриченков М.В. Влияние гамма-облучения на покоящиеся яйца и жизненный цикл ветвистоусого рачка *Moina macroscopa* // Доклады Академии Наук. 2016. Том 446. №5. С. 1-5.
2. Лопатина Т.С., Бобровская Н.П., Оськина Н.А., Задереев Е.С. Сравнительное исследование токсического воздействия никеля и кадмия на активные и покоящиеся стадии ветвистоусого рачка *Moina macroscopa* // Журнал Сибирского федерального университета, Биология. 2017. Том 10. № 3. С. 358-372.

3. Zadereev E., Lopatina T., Oskina N., Zotina T., Petrichenkov M., Dementyev D. Gamma irradiation of resting eggs of *Moina macrocopa* affects individual and population performance of hatchlings // Journal of Environmental Radioactivity. 2017. V. 175-176. P. 126-134.

4. Лопатина Т.С., Задереев Е.С., Оськина Н.А., Петриченко М.В. Чувствительность покоящихся яиц ветвистоусого рачка *Moina macrocopa* к облучению во время реактивации // Доклады Академии Наук. 2018. Т 480. № 6. С. 169-172.

5. Oskina N., Lopatina T., Anishchenko O., Zadereev E. High resistance of resting eggs of Cladoceran *Moina macrocopa* to the effect of heavy metals // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2018. V. 102. P. 335-340.

Главы в монографиях:

Zadereev E., Lopatina T.S., Oskina N. Resistance of Dormant Eggs of Cladocera to Anthropogenic Pollutants // In: Dormancy in Aquatic Organisms. Theory, Human Use and Modeling / editors V. R. Alekseev, B. Pinel-Alloul – Springer Nature Switzerland AG. 2019. – P. 121-135.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Антропогенное загрязнение водных экосистем тяжелыми металлами (Ваганова, 2011; Zhang et al., 2017; Rajeshkumar et al., 2018; Islam et al., 2015, Wang, Chen, 2009), органическими токсикантами (Никаноров, Страдомская, 2007; Möst et al., 2015) и радионуклидами (Болсуновский и др., 2016; Крышев и др., 2012; Inoue et al., 2017; Maringer et al., 2017) делает актуальной разработку методов оценки реакции обитателей водоемов на действие поллютантов и устойчивости экосистем. Многие исследователи предполагают, что для полного понимания степени токсичности исследуемой среды необходимо применять не только химические, но и биологические методы, в частности биотесты (Chapman et al., 2002, Tuikka et al., 2011).

Чаще всего при анализе загрязнения водных экосистем токсикантами внимание исследователей обращено на токсичность непосредственно водной среды. Однако функционирование практически любой водной экосистемы связано с взаимодействием нескольких зон обитания, в частности донных отложений. Донные отложения, помимо органических остатков, могут накапливать в себе токсичные вещества, поступающие в водоемы и водотоки и отравляющие живые организмы, обитающие в этих биотопах (Зотина и др., 2014; Никаноров, Страдомская, 2007; Rajeshkumar et al., 2018). Так же, токсичные вещества, накопленные в донных отложениях, могут переходить обратно в водную толщу, продлевая интоксикацию водоема даже в случае снижения антропогенной нагрузки, что в свою очередь свидетельствует о необходимости оценки токсичности донных отложений (Калинкина и др., 2013) для прогнозирования состояния исследуемых экосистем и разработки методов их очистки.

Далее будут рассмотрены современные методики биотестирования и биоиндикации, продемонстрированы достижения и проблемы, связанные с биологическими методами оценки качества природных объектов. Следующие разделы литературного обзора будут посвящены анализу основных проблем загрязнения водных объектов тяжелыми металлами и радиоактивными

компонентами, реакции организмов водной среды на эти антропогенные воздействия. В последней части будут рассмотрены особенности влияния тяжелых металлов и радиоактивных соединений на покоящиеся яйца зоопланктона.

1.1. Биотестирование и биоиндикация природных вод и донных отложений

Биотестирование вод, водных вытяжек из почв и донных отложений – экспериментальные методы оценки токсичности исследуемой среды, основанные на изменчивости параметров жизненного цикла подопытных организмов (планктонных рачков, инфузорий, водорослей).

Методики биотестирования позволяют оценить токсичность исследуемой среды в сравнении с контрольной и определить кратность разведений, приводящую к исчезновению токсичного действия на живой организм. При биотестировании выявляют такие параметры как острая и хроническая токсичность. При определении острой токсичности выявляют кратность разведений исследуемой среды, в которой за определенное время погибнет 50% подопытных организмов, в данном случае говорят о полулетальной дозе (ЛД₅₀) или полулетальной концентрации (ЛК₅₀). Продолжительность эксперимента зависит от особенностей тест объекта и, как правило, указана в методическом пособии по выполнению теста. Например, для дафний определяют полулетальную дозу за 48 часов (ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, 2006). При определении хронической токсичности определяют полуэффективную дозу (ЭД₅₀) или полуэффективную концентрацию (ЭК₅₀) для какого-либо параметра жизненного цикла тест-объекта – кратность разведений исследуемой среды, в которой значение параметра жизненного цикла (продолжительность жизни, плодовитость, скорость роста) подопытного организма уменьшится вдвое по сравнению с контролем (ГОСТ Р 56236-2014 (ИСО 6341:2012); ГОСТ Р 57166-2016; ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, 2006).

Биоиндикация подразумевает собой оценку состояния биотопа по наличию в нем тех или иных видов живых организмов. К примеру, метод С.Г. Николаева по оценке уровня сапробности вод, основан на том, что личинки веснянок и поденок

не способны обитать в водах с высоким содержанием органического ила, поскольку нуждаются в высоком содержании кислорода. Трубочник (*Tubifex tubifex*), в свою очередь, не нуждается в хорошем кислородном режиме, для него важнее скопления большого количества разлагающихся органических остатков, илистые донные отложения, которые используются трубочником в качестве корма и мягкого субстрата для зарывания в грунт (Воробейчик, Садыков, Фарафонов, 1984). Таким образом, методики биоиндикации опираясь на наличие или отсутствие видов индикаторов, позволяют оценивать уровни сапробности, следовательно, и чистоты вод.

Для оценки состояния среды можно использовать не только индикаторные виды, но и индексы видового разнообразия растений и животных (Чеснокова, 2007). Например, индекс Шеннона позволяет оценить состояние водоема по обилию видов и соотношению численности представителей видов. Чем выше величина индекса, тем более устойчива исследуемая экосистема. Предполагается, что при поступлении в водоем каких-либо загрязнителей, будет наблюдаться вымирание одних видов и более интенсивное развитие других. Таким образом, снижение видового разнообразия будет являться откликом биоценоза на воздействие загрязнителя. Схожие закономерности наблюдаются в природе. Например, видовое разнообразие и количественные показатели зоопланктона в р. Кенти при продолжительном калийно-сульфатном загрязнении, снижались по мере приближения к источнику загрязнения. При этом конкурентное преимущество получали эврибионтные виды зоопланктона, более устойчивые к загрязнениям и вытесняющие стенобионтов (Кучко и др., 2015).

Не только наличие или отсутствие тех или иных организмов в биотопе позволяет судить о загрязнении, но и нарушения строения тела, и органов животных, обитающих на исследуемой территории, позволяют выявлять загрязнения среды обитания пораженных организмов (Томилина и др., 2011). Метод оценки, основанный на обнаружении аномалий животных, позволяет судить не только о смертности тест-объекта, но и о качестве выживших особей в

загрязненной среде. Таким образом, ориентируясь на состояние живых организмов, данный метод более чувствителен, чем методики, основанные на смертности.

Несмотря на достаточно качественно разработанные методики биотестирования и биоиндикации вод, и их активное применение (Шилова и др., 2010; Рыжков и др., 2011; Пяткова и др., 2007), существуют проблемы, которые усложняют или делают невозможным оценку состояния вод в лабораторных условиях. К таковым относятся: проблемы хранения образцов воды перед проведением биотестирования (существуют определенные требования, которых порой невозможно достичь в полевых работах), проблемы связывания токсичных веществ органическими соединениями (Григорьев и др., 2005), сезонная изменчивость физиологии тест-объектов (Заличева, Ганина, 2015; Воробьева и др., 2013), особенности сезонного изменения видового состава биотопов и периоды цветения, приспособляемость зоопланктонных сообществ к загрязнению среды (Штамм и др., 2017), биологические инвазии, приводящие к изменчивости биоразнообразия экосистем (Романова и др., 2016; Максимов, 2010; Семенченко и др., 2014).

Примером обнаружения и решения проблем методов биотестирования может служить работа Шашковой и Григорьева (2013). Авторами оценивалось влияние бихромата калия на скорость потребления корма планктонным пресноводным рачком *Daphnia magna*. Было показано, что на чувствительность показателя к токсиканту влияет возраст рачков, количество корма в среде, предшествующей тестируемой, время подачи корма в период эксперимента. В ходе исследования авторы установили условия проведения экспериментов по оценке токсичности воды на основании скорости потребления корма пресноводным рачком *Daphnia magna*, с учетом факторов, влияющих на чувствительность метода (Шашкова, Григорьев, 2013).

Донные отложения представляют собой осадок на дне водоема. В зависимости от гидрологического режима водоема, а также от пород водосборной площади, состав донных отложений может различаться, что приводит к различию в токсичности веществ, поступающих в донные отложения. Между донными

отложениями и токсичными веществами, возможны различные химические реакции (окисление, восстановление, адсорбция, хемосорбция, десорбция). Характер этих реакций и устойчивость соединений, а значит и биодоступность токсикантов, зависят от физико-химических свойств среды (Папина, 2001). Механические различия между водой и донными отложениями (жидкая среда, вязкая среда), отличия в химическом составе, требуют разработки методов биотестирования для донных отложений.

Например, Филенко и Медянкина (2010) оценили влияние состава донных отложений на токсичность веществ, поступающих в водоем, по смертности взрослых особей *D. magna* и по количеству и выживаемости потомков, рожденных самками в ходе эксперимента длительностью 21-24 суток. Донные отложения добавляли на дно стаканов слоем 1 см. В качестве донных отложений применяли кварцевый песок, активный ил из аквариумного фильтра, пылеватый тяжелый суглинок и тяжелую супесь. Токсичное действие бихромата калия на *D. magna* снижалось при наличии в донных отложениях суглинка и ила. Хлорид меди становился менее токсичен для рачков при наличии супеси, суглинка и ила. Фунгицид сульфат имазалила проявлял менее токсичное действие на выживаемость рачков в присутствии супеси (Филенко, Медянкина, 2010).

На данный момент известны методы оценки токсичности почв и донных отложений с применением в качестве тест-организма растений (ГОСТ Р ИСО 22030-2009), кольчатых червей и хирономид (OECD, 1984). Известен метод тестирования вытяжек из почв и донных отложений (ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06). Приготовленные вытяжки пригодны для оценки их токсичности на тест-объекте *Daphnia magna* (Straus). Полученные данные можно применять для выявления степени токсичности почв и донных отложений, из которых получали данные вытяжки.

Физико-химические различия между донными отложениями и водной средой предполагают потребность в разработке новых методик биотестирования, основанных на поиске организмов непосредственно контактирующих с донными отложениями (Калинкина и др. 2013). Такими организмами могут быть

представители зообентоса и фитобентоса (включая высшие водные растения), на поиск которых и обращено внимание некоторых современных исследователей (Зотина и др., 2014; Калинкина и др., 2013).

Например, в работе Калинкиной с соавторами (2013) применялись водные вытяжки из донных отложений, для проведения биотеста с планктонным рачком *Ceriodaphnia affinis* и бентосной амфиподой *Gmelinoides fasciatus*. Этот вид амфипод представлял интерес для исследователей тем, что *G.fasciatus* контактирует с донными отложениями, закапываясь в грунт, перебирая частички ила. При использовании водных вытяжек *G. fasciatus* проявил высокую чувствительность к токсичному загрязнению донных отложений (Калинкина и др., 2013). Чувствительность *G. fasciatus* позволяет задуматься о разработке прямого, контактного метода биотестирования донных отложений.

Одна из методик тестирования донных отложений основана на изменении скорости передвижения дафнии в опытной среде относительно контрольной (Nikitin et al., 2018). При проведении экспериментальных работ по разработке данной методики авторы перемещали рачков из контрольной воды, в воду которая выдерживалась 8 часов в контакте либо с чистыми донными отложениями, либо с загрязненными модельным токсикантом $K_2Cr_2O_7$. В результате исследования было обнаружено, что скорость передвижения дафний в контрольной среде и воде после контакта с чистыми донными отложениями не изменялась, а вот при перемещении рачков в воду после контакта с донными отложениями в которые был добавлен токсикант, плавательная активность рачков снижалась за час в два раза (Nikitin et al., 2018).

Как известно, донные отложения чаще всего содержат в себе не один токсичный компонент. При сильной антропогенной нагрузке перечень токсичных веществ может достигать десятков наименований (Paiva et al., 2015). Подобные сочетания могут усиливать или уменьшать токсичное действие загрязненных донных отложений на живые организмы (Stankovic et al., 2014). Вдобавок ко всему, разные организмы могут по-разному реагировать на действие различных смесей токсичных веществ (Курбатова и др., 2007). На разных этапах развития тест-объект

может изменять свою чувствительность к токсиканту. Учитывая все вышесказанное, проводятся работы по оценке чувствительности различных организмов и стадий развития к токсичности среды (Tuikka et al., 2011).

Растения и некоторые водные организмы, имеют в своем жизненном цикле покоящуюся стадию, которая позволяет им пережить неблагоприятные условия среды обитания. Как правило, покоящиеся яйца и семена накапливаются в донных отложениях водоема либо почве. Поскольку донные отложения способны накапливать различные токсиканты, в них происходит длительный контакт покоящейся стадии с токсичными веществами. Оценке действия антропогенных токсикантов на покоящиеся стадии различных организмов посвящено немало работ (Möst et al., 2015; Rogalski, 2015; Navis et al., 2015; Jiang et al., 2007; Phoungthong et al., 2016; Chen, White, 2004; Макрушин, 2009).

Разработаны методики по оценке токсичности твердых субстратов, почв и донных отложений при помощи семян высших растений. Критериями токсичности могут выступать как морфологические изменения у подопытных растений, например, длина или сухая масса проросшего корня (Семенова и др., 2015), так и генетические нарушения (митотическая активность, количество аберраций в анафазе) в апикальной части корня (Chen, White, 2004).

Можно сказать, что особенность биотестирования заключается в том, что с помощью живых организмов оценивается не количество загрязняющих веществ или их состав, а проводится общая оценка качества среды. При этом изменчивость условий среды обитания может приводить к изменчивости токсичности веществ. В этом случае нетоксичная среда может становиться токсичной, или, наоборот, в лабораторных условиях проявлять меньшую токсичность. Это указывает на необходимость разработки методов биотестирования максимально приближенных к условиям окружающей среды и «естественных» для организмов.

Необходимо отметить, что разнообразие современных методов оценки качества водных экосистем с применением живых организмов сводится к изобилию методик оценки качества воды и скудности прямых контактных методов оценки токсичности донных отложений. В то же время, донные отложения

являются местом скопления антропогенных загрязнений и покоящихся яиц планктонных рачков, играющих немаловажную роль в функционировании зоопланктонных сообществ. С одной стороны, это делает покоящиеся яйца одним из объектов, который можно использовать для оценки токсичности донных отложений. С другой, подтверждает необходимость оценивать влияние токсикантов, находящихся в донных отложениях, на покоящиеся яйца зоопланктона.

1.2. Общие закономерности влияния тяжелых металлов на живые организмы в воде и донных отложениях

Тяжелые металлы представляют собой особо опасные для человека, растений и животных токсичные вещества, что вызывает закономерный интерес в научной среде к исследованию их взаимодействия с экосистемами и организмами (Ваганова, 2011; Борисков и др., 2016; Никаноров, Страдомская, 2007; Stankovic et al, 2014). Тяжелыми называют металлы, атомная масса которых больше скандия. К ним относятся Cu, Co, Cr, Cd, Fe, Zn, Pb, Sn, Hg, Mn, Ni, Mo, V, W (Stankovic et al., 2014). Металлы Cu, Ni, Cr, Zn, Cd влияют на живые организмы в следовых количествах. Такие тяжелые металлы как Hg, Cr, Cd, Ni, Cu, As, Pb, попадая в водные экосистемы, могут быть высокотоксичны для водных организмов (Stankovic et al., 2014)

Металлы, влияющие на живые организмы в следовых количествах (Cu, Ni, Cr, Zn, Cd), наиболее часто используются в исследованиях в качестве модельных токсикантов (Wong, 1992; Wong, 1993; Zou, Bu, 1994; Ward, Robinson, 2005; Nadini et al., 2007; Шилова и др., 2010; Qu et al., 2013). На основании данных Мура и Рамамурти (1987) эти металлы можно ранжировать по степени их токсичности для разных групп организмов: для рыб – Cu>Cd>Ni>Cr>Zn; для беспозвоночных животных – Cu>Cd>Zn>Ni>Cr; для растений – Cu>Cd>Zn>Cr>Ni. Как видно медь является наиболее токсичным элементом среди проанализированных металлов. Следует отметить, что полулетальные дозы меди для разных организмов

варьируют в пределах от 0.006 до 3 мг/л. Кадмий по токсичности для беспозвоночных и растений близок к меди, полулетальные дозы находятся в диапазоне от 0.003 до 1 мг/л. Токсичность кадмия для разных видов рыб находится в широком диапазоне (от 0.09 до 105 мг/л). Этот разброс обусловлен возрастом тест-объектов и химическими параметрами среды обитания, такими как соленость и уровень pH.

Для водных растений никель по степени токсичности сопоставим с кадмием, полулетальные дозы находятся в диапазоне от 0.1 до 0.5 мг/л. Цинк имеет идентичный диапазон полулетальных концентраций, для рыб и водных беспозвоночных он составляет 0.5 – 5 мг/л. Такая же полулетальная доза для водных растений по хрому (0.5 – 5 мг/л). Хром также имеет схожие полулетальные концентрации для рыб и водных беспозвоночных (от 3 до 118 мг/л). Степень токсичности никеля для водных беспозвоночных и рыб различна, если для беспозвоночных полулетальные концентрации находятся в диапазоне от 0.5 до 20 мг/л, то для рыб – от 5 до 100 мг/л (Мур, Рамамурти, 1987).

К факторам, влияющим на состояние металлов в пресноводных экосистемах, относят ионную силу среды, жесткость воды, наличие органического вещества, pH, окислительно-восстановительный потенциал. Сочетание действия этих факторов может приводить к образованию форм тяжелых металлов с разной степенью растворимости, тем самым увеличивая или уменьшая их биодоступность (Bjerregaard, Andersen, 2007). Значения pH, щелочности, жесткости и ионного состава, физико-химические особенности гуминовых веществ, в пресных водах зависят от геологических характеристик водосборных площадей, климата, распространенности растительного покрова, состава почв, антропогенных загрязнений, и приводит к появлению различных форм тяжелых металлов в водоемах и водотоках (Моисеенко и др., 2013).

Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах могут быть представлены тремя фракциями: раствор, коллоидные частицы, взвесь (Nystrand et al., 2012). Растворенная часть наиболее подвижна и биодоступна, следовательно, и более токсична, но некоторая часть растворенных металлических ионов может

реагировать с донными отложениями и глиной, образуя комплексы и становясь менее биодоступными и токсичными. Коллоидная фракция может быть растворима, и, следовательно, токсична для живых организмов (Paiva et al., 2015).

Металлы, связанные в крупных молекулах, образуют взвеси, которые постепенно оседают на дно и накапливаются в донных отложениях. Связанные металлы обычно недоступны для животных и растений и нетоксичны, однако, изменчивость химического состава среды может влиять на растворимость и, следовательно, на биодоступность этой фракции тяжелых металлов (Butler et al., 2008)

Курилов с соавторами (2009) подразделяет тяжелые металлы в водоемах и водотоках по степени доступности для живых организмов на легкодоступные, умеренно доступные и труднодоступные формы. Легкодоступные и умеренно доступные могут освобождаться из комплексов в условиях природных водоемов и быть токсичными для живых организмов. К легкодоступным формам металлов автор относит обменные и кислоторастворимые формы металлов. Умеренно доступными названы металлы, связанные с аморфными оксидами марганца, с гуматами и фульватами. Труднодоступные формы металлов не растворяются в условиях водного объекта, потому не представляют интереса для экологических исследований (Курилов и др., 2009).

Обращая внимание на огромное количество факторов, влияющих на формы нахождения металлов в пресных водах, возникает острая необходимость более детальной разработки уровней ПДК (предельно-допустимых концентраций), соответствующей физико-химическим характеристикам водоемов. Таким образом, необходима разработка региональных нормативов ПДК с учетом геохимических и биологических характеристик водосборных площадей, оценкой степени антропогенной нагрузки и взаимодействия металлов с другими веществами, входящими в состав вод региональных водных объектов (Моисеенко, Гашкина, 2007)

Помимо токсичных свойств, тяжелым металлам присуще свойство биоаккумуляции – они могут накапливаться в живых организмах, и сохранять свои

концентрации при переходе с одного трофического уровня на другой (Анищенко и др., 2009). Таким образом, наибольшему воздействию тяжелых металлов в трофической сети подвергаются верхние звенья. Одним из потребителей организмов верхнего звена трофических сетей водных экосистем является человек. Поэтому, очень важно знать, где и сколько тяжелых металлов накапливается в водных экосистемах, к каким последствиям приводит их нахождение в среде в тех или иных формах, концентрациях, при действии и изменчивости физических и химических факторов среды.

В работах по исследованию тяжелых металлов в водных экосистемах очень часто применяются химические методы оценки качества среды. Как известно, химические методы отвечают на вопрос о количестве вещества, а не о его токсичности. К тому же, тяжелые металлы в разных комбинациях приводят к антагонистическому или синергетическому эффекту (Nandini et al., 2007). Следовательно, в исследовании природных экосистем необходимо применение биотестов (Пяткова и др., 2007).

Рассмотрим примеры работ по оценке влияния тяжелых металлов на зоопланктонные организмы и модификации их токсичности под действием разных факторов среды. Эксперименты с планктонным рачком *Moina macroscopa* показали, что наиболее токсичным металлом для этого вида, как и в целом для ракообразных, является медь. Выживаемость рачков (продолжительность жизни) при концентрации 0.02 мг Cu/л значительно отличалась от выживаемости рачков в контроле. Хром также весьма токсичен для мойн, отличия в выживаемости от контрольной группы наблюдались при концентрации 0.04 мг Cr/л (Wong, 1993). Никель и цинк менее токсичны, чем медь и хром. Концентрации, при которых наблюдались отличия в выживаемости от контрольных групп составляли 0.25 мг Ni/л и 0.50 мг Zn/л (Wong, 1993). Полулетальные концентрации представленных металлов в 24 и 48 часовых острых тестах на токсичность с *M. macroscopa* составляли: для никеля 23.59 и 6.48 мг/л, для цинка 2.04 и 1.17 мг/л, для хрома 0.76 и 0.36 мг/л, для меди 0.09 и 0.08 мг/л (Wong, 1992).

В другой работе полулетальная концентрация никеля для суточных рачков *M. macroscopa* составила 6.84 мг/л в воде. В присутствии искусственных донных отложений полулетальная концентрация никеля для активной стадии рачков увеличилась до 12.09 мг/кг, благодаря наличию в искусственных донных отложениях органического вещества и каолина, которые связывали тяжелые металлы, снижая вдвое их токсичные свойства (Martinez-Tabche et al., 2000).

Полулетальная концентрация кадмия для солоноводного рачка *Moina monogolica* при 24-х часовой экспозиции составила 9.59 мг/л, при 48 часовой экспозиции – 1.87 мг/л. Хронические эффекты кадмия проявлялись в снижении продолжительности жизни и способности рачков к размножению. Выживаемость снижалась при концентрациях от 26.7 мкг/л. Размер кладок и общее количество потомства на самку, начинало значимо отличаться от контроля при концентрации 4.10 мкг/л, количество кладок снижалось при концентрации 26.7 мкг/л, что свидетельствовало о чувствительности *M. monogolica* к действию кадмия (Wang, 2009). Полулетальная доза кадмия за 24 часа для пресноводного рачка *M. macroscopa* составила 0.68 мг/л (Garcia et al., 2004), что подтверждает большую устойчивость солоноводных видов к действию тяжелых металлов, чем пресноводных.

Температурный режим влиял на устойчивость планктонного рачка *Moina irrasa* к токсичному действию тяжелых металлов. Так, например, при повышении температуры с 20 до 30 градусов Цельсия увеличивалась токсичность солей тяжелых металлов, полулетальные концентрации меди за 24 часа снижались с 6.49 до 1.42 мкг/л, кадмия – с 38.25 до 29.04 мкг/л, цинка – с 306.49 до 81.28 мкг/л (Zou, Yu, 1994).

Водородный показатель среды изменял токсичность тяжелых металлов для *Moina irrasa*. Смещение pH от кислой среды к нейтральной и слабощелочной (pH 5.0-8.0), увеличивало полулетальную концентрацию при 24 часовой экспозиции и 20°C, для меди с 6.49 до 19.67 мкг/л, для кадмия с 38.25 до 84.02 мкг/л, для цинка с 147.30 до 327.27 мкг/л (Zou, Yu, 1994). Однако увеличение pH от 5.0 до 9.0 постепенно увеличивало токсичность кадмия для *Daphnia magna*. Так

полуэффективная концентрация (EC_{50}) изменялась от 1.2 мг/л при рН в диапазоне 5.0-6.0 до примерно 0.3 мг/л при рН в диапазоне от 7.0 до 9.0 (Qu et al., 2013).

При кормлении дафний пищей, обогащенной цинком, наблюдалось снижение количества рожденных самками потомков, тогда как не было отмечено изменений в скоростях роста и потребления пищи (Schamphelaere et al., 2004). Высокая обеспеченность пищей снижала степень токсичного действия кадмия на кладоцер. Так, например, полуэффективная концентрация (EC_{50}) при увеличении количества корма с 0.5 до $1.5 \cdot 10^6$ клеток хлореллы/мл, увеличивалась в два раза для чистой скорости воспроизводства и времени размножения *Echinisca triserialis*

Как известно, зоопланктон накапливает тяжелые металлы (Chen et al., 2000, Ward et al., 2012), а после может передавать их своим потомкам (Tsui, Wang 2004), что в свою очередь увеличивает риск появления патологий развития у потомков (Khangarot, Das 2009). Помимо перехода тяжелых металлов потомкам, также происходит переход тяжелых металлов по трофической цепи (Ruangsomboon, Wongrat, 2006).

Подводя промежуточный итог можно сказать, что тяжелые металлы крайне токсичны для планктонных ракообразных. Донные отложения, а точнее содержащиеся в них глины и органические вещества могут снижать токсичность металлов. Водородный показатель также изменяет степень токсичности тяжелых металлов. Солоноводные организмы более устойчивы к загрязнению тяжелыми металлами, чем пресноводные. Стрессовые ситуации, такие как изменение температурного режима, низкая обеспеченность кормом, способны снижать устойчивость зоопланктона к действию тяжелых металлов. В целом под действием изменчивых характеристик окружающей среды, может наблюдаться ослабление и усиление токсичного эффекта тяжелых металлов, что требуется учитывать при биотестировании.

1.3. Общие закономерности влияния ионизирующего излучения на живые организмы в воде и донных отложениях

Водная среда имеет три основных источника радиоактивности – радионуклиды естественного происхождения, продукты ядерных взрывов, водные сбросы ядерной промышленности (Крышев, Сазыкина, 2009). Естественный фон (4-15 мкР/час) ионизирующего излучения, возникающий при распаде природных радионуклидов, влиял на биосферу на протяжении всего её существования. Таким образом живые организмы выработали для себя диапазон толерантности к ионизирующей радиации. Как известно облучение живых организмов дозами, заметно превышающими естественный фон, приводит к негативным последствиям. Однако нижний предел диапазона толерантности совпадает с уровнем естественного фона. Экспериментально доказано, что снижение уровня облучения ниже естественного фона может приводить к негативному воздействию на биоту (Крышев, Сазыкина, 2013).

При оценке безопасного для окружающей среды уровня радиоактивного загрязнения в прошлом столетии были популярны предельно-допустимые дозы, ориентированные на человека. К примеру, Даллас с соавторами (2012) приводят цитату из постановления Международной комиссии по Радиационной защите от 1983 года, в которой предполагается, что уровни радиации безопасные для человека, будут безопасны и для биосферы. Сарапульцева (2017) также отмечает, ориентированность стандартов безопасности на человека, а не на биоту.

Согласно современным представлениям, в первую очередь необходимо оценивать влияние радиоактивных выбросов на биоту. Например, Крышев с Сазыкиной (2013) в своей работе указывают, что человек подвергается меньшему воздействию радиоактивных излучений, благодаря умышленному избеганию зоны загрязнения, тогда как живые организмы не способны осознавать опасности зон загрязнений, и находятся в них постоянно. Авторы отмечают необходимость разработки стандартов не на основе полулетальной дозы радиации для человека, а на основе безопасных доз для растений и животных (Крышев, Сазыкина, 2013). Определяя результаты действия ионизирующего излучения на живые организмы, специалисты создают единую систему оценки.

Живые организмы по-разному реагируют на воздействие радиоактивного загрязнения. Некоторые из организмов более чувствительны. Например, рыба и водные растения способны качественно отображать показатели радиоактивного загрязнения, поэтому рекомендованы для использования в роли биоиндикаторов радиационно-экологического воздействия. (Лунева и др., 2012).

Среди наиболее популярных видов для биотестирования, водоросль *Chlorella vulgaris* и инфузория *Spirostomum ambiguum* оказались более чувствительными к загрязнению поверхностных и подземных вод в районе хранилища отходов ядерного производства, чем пресноводный рачок *Daphnia magna*. Авторы говорят о необходимости проведения хронических опытов на дафнии, чтобы обнаружить эффекты длительного воздействия загрязненных вод (Пяткова и др. 2007). Однако хронические тесты с дафниями длятся до 30 суток, и не охватывают весь период жизни рачка, в результате не учитывается такой немаловажный показатель как продолжительность жизни, а трудовых ресурсов на проведение такого теста требуется достаточно много, и результат неполон. Выходом в такой ситуации может быть поиск животных для хронических тестов с более коротким периодом активной стадии, например, таких как ветвистоусый рачок с коротким жизненным циклом *Moina macroscopa*.

Достаточно высокую чувствительность к загрязнению вод в районе хранилища отходов ядерного производства показывает тест цито- и генотоксичности на клетках меристемы молодых корешков лука *Allium cepa*. Чувствительность теста цитогенетической токсичности и положительную корреляцию с содержанием техногенных радионуклидов показывают также Медведева с соавторами (2014) на канадской элодее при исследовании корнеобитаемого слоя донных отложений р. Енисей.

Таким образом существует необходимость поиска новых видов животных для проведения хронических и прямых контактных тестов биотестирования. Достаточно привлекателен метод цитогенетической токсичности для растений.

Если обращаться непосредственно к ракообразным, то последствия воздействия ионизирующего излучения на пресноводных кладоцер как в активной

фазе, так и на стадии покоящегося яйца исследованы слабо. В ряде работ оценивалось действие малых доз радиации на пресноводных кладоцер (Сарапульцева и др., 2009). Авторами обнаружены прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у ракообразных (Сарапульцева., 2015), выявлены линейно-пороговые эффекты γ -облучения в диапазоне малых доз у представителей кладоцер (Сарапульцева и др., 2007).

Гамма-излучение по данным Сарапульцевой с соавторами (2007) влияет на рачков *Daphnia magna* не равномерно, а скачкообразно с последующими плато по показателям физического состояния. Так, например, при облучении рачков дозами от 0.01 до 0.1 Гр летальные эффекты не регистрировались, в диапазоне от 0.1 до 10 Гр наблюдался первый скачок, выраженный в 25% смертности животных.

В работе Гилбина с соавторами (Gilbin et al., 2008) исследовано действие гамма-излучения на дыхание, устойчивость потомков облученных родителей к голоду, сухую массу тела, способность к размножению самок *Daphnia magna*. Рачки получали низкие дозы облучения от раствора Cs^{137} . Микродозы были получены в результате облучения источниками мощностью 0.41, 4.2 и 31 мГр/ч⁻¹. Способность рачков к партеногенезу снижалась при интенсивности облучения 31 мГр/ч⁻¹ в течение 15 дней. В этом случае размер кладок у облученных самок снижался до 21% по сравнению с контролем. Наблюдалось снижение интенсивности дыхания дафний при интенсивности облучения 31 мГр/ч⁻¹ в течение 23 дней. Потомки от облученных самок по сравнению с контролем имели низкую устойчивость к голоду.

Хронические эффекты при постоянном воздействии гамма-излучения в низких дозах (20-75 рентген/час по 19 часов в сутки) на планктонного рачка *Daphnia pulex* проявлялись в пренатальной смертности партеногенетических потомков, вызванной летальными хромосомными абберациями или бесплодием самок. Также с увеличением дозы радиации наблюдалось увеличение индивидуальных размеров тела, что автор связывает с использованием энергии, не использованной для размножения (Marshall, 1962).

Хроническое воздействие альфа-излучения на рачков *Daphnia magna* в трех поколениях изучено в работе Алонзо с соавторами (Alonzo et al., 2008). У первого и второго поколений (F1 и F2) наблюдалась ювенильная смертность (38-90%) при максимальной мощности постоянного воздействия (1.5 мГр/ч^{-1}). Облучение также сказывалось на репродуктивных параметрах. Так при облучении мощностью 1.5 мГр/ч^{-1} доля размножающихся самок в первом выводке составляла лишь 62% от численности дафний. При облучении мощностью 0.3 мГр/ч^{-1} доля размножающихся самок снижалась во втором выводке до 69% от численности дафний. Размер тела и масса рачков значительно снижались во втором поколении: на 15% при облучении источником мощностью 0.3 мГр/ч^{-1} и на 27% - при 1.5 мГр/ч^{-1} .

Хроническое воздействие урана на три поколения рачков *Daphnia magna* дозами $10, 25, 75 \text{ мкгU/л}^{-1}$ в опытных образцах воды исследовано Массариным с соавторами (Massarin et al., 2010). Отмечено, что выживаемость рачков в поколении F0 незначительно отличается от контроля. В поколении F1 заметно резкое вымирание потомков в опыте с максимальной концентрацией урана. В поколении F2 разница в продолжительности жизни между опытом и контролем снижается.

Таким образом, существует естественный фон ионизирующего излучения, отклонения от которого негативно влияют на живые организмы. Поскольку живые формы кроме человека не избегают радиоактивных загрязнений, современные взгляды в области ПДД (предельно-допустимая доза) обращены не к человеку, а к биоте. Поэтому, современные исследования в данной области посвящены поиску организмов для биотестирования, оценке влияния ионизирующего излучения на живые организмы и их потомство, как при кратковременном, так и при хроническом воздействии, определению безопасных доз облучения для биоты.

1.4. Действие токсикантов различной природы на покоящиеся яйца ракообразных

Как было отмечено выше, природные популяции ветвистоусых ракообразных помимо активной стадии, развивающейся в воде, также широко представлены покоящимися яйцами в донных отложениях. Покоящиеся стадии зоопланктона, сохраняя свою жизнеспособность при наступлении неблагоприятных условий (недостаток кислорода, засуха, промерзание), способствуют сохранению генетического материала популяции и служат для восстановления ее после вымирания активной стадии (Radzikowski, 2013). Сложно переоценить необходимость сохранения жизнеспособности покоящихся яиц, а также пополнения банка яиц.

Поступающие в результате человеческой деятельности в водные объекты тяжелые металлы могут оказывать негативное воздействие на банки покоящихся яиц двумя путями. Во-первых, они оказывают влияние на динамику накопления покоящихся яиц, которая может различаться у видов с разной устойчивостью к загрязнению (Piscia et al., 2012). Во-вторых, они могут накапливаться в донных отложениях и напрямую воздействовать на жизнеспособность покоящихся яиц.

Тяжелые металлы в донных отложениях, как и любые другие загрязняющие вещества, потенциально могут, как вызывать смертность покоящихся яиц, так и оказывать негативные эффекты на рачков, вылупившихся из яиц подвергнутых воздействию металлов (Rogalski, 2015). Жизнеспособность покоящихся яиц зависит не только от концентрации тяжелых металлов в окружающей среде, но и продолжительности контакта с токсикантами. При этом стоит учитывать, что длительность хранения покоящихся яиц планктонных ракообразных влияет на их способность к реактивации (Brendonck, Meester, 2003). В работе Rogalski (2015) показано, что покоящиеся яйца дафнии из поверхностных (молодых) слоев донных отложений, загрязненных металлами, реактивировались лучше, чем из глубинных более старых с такими же уровнями загрязнения. Однако, покоящиеся яйца из глубинных слоев с меньшими концентрациями загрязнения реактивировались лучше, чем из старых слоев с высоким загрязнением. Таким образом, можно сказать, что длительное воздействие тяжелых металлов на покоящиеся яйца планктонных ракообразных снижают их жизнеспособность.

Влияние тяжелых металлов на покоящиеся яйца *Acartia pacifica* из залива Ксямен (Xiamen), проявлялось в снижении количества вылупившихся науплий при увеличении концентрации металлов и времени пребывания покоящихся яиц в загрязненных донных отложениях. Наблюдался синергетический эффект при совместном воздействии нескольких металлов (Jiang et al., 2007).

По данным Алексева с соавторами (2010) покоящиеся яйца *Moina macroscopa* сохраняют способность к реактивации после инкубирования в растворе (500 мг/л) меди (CuSO_4), на протяжении 97 дней (Alekseev et al., 2010). Полулетальная концентрация тяжелых металлов для покоящихся яиц *Acartia pacifica* составила 79.37 мг/кг меди и 3.44 мг/кг кадмия (Jiang et al., 2007).

Далее рассмотрим влияние органических загрязнителей на покоящиеся стадии зоопланктона. Многие из используемых человеком пестицидов сохраняют токсичность и в гидросфере, негативно влияя на сообщества морских и пресноводных экосистем. Как и другие животные ткани, ткани покоящихся яиц способны накапливать токсичные вещества. Это и было продемонстрировано при оценке влияния феноксикарба на покоящиеся яйца дафний. Так же было обнаружено, что концентрация пестицида в покоящихся яйцах, находящихся в эфиппиуме, схожа с концентрацией в покоящихся яйцах, лишенных эфиппиума, что дает основание судить о том, что эфиппиум не защищает покоящиеся яйца от воздействия пестицида. Отмечено, что успешность реактивации декапсулированных яиц была выше, чем инкапсулированных, авторы связывают это с тратами энергии на разрывание эфиппиума (Navis et al., 2015).

Оценивая влияние трихлоруглерода, бензотриазола, 5-метил-бензотиазола, октокрилена, пропиконазола, тербутирана, прохлора, триклозана на покоящиеся яйца дафний обнаружен эффект стимуляции выклева рачков из яиц. По мнению авторов, подобное явление может приводить к истощению банков яиц, что в свою очередь приведет к возможному вымиранию локальной популяции по причине снижения запаса покоящихся яиц (Möst et al., 2015).

Судьба рачков, вылупившихся из яиц, подвергнутых воздействию токсикантов, рассматривалась в работе Навис с соавторами (Navis et al., 2013).

Авторы оценивали влияние феноксикарба в концентрациях 0.5; 5; 50; 500 и 5000 мг/л, и карбарила, на покоящиеся яйца *D. magna*. Обнаружено, что воздействие на покоящиеся яйца дафний феноксикарбом, приводит к увеличению возраста отрождения первой кладки и снижению количества потомков в кладке. При высоких концентрациях феноксикарба прослеживалось снижение размеров тела вылупившихся рачков. Карбарил оказывал значительное влияние на выживаемость рачков, вылупившихся из яиц, подвергшихся воздействию; вызывал увеличение возраста отрождения первой кладки, снижение численности потомков в кладках и уменьшение размеров тела вылупившихся рачков (Navis et al., 2013).

Проблема инвазивных видов, привнесенных с балластными водами кораблей, привела к потребности разработки химических методов борьбы с живыми организмами, путешествующими в балластных водах. Однако, как известно покоящиеся яйца защищены от воздействия многих стрессовых факторов. Таким образом, была проведена работа по оценке влияния реактивов для очистки балластных вод от живых организмов на покоящиеся яйца *Daphnia mendotae* и *Artemia sp.* Выяснено, что в водной среде ЛД₉₀ глутаральдегида для покоящихся яиц артемии составила 226 ± 10 мг/л; ЛД₉₀ гипохлорида натрия для покоящихся яиц *Artemia sp.* составляла 86.5 ± 3.0 мг/л воды, для покоящихся яиц *D. mendotae*— 78.3 ± 1.6 мг/л воды (Raikow et al., 2007). Оценка устойчивости покоящихся стадий водных организмов к воздействию фенола, формалина, и аммиака, показала, что наиболее токсичным для покоящихся стадий является аммиак и перекись водорода которые авторы рекомендуют в качестве реагента для стерилизации балластных вод (Alekseev et al., 2010).

Взаимодействие токсичных веществ с донными отложениями, приводящее к нейтрализации загрязнителя по отношению к покоящимся яйцам, наблюдалось в работе Райкова с соавторами (2007). При оценке влияния донных отложений на токсичность исследуемых веществ, покоящиеся яйца *Daphnia mendotae* помещали в емкости, где находилось 15 мл донных отложений и 85 мл воды с токсикантом. В присутствии донных отложений не обнаружено токсичного эффекта на

покоящиеся яйца *D. mendotae*, при увеличении концентрации глутаральдегида и гипохлорида натрия до 2000 мг/л (Raikow et al., 2007).

Работ по оценке действия радиоактивного облучения на покоящиеся яйца не так много. Новикова с коллегами (2011) исследовали устойчивость покоящихся яиц зоопланктона к нахождению в открытом космосе, где яйца подвергались высоким температурным перепадам и действию ионизирующего излучения. Поглощенная доза соответствовала 2-3 Гр. Показано, что после 13 месяцев пребывания покоящихся яиц *Daphnia magna* в открытом космосе до 11-35% яиц успешно реактивируется после возвращения на Землю. Что говорит об устойчивости покоящихся яиц ионизирующему излучению в условиях открытого космоса (Novikova et al., 2011).

Ивасаки (1964) оценил чувствительность покоящихся яиц артемий к влиянию гамма-излучения по скорости вылупления облученных яиц рачков. Облученные покоящиеся яйца развивались медленнее контрольного образца. Так, при накопленной дозе 480 и 600 килорентген первые рачки вылупились только через 22 и 26 часов, в то время как в контроле реактивация яиц началась через 12 часов после помещения яиц в культивационную среду. Кроме того, процент вылупившихся рачков из облученных яиц был в два раза ниже. Полулетальная доза для покоящихся яиц артемии составила 500 килорентген (Iwasaki, 1964).

Покоящиеся стадии живых организмов в отличие от активных стадий могут продолжительное время находиться в одном и том же месте, подвергаясь воздействию локального радиоактивного загрязнения. Поскольку одной из важнейших функций покоящихся яиц является сохранение генетического материала популяции рачков, повреждения или гибель банка покоящихся яиц может приводить к негативным последствиям для такого важного звена водных экосистем как планктонные ракообразные.

Несмотря на устойчивость покоящихся яиц к различным неблагоприятным условиям, антропогенные загрязнители представляют собой новые факторы воздействия, и неизвестно, как они повлияют на покоящиеся яйца ракообразных. Как показано выше, степень устойчивости покоящихся яиц к различным типам

токсичных веществ различна. При этом исследования устойчивости покоящихся яиц к токсикантам часто фрагментарны, редко оценивают последствия воздействия на стадии покоящего яйца для реактивировавшихся рачков. В нашей работе исследованы не только выживаемость покоящихся яиц *M. macroscopa* после воздействия гамма излучения и солей тяжелых металлов, но и на последствия этих воздействий для вылупившихся рачков.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

В качестве модельного объекта исследования использован пресноводный планктонный рачок *Moina macroscopa* и его покоящиеся яйца. Лабораторная культура *M. macroscopa* была получена из покоящихся яиц, предоставленных В.К. Чугуновым (Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН) и к.б.н. Я.Р. Галимовым, из временно пересыхающих водоемов.

Таксономическое положение объекта:

Тип: *Arthropoda*

Класс: *Crustacea*

Подкласс: *Cladocera*

Отряд: *Daphniiformes*

Семейство: *Moinidae*

Род: *Moina*

Вид: *M. macroscopa* (Straus, 1820) (Чертопруд, Чертопруд, 2005)

Обитатель пресноводных экосистем планктонный рачок *Moina macroscopa* обычно населяет временные небольшие водоемы, заводи, лужи, пруды (Чертопруд, Чертопруд 2005). Как и другие планктонные ракообразные моины способствуют естественному очищению вод и играют важную роль в сетях питания как стартовый корм для мальков рыб. Таким образом, *M. macroscopa* является важным компонентом пресноводных экосистем.

Наличие двух типов размножения в жизненном цикле позволяет моине быть устойчивой к изменениям условий среды обитания (Макрушин, 1992). В благоприятных условиях, благодаря партеногенезу, самки *M. macroscopa* быстро увеличивают численность популяции (Лопатина, 2013). В неблагоприятных условиях моины переходят к половому типу размножения, во время которого продуцируют покоящиеся яйца, устойчивые к промерзанию, высыханию, воздействию многих токсичных веществ (Brendonk, Meester, 2003).

По типу диапаузы *M. macrocopa* относится к моноцикличному виду с летним периодом партеногенетического размножения. Длительность диапаузы превышает сроки активного развития популяции. Наиболее явными факторами, индуцирующими диапаузу у моин, являются фотопериод, температура, трофические условия, продукты жизнедеятельности своего вида (Задереев, Губанов, 1996). Увеличение плотности популяции может вызывать образование покоящихся яиц не только через скопившиеся метаболиты, но и по причине снижения пищевой обеспеченности (Алексеев, 1990).

При партеногенетическом размножении развитие моин происходит без метаморфоза, самки вынашивают потомков в выводковых сумках. Отрожденная молодь внешне напоминает взрослых особей, с небольшими морфологическими отличиями и меньшим размером. Соматический рост интенсивен преимущественно в ювенильный период жизненного цикла, с наступлением половой зрелости рост замедляется, либо прекращается (Гиляров, 1987).

Оплодотворенные покоящиеся яйца помещены в эфиппиумы, которые формируются из части раковинки рачка. Отделение покоящихся яиц в эфиппиуме от самки происходит во время линьки рачков. Желток эуфиллоподного типа (мелкозернистый без жировых вакуолей) позволяет латентным яйцам *M. macrocopa* претерпевать высушивание. Такое свойство развилось в ходе эволюции у этих рачков неслучайно, и связано со средой обитания (мелкие лужи с непостоянным гидрологическим режимом), а также с необходимостью расселения ветром в другие водоемы (Макрушин, 1991). Моины способны возвращаться к партеногенезу после гамогенеза в случае улучшения условий среды обитания (Кокова, 1982).

Ряд особенностей делают *M. macrocopa* удобным объектом для лабораторных, в частности токсикологических, исследований. Относительно короткая продолжительность жизни *M. macrocopa* (15-20 дней) позволяет при проведении токсикологических экспериментов наблюдать за полным жизненным циклом рачков. *M. macrocopa* достаточно чувствительна к действию токсикантов. Так по данным Дятловой (2001), рачки более чувствительны к модельному токсиканту (бихромат калия) по сравнению с другими исследованными видами

(*Simnocephalus vetulus*, *Ceriodaphnia affinis*, *Daphnia magna*, *Scapholeberis mucronata*). Самки *M. macroscopa* обладают высокой средней плодовитостью (Дятлова, 2001), что облегчает задачу получения большого количества ювенильных потомков в синхронизированной культуре, необходимой для биотестов. Простота получения покоящихся яиц в лабораторных условиях позволяет сохранять моин без постоянного поддержания оптимальных для активной стадии условий, а также использовать покоящиеся яйца как один из объектов для проведения оценки токсичности среды.

2.2. Условия проведения экспериментов

2.2.1 Среда культивирования

Для проведения экспериментов в качестве среды культивирования использовали водопроводную воду. Перед набором воду спускали на максимальной для крана мощности в течение 5-8 минут. Далее отбирали воду в пластиковые емкости вместимостью 10 литров и аэрировали в течение двух суток при комнатной температуре и освещении. Перед использованием воды в эксперименте измеряли ее температуру. В случае если температура была ниже 23°C, нужную порцию воды предварительно подогревали.

2.2.2. Приготовление корма

В качестве корма использовали одноклеточную водоросль *Chlorella vulgaris*. Водоросль культивировали в лабораторных условиях в климатическом боксе. В качестве субстрата использовали среду Тамия: в 1 литр дистиллированной воды добавляли 5 г KNO₃; 2.5 г MgSO₄*7H₂O; 1.25 г KH₂PO₄; 0.037 г C₁₀H₁₈N₂Na₂O; 5 мл раствора водного 0.5 % раствора FeC₆H₅O₇; микроэлементы 3 мл (в 1 литре дистиллированной воды 2.86 г H₃BO₃; 1.81г MnCl₂*4H₂O; 0.222 г ZnSO₄*7H₂O; 0.018 г MoO₃; 0.023 г NH₄VO₃) (Tamiya et al., 1953). Для культивирования

использовали стерильные колбы емкостью 0.5 л. В колбах происходила постоянная аэрация. Через две недели после посева среду с водорослями центрифугировали при скорости 3000 оборотов в минуту. Образовавшийся супернатант сливали, а осевшие на дне водоросли промывали отстоянной водопроводной водой и снова центрифугировали. Процедуру промывки повторяли ещё раз, далее концентрированные на дне пробирок водоросли смывали небольшим количеством воды (1-2 мл) в колбу (100 мл), закрывали плотно крышкой и хранили в холодильнике до использования в эксперименте и для посева.

Для использования в эксперименте небольшое количество (0.5-1 мл) концентрированной суспензии клеток водоросли разбавляли водой (100-150 мл). Затем отбирали 0.1 мл разбавленной суспензии и помещали в 1 мл изотонического раствора для подсчета количества клеток на счетчике частиц CASY TTC (SCHÄRFE SYSTEM GmbH, Германия). Методом пропорции рассчитывали нужное количество разбавленной суспензии для требуемого объема воды для достижения заданной концентрации клеток водорослей в среде.

2.2.3. Подготовка посуды

Посуду, не загрязненную тяжелыми металлами, промывали ершиком или губкой, споласкивали сначала водопроводной водой, а после дистиллированной и сушили вверх дном на чистой хлопчатобумажной ткани.

Загрязненную тяжелыми металлами посуду замачивали в растворе трилона Б (динатриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты) на 1 час, далее ополаскивали водопроводной водой, чистили губкой с пищевой содой. Тщательно ополаскивали теплой водой с использованием чистой губки. Снова ополаскивали водопроводной водой, после дистиллированной водой. Далее сушили посуду на чистой хлопчатобумажной ткани.

2.2.4. Получение покоящихся яиц

Покоящиеся яйца *M. macroscopa*, используемые в экспериментах, получали от лабораторной культуры моин. Для стимуляции производства яиц использовали накопительный режим культивирования популяции *M. macroscopa*. Небольшое количество самок (около 20 особей) помещали в стакан с 4 литрами культуральной среды (отстоянная аэрированная водопроводная вода + корм *Chlorella vulgaris* 1 млн клеток/мл, температура 25°C). Смену воды и сбор яиц проводили 1 раз в 3-4 дня. Для смены воды и сбора покоящихся яиц содержимое стакана процеживали через планктонную сеть. Рачков и покоящиеся яйца помещали в чашку Петри с небольшим количеством воды. Пипеткой отбирали рачков и помещали в стакан с 4 литрами свежей культуральной среды. Оставшиеся в чашке Петри покоящиеся яйца промывали отстоянной, аэрированной, водопроводной водой. Далее яйца помещали в пробирки с 1-3 мл воды и хранили в темноте при температуре 4°C. Партия яиц представляла собой пробирку, в которую были собраны несколько тысяч покоящихся яиц, образованных в течение 14-30 дней накопительного культивирования популяции *M. macroscopa*.

В экспериментах использовали эфипшиумы с двумя неповрежденными яйцами. На момент реактивации покоящихся яиц, используемых в экспериментах, период покоя составлял не менее 8 месяцев и не более года. Проверляли успешность реактивации в используемой партии яиц на выборке из 20 эфипшиумов. Если в выборке вылуплялось более 80% рачков, то данную партию яиц использовали в эксперименте.

2.2.5. Условия реактивации яиц

Эфипшиумы с двумя покоящимися яйцами помещали в 500 мл отстоянной водопроводной воды в оптимальные условия для реактивации ($t - 25^{\circ}\text{C}$, свет и темнота – 16 и 8 часов соответственно, концентрация корма 400 тысяч клеток/мл). Реактивацию яиц во всех экспериментах проводили в течение 10 дней. Каждые три

дня меняли воду на свежеприготовленную. Каждый день подсчитывали количество вылупившихся особей. Основная доля рачков вылуплялась на второй-третий день реактивации (Рисунок 1).

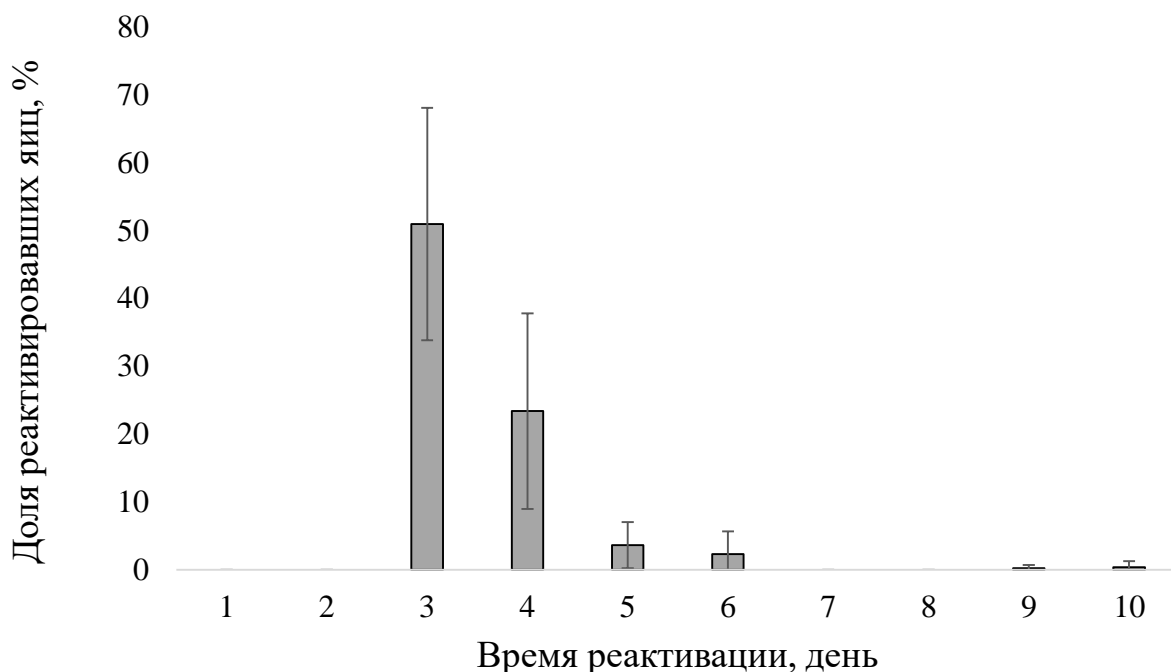


Рисунок 1. Динамика реактивации покоящихся яиц *M. macroscopa* в контрольных группах, проведенных в ходе выполнения работы экспериментов.

При помощи бинокля ЛОМО (МСП-1) с видеокамерой было зафиксировано время реактивации покоящихся яиц (Рисунок 2). На фотографиях виден практически сформировавшийся рачок внутри покоящегося яйца по прошествии 16 часов реактивации. Выход первых рачков из оболочек эфиппиума происходил через 32 часа после помещения покоящихся яиц в благоприятные условия. Также заметно, что не все яйца начинают реактивироваться сразу (Рисунок 2).

В предварительных экспериментах было обнаружено, что даже для промытых в дистиллированной воде яиц, в том случае, когда они на стадии экспонирования находились в высоких концентрациях солей тяжелых металлов, после успешной реактивации наблюдается массовая смертность вылупившихся

рачков. Мы предположили, что это связано с адсорбцией солей тяжелых металлов на поверхности яиц и последующей диффузией токсикантов в воду. Смертность молоди рачков в этом случае наступала не в результате негативного воздействия токсиканта на яйцо – реактивация была успешной, а из-за загрязнения среды культивирования тяжелыми металлами с поверхности яиц.

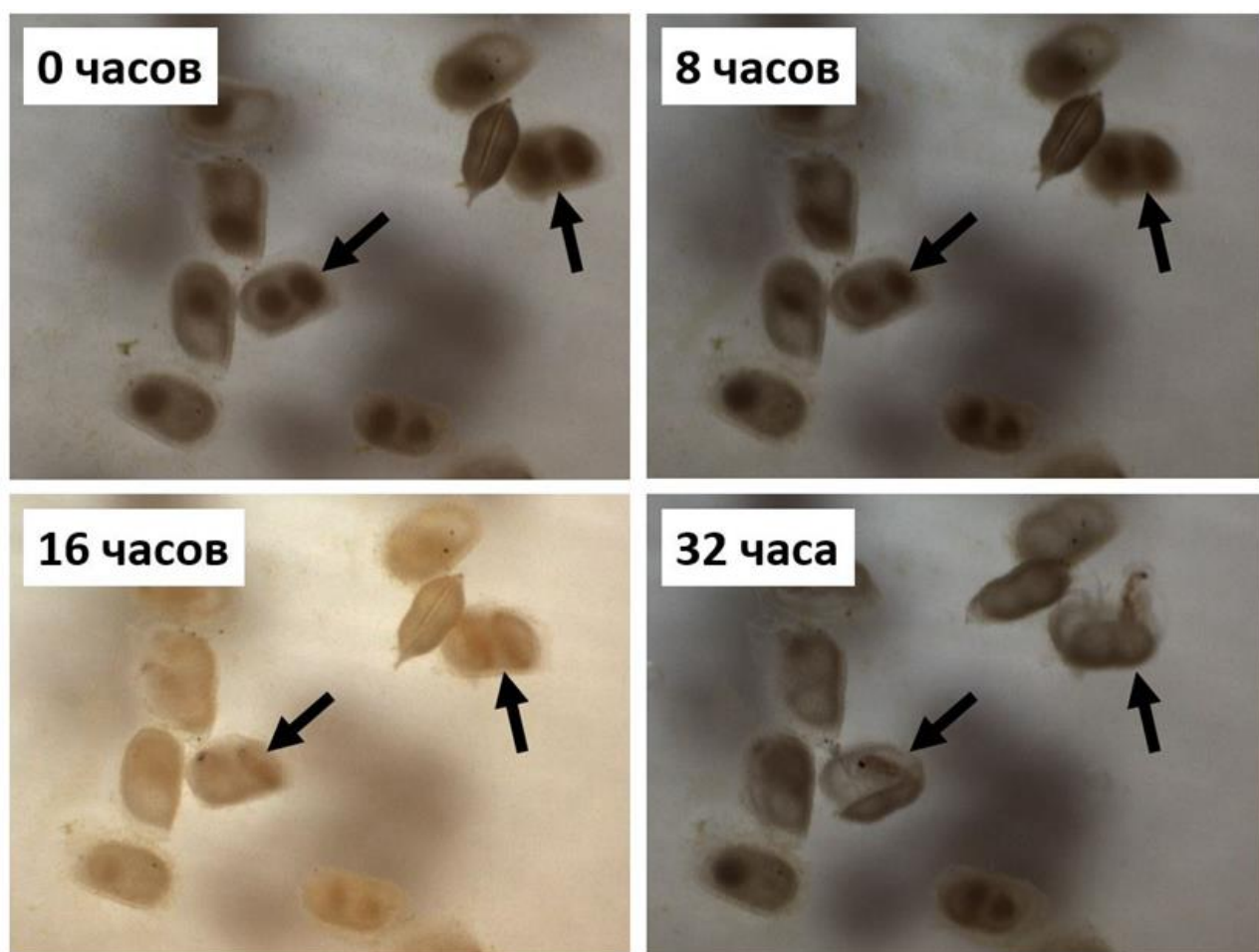


Рисунок 2. Внешний вид и состояние эмбрионов *M. macroscopa* внутри эфиппидального яйца во время реактивации. Стрелки указывают на яйца, из которых через 32 часа после начала реактивации вылупились рачки.

Для очистки поверхности яиц от токсикантов после длительного воздействия мы применили комплексную обработку яиц с помощью трилона Б. Известно, что трилон Б (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) способствует связыванию тяжелых металлов в нетоксичные комплексы (Zhang, et

al., 2017). В дальнейших экспериментах с покоящимися яйцами *M. macroscopa* и солями тяжелых металлов, перед вылуплением яйца сначала промывали дистиллированной водой, затем помещали в раствор трилона Б на 30 минут, после снова промывали водой и реактивировали. Тестовые эксперименты показали, что после такой обработки вылупившиеся из яиц рачки не погибают. На второй день реактивации сменяли воду на свежеприготовленную, далее меняли воду каждый третий день. С контрольным образцом проводили манипуляции аналогичные опытным.

2.2.6. Условия индивидуального культивирования рачков

Для экспериментов с одиночными животными во время массовой реактивации яиц (второй-третий день) отбирали 20 рачков одной размерной группы (0.45-0.65 мм). Индивидуальное культивирование проводили в стаканах емкостью 50 мл. В каждый стакан наливали 20 мл среды с количеством корма 200000 клеток/мл. Стаканы с животными помещали в климатический шкаф с постоянными температурой 25°C и фотопериодом 16 часов свет, 8 часов темнота. Каждый день среду в стаканах меняли на свежеприготовленную. Длину тела измеряли от вершины головы до конца створок панциря при 16 кратном увеличении с помощью бинокулярного микроскопа МБС 9. Длину тела измеряли в первые сутки и за сутки до отрождения самками первой кладки. Отмечали время отрождения первой кладки, продолжительность жизни. Подсчитывали количество отрожденных кладок ($N_{кл}$) и потомков ($N_{п}$). На основании полученных данных рассчитывали удельную скорость ювенильного роста, чистую скорость воспроизводства, скорость роста популяции.

Удельную скорость ювенильного роста (g) рассчитывали по формуле:

$$g = \frac{(\ln L_{fin} - \ln L_0)}{t}, \quad (1)$$

где, L_{fin} – длина тела, измеренная за 1 день до отрождения первой кладки, мм; L_0 – длина тела в первый день жизни, мм; t – время между измерениями, сут.

Чистую скорость воспроизводства (R_0) рассчитывали по формуле:

$$R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x \cdot m_x, \quad (2)$$

где, l_x – доля животных, доживших до времени x ; m_x – средняя плодовитость самок в возрасте x .

Плодовитость (F) определяли, как среднее количество потомков отрожденных самкой. Продолжительность жизни (L) определяли, как разницу между датой реактивации и датой смерти.

Скорость роста популяции (r) рассчитывали на основе итерационного решения уравнения Эйлера-Лотки:

$$\sum_{x=0}^{\infty} e^{-rx} \cdot l_x \cdot m_x = 1 \quad (3)$$

2.3. Оценка устойчивости рачков и покоящихся яиц *Moina macroscora* к воздействию тяжелых металлов

В работе использовали соли тяжелых металлов $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 . При приготовлении растворов тяжелых металлов и искусственных донных отложений с заданной концентрацией металла использовали стоковые концентрированные растворы и их разведения. Для оценки надежности методики на основе разведений, концентрации металлов в водных

растворах и донных отложениях определяли в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН (Красноярск). Ожидаемая в результате разведений стокового раствора и измеренная концентрация металлов во всех экспериментах были схожи (Рисунок 3), что говорит о надежности применяемых методик.

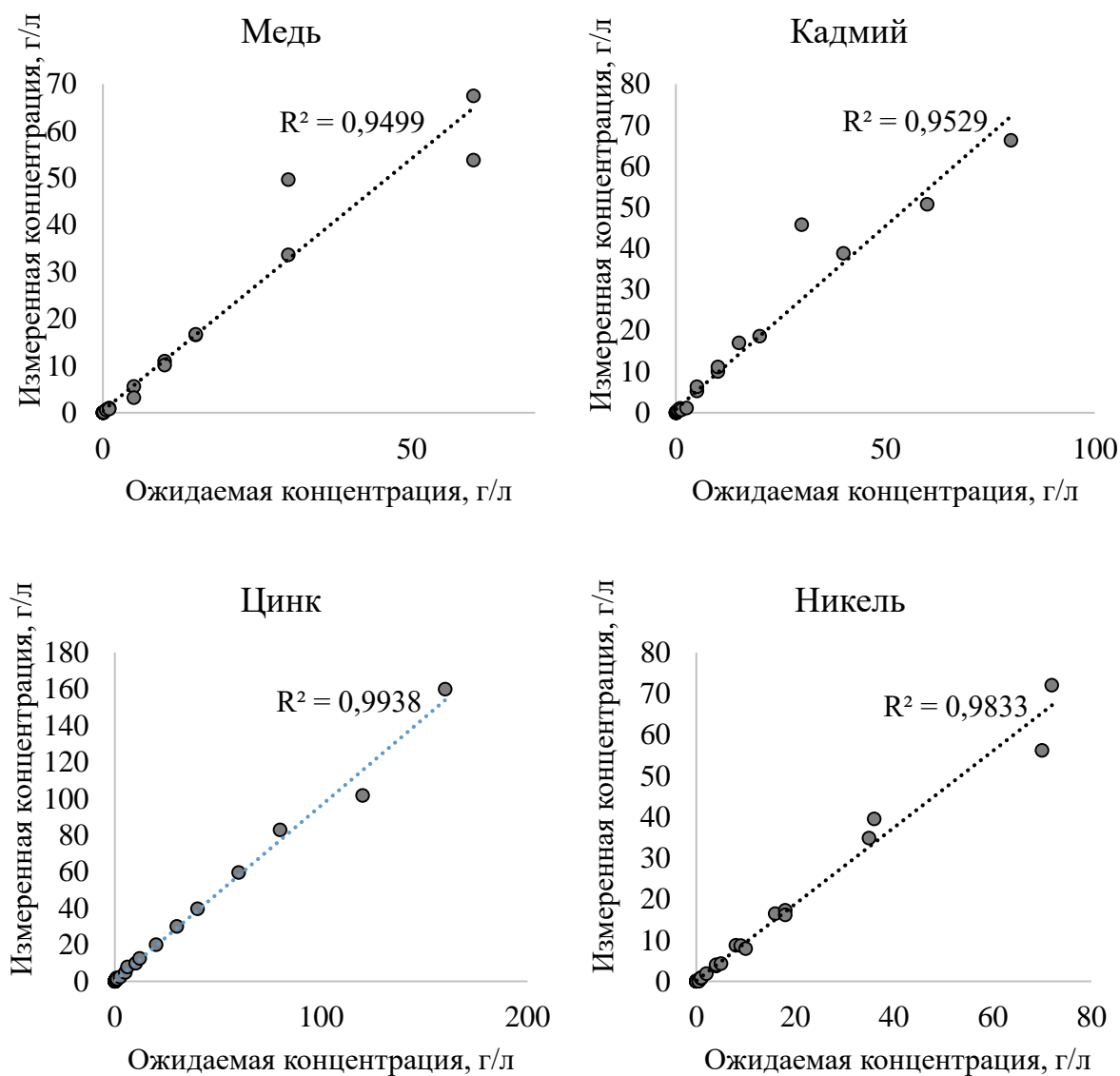


Рисунок 3. Соотношение измеренной и ожидаемой концентраций тяжелых металлов в экспериментах.

2.3.1. Определение полулетальных (за 24 и 48 часов) концентраций тяжелых металлов для рачков *M. macroscopa*

Острая токсичность вещества определяется смертностью тест-объекта за определенный период времени воздействия токсичного вещества. При определении острой токсичности выявляли полулетальные концентрации (ЛК₅₀). ЛК₅₀ за 24 и 48 часов подразумевает такую концентрацию вещества, при которой за 24 и 48 часов воздействия погибает 50% подопытных животных (Гост ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06).

При выявлении остро-токсичной концентрации солей тяжелых металлов на активную стадию *M. macroscopa* использовали синхронизированную культуру (Гост ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06). Для получения синхронизированной культуры *M. macroscopa* отбирали несколько (3-5 особей) ювенильных самок которых помещали в оптимальные для роста и партеногенетического размножения условия. На третий день из них выбирали одну самку с наибольшим количеством партеногенетических зародышей в выводковой камере. Далее ожидали, когда самка отродит первую кладку, отрожденных потомков помещали в отдельные стаканы в оптимальные условия. Получали новое поколение, которое использовали в экспериментах на острую и хроническую токсичность. Согласно государственному стандарту (Гост ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06) такая культура рачков весьма однородна по генетическому составу, особи в ней приступают к размножению одновременно, растут одинаково, и одинаково реагируют на химические и физические изменения окружающей среды.

Предварительно, для каждого металла подготавливали маточный раствор с концентрацией 0.5 г токсиканта/л дистиллированной воды. Опытные растворы получали добавлением рассчитанного количества маточного раствора на требуемый объем воды. Для оценки надежности разбавлений проводили контрольные замеры концентраций в опытных растворах при помощи эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой серии iCAP 6300 Duo

ICP-OES (Thermo Scientific, England, 2010), по методике EPA 200.7 (2001) в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН.

При определении остро-токсичной дозы использовали по 10 самок *M. macroscopa* возрастом не более суток, для каждой исследуемой концентрации солей тяжелых металлов. Рачков помещали в отдельные стаканы с 20 мл отстоянной водопроводной воды без корма с добавкой солей тяжелых металлов. Культивирование проводили в климатическом боксе, где готовилась синхронизированная культура, с температурой 25°C и фотопериодом 16 часов свет и 8 часов темнота. В острых тестах фиксировали количество мертвых самок через 24 и 48 часов. Острые тесты проводились в трех повторностях.

2.3.2. Оценка влияния тяжелых металлов на параметры жизненного цикла активной стадии рачков *M. macroscopa*

При оценке влияния солей тяжелых металлов на живых рачков *M. macroscopa* использовали полулетальные концентрации за 48 часов, их разбавления и контроль. Маточные и опытные растворы готовили аналогично экспериментам по определению полулетальных концентраций (см. раздел 2.3.1).

Для каждой концентрации тестировали по 20 самок из синхронизированной культуры. Рачков культивировали индивидуально по методике, подробно описанной в разделе 2.2.6, с добавлением в среду солей тяжелых металлов. Каждый эксперимент включал контроль, в котором использовалась среда без токсикантов. Эксперимент вели до гибели всех животных в опытных и контрольных группах. В ходе эксперимента собирали данные о жизненном цикле рачков согласно описанию в разделе 2.2.6.

2.3.3. Воздействие водных растворов тяжелых металлов на покоящиеся яйца *M. macroscopa*

Покоящиеся яйца инкубировали в водных растворах солей тяжелых металлов ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2) в течение 30 дней в темноте при температуре 4°C . Использовали концентрации от максимально-возможных при растворении до 48 часовой полуметальной дозы для активных стадий рачков. Соли тяжелых металлов растворяли в культивационной воде без корма. В контрольном образце использовали культивационную воду без добавления корма и солей тяжелых металлов. Концентрации металлов в опытных образцах измеряли методом пламенной атомно-адсорбционной спектрометрии на атомно-адсорбционном спектрометре Квант 2А в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН (Таблица 1).

Таблица 1. Концентрации тяжелых металлов в водных растворах (г/л) в экспериментах по оценке устойчивости покоящихся яиц.

Металл №	Cu	Cd	Ni	Zn
Контроль	0.003	0.002	0.001	0.024
1	0.089	0.680	0.308	2.324
2	0.802	1.140	0.715	4.836
3	3.194	6.280	4.054	9.852
4	10.134	11.090	8.774	20.030
5	16.650	18.550	16.504	39.768
6	49.554	38.800	39.520	82.880
7	53.820	66.260	72.040	160.300

Для каждой концентрации отбирали по 30-50 эфиппиумов содержащих по 2 покоящихся яйца, помещали в бюксы с растворами тяжелых металлов и контрольный образец, далее хранили в темноте при температуре 4°C . Через 30 суток эфиппиумы извлекали из растворов тяжелых металлов и реактивировали (условия реактивации описаны в разделе 2.2.5).

В период массовой реактивации (второй-третий день) для всех опытных и контрольных групп отбирали по 20 одноразмерных самок для последующего индивидуального культивирования и получения данных о параметрах жизненном цикле рачков, вылупившихся из покоящихся яиц, инкубированных в растворах солей тяжелых металлов (см. раздел 2.2.6 – условия индивидуального культивирования рачков).

2.3.4. Воздействие тяжелых металлов в искусственных донных отложениях на покоящиеся яйца *M. macroscopa*

Покоящиеся яйца помещали в искусственные донные отложения с добавкой тяжелых металлов ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 .) на длительное время (6-8 месяцев). Использовали искусственные донные отложения, изготовленные по методике (OECD, 1984) биотестов для почвенных червей. В состав донных отложений входили: измельченный торф 10%, промытый строительный песок 70%, каолин 20%. Все компоненты в сухом виде смешивали, увлажняли деионизированной водой до 35% влажности. Для оценки влажности отбирали навеску полученных донных отложений, высушивали при 105°C взвешивали перед сушкой и после. Визуально влага обнаруживалась только при сжимании полученной массы. В донных отложениях измеряли и в случае необходимости корректировали значение pH, которое, согласно методике, должно быть равно 6.0.

Соли тяжелых металлов добавляли растворенными в дистиллированной воде, с пересчетом на сухую массу грунта. В контрольный образец добавляли отстоянную водопроводную воду. По прошествии трех суток, брали навеску донных отложений для оценки концентрации солей тяжелых металлов в искусственных донных отложениях. Оценку концентраций тяжелых металлов в искусственных донных отложениях проводили химическим анализом в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН методом пламенной

атомно-адсорбционной спектрометрии на атомно-адсорбционном спектрометре Квант 2А (Таблица 2).

Закладку покоящихся яиц в донные отложения (с добавкой солей тяжелых металлов и контрольный образец) производили следующим образом:

- Небольшое количество донных отложений выкладывали на дно чашки Петри,
- Покоящиеся яйца отцеживали через квадрат мельничного газа размером 3*3 см,
- Квадрат мельничного газа размещали на донные отложения в чашку Петри,
- На мельничный газ добавляли комок донных отложений размером с горошину, для непосредственного контакта яиц с донными отложениями,
- Размещали второй квадрат мельничного газа,
- Сверху выкладывали остатки донных отложений,
- Закрывали чашку Петри крышкой и заклеивали пленкой (parafilm).

Таблица 2. Использованные в экспериментах по длительному экспонированию покоящихся яиц валовые концентрации тяжелых металлов в искусственных донных отложениях (г/кг сухого грунта).

№ \ металл	Cu	Cd	Zn	Ni
Контроль	0.0064	0.00035	0.022	0.016
1	5.60	5.30	8.00	4.40
2	11.00	17.00	12.60	8.00
3	16.60	50.70	30.00	16.20
4	33.60		59.50	37.50
5	67.40		101.20	56.20

Данный метод позволяет покоящимся яйцам контактировать непосредственно с исследуемыми донными отложениями, облегчает извлечение эфиппиумов из донных отложений после периода экспозиции (обнаруживалось от 80 до 100% внесенных эфиппиумов за 30-40 минут). Яйца в донных отложениях с добавкой токсикантов и контрольный образец экспонировали в течение 6-8 месяцев в темноте при температуре 4°C.

Через 6-8 месяцев покоящиеся яйца извлекали из донных отложений. Для этого снимали с верхнего кусочка мельничного газа слой донных отложений, перемещали верхний и нижний кусочки мельничного газа в отдельную чашку Петри, заливали небольшим количеством воды и извлекали покоящиеся яйца. Далее реактивировали покоящиеся яйца (см. раздел 2.2.5), из каждой опытной группы и контроля отбирали по 20 вылупившихся рачков для индивидуального культивирования с целью получения данных по индивидуальным параметрам жизненного цикла (см. раздел 2.2.6.).

2.3.5. Оценка биодоступности тяжелых металлов в искусственных донных отложениях

Искусственные донные отложения для проведения оценки биодоступности тяжелых металлов готовили согласно методике (OECD 1984, см. раздел 2.3.4.). Для оценки концентрации биодоступной формы металлов в искусственных донных отложениях, получали водные вытяжки тяжелых металлов по международной методике (OECD, 1993).

После приготовления искусственных донных отложений в них добавляли растворенные в дистиллированной воде соли тяжелых металлов ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 .) Для каждого тяжелого металла было приготовлено по два образца (80 грамм каждый) искусственных донных отложений – с общей ожидаемой концентрацией металла в образце 4 и 40 г/кг. Образцы хранили в течение 7 суток в темноте при температуре 4°C, что соответствует условиям эксперимента с покоящимися яйцами. После этого из каждого образца

отбирали по навеске (15 грамм) для оценки концентрации тяжелых металлов в донных отложениях и по три навески (20 грамм каждая) для приготовления водных вытяжек. Навески искусственных донных отложений, загрязненных тяжелыми металлами, для получения водных вытяжек разводили дистиллированной водой, не высушивая, в соотношении 1:4, тщательно размешивали и выдерживали 12 часов при комнатной температуре. После этого образцы перемешивали и центрифугировали при 7500G в течение 30 минут. После осаждения оценивали концентрацию тяжелых металлов в супернатанте. В исходных (загрязненных) образцах донных отложений измеряли общую концентрацию металлов. Оценку концентраций тяжелых металлов в вытяжках и искусственных донных отложениях проводили в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН методом пламенной атомно-адсорбционной спектрометрии на атомно-адсорбционном спектрометре Квант 2А.

Концентрации тяжелых металлов в грунте и в водной вытяжке представлены на Рисунке 4. Видно, что концентрации тяжелых металлов в водных вытяжках (биодоступная форма металла) меньше, чем в донных отложениях. По всей видимости донные отложения способны связывать часть добавленных соединений в нерастворимую форму.

При этом способность переходить в нерастворимую форму для разных металлов различается (Рисунок 5). Видно, что наиболее сильно в искусственных донных отложениях связывается медь. При добавке в донные отложения хлорида меди в концентрации 4 г меди на килограмм донных отложений практически весь токсикант перешел в нерастворимую форму (в водной вытяжке обнаруживается менее 1% от исходного количества). Наименьшую способность к связыванию в искусственных донных отложениях продемонстрировал никель (Рисунок 5).

Необходимо отметить, что высокая эффективность связывания тяжелых металлов и перехода их в недоступную форму может быть обусловлена не только химическими характеристиками используемых нами донных отложений, но и особенностью методики приготовления водных вытяжек.

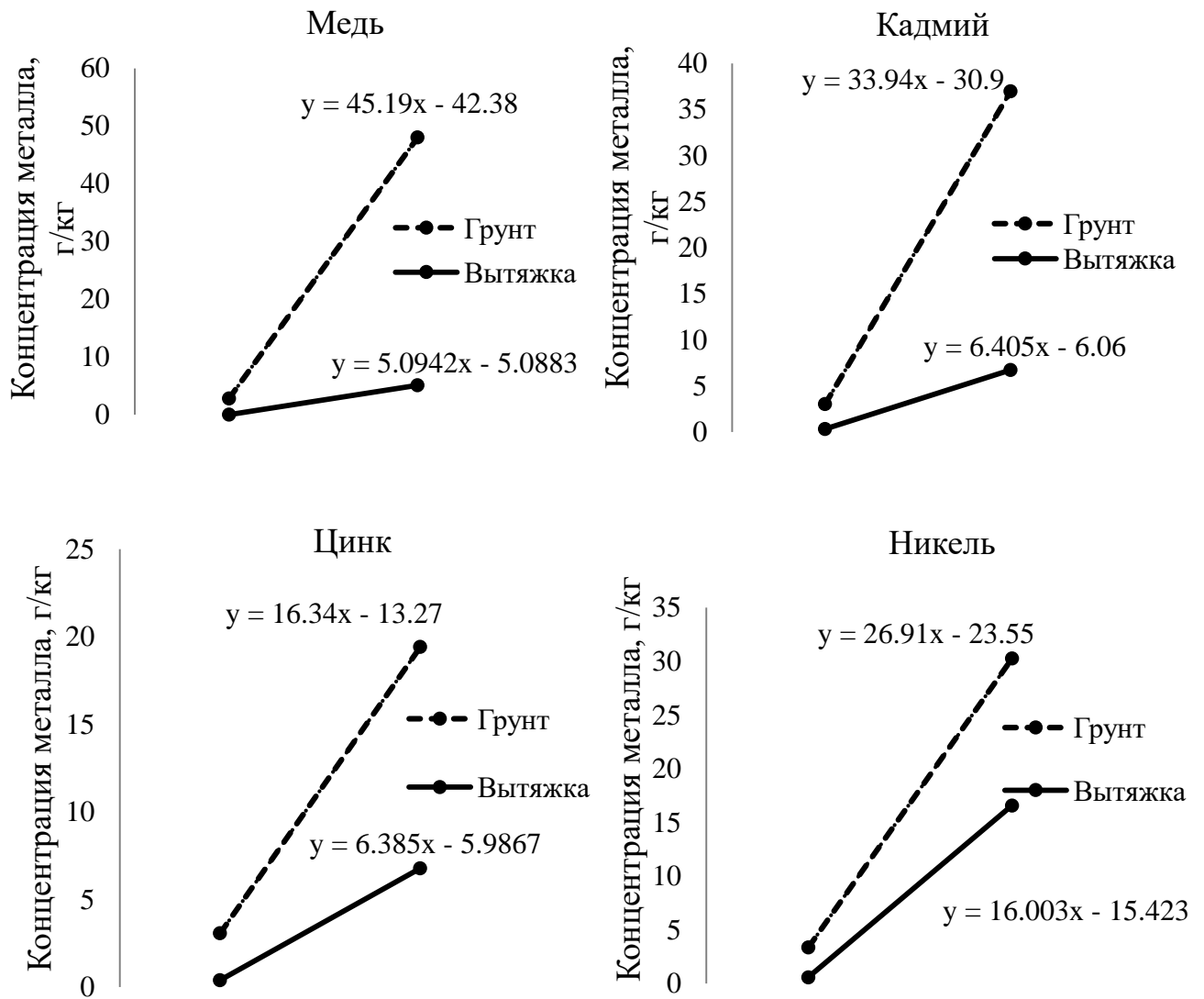


Рисунок 4. Концентрации металлов в искусственных донных отложениях и водной вытяжке.

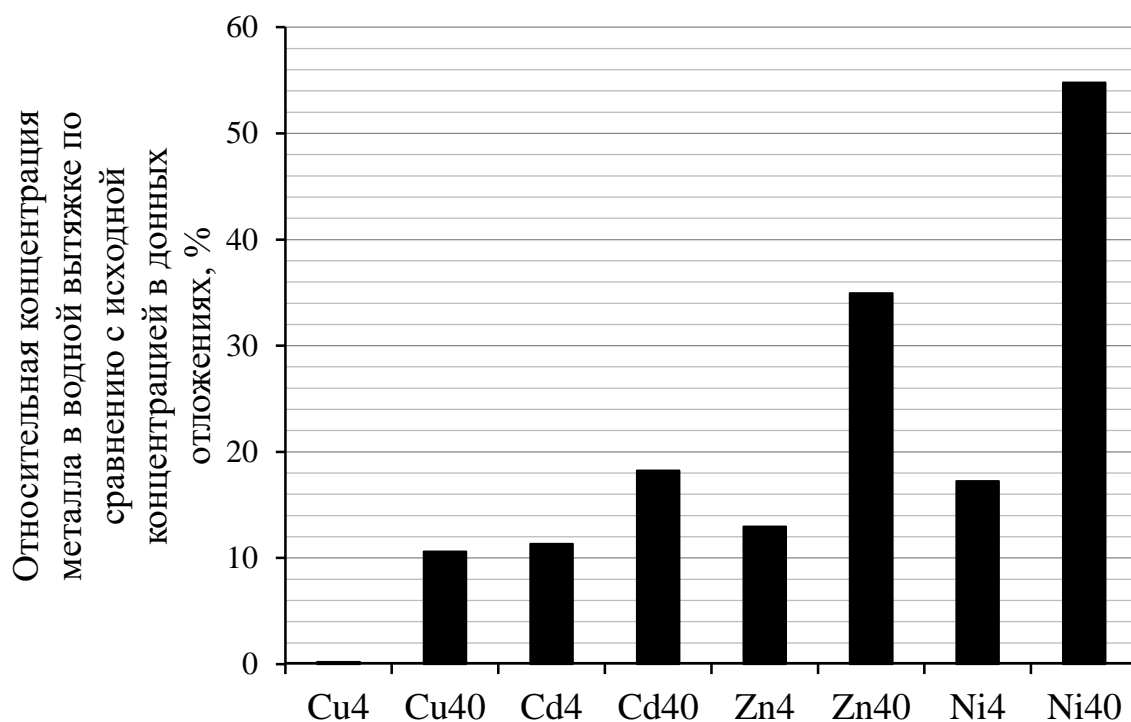


Рисунок 5. Эффективность связывания меди (Cu), кадмия (Cd), цинка (Zn) и никеля (Ni) с искусственными донными отложениями в образцах с концентрациями металла 4 и 40 г/кг донных отложений.

Ранее было отмечено, что максимум концентраций тяжелых металлов в воде при приготовлении водных вытяжек из донных отложений достигается через один час (Решетняк, Закруткин, 2016). Это позволяет нам отбросить предположение о том, что некоторые металлы могли не достичь максимума концентрации в водных вытяжках. Однако, при центрифугировании по причине воздействия центробежных сил, тяжелые металлы с большой относительной атомной массой переходят в иловый раствор, тем самым искажая данные по концентрации в вытяжке (Манихин, Никаноров, 2001). В нашем случае, при одинаковых внесенных концентрациях, содержание меди в вытяжке ниже, чем кадмия, хотя атомная масса кадмия в 2 раза выше атомной массы меди. По всей видимости различия в концентрациях тяжелых металлов в вытяжках все-таки связаны с особенностями взаимодействия искусственных донных отложений и металлов, а не искажениями метода центрифугирования.

Для оценки биодоступных концентраций тяжелых металлов в экспериментах с покоящимися яйцами в донных отложениях использовали линейные аппроксимации (Рисунок 4). Для каждой, использованной в эксперименте концентрации токсиканта (Таблица 2), была рассчитана ожидаемая биодоступная концентрация токсиканта в вытяжке.

2.6. Гамма-облучение покоящихся яиц *M. macroscopa* в состоянии глубокой диапаузы

В экспериментах использовали покоящиеся яйца, которые находились в состоянии диапаузы несколько месяцев. Облучение проводили тремя источниками гамма-излучения: 1 – частица ^{137}Cs мощностью 4.15 мГр/ч на расстоянии от частицы 1.5 см; 2 – точечный закрытый источник на основе ^{137}Cs мощностью 37.7 мГр/ч на расстоянии от частицы 15 см; 3 – промышленный высокоэффективный электронный ускоритель модель ИЛУ-6 с мощностью излучения 0.5 Гр/сек.

Применение ускорителя позволяет существенно сократить время при облучении образцов большими дозами в сравнении с использованием радионуклидного источника на основе ^{137}Cs . Так же уменьшается погрешность при наборе больших доз из-за регулировки доз временем облучения, а не расстоянием от источника при фиксированном времени облучения, которое составляет 48 ч и не может быть существенно увеличено по техническим причинам. Для набора больших доз 80-100 Гр образец размещался на малом расстоянии ~2 см от имеющегося радионуклидного источника.

Высокочастотный ускоритель электронов ИЛУ-6 генерирует импульсный поток ионизирующего излучения в отличие от непрерывного потока от радионуклидного источника. Энергия первичного пучка электронов 2.4 МэВ. Для облучения использовалось тормозное излучение, полученное конверсией импульсного пучка электронов на мишени из тантала толщиной 0.6 мм. Импульсный ток пучка электронов 320 мА, длительность отдельного импульса тормозного излучения около 0.6 мс при частоте циклов ускорения 25 Гц. Средняя

мощность дозы тормозного излучения в месте расположения образцов составила 0.5 Гр/с по данным измерений. Соответственно, менялось время облучения для получения набора доз до 200 Гр.

Спектр фотонов из конверсионной мишени содержит более жесткие, в сравнении с выделяющимися при распаде ^{137}Cs , фотоны вплоть до энергий исходного электронного пучка 2.4 МэВ. Средняя часть спектра приходится на энергии 0.5МэВ (при энергии цезиевой линии 662кэВ). Это позволяет рассматривать ускоритель с энергий исходного электронного пучка ~ 2.4 МэВ, падающего на конвертор, как источник фотонного излучения сопоставимый с ^{137}Cs . Облучение покоящихся яиц проводили в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (Новосибирск).

Использовалось два режима облучения. В первом режиме разницы накопленных доз облучения достигали за счет изменения продолжительности воздействия, во втором – за счет изменения расстояния от частицы до пробирки с покоящимися яйцами (Таблица 3).

Для облучения эфиппиумы помещали на дно пробирки Eppendorf объемом 1.5 мл, в каплю воды объемом не более 0.5 мл. В каждую пробирку закладывали по 30-50 эфиппиумов содержащих 2 неповрежденных покоящихся яйца. Таким образом, количество облученных яиц составляло 60-100 шт. Контрольный образец отбирали также как опытный, но не облучали. Облучение проводили в темноте при температуре 4°C.

Облученные покоящиеся яйца и контрольные, реактивировали в оптимальных условиях. В период максимальной активности выклева рачков (2-3 день) отбирали по 15-20 особей одной размерной группы 0.45-0.65 мм, для индивидуального культивирования и получения информации о параметрах жизненного цикла рачков (см. раздел 2.2.6).

Таблица 3. Режимы облучения для достижения различных поглощенных доз от различных источников

Источник	Расстояние до источника (см)	Продолжительность облучения	Поглощенная доза (Гр)
^{137}Cs мощностью 4.15 мГр/ч на расстоянии от частицы 1.5 см.	1.5	45ч	0.19
	1.5	95 ч.	0.39
	1.5	212 ч.	0.88
	1.5	404 ч.	1.67
	1.5	504 ч.	2.09
	1.5	570 ч.	2.37
^{137}Cs мощностью 37.7 мГр/ч на расстоянии 15 см	20.2	48 ч.	1
	14.3	48 ч.	2
	6.4	48 ч.	10
	4.5	48 ч.	20
	3.2	48 ч.	40
	2.3	48 ч.	80
	2.0	48 ч.	100
ИЛУ-6 электронный ускоритель, мощностью 0.5 Гр/с.	-	20 сек.	10
	-	40 сек.	20
	-	80 сек.	40
	-	200 сек.	100
	-	400 сек.	200

Также были проведены эксперименты для выявления популяционных эффектов облучения покоящихся яиц. Облучение покоящихся яиц производили с помощью частицы ^{137}Cs мощностью 37.7 мГр/ч при расстоянии 15 см, достигнутые дозы облучения представлены в таблице 3. Для проведения популяционных экспериментов использовали проточно-накопительный режим культивирования. Популяции развивались в стаканах объемом 600 мл с объемом культивационной среды 500 мл и концентрацией корма 200000 кл/мл среды. Обновление среды в

стаканах осуществлялось в непрерывном режиме с помощью перистальтического насоса (ISMATEC, ISM934C) со скоростью 500 мл/сутки. Среда для обновления поступала в культивационные стаканы из общего стакана объемом 5000 мл. Среда в общем стакане постоянно перемешивалась. Ежедневно в общий стакан добавляли свежеприготовленную среду.

В начале популяционных экспериментов в каждый стакан добавляли по пять самок, вылупившихся из яиц, подвергшихся облучению, которые были стартовыми для развития популяции. Для каждой дозы облучения культивировали три популяции. Каждый четвертый день во всех популяциях подсчитывали общую численность рачков, численности самок с эфиппидальными и партеногенетическими яйцами, самцов, ювенильных самок, количество сброшенных покоящихся яиц, измеряли размеры рачков для классификации их по размерным группам 0.40-0.60 мм, 0.61-0.80 мм, 0.81-1.00 мм, 1.01-1.20 мм, 1.21-1.40 мм, 1.41 мм и больше. Эксперименты длились 20 дней.

2.7. Облучение покоящихся яиц *M. macroscopa* в период реактивации

При исследовании влияния гамма-излучения на покоящиеся яйца *M. macroscopa* в период реактивации, применяли второй режим облучения (Таблица 3). Яйца облучали в оптимальных для реактивации условиях. Эфиппидумы помещали в пробирки с водой объёмом 50 мл, концентрацией корма 400000 клеток/мл, фотопериодом 16 свет и 8 часов темнота, температурой 23-25°C. Облучение начинали с момента закладки яиц в оптимальные условия. Время экспозиции составляло 48 часов. Дозы облучения варьировали от 1 до 100 Гр. Для контроля создавали идентичные условия, но без воздействия источника излучения.

К моменту завершения облучения из эфиппидумов вылуплялось около 30% яиц. Из вылупившихся к третьему дню рачков для каждой дозы облучения отбирали по 20 особей одной размерной группы (0.45-0.65 мм) для проведения индивидуальных экспериментов по исследованию параметров жизненного цикла (см. раздел 2.2.6).

2.8 Статистическая обработка данных

Полулетальные дозы тяжелых металлов в острых тестах на токсичность оценивали с помощью пакета обработки данных *drc* в программе R (Ritz et al., 2015). В тестах на хроническую токсичность с активными особями *M. macroscopa* оценивали влияние тяжелых металлов на удельную скорость роста ювенильных самок, среднюю продолжительность жизни, количество кладок и плодовитость с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Влияние концентрации металлов и дозы облучения на эффективность реактивации покоящихся яиц и чистую скорость воспроизводства оценивали при помощи корреляционного анализа между фактором воздействия и зависимой переменной.

При обработке данных по влиянию солей тяжелых металлов и гамма-излучения на параметры жизненного цикла рачков *M. macroscopa* в случае воздействия на покоящиеся яйца, была проведена проверка массива данных на нормальность. Нормальность всех данных оценивали при помощи коэффициента асимметрии, эксцессу, по критериям Колмагорова-Смирнова и Шапиро-Уилка, по описанию распределения данных кривой Гаусса, ящичной диаграммой. Считали, что данные распределены нормально если ненормальность распределения проявлялась не более чем в одном методе оценки. В результате обнаружено, что большинство выборок имеют ненормальное распределение данных. Поскольку нормальное распределение для параметров жизненного цикла наблюдалось редко, проверку статистической значимости влияния фактора воздействия (концентрация тяжелых металлов или доза гамма-облучения) на параметры проводили при помощи критерия Краскела-Уоллиса.

Все статистические расчеты проводили в программе STATISTICA 8.0.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение полуметальных концентраций тяжелых металлов для ювенильных самок *M. macroura* в острых опытах на токсичность

В тестах на определение острой токсичности выживаемость ювенильных самок снижалась с увеличением концентрации тяжелых металлов в среде. Для всех протестированных концентраций доля выживших животных в 24-часовом (Рисунок 6) тесте была больше, чем в 48-часовом тесте (Рисунок 7).

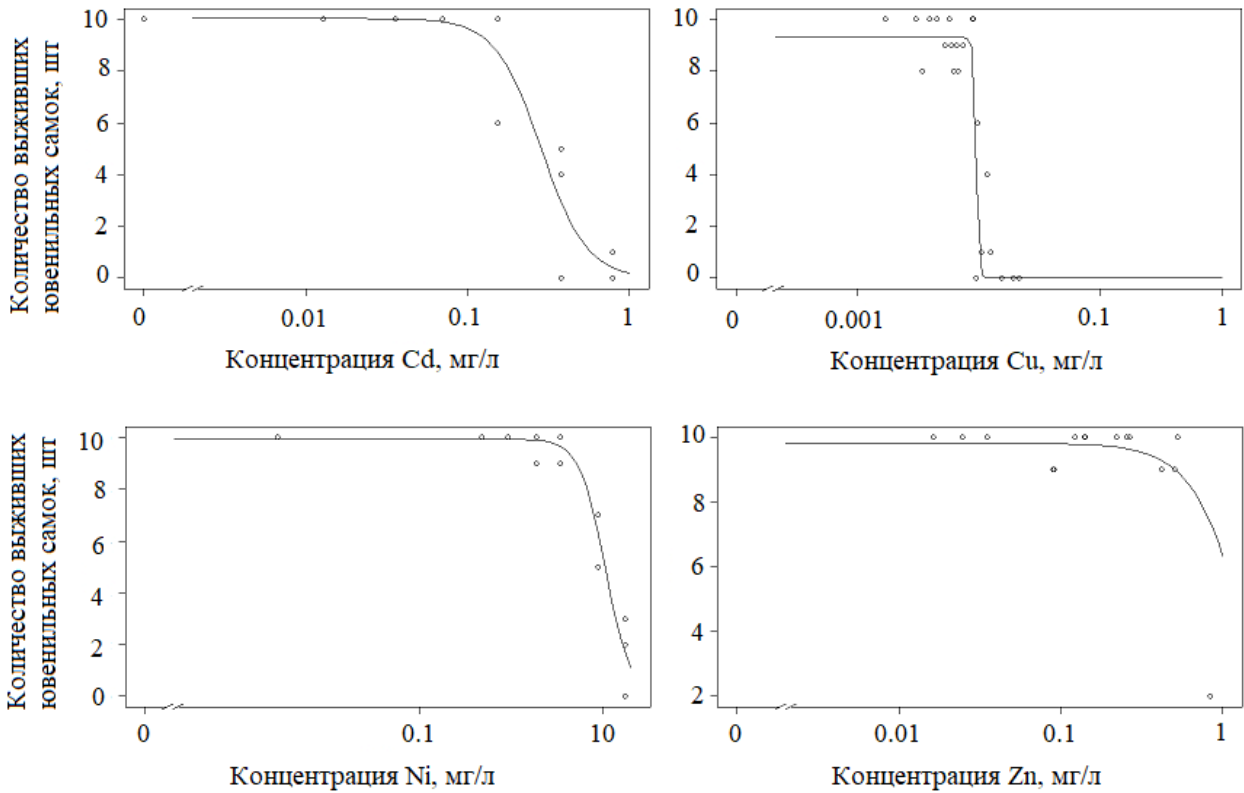


Рисунок 6. Влияние тяжелых металлов на выживаемость ювенильных самок *M. macroura* в тесте на определение острой токсичности через 24 часа воздействия токсиканта.

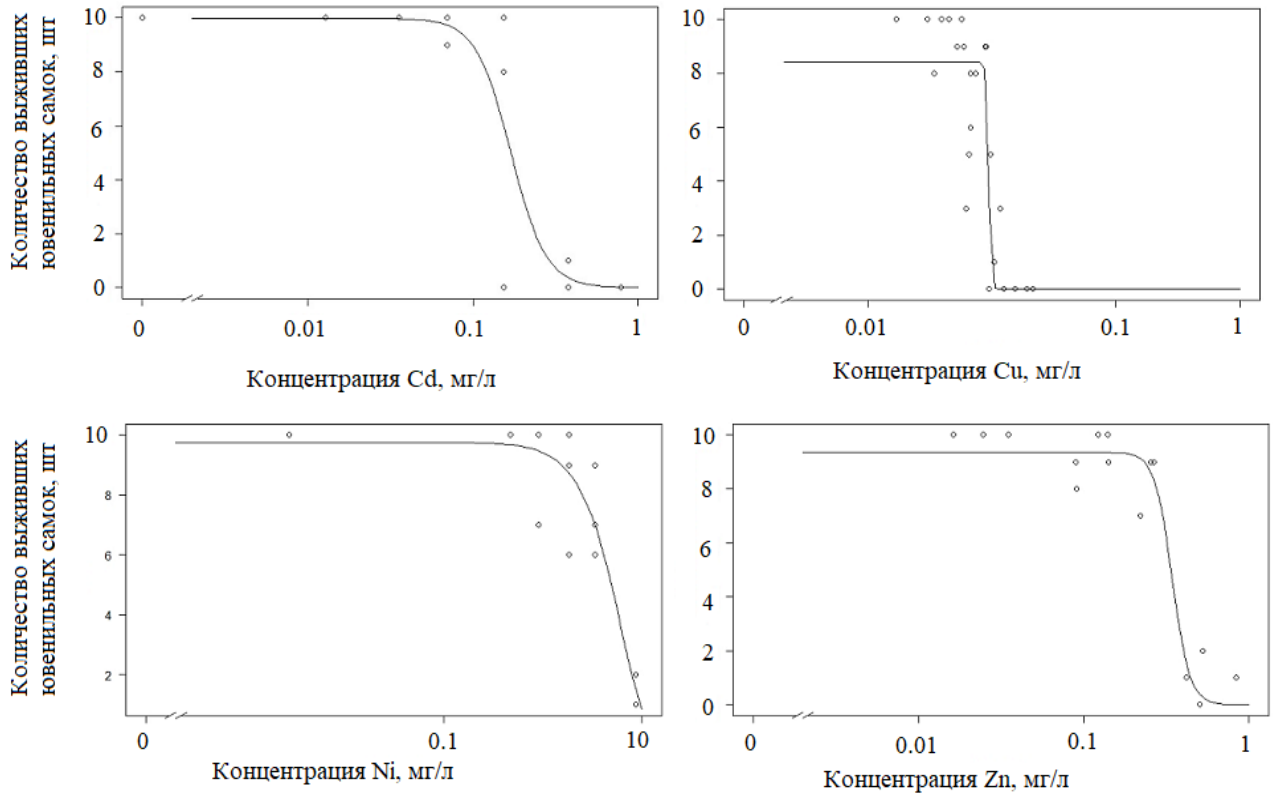


Рисунок 7. Влияние тяжелых металлов на выживаемость ювенильных самок *M. macroscora* в тесте на определение острой токсичности через 48 часов воздействия токсиканта.

На основании результатов тестов на определение острой токсичности была определена полулетальная концентрация выбранных металлов для ювенильных самок *M. macroscora*. Наибольшей токсичностью обладала медь (Рисунок 8). Далее по убыванию степени токсичности металлы расположились в следующем порядке $Cd > Zn > Ni$. Для меди полулетальные концентрации в 24 и 48 часовых тестах не различались. Полулетальные концентрации для кадмия и никеля для 48 часового теста снижались вдвое по сравнению с 24 часовым тестом. Полулетальная концентрация цинка в 24 часовом тесте была в 3.5 раза выше, чем в 48 часовом тесте.

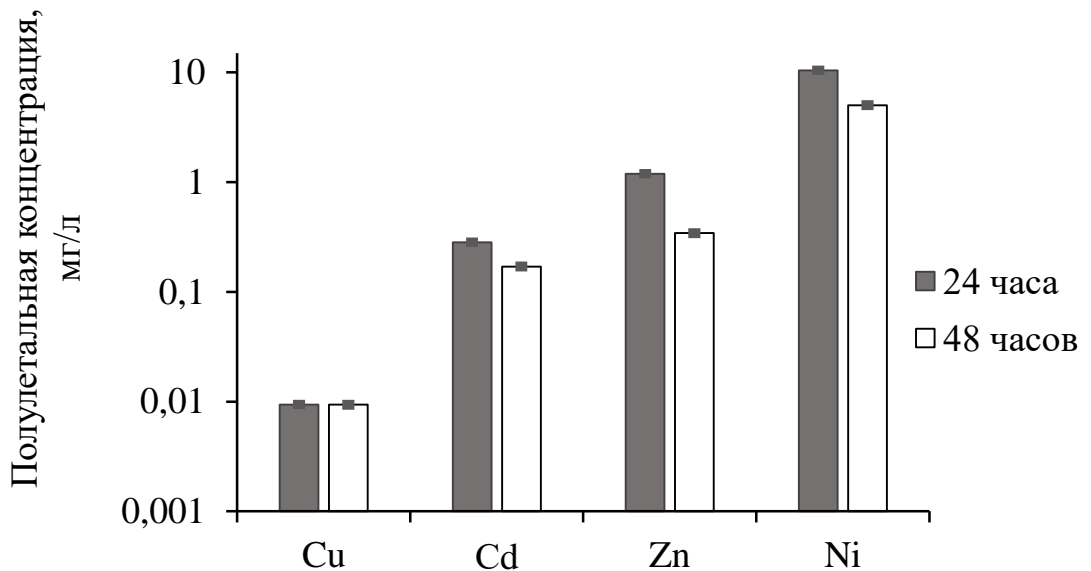


Рисунок 8. Полулетальные концентрации (LC_{50}) меди (Cu), кадмия (Cd), цинка (Zn) и никеля (Ni) для ювенильных самок *M. macroscopa* в острых тестах на токсичность.

Полулетальные концентрации выбранных тяжелых металлов для *M. macroscopa* оценивались и ранее (Таблица 4). Однако, для приготовления растворов авторами применялись различные соединения тяжелых металлов. Так, например, полулетальная концентрация кадмия в 48-часовом тесте, полученная при применении $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ (Таблица 4, Hatakeyama, Yasuno, 1981), на порядок меньше, чем полученная нами полулетальная концентрация с использованием $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ (Таблица 4, наши данные). В экспериментах с использованием меди обнаружено, что при применении соединения $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Таблица 4, наши данные) полулетальная концентрация металла была на порядок ниже, чем при применении $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Таблица 4, Wong, 1992). В тоже время токсичность цинка при применении $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Таблица 4, Wong, 1993) и $ZnCl_2$ (Таблица 4, наши данные) были сопоставимы.

Сравнение наших и литературных данных показывает, что степень токсичности меди снижается при добавлении корма. Полулетальная концентрация в 24 часовом тесте при наличии в среде $1 \cdot 10^6$ клеток *Chlorella vulgaris*/мл была в 70 раз выше, чем при проведении опыта в отсутствии корма (Таблица 4, Nandini et al.,

2007 и наши данные). Однако приведенные здесь же данные по цинку, также при проведении эксперимента с кормом, сопоставимы с нашими данными (Таблица 4).

Таблица 4. Сравнение литературных и полученных в наших экспериментах значений полулетальных концентраций тяжелых металлов для ювенильных самок *M. macroscora*

Металл	ЛК ₅₀ / 24ч (мг/л)	ЛК ₅₀ / 48ч (мг/л)	Источник данных
Cu	0.009±0.0002	0.009±0.0002	Наши данные
	0.090	0.080	Wong, 1992
	0.71±0.02 (с кормом)	-	Nandini et al., 2007
Cd	0.284±0.030	0.17±0.02	Наши данные
	0.218	0.013	Pokethitiyook et al., 1987
	-	0.071	Hatakeyama, Yasuno 1981
Zn	1.20±0.18	0.34±0.02	Наши данные
	2.04	1.17	Wong et al., 1991
	1.01±0.063 (с кормом)	-	Nandini et al., 2007
	2.04	1.17	Wong, 1992
Ni	10.41±0.52	5.01±0.58	Наши данные
	2.20	0.46	Pokethitiyook et al., 1987
	23.59	6.48	Wong, 1992

Можно сделать следующее заключение. На острую токсичность металлов даже для одного и того же вида ветвистоусых ракообразных большое влияние оказывают условия проведения экспериментов. В обзорной работе Paiva et al. (2015) отмечается, что понимание механизмов токсичности металлов в водных экосистемах сложная задача из-за влияния многих химических и биологических факторов. В частности, на токсичность металлов влияют ионный состав и pH среды, концентрация корма в среде, физиологическое состояние используемых организмов. При этом, даже в случае различающихся между собой значений

полулетальных концентраций относительная токсичность металлов, определенная в разных тестах, совпадает – медь является самым токсичным из исследованных металлов, далее по убыванию токсичности располагаются кадмий, цинк и никель. В целом ювенильные самки *M. macroscopa* крайне чувствительны к действию тяжелых металлов.

3.2. Влияние хронического воздействия тяжелых металлов на параметры жизненного цикла самок *M. macroscopa*

Негативный эффект хронического воздействия тяжелых металлов проявлялся на всех параметрах жизненного цикла *M. macroscopa* кроме удельной скорости роста в эксперименте с кадмием (Таблица 5). Наиболее чувствительными к хроническому воздействию солей тяжелых металлов оказались репродуктивные параметры. Для всех металлов с увеличением концентрации наблюдалось снижение количества отрожденных кладок. Чистая скорость воспроизводства также снижалась с увеличением концентрации металлов в среде. Концентрация поллютантов при которой чистая скорость воспроизводства снижалась вдвое составила: для Cu – 0.007 мг/л, Cd – 0.005 мг/л, Zn – 0.25 мг/л, Ni – 0.25 мг/л.

Такие низкие концентрации токсикантов при которых чистая скорость воспроизводства рачков снижается вдвое свидетельствуют о тяжелых последствиях для популяций *M. macroscopa* даже при незначительном загрязнении водоемов тяжелыми металлами. Высокая чувствительность репродуктивных параметров *M. macroscopa* к действию тяжелых металлов, была отмечена в исследованиях Вонга (1993). Самки *M. macroscopa* переставали размножаться при хроническом воздействии меди (более 0.15 мг/л), никеля (более 1.50 мг/л). Чистая скорость воспроизводства снижалась при концентрациях 0.08 мг Cu/л; 0.5 мг Ni/л; 0.7 мг Zn/л (Wong, 1993).

Таблица 5. Влияние тяжелых металлов (Me) на продолжительность жизни (L), удельную скорость ювенильного соматического роста (g), количество отрожденных кладок ($N_{кл}$), плодовитость (F) самок *M. macroscora*, среднее значение \pm стандартное отклонение.

Me, мг/л	L, сутки	g, 1/день	$N_{кл}$, штук	F, потомков/самку
Медь				
Контроль	13.5 \pm 0.6	0.35 \pm 0.01	5.1 \pm 0.6	41.8 \pm 5.4
0.005	12.7 \pm 1.3	0.34 \pm 0.01	4.9 \pm 0.7	47.3 \pm 6.7
0.006	12.5 \pm 1.0	0.31 \pm 0.01*	4.7 \pm 0.4	50.7 \pm 5.1
0.007	5.9 \pm 0.9*	0.23 \pm 0.01*	0.7 \pm 0.3*	7.0 \pm 3.3*
0.008	2.9 \pm 0.7*	0.16*	0.1 \pm 0.1*	0.1 \pm 0.1*
ANOVA	F(4.45)=25.62 p<0.0001	F(4.33)=25.37 p<0.0001	F(4.45)=26.85 p<0.0001	F(4.45)=25.98 p<0.0001
Кадмий				
Контроль	13.0 \pm 0.7	0.20 \pm 0.01	5.4 \pm 0.4	53.4 \pm 4.1
0.001	13.4 \pm 1.1	0.25 \pm 0.01	5.6 \pm 0.7	58.9 \pm 7.2
0.002	12.5 \pm 0.9	0.23 \pm 0.02	3.9 \pm 0.5*	33.2 \pm 3.1*
0.004	10.0 \pm 1.1*	0.25 \pm 0.01	2.5 \pm 0.3*	21.4 \pm 1.9*
0.008	7.9 \pm 0.6*	0.25 \pm 0.02	1.8 \pm 0.3*	17.8 \pm 2.8*
ANOVA	F(4.45)=7.03 p<0.0001	F(4.45)=1.83 p=0.14	F(4.45)=12.95 p<0.0001	F(4.45)=19.12 p<0.0001
Цинк				
Контроль	9.0 \pm 0.9	0.28 \pm 0.01	2.7 \pm 0.6	36.6 \pm 9.2
0.05	8.1 \pm 1.3	0.22 \pm 0.03	2.7 \pm 0.9	38.2 \pm 12.2
0.08	10.5 \pm 0.3	0.25 \pm 0.01	3.1 \pm 0.3	47.2 \pm 4.7
0.14	9.4 \pm 0.3	0.24 \pm 0.01	2.7 \pm 0.4	34.2 \pm 3.2
0.29	4.8 \pm 0.6*	0.17 \pm 0.02*	0.2 \pm 0.1*	2.6 \pm 1.8*
0.56	3.0 \pm 0.3*	0.09 \pm 0.02*	0.0*	0.0*
ANOVA	F(5.54)=16.18 p<0.0001	F(5.44)=6.96 p<0.0001	F(5.54)=7.90 p<0.0001	F(5.54)=8.90 p<0.0001
Никель				
Контроль	14.6 \pm 0.8	0.28 \pm 0.01	7.3 \pm 0.4	58.4 \pm 4.9
0.04	12.0 \pm 0.8	0.26 \pm 0.01	5.7 \pm 0.6	43.3 \pm 4.2*
0.08	10.2 \pm 0.8*	0.25 \pm 0.01	4.5 \pm 0.6*	31.9 \pm 4.7*
0.16	12.0 \pm 0.5	0.26 \pm 0.01	4.9 \pm 0.6*	37.2 \pm 4.5*
0.32	7.9 \pm 0.8*	0.24 \pm 0.02	2.8 \pm 0.3*	19.8 \pm 2.0*
0.64	4.8 \pm 0.3*	0.16 \pm 0.01*	0.6 \pm 0.2*	2.7 \pm 1.1*
ANOVA	F(5.53)=24.40 p<0.0001	F(5.53)=8.67 p<0.0001	F(5.54)=22.75 p<0.0001	F(5.54)=25.02 p<0.0001

* - разница между контролем и опытом достоверна.

Ранее при оценке последствий хронического воздействия кадмия на самок *M. macroscopa*, было показано, что концентрация 0.001 мг/л не оказывает хронических эффектов на рачков. Существенное снижение репродуктивных параметров наблюдается только при концентрации кадмия 0.005 мг/л (Wong, Wong, 1990), что сопоставимо с нашими данными.

Для оценки экологической значимости полученных значений полулетальных и полуэффективных концентраций тяжелых металлов мы сравнили их с предельно-допустимыми концентрациями (ПДК) этих же металлов для рыбохозяйственных водоемов из приказа от 13 декабря 2016 года N 552 «Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 12 октября 2018 года)» (Рисунок 9).

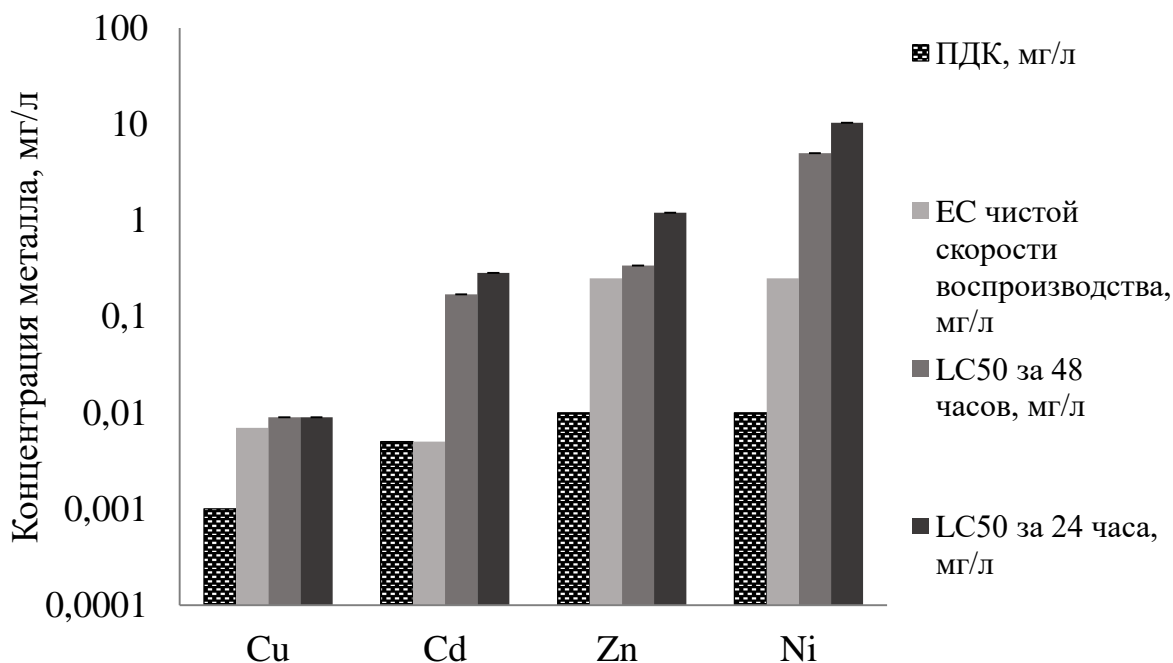


Рисунок 9. Сравнение полулетальных (ЛК50 за 48 часов, Лк50 за 24 часа) и полуэффективной по чистой скорости воспроизводства (ЭК₅₀) концентраций для активных рачков *M. macroscopa* с предельно-допустимыми концентрациями тяжелых металлов для пресных вод рыбохозяйственных водоемов (ПДК).

Обнаружено, что ПДК ниже полулетальных концентраций исследуемых металлов для активных рачков *M. macroscopa*, (Рисунок 9). Полуэффективная концентрация по показателю чистая скорость воспроизводства при хроническом воздействии для кадмия сопоставима с ПДК. Чистая скорость воспроизводства при хроническом воздействии меди, цинка и никеля снижается вдвое при концентрациях на порядок выше ПДК.

Токсикологическое обоснование ПДК для рыбохозяйственных водоемов представляет собой систему биологических тестов, проведенных на представителях всех групп водных организмов (от бактерий до рыб), с учетом особенностей предпочитаемых мест обитания (планктон, нектон, бентос). Таким образом ПДК для рыбохозяйственных водоемов учитывает допустимые концентрации загрязнения не для рыб, а для всей водной экосистемы в целом (Соколова, 2011).

Устойчивость активных рачков *M. macroscopa* к действию тяжелых металлов, может быть сопоставима с другими обитателями пресных вод, а может и значительно отличаться. Например, для близкородственной *Daphnia magna* полулетальные концентрации кадмия за 48 часов составили 0.17 мг/л, цинка – 0.41 мг/л (Teodorovic et al., 2009) никеля за 24 часа – 10.64 мг/л (Seco et al., 2003), что сопоставимо с нашими данными (Таблица 5). Полулетальные концентрации металлов за 24 часа для инфузорий видов *Dexiotricha granulosa*, *Colpidium colpoda*, *Euplotes aediculatus*, *Halteria grandinella* были в диапазонах Cd: 0.03-1.26 мг/л, Cu: 0.004-0.18 мг/л, Ni: 0.01-1.62 (Madoni, Romeo, 2006). Для пресноводной рыбки *Zacco barbata* полулетальная концентрация меди за 24 часа составила 0.13 мг/л, кадмия – 2.598 мг/л (Shyong, Chen, 2000). Более устойчивы к тяжелым металлам были головастики жабы *Bufo melanostictus*, полулетальные концентрации за 24 часа: Cu – 0.843 мг/л, Cd – 19.81 мг/л, Zn – 47.26 мг/л, Ni – 53.21 (Khangarot, Ray, 1987). Чувствительность организмов к влиянию тяжелых металлов различна, и для разработки нормативов по предельно-допустимым концентрациям необходимо оценивать разные группы организмов. Для разработки же методов биотестирования необходим поиск

наиболее чувствительных представителей биоты, для определения наиболее безопасного уровня загрязнения среды.

Наши оценки полулетальных и полуэффективных доз тяжелых металлов для рачка *M. macrocopa* показывают, что ПДК для рыбохозяйственных водоемов в целом можно использовать для оценки опасности загрязненных вод для ветвистоусых ракообразных, так как значения ПДК ниже или сопоставимы (для кадмия) с нашими экспериментальными значениями и данными литературных источников.

3.3. Влияние нахождения покоящихся яиц *M. macrocopa* в водных растворах тяжелых металлов на их способность к реактивации и параметры жизненного цикла вылупившихся рачков

Нахождение покоящихся яиц в растворах тяжелых металлов в течение 30 суток не повлияло на способность покоящихся яиц к реактивации. Эффективность реактивации опытных групп рачков была сопоставима с контрольными (Рисунок 10).

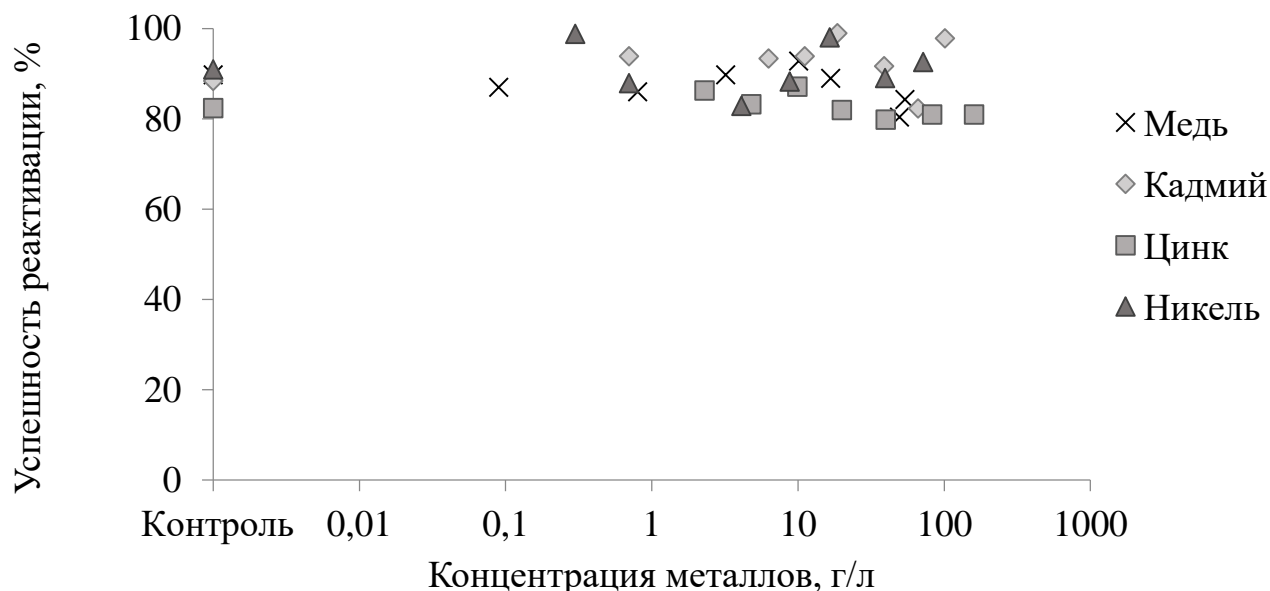


Рисунок 10. Успешность реактивации покоящихся яиц после контакта с растворами тяжелых металлов в течение 1 месяца.

Ранее было показано, что покоящиеся яйца *M. macroscopa* сохраняют свою жизнеспособность после нахождения в растворе меди (500 мг/л) в течение 100 дней (Alekseev et al., 2010). В наших экспериментах продолжительность воздействия была в три раза ниже, но концентрации металлов были выше в сотни раз.

При исследовании параметров жизненного цикла рачков, которые вылупились из яиц, подверженных воздействию тяжелых металлов, не было обнаружено отличий между ними и контрольной группой животных. В частности, продолжительность жизни рачков, вылупившихся из яиц подверженных воздействию водных растворов солей тяжелых металлов в течении одного месяца (Рисунок 11а), была сопоставима с контрольными группами (Таблица 6), что свидетельствует об отсутствии влияния фактора на этот параметр. Важно отметить, что для ювенильных самок полувзрослые концентрации этих же металлов были в миллионы раз меньше. То есть эмбрионы в состоянии диапаузы, находясь в оболочке эфиппидального яйца, надежно защищены от воздействия тяжелых металлов. Скорость роста тела (Рисунок 11б; Таблица 6), количество отрожденных кладок (Рисунок 11в; Таблица 6), количество отрожденных потомков (Таблица 6), а также чистая скорость воспроизводства (Рисунок 11г), также были сопоставимы с контрольными группами. Для некоторых параметров жизненного цикла непараметрический критерий Краскела-Уоллиса показывает слабо значимый эффект воздействия металла (Таблица 6, например, количество отрожденных потомков в случае воздействия цинка или удельная скорость ювенильного соматического роста при воздействии меди). Однако, эти эффекты не носят систематического характера (например, снижения значения параметра с ростом концентрации токсиканта) и связаны с единичными различиями между контролем и одной из используемых концентраций токсиканта. Такие различия могут быть, в частности, связаны с возможностью оболочек покоящихся яиц связывать тяжелые металлы и после выделять их в среду при реактивации рачков. Мы постарались исключить этот эффект благодаря обработке яиц (см. раздел 2.2.5 в методике), однако, остаточные эффекты все же возможны.

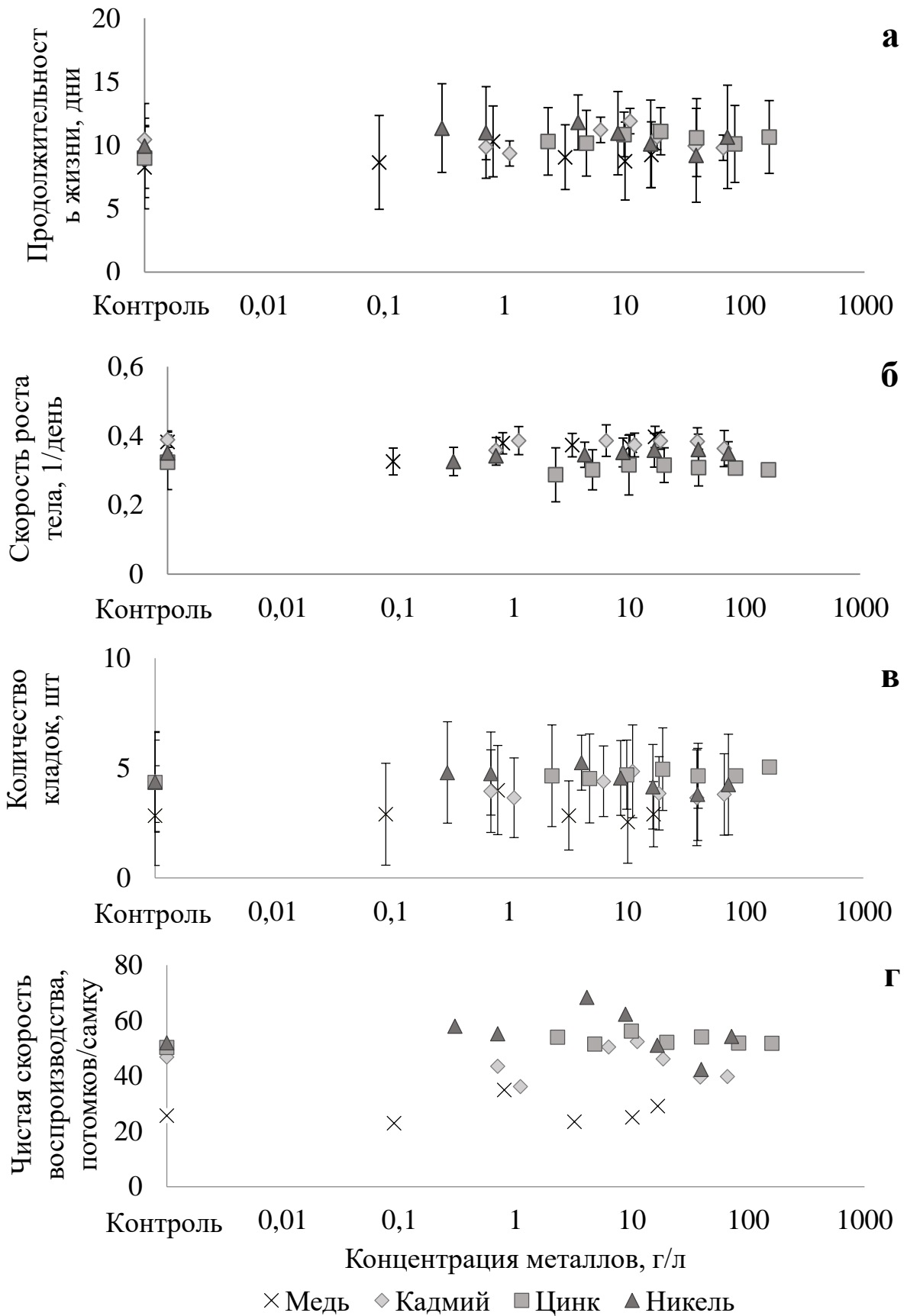


Рисунок 11. Параметры жизненного цикла рачков, вылупившихся из яиц, находившихся в контакте с растворами тяжелых металлов.

Таблица 6. Достоверность отклика параметров жизненного цикла (продолжительность жизни (L), удельная скорость ювенильного соматического роста (g), количество отрожденных кладок ($N_{кл}$), количество отрожденных потомков ($N_{п}$)) самок *M. macroscopa*, вылупившихся из покоящихся яиц, контактировавших с растворами тяжелых металлов.

Металл	L, сутки	g, 1/день	$N_{кл}$, штук	$N_{п}$, штук
Cu (N=5, n=114)	H=3.93 p=0.56	H=11.85 p=0.04	H=6.33 p=0.27	H=6.36 p=0.27
Cd (N=7, n=160)	H=10.86 p=0.14	H=13.78 p=0.06	H=6.35 p =0.49	H=8.51 p=0.29
Zn (N=7, n=158)	H=7.58 p=0.37	H=13.75 p =0.06	H=6.65 p =0.46	H=14.97 p =0.04
Ni (N=7, n=160)	H=12.01 p=0.10	H=7.96 p=0.34	H=3.30 p=0.86	H=3.89 p =0.79

Примечание Н – критерий Краскела-Уоллиса, р – уровень значимости, N – количество выборок, сравниваемых с контролем, n – количество значений в оцениваемом массиве данных.

Говоря об экологической значимости полученных результатов следует сделать одно важное уточнение. Мы исследовали последствия воздействия тяжелых металлов на покоящиеся яйца и потенциальную опасность такого воздействия на находящиеся в яйцах эмбрионы. При этом, благодаря обработке яиц перед реактивацией (см. раздел 2.2.5 в методике), мы исключили эффект того, что связавшиеся с поверхностью эфиппиума тяжелые металлы будут отравлять вылупившихся рачков. Накопление тяжелых металлов оболочками покоящихся яиц планктонных ракообразных наблюдалось и ранее (Saccasi et al., 2014). Хитин, содержащийся в оболочках яиц ракообразных, способен накапливать в себе тяжелые металлы, благодаря этим свойствам хитин применяют в приготовлении препаратов для восстановления водных объектов после загрязнения тяжелыми металлами (Wang, Chen, 2009; Pinto et al., 2011).

3.4. Влияние длительного контакта покоящихся яиц *M. macroscopa* с тяжелыми металлами в искусственных донных отложениях на их способность к реактивации и параметры жизненного цикла вылупившихся рачков

При длительном контакте покоящихся яиц с тяжелыми металлами в донных отложениях нам удалось зафиксировать летальные эффекты. Прекращение реактивации покоящихся яиц наблюдалось после контакта с донными отложениями в которых присутствовала медь в высоких концентрациях (33.6 и 67.4 г/кг сухого веса грунта). Покоящиеся яйца из этих образцов не реактивировались, внешние признаки пробуждения яиц отсутствовали. При этом донные отложения с более низкими концентрациями меди (5.6; 11 и 16 г/кг сухого веса грунта) не приводили к остановке реактивации покоящихся яиц. Донные отложения с менее токсичными кадмием, цинком и никелем в концентрациях практически до 100 г/кг не оказывали воздействия на реактивацию покоящихся яиц (Рисунок 12а).

При оценке биодоступности металлов мы обнаружили, что концентрации металлов способные переходить из искусственных донных отложений в водную вытяжку в разы меньше, чем общая концентрация внесенных в донные отложения металлов. Так, концентрация меди, рассчитанная для водной вытяжки, была в 9-17 раз меньше чем общая концентрация металла в донных отложениях, кадмия – в 5-7 раз меньше, цинка и никеля – в 2-4 раза меньше. Как было отмечено выше (см. раздел 2.5.1) различия в концентрациях металлов в водных вытяжках по всей видимости не связаны с центрифугированием водных вытяжек, поскольку относительная атомная масса кадмия (112.411 г/моль) в два раза выше меди (63.546 г/моль), а относительные атомные массы цинка (65.39 г/моль) и никеля (58.693 г/моль) близки к массе меди. Можно предположить, что низкие концентрации тяжелых металлов в водной вытяжке связаны с их переходом в водонерастворимые формы в результате взаимодействия с компонентами искусственных донных отложений (каолин, торф, песок).

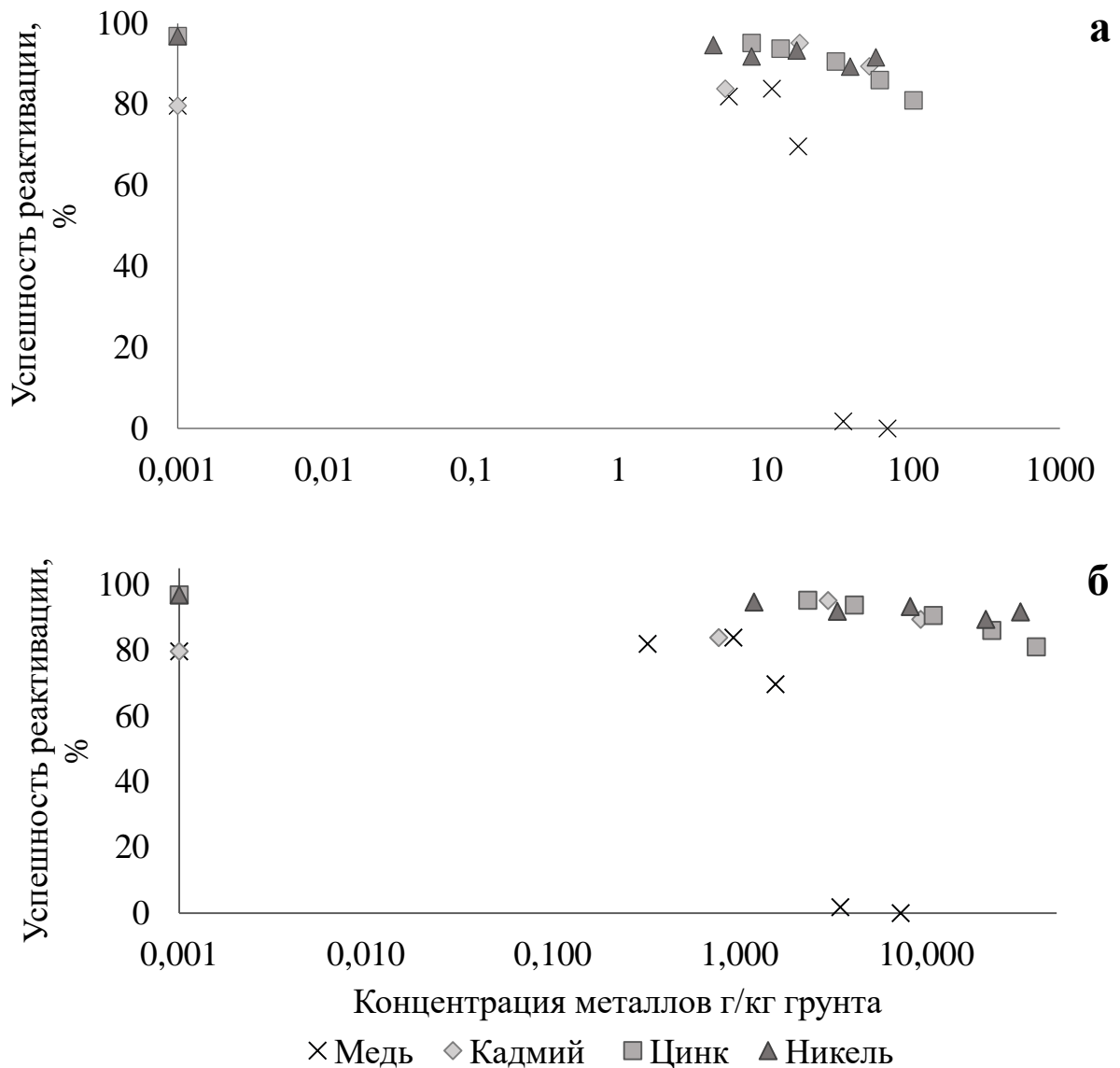


Рисунок 12. Успешность реактивации покоящихся яиц после длительного контакта с загрязненными тяжелыми металлами искусственными донными отложениями (а) – общая концентрация металлов, (б) – рассчитанная биодоступная концентрация в водных вытяжках.

Мы рассчитали возможные действующие (биодоступные) концентрации металлов в эксперименте с покоящимися яйцами на основе оценок биодоступности с помощью водных вытяжек (Таблица 7, Рисунок 12б). Однако даже в этом случае концентрации металлов в разы превышают полулетальные дозы для активных рачков. При этом стоит отметить, что если общая концентрация металла в донных отложениях – это максимальная оценка концентрации потенциального токсиканта,

то концентрация металла в водной вытяжке – это своеобразная минимальная оценка (см. Рисунок 4). Можно предположить, что в разных условиях, при воздействии различных факторов часть связанных в донных отложениях металлов будет переходить в биодоступную форму.

Таблица 7. Общая концентрация металлов (Tot_{conc}) в искусственных донных отложениях, используемых в эксперименте, и рассчитанная на основе метода водных вытяжек биодоступная (Bio_{conc}) концентрация.

Cu		Cd		Zn		Ni	
Tot_{conc} , г/кг	Bio_{conc} , г/л	Tot_{conc} , г/кг	Bio_{conc} , г/л	Tot_{conc} , г/кг	Bio_{conc} , г/л	Tot_{conc} , г/кг	Bio_{conc} , г/л
5.60	0.32	5.30	0.77	8.00	2.32	4.40	1.20
11.00	0.93	17.00	2.98	12.60	4.12	8.00	3.34
16.60	1.56	50.70	9.35	30.00	10.92	16.20	8.22
33.60	3.47			59.50	22.45	37.50	20.88
67.40	7.29			101.20	38.94	56.20	32.00

Снижение способности к реактивации покоящихся яиц после контакта с загрязненными тяжелыми металлами донными отложениями наблюдалась и в природных объектах. Так, например, у покоящихся яиц дафний, извлеченных из загрязненных донных отложений, снижалась способность к реактивации (Rogalski, 2015). Покоящиеся яйца *Acartia pacifica* хуже реактивировались после воздействия донных отложений с концентрацией 348 мг/кг меди и 6.8 мг/кг кадмия (Jiang et al., 2007).

Покоящиеся стадии известны и для других видов живых существ. Известно, что семена некоторых растений весьма устойчивы к загрязнениям и способны реактивироваться после очистки от загрязнителя. Например, при оценке всхожести семян березы *Betula* sp. и водяники *Empetrum nigrurn ssp. hermaphroditum* из районов с различным уровнем загрязнения никелем (от 7.7 до 1390 мг/кг грунта) и медью (от 5 до 2490 мг/кг грунта), не обнаружено значительного отличия во

всхожести семян (Komulainen et al., 1994). В более поздних работах также не обнаружено зависимости всхожести семян березы *Betula pubescens* от уровня загрязнения тяжелыми металлами, однако, обнаружено что количество проростков вереска *Calluna vulgaris* из семян, собранных в диапазоне 8 километров от медно-никелевого завода, увеличивалось с увеличением расстояния от источника загрязнения (Salemaa, Uotila, 2001).

Некоторые данные указывают на то, что устойчивость организмов к действию токсиканта может изменяться. В этом случае покоящиеся яйца будут иметь еще одну важную экологическую роль. Например, дафнии, реактивировавшиеся из старых горизонтов донных отложений с более высоким уровнем загрязнения свинцом, были устойчивее к наличию свинца в среде культивирования, чем те, которые реактивировались из свежих горизонтов донных отложений с низким уровнем загрязнения свинцом (Turko et al., 2016). Снижение устойчивости рачков к загрязнению из свежих горизонтов, указывает на то, что популяция может как приобретать, так и утрачивать устойчивость к загрязнителю. В этом случае покоящиеся яйца, сохраняющие жизнеспособность при определенных уровнях загрязнения, могут служить резервом в случае загрязнения водной толщи токсичным соединением.

Продолжительность жизни рачков, вылупившихся из яиц, подверженных воздействию солей тяжелых металлов в донных отложениях, не отличалась от контрольных (Рисунок 13), и не зависела от концентрации токсикантов (Таблица 8). Так же мы не зафиксировали влияния контакта покоящихся яиц с металлами в донных отложениях на другие параметры жизненного цикла вылупившихся рачков (Рисунок 13, Таблица 8). На основании этих результатов можно сделать вывод об отсутствии влияния длительного контакта покоящихся яиц с тяжелыми металлами на параметры жизненного цикла вылупившихся рачков.

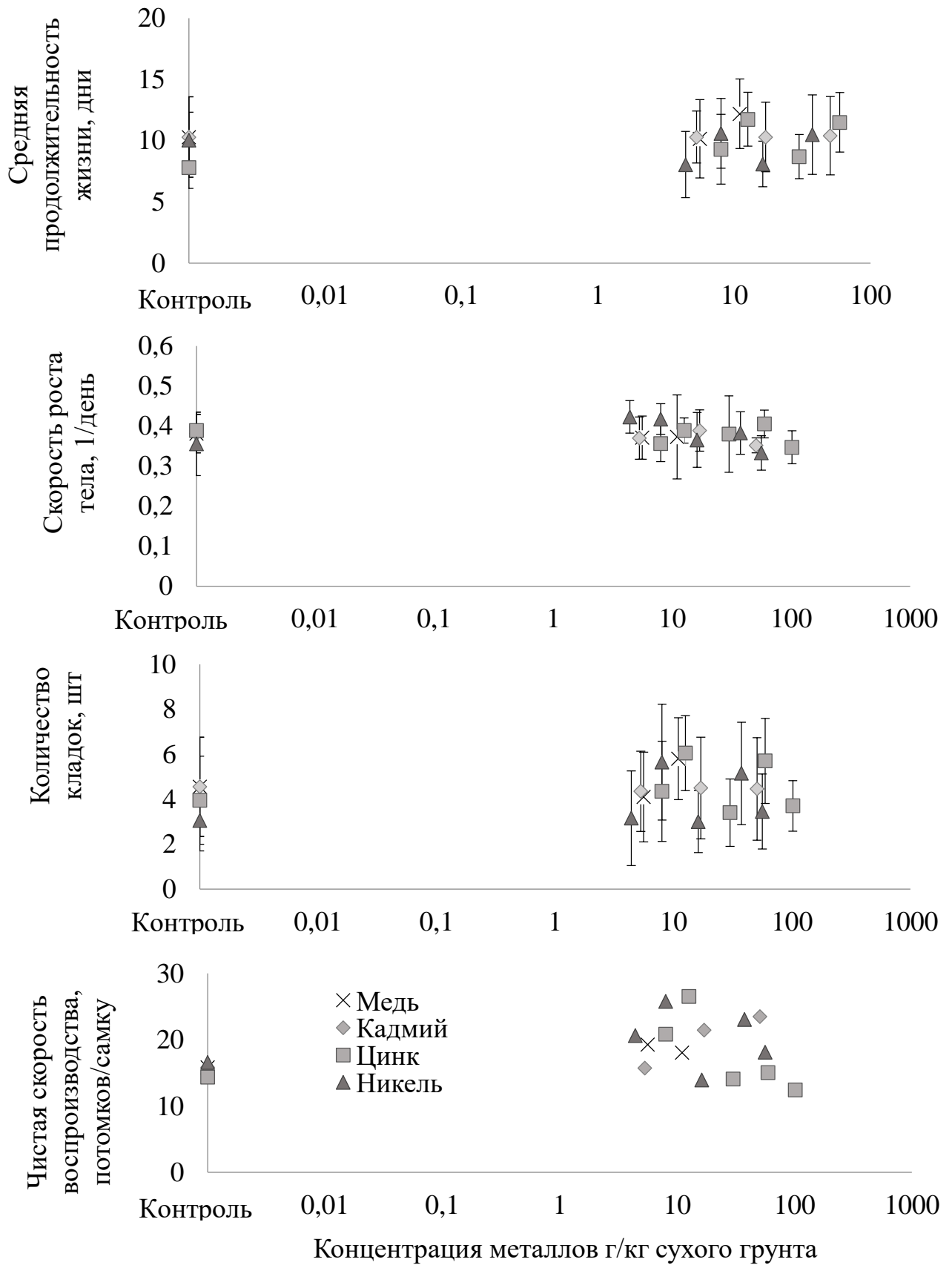


Рисунок 13. Параметры жизненного цикла рачков, вылупившихся из яиц, находившихся в контакте с загрязненными тяжелыми металлами искусственными донными отложениями.

Таблица 8. Достоверность отклика параметров жизненного цикла (продолжительность жизни (L), удельная скорость ювенильного соматического роста (g), количество отрожденных кладок ($N_{кл}$), количество отрожденных потомков ($N_{п}$)) самок *M. macroscopa* на длительный контакт с загрязненными тяжелыми металлами искусственными донными отложениями.

Металл	L, сутки	g, 1/день	$N_{кл}$, штук	$N_{п}$, штук
Cu (n=60)	H=1.49 p=0.22	H=1.41 p=0.52	H=1.24 p=0.26	H=1.97 p=0.16
Cd (n=80)	H=0.12 p= 0.72	H=1.31 p= 0.25	H= 0.02 p= 0.86	H=0.43 p=0.51
Zn (n=160)	H=0.15 p=0.69	H=0.87 p =0.34	H =0.52 p =0.46	H=0.68 p=0.40
Ni (n=160)	H=1.80 p =0.17	H =2.49 p=0.11	H=5.74 p=0.21	H=2.26 p=0.13

Примечание H - критерий Краскела-Уоллиса, p - уровень значимости, n - количество значений в оцениваемом массиве данных.

Предполагается, что оболочки покоящихся яиц достаточно надежно защищают эмбрион от контакта с тяжелыми металлами. Используемые в экспериментах концентрации практически не встречаются в природных и редко встречаются в высоко загрязненных водоемах. Например, концентрация меди возле медного рудника в Китае составляла 5 г/кг донных отложений (Deng et al., 2004), 0.5 г/кг донных отложений в местах впадения городских стоков в водоем (Vesk, Allaway, 1997), 5 г/кг в горнопромышленном районе Мексики (Razo et al., 2004). При этом в данных исследованиях нет информации о биодоступных концентрациях металлов. Наши исследования показывают, что даже при длительных контактах покоящиеся яйца способны сохранять жизнеспособность в таких концентрациях токсикантов.

Длительный контакт покоящихся яиц со средой загрязненной тяжелыми металлами, может приводить к потере их способности к реактивации. Влияние длительного контакта покоящихся яиц кладоцер наблюдалось в природе, когда покоящиеся яйца из глубинных слоев донных отложений, загрязненных тяжелыми металлами, реактивировались хуже, чем покоящиеся яйца из поверхностных слоев (имевшие недолгий контакт с тяжелыми металлами), а также хуже, чем покоящиеся яйца из менее загрязненных глубинных слоев (Rogalski, 2015). Что подтверждает опасность длительного воздействия тяжелых металлов на покоящиеся яйца зоопланктона.

Однако, длительный период покоя яиц способен снижать жизнеспособность покоящихся яиц. Увеличение периода покоя происходит при замывании покоящихся яиц глубоко в донные отложения, как правило, вклад таких яиц в восстановление популяции очень мал. Возраст покоящихся яиц, участвующих в восстановлении озерного зоопланктона не более 10-20 лет (Hairston, 1996; Hairston et al., 2000). Но, в целом, покоящиеся яйца зоопланктона способны сохранять свою жизнеспособность до 300 лет (Hairston et al., 1995). Скорее всего, такие «древние» покоящиеся яйца, занесет большим слоем донных отложений, и они не смогут реактивироваться. К тому же вклад в популяционную динамику животных, вылупившихся весной, незначителен в случае, когда старая популяция выжила после зимовки (Rother et al., 2010), однако имеет большое значение в случае гибели старой популяции после неблагоприятных условий. Таким образом, экологическая значимость токсичных эффектов при воздействии тяжелых металлов на покоящиеся яйца может быть невысока.

Мы показали в лабораторных экспериментах, что после длительного контакта (8 месяцев) с искусственными донными отложениями, загрязненными медью (30 г/кг и выше), покоящиеся яйца *M. macroscopa* теряют способность к реактивации (Oskina et al., 2018). Цинк, никель и кадмий в таких же условиях не влияли на способность покоящихся яиц к реактивации в концентрациях до 50 г/кг сухой массы грунта.

В то же время, если тяжелые металлы находятся в высоких концентрациях в донных отложениях, то скорее всего, они будут обнаруживаться и в воде. Учитывая высокую чувствительность ветвистоусых ракообразных к тяжелым металлам (см. раздел 4.2), существуют риски смертности рачков после реактивации, даже при крайне малых концентрациях металлов в водной среде. Подобный вывод был получен при оценке токсичного влияния цинка на покоящиеся яйца артемии (Sarabia et al., 2008). Авторы указывают на то, что в естественных условиях хроническая токсичность для активной стадии рачков растворенного металла в воде, имеет большее значение чем токсичность загрязненных донных отложений для покоящихся яиц. Однако, нельзя недооценивать эволюционных последствий от воздействия тяжелых металлов на банки покоящихся яиц и активную популяцию рачков (Gutierrez et al., 2017; Turko et al., 2016; Aranguiz-Acuna and Perez-Portilla, 2017, Rogalski, 2015). В свою очередь отсутствие новых поколений рачков, в периоды наступления благоприятных условий, может приводить к истощению банков яиц планктонных рачков, и исчезновению или обеднению зоопланктонного сообщества в водоеме.

Можно предположить, что ввиду сложности очистки биотопов от загрязнения тяжелыми металлами, внимание ученых было обращено в основном на влияние металлов на покоящиеся стадии с последующей реактивацией в загрязненной среде. Что привело к недостаточной изученности вопроса о том, как влияют токсичные вещества на покоящиеся стадии в период покоя. Однако в настоящее время активно разрабатываются методы очистки водоемов, что открывает возможности очистки биотопов от загрязнений до приемлемых показателей. Это приводит к необходимости получения знаний о том насколько устойчивы покоящиеся стадии. Таким образом, наше исследование, посвященное оценке выживаемости покоящихся стадий, способствует разработке прогнозов пользы от мероприятий по очистке биотопов от загрязнения тяжелыми металлами.

3.5. Влияние гамма-излучения на рачков *Moina macrocora* в период глубокой диапаузы

В экспериментах удалось определить критические дозы гамма-излучения для реактивации покоящихся яиц в состоянии глубокой диапаузы. В диапазоне доз облучения от фонового уровня до 100 Гр при использовании в качестве источника облучения точечного источника Cs^{137} (Рисунок 14, источник 1, 2) количество реактивированных покоящихся яиц не отличалось от контроля ($r=0.13$, $p=0.547$). Средняя эффективность реактивации покоящихся яиц в контрольных группах составляла $90.25 \pm 6.34\%$. При облучении дозой 200 Гр при использовании в качестве источника излучения ускорителя зафиксировано 100% подавление реактивации покоящихся яиц (Рисунок 14, источник 3).

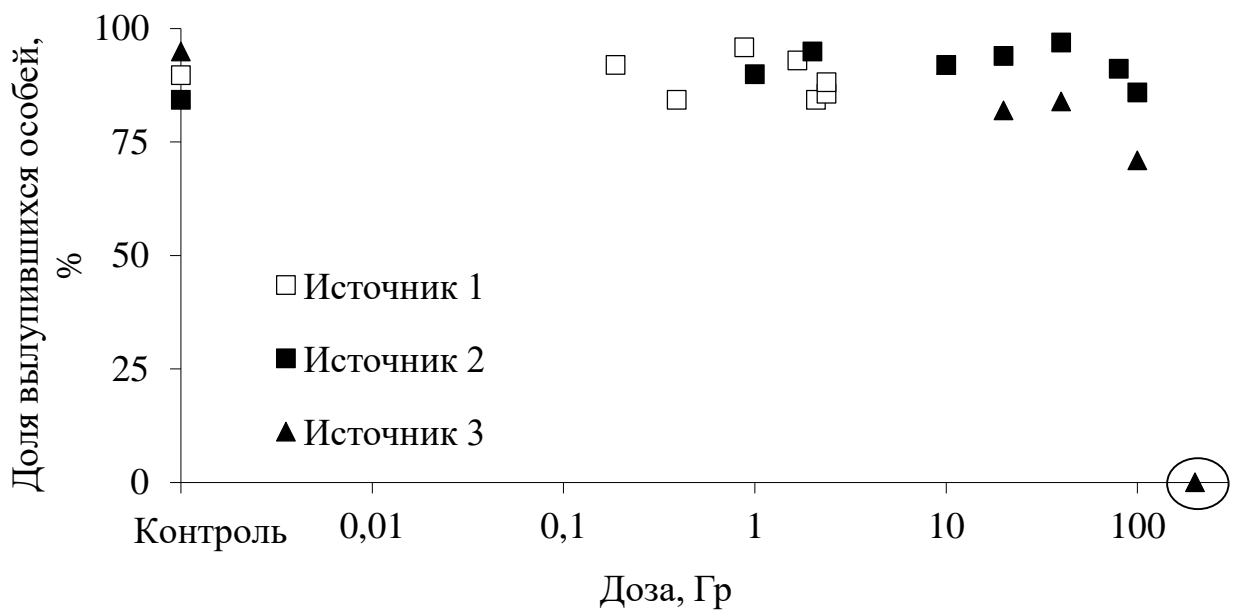


Рисунок 14. Зависимость успешности реактивации покоящихся яиц *M. macrocora* от поглощенной дозы облучения.

Работы по облучению покоящихся яиц ракообразных единичны. В эксперименте, проведенном на международной космической станции (МКС), проверяли способность покоящихся стадий различных организмов, в том числе покоящихся яиц ветвистоусых ракообразных, переносить условия открытого

космоса. Покоящиеся яйца находились в специальных контейнерах на поверхности МКС в течение 13 и 18 месяцев. Несмотря на высокие перепады температур и действие ионизирующего излучения (накопленная доза 2-3 Гр) часть покоящихся яиц сохранила способность к реактивации (Novikova et al., 2011). В целом следует ожидать относительно высокую устойчивость покоящихся яиц к облучению.

Ранее было отмечено, что радиочувствительность положительно коррелирует с темпами метаболических процессов, что приводит к устойчивости покоящихся яиц водных беспозвоночных (Eisler, 1994) или животных в криптобиозах (Watanabe, 2006) к облучению. Некоторые беспозвоночные обладают чрезвычайно высокой устойчивостью к радиации. Например, тихоходка *Macrobotus isolatus* переносит воздействие 5500 Гр рентгеновского излучения (May et al., 1964). Было установлено, что LD₅₀ для сухих цист артемий может достигать 5000 Гр при облучении источником Co60 (Iwasaki, 1964).

По данным разных исследователей стадия покоя для эмбрионов в эфиппидальном яйце проходит в состоянии бластулы (Zaffagnini, Zeni, 1987) или гастролы (Макрушин, 1985). Как уже было отмечено, покоящиеся яйца способны переносить различные неблагоприятные условия. По всей видимости, высокая устойчивость покоящихся яиц к действию внешних воздействий связана, в том числе, и с наличием эффективных механизмов репарации повреждений ДНК. Это может быть и одной из причин их высокой устойчивости к действию ионизирующего излучения. При исследовании устойчивости бделлоидных коловраток к действию ионизирующего излучения, было показано (Gladyshev and Meselson, 2008), что для некоторых видов коловраток доза облучения, снижающая интенсивность размножения по сравнению с контролем в два раза, может достигать значений 500-600 Гр. Экстремальную устойчивость к действию ионизирующего излучения авторы связывают со способностью данных видов переносить засуху в любом возрасте и, следовательно, с наличием эффективных механизмов репарации ДНК.

Чувствительность покоящихся стадий к гамма излучению может зависеть от глубины покоя. Высушенные покоящиеся яйца считаются глубоко покоящимися в

отличие от влажных (Watanabe, 2006). Например, чувствительность покоящихся яиц тихоходок вида *Ramazzottius varieornatus* зависит от влажности яиц, полувлетальная доза для сухих покоящихся яиц составила 1690 Гр, а для влажных 509 Гр (Horikawa et al, 2012).

Сравнения критические дозы для реактивации покоящихся яиц беспозвоночных и семян растений видно, что часто они сопоставимы. Так, длина ростков и корней турецкого гороха значительно снижалась при облучении семян дозами выше 200 Гр (Toker et al., 2005). Семена томата более устойчивы к гамма-излучению, 43% семян взошли на 6 день при облучении дозой 800 Гр, тогда как в контроле взошло 90% семян (Norfadzrin et al., 2007). Гамма-облучение семян салата (*Lactuca sativa* var. *capitata*), дозами до 30 Гр приводило к стимуляции прорастания семян по сравнению с контрольной группой. Более высокая доза (70 Гр) снижала процент проросших семян (Marcu et al., 2012).

При исследовании параметров жизненного цикла рачков, вылупившихся из облученных яиц, нами получены следующие результаты. Продолжительность жизни рачков, вылупившихся из яиц, облученных дозами до 100 Гр, была сопоставима ($p=0.09$) с продолжительностью жизни рачков из контрольных групп (Рисунок 15). Средняя продолжительность жизни рачков в контроле составила 9.69 ± 0.76 суток. Рачки в активной стадии более чувствительны к облучению. Как показано на самках *Daphnia magna* (Сарапульцева и др., 2007) 25% смертность рачков происходит при достижении дозы облучения 10 Гр.

Ювенильная скорость роста тела рачков, вылупившихся из яиц, облученных источником на основе ^{137}Cs (Рисунок 16, источник 1, 2), не отличалась от скорости роста у контрольных групп (0.35 ± 0.03 1/сутки). При облучении покоящихся яиц электронным ускорителем ИЛУ-6, наблюдалось значимое (Краскел-Уоллис, $p < 0.0001$) отличие ювенильной скорости роста тела у групп, получивших дозу облучения 40 и 100 Гр, от животных контрольной группы (Рисунок 16, источник 3).

Репродуктивные показатели были более чувствительны к гамма-облучению. Количество отрожденных кладок, чистая скорость воспроизводства и расчетная

скорость роста популяции резко снижались при дозах облучения покоящихся яиц 80 и 100 Гр (Рисунок 17). Эффективная поглощенная доза облучения, при которой значения показателя снижаются вдвое по сравнению с контролем, для количества кладок составила 47 Гр, для чистой скорости воспроизводства – 50 Гр, для скорости роста популяции – 44 Гр.

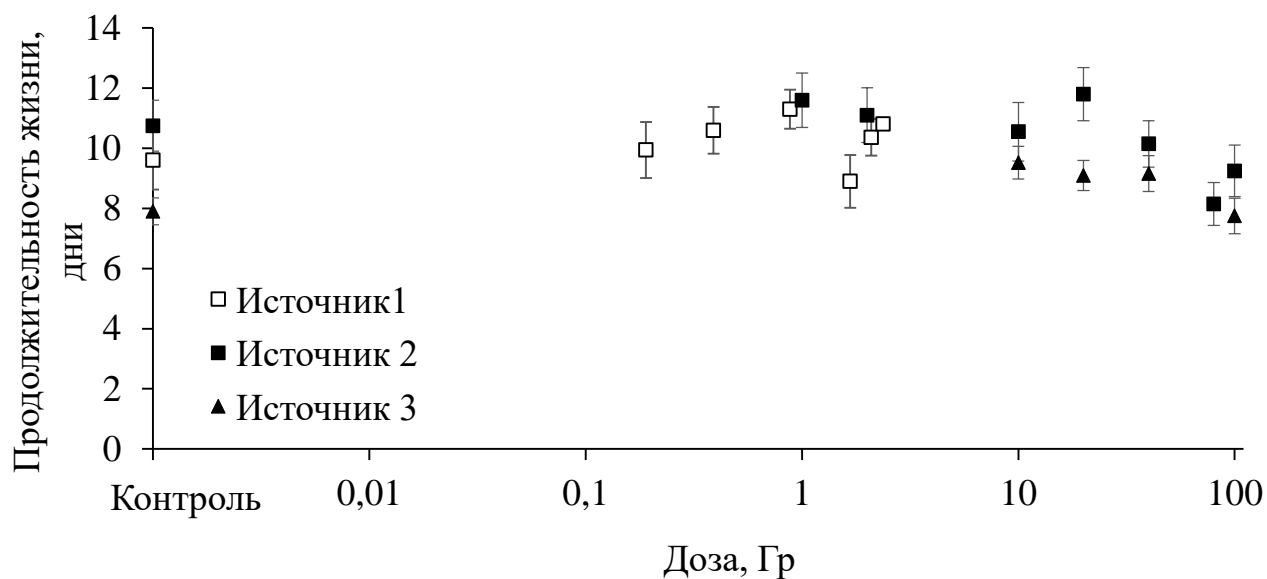


Рисунок 15. Продолжительность жизни рачков *M. macroscora*, вылупившихся из облученных яиц.

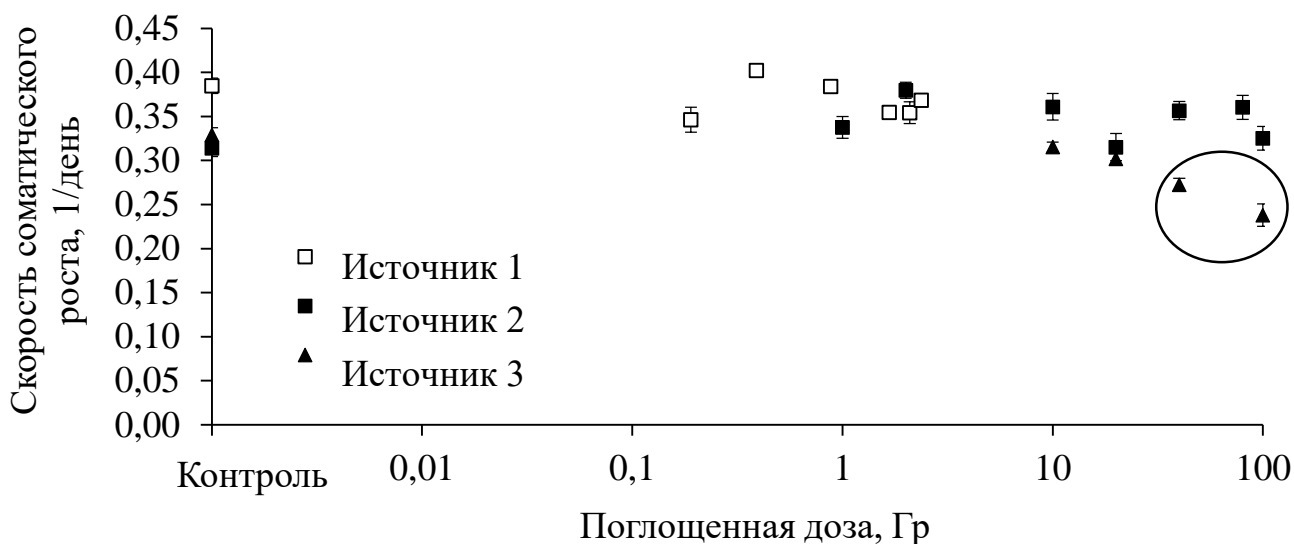


Рисунок 16. Скорость роста тела *M. macroscora*, вылупившихся из облученных яиц.

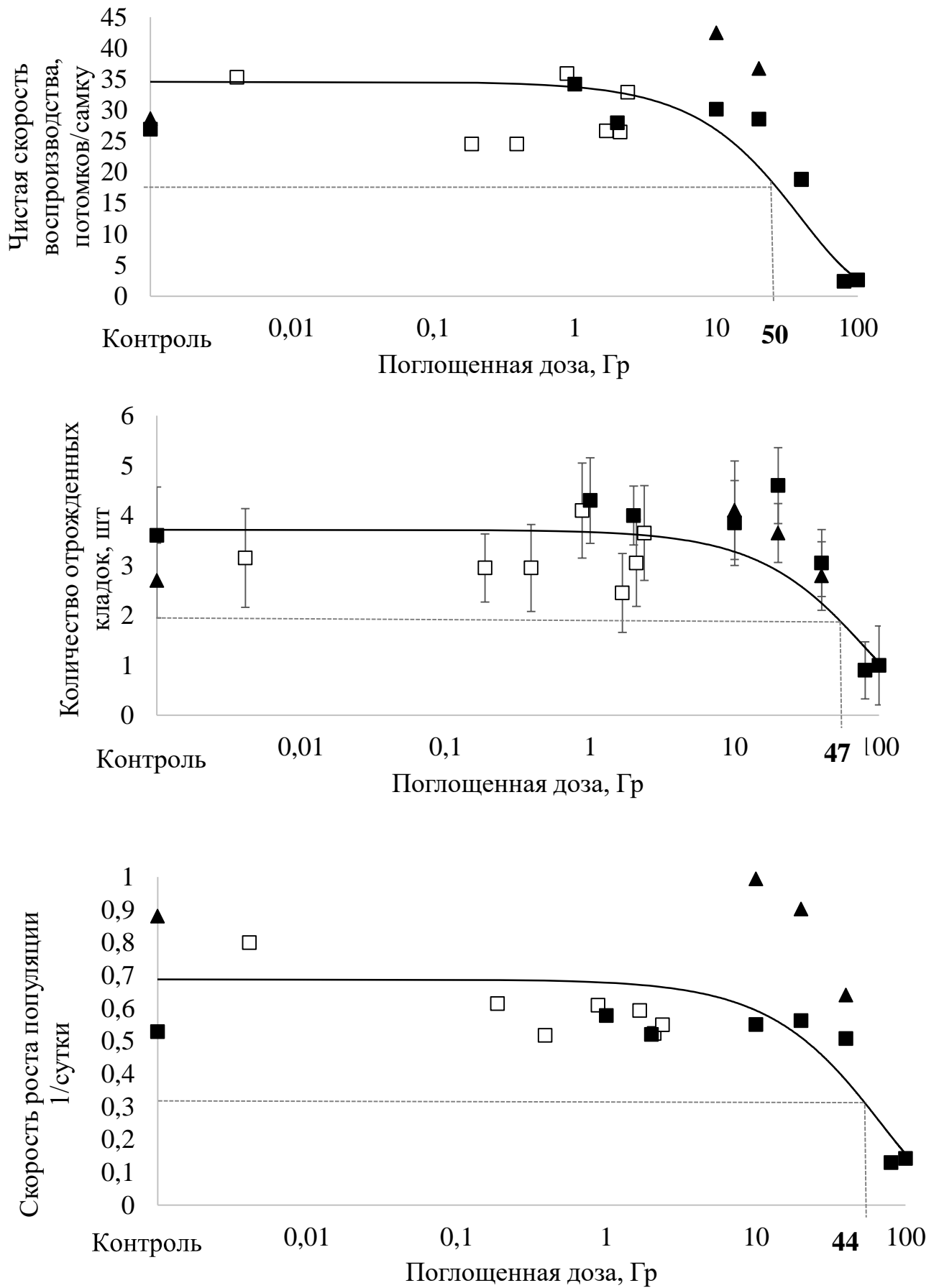


Рисунок 17. Влияние гамма-излучения на репродуктивные параметры рачков, облученных в период эмбриональной диапаузы.

Несмотря на то, что дозы облучения до 100 Гр не влияли на реактивацию покоящихся яиц, эффект облучения проявлялся у вылупившихся из них рачков. Отрицательные эффекты на параметры жизненного цикла наблюдались только в диапазоне высоких доз. Наиболее чувствительным параметром была чистая репродуктивная скорость. Результаты, указывающие на высокую чувствительность именно репродуктивных параметров, были получены и другими авторами.

Так, при исследовании чувствительности ветвистоусых ракообразных к действию ионизирующего излучения было показано, что наиболее чувствительными параметрами при облучении живых особей являются потребление кислорода и репродуктивные параметры: потребление кислорода у самок *Daphnia magna* снижалось при дозах облучения 0.2-0.4 Гр (Alonzo et al., 2008), снижение размера отрожденной кладки у самок *D. magna* происходило при дозе облучения выше 0.1 Гр. При этом дозы облучения до 1-2 Гр не влияли на выживаемость и соматическую скорость роста рачков (Gilbin et al., 2008). Для этого же вида было показано, что дозы облучения от 0.1 до 20 Гр оказывали незначительное (однако регистрируемое) воздействие на смертность живых особей, массовая смертность начиналась при дозах облучения 100 Гр и выше (Sarapultseva, Vyckovskaya, 2010). Более того, в работе Alonzo et al. (2016) оценили модельный популяционный ответ на хроническое внешнее гамма-излучение у 12 лабораторных видов (включая водных и почвенных беспозвоночных, рыб и наземных млекопитающих) и обнаружили, что у всех видов чистая скорость размножения имеет самый низкий показатель EDR10 (эффективная мощность дозы, индуцирующая 10% отклик).

Эксперименты показали, что облучение покоящихся яиц *M. macroscopa* в состоянии эмбриональной диапаузы источником гамма-излучения в диапазоне доз до 100 Гр не оказывает влияния на продолжительность жизни и скорость роста ювенильных самок. При этом при дозах облучения 80 и 100 Гр резко снижаются значения репродуктивных параметров самок, вылупившихся из облученных яиц. Поскольку диапауза представляет собой одну из форм временного физиологического покоя, во время которой резко снижается интенсивность

метаболизма и останавливается рост и развитие организма (Алексеев, 1990), устойчивость рачков в состоянии эмбриональной диапаузы может объясняться корреляцией между радиочувствительностью и метаболической активностью организма (Donaldson, Foster, 1957)

Также мы исследовали отложенные популяционные эффекты – развитие популяций, которые стартовали из яиц, получивших дозу облучения. Популяционные эффекты от воздействия радиации на покоящиеся яйца наблюдались при высоких дозах облучения яиц и проявлялись в размере и структуре популяции (Рисунок 18). Размер популяции, стартовавшей из самок, вылупившихся из яиц облученных дозой 80 Гр, был значительно ниже контрольной на 4 и 7 день, но позже размер популяции стал сопоставим с контролем. Размер популяции, стартовавшей из яиц облученных дозой 100 Гр, был значительно меньше на протяжении всего периода наблюдения (Рисунок 18а).

Влияние облучения на структуру популяции проявлялось в изменении количества ювенильных и партеногенетических самок (Таблица 9). В начальном периоде развития популяций, количество ювенильных самок в контрольной популяции было выше чем в популяциях, стартовавших из яиц, облученных дозами 80 (4 и 7 день) и 100 Гр (4, 7 и 10 день) (Рисунок 18б, Таблица 9). Количество партеногенетических самок в популяции, стартовавшей из яиц, облученных дозой 80 Гр, было ниже, чем в контроле только на 7 день наблюдения (Рисунок 18в, Таблица 9). В популяции, стартовавшей из яиц, облученных дозой 100 Гр, отличие в количестве партеногенетических самок от контроля наблюдалось на протяжении всего периода наблюдения за исключением 4 дня (Рисунок 18в). Количество самцов и эфиппидальных самок не отличалось во всех опытных популяциях по сравнению с контролем (Рисунок 18 г, д).

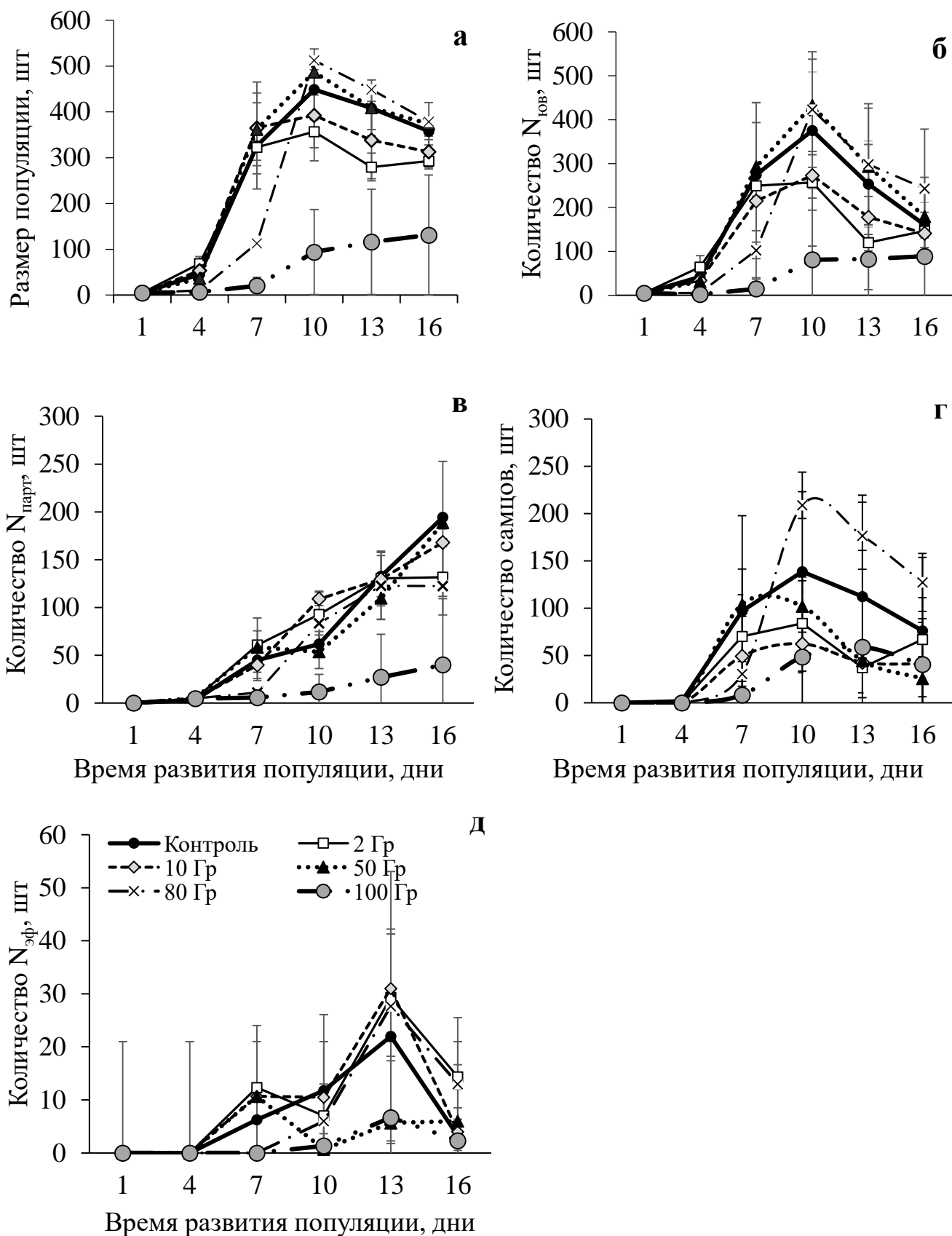


Рисунок 18. Изменчивость размера и структуры ($N_{\text{парт}}$ — партеногенетические самки, $N_{\text{эф}}$ — эфипиальные самки, $N_{\text{юв}}$ — ювенильные самки) популяций, стартовавших из облученных яиц.

Таблица 9. Уровни значимости отличий в размере и составе популяции в контрольных и опытных группах в различные дни наблюдения. Результаты post-hoc анализа (ANOVA).

День наблюдения	Размер популяции		Количество ювенильных самок		Количество партеногенетических самок	
	80 Гр	100 Гр	80 Гр	100 Гр	80 Гр	100 Гр
4	p=0.04	p=0.03	p=0.03	p=0.02		
7	p=0.04	p=0.005	p=0.02	p=0.01	p=0.02	p=0.01
10		p=0.003		p=0.01		p=0.004
13		p=0.01				p=0.005
16		p=0.02				p=0.0006

Количество образованных покоящихся яиц один из ключевых параметров, характеризующих развитие популяции. Воздействие дозы облучения было достоверным для этого параметра ($p=0.046$): количество покоящихся яиц, образованных в результате развития популяции, снижалось с ростом дозы облучения яиц, использованных для старта популяции (наименьшее количество яиц было образовано популяциями, стартовавшими из покоящихся яиц, облученных дозами 50 и 100 Гр) (Рисунок 19).

Недавно было показано, что облучение самок *Daphnia magna* в материнском поколении влияет на выживаемость и параметры размножения, как материнского поколения, так и потомков облученных самок (Sarapultseva and Dubrova, 2016). Облучение влияло на выживаемость, плодовитость и количество отрожденных кладок облученных самок и их первого потомства. В то же время уже у второго потомства (F2) происходило частичное восстановление параметров жизненного цикла по сравнению с облученным F0 потомством (Sarapultseva and Dubrova, 2016).

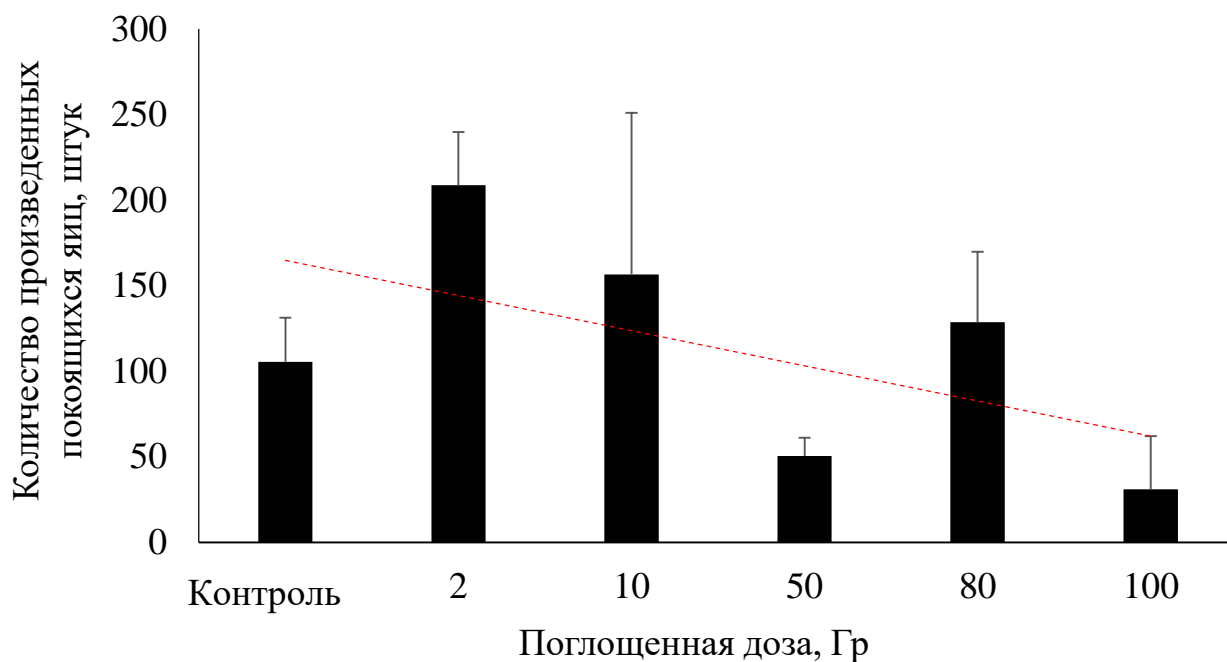


Рисунок 19. Образование покоящихся яиц популяциями *M. macroscopa*, инициированными из облученных покоящихся яиц. Столбики – среднее значение \pm стандартное отклонение. Пунктирная линия - линейная регрессия данных.

В наших экспериментах межпоколенческие эффекты в экспериментах с индивидуальными животными не были исследованы. Однако были проведены популяционные эксперименты, которые продолжались в несколько раз дольше, чем длительность поколения у *M. macroscopa*. От момента рождения самки *M. macroscopa* до наступления половозрелости и отрождения первого потомства проходит 3-4 дня. Популяционные эксперименты продолжались 15 дней, что означает присутствие трех-четырех поколений рачков в популяции, которая стартовала из облученных покоящихся яиц. Таким образом, в популяционных экспериментах наблюдаются эффекты, которые могут быть связаны как с прямым воздействием радиации на поколение F0, так и межпоколенческими эффектами.

Популяционные эксперименты показали, что облучение на стадии покоя животных, которые будут использованы для старта популяции, оказывает воздействие на развитие популяции. Основные отличия были зафиксированы в популяции, которая была инициирована животными, вылупившимися из

покоящихся яиц, облученных дозой 100 Гр. В этой популяции было зафиксировано снижение численности, снижение количества образованных покоящихся яиц.

Если основываться на концептуальной модели биологических ответов на разные дозы облучения, предложенной Поликарповым (Polikarpov, 1998), то дозы облучения, которые вызывают популяционные эффекты, должны быть выше, чем дозы облучения, вызывающие отклики на индивидуальном уровне. Зафиксированные в наших экспериментах отклики на индивидуальном и популяционном уровнях на острое облучения в период покоя в целом соответствуют концептуальной модели Поликарпова (Polikarpov, 1998). Доза облучения покоящихся яиц 50 Гр вызывала снижение чистой скорости воспроизводства у животных в индивидуальных экспериментах в два раза. Однако развитие популяции из яиц, получивших дозу облучения 50 Гр, не отличалось от контрольной популяции. Доза облучения 80 Гр на стадии покоящихся яиц проявлялась в задержке развития популяции, но позже численность популяции достигала контрольных численностей. Отклики на уровне популяции скорее всего были нивелированы индивидуальной изменчивостью и восстановлением потомства самок F₀, получивших облучение на стадии покоя. Таким образом, на индивидуальном уровне существенные изменения в параметрах развития наблюдались при более низких дозах облучения покоящихся яиц, чем в популяционных.

3.6. Влияние гамма-излучения на покоящиеся яйца в период реактивации

При облучении покоящихся яиц на стадии реактивации зафиксировано достоверное влияние дозы облучения на выход рачков из яиц. Для яиц, получивших во время реактивации дозы облучения 2, 64, 80 и 100 Гр, количество вылупившихся рачков достоверно отличалось от контроля. Наименьший процент выхода рачков из яиц зафиксирован для максимальной дозы облучения – 100 Гр (Рисунок 20). Можно отметить, что по сравнению с облучением в период глубокой диапаузы, при реактивации рачки более чувствительны к влиянию гамма-излучения.

При исследовании воздействия гамма-излучения на покоящиеся яйца ветвистоусых рачков *Moina macroscopa* в период их реактивации (стадия активного эмбрионального развития от гастролы до сформированного организма) мы обнаружили, что выживаемость яиц снижается, начиная с доз облучения 2 Гр. В мировой литературе отсутствуют работы по облучению ветвистоусых ракообразных на стадии эмбрионального развития. Однако подобные исследования проводились для других водных организмов.

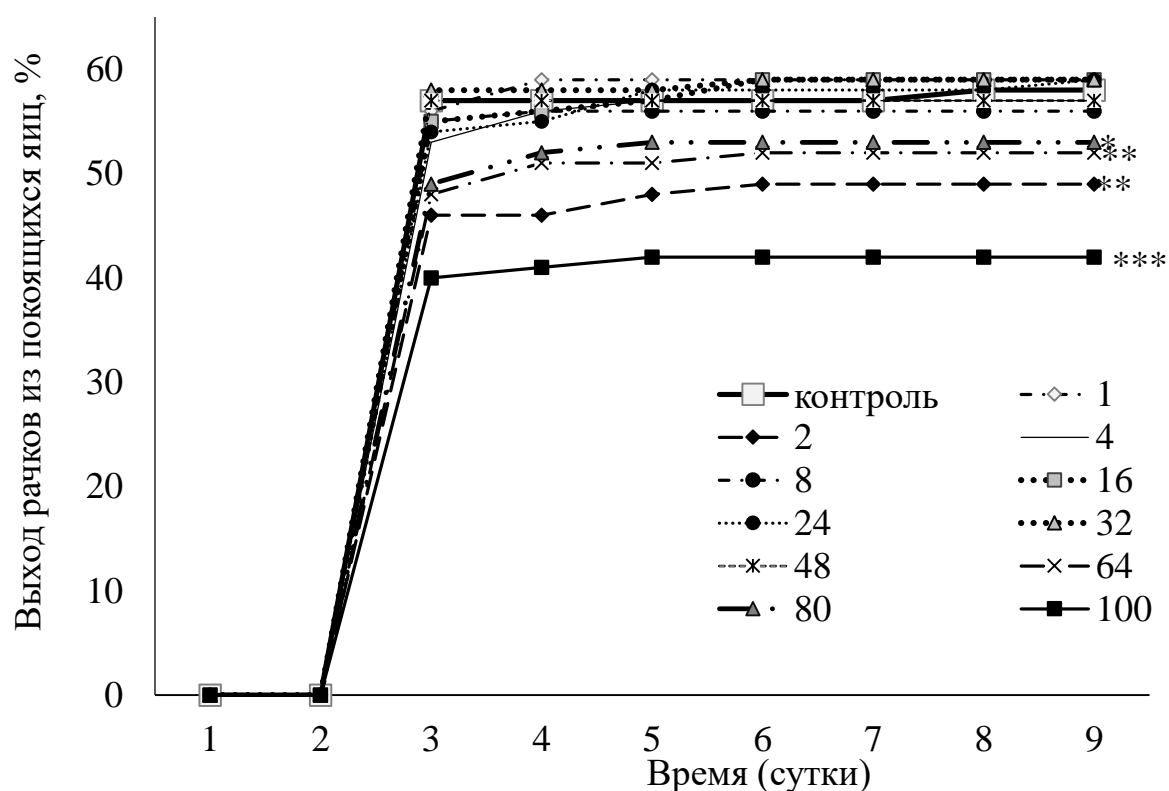


Рисунок 20. Влияние облучения покоящихся яиц *M. macroscopa* во время их реактивации точечным источником ^{137}Cs на выход рачков из яиц. * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, *** - $P < 0.000001$.

Наиболее чувствительными к радиационному фактору из протестированных водных организмов, согласно литературным данным, являются яйца и молодь некоторых пресноводных видов рыб (Donaldson, Foster, 1957). Например, у рыб рода *Oryzias*, хромосомные aberrации появляются при воздействии бета- (более 0.19 Гр) и гамма- (более 0.58 Гр) излучения на яйца на их ранней стадии развития (сразу после оплодотворения) (Suyama, 1981). В работе по

оценке влияния гамма-облучения на яйца моллюска *Milax nigricans* на стадии двух бластомеров, показано, что смертность яиц увеличивается при дозе 0.2 Гр и становится абсолютной при дозе облучения 0.8 Гр. Однако из яиц, облученных в возрасте двух дней дозой облучения 0.8 Гр, вылупляется 80% животных, при этом процент выживших яиц в эксперименте продолжает возрастать с увеличением возраста яиц, подвергаемых облучению (Zampi, Focardi, 1973).

Для видов, имеющих в жизненном цикле диапаузу или период покоя, критические уровни облучения существенно выше. Однако и они во время реактивации демонстрируют более высокую чувствительность к радиоактивному излучению. Так, при облучении диапаузирующих яиц рачка вида *Artemia* установлено, что радиочувствительность намоченных в течение короткого времени яиц (начало развития яиц) к дозе облучения 500 Гр возрастает более чем в два раза по сравнению с высушенными яйцами (Donaldson, Foster, 1957). Чувствительность к облучению была зарегистрирована при воздействии на эмбрионы тихоходок *Milnesium cf. tardigradum* в период их ранней стадии развития. По сравнению со средней и поздней стадиями развития, смертность яиц возрастала при дозах облучения выше 50 Гр (Beltran-Pardo, 2013).

Облучение покоящихся яиц во время реактивации также оказывало влияние на параметры жизненного цикла вылупившихся из них животных (Таблица 10). Ионизирующее излучение в исследованном диапазоне доз оказало значимое воздействие на удельную скорость роста ювенильных самок, измеренные (плодовитость и количество образованных кладок) и расчетные (скорость роста популяции и чистая скорость воспроизводства) репродуктивные параметры. Удельная скорость роста ювенильных самок снижается при дозах облучения яиц 24 Гр и выше; плодовитость и количество отрожденных кладок снижаются при дозах облучения 64 Гр и выше. Ионизирующее излучение не оказало существенного влияния на пропорцию самцов в потомстве и среднюю продолжительность жизни самок в эксперименте.

Таблица 10. Параметры жизненного цикла самок *M. macroscopa*, облученных точечным источником ^{137}Cs во время реактивации из покоящихся яиц.

Доза, Гр	Параметры жизненного цикла, среднее \pm стандартное отклонение/ минимальное-максимальное значение параметра					Расчетные параметры	
	g	F	N _{кл}	MP	L	r	R ₀
0	0.35 \pm 0.05/0.26-0.49	46.6 \pm 27.3/0-125	5.3 \pm 2.7/1-12	27 \pm 23/0-92.86	11.4 \pm 3.5/5-20	0.79	46.5
1	0.35 \pm 0.04/0.29-0.47	56.6 \pm 25.0/13-93	5.2 \pm 2.1/2-9	26 \pm 20/0-77.27	11.0 \pm 3.1/7-17	0.86	56.6
2	0.35 \pm 0.03/0.27-0.39	45.7 \pm 24.0/7-95	4.2 \pm 2.1/1-8	31 \pm 24/0-90.48	10.2 \pm 3.0/6-17	0.83	45.7
4	0.36 \pm 0.04/0.29-0.44	52.4 \pm 24.5/0-95	4.8 \pm 2.2/0-9	29 \pm 23/0-85.11	10.6 \pm 3.2/2-16	0.82	52.4
8	0.31 \pm 0.07/0.21-0.44	53.0 \pm 21.9/8-93	5.3 \pm 2.1/1-9	29 \pm 13/0-51.52	11.6 \pm 2.8/6-18	0.85	53.0
16	0.34 \pm 0.05/0.21-0.48	51.1 \pm 21.6/0-91	4.6 \pm 2.0/0-8	29 \pm 20/0-83.78	10.8 \pm 2.1/6-14	0.88	51.1
24	0.27 \pm 0.06*/0.19-0.45	47.4 \pm 31.7/0-86	6.3 \pm 3.5/0-11	31 \pm 26/0-100.0	12.6 \pm 4.2/3-18	0.84	47.4
32	0.31 \pm 0.05/0.22-0.39	34.6 \pm 30.2/0-123	3.9 \pm 3.1/0-11	26 \pm 20/0-62.60	11.2 \pm 3.3/6-20	0.67	34.6
48	0.26 \pm 0.05*/0.17-0.34	20.4 \pm 24.8/0-59	3.3 \pm 3.3/0-9	25 \pm 23/0-75.00	10.2 \pm 3.7/4-15	0.55	20.4
64	0.25 \pm 0.03*/0.16-0.29	2.5 \pm 5.4*/0-16	0.6 \pm 1.0*/0-3	47 \pm 38/0-93.33	8.8 \pm 3.7/2-14	0.18	2.5
80	0.25 \pm 0.06*/0.12-0.38	7.8 \pm 18.8*/0-63	1.3 \pm 2.7*/0-8	8 \pm 12/0-28.57	10.6 \pm 3.6/4-16	0.31	7.8
100	0.27 \pm 0.04*/0.19-0.37	5.6 \pm 11.5*/0-40	1.4 \pm 2.5*/0-9	30 \pm 27/0-68.75	11.4 \pm 3.3/6-18	0.26	5.6
Достоверность отличий							
	Непараметрический критерий Краскела-Уоллеса					МРА	
	*	*	*	-	-	*	*

g – удельная скорость роста ювенильных самок, 1/сутки; F – плодовитость, потомков/самку; N_{кл} – количество отрожденных кладок, шт; MP – доля самцов в потомстве, %; L – средняя продолжительность жизни, сутки; r – скорость роста популяции, 1/сутки; R₀ – чистая скорость воспроизводства, потомков/самку. МРА – множественный регрессионный анализ. Достоверность отличия значения параметра от контроля, достоверность эффекта дозы облучения: * – p<0.001

Мы ожидали обнаружить более высокую чувствительность *M. macroscopa* к действию ионизирующего излучения во время реактивации яиц. Действительно, мы зафиксировали не только снижение эффективности реактивации яиц при высоких дозах облучения, но и резкое уменьшение значений репродуктивных параметров и скорости роста ювенильных самок при дозах облучения 64 Гр и выше.

Следует отметить, что дозы облучения были рассчитаны на весь период облучения, однако массовый выход рачков из яиц начинался через 30-32 часа после начала облучения. Рачки, вылупившиеся из яиц, начинают активное перемещение по пробирке, используемой для облучения, тем самым, изменяя расстояние до точечного источника излучения. При этом в случае высоких доз облучения, даже небольшое увеличение расстояния до источника приведет к резкому снижению накопленной дозы. Точную оценку величины накопленной дозы в этом случае сделать сложно. Можно лишь предполагать, что для больших доз облучения (близкое расстояние между источником излучения и точкой на дне пробирки, для которой рассчитывается накопленная доза) реальные дозы облучения рачков в период активного роста будут меньше, чем расчетные.

В то же время мы не можем сказать, что стадия реактивации яйца является самой чувствительной к действию ионизирующего излучения у ветвистоусых ракообразных. При облучении живых рачков *Daphnia magna*, смертность единичных животных наблюдалась уже при дозе облучения 0.1 Гр (Сарапульцева, Малина, 2009). Плодовитость и количество отрожденных кладок для животных этого же вида были более чувствительными параметрами и снижались при дозах облучения 0.1 и 1 Гр, соответственно (Sarapultseva, Dubrova, 2016).

Стоит сравнить дозы, использованные в нашем исследовании, и дозы, с которыми покоящиеся яйца могут сталкиваться в природных экосистемах. Рассмотрим некоторые данные о присутствии радионуклидов в природных и искусственных озерах, пострадавших от различных видов ядерной деятельности. Максимальная мощность дозы для осадков озера Инба, пострадавшего от аварии на АЭС Фукусима (Сао et al., 2017) и озера Маджоре (Италия, Швейцария), получившего радиоактивное загрязнение в результате атмосферных осадений

(Putyrskaya et al., 2009), оценивалась в 6 мГр/ч. Таким образом, доза 100 Гр, которая будет вызывать индивидуальные и популяционные эффекты у животных, вылупившихся из покоящихся яиц, находящихся в таких отложениях, будет накапливаться в течение примерно 1900 лет. Для нескольких районов с высоким уровнем радиоактивного загрязнения (оз. Карачай, озера Южного Урала (Россия), охлаждающий водоем Чернобыльской АЭС и район морской охлаждения Ленинградской АЭС) радиоэкологические эффекты ионизирующей радиации на водные организмы проявляют себя в широком диапазоне доз от 0.002 до 800 Гр в день (Kryshev, Sazykina, 1998). Доза 100 Гр в таких осадках будет накапливаться в течение 137 лет (для мощности дозы 0.002 Гр в день) или в течение нескольких часов (для мощности дозы 800 Гр в день).

Данные по воздействию ионизирующего излучения на водных беспозвоночных не полны (Dallas et al., 2012). Наше исследование закрывает существенный пробел в этой области. Мы впервые определили летальные дозы облучения для покоящихся яиц ветвистоусого рачка *M. macroscopa*, изучили на индивидуальном и популяционном уровнях эффекты, проявляющиеся у животных, вылупившихся из облученных яиц, исследовали чувствительность покоящихся яиц к облучению на стадии реактивации. Возраст покоящихся яиц, которые вносят активный вклад в сообщества зоопланктона в озерах, находится в диапазоне 10-20 лет (Hairston, 1996; Hairston et al., 2000). Покоящиеся яйца могут сохранять жизнеспособность и дольше (например, до 300 лет (Hairston et al., 1995)). Таким образом, даже донные осадки, загрязненные антропогенными радионуклидами низкой активности, могут накапливать кумулятивную дозу, которая будет влиять либо на реактивацию покоящихся яиц, либо на показатели жизненного цикла и популяционную динамику вылупившихся из них животных.

ВЫВОДЫ

1. Определены критические дозы гамма-облучения, при которых наблюдаются негативные эффекты на уровне облученных покоящихся яиц *Moina macroscopa*, вылупившихся из них одиночных животных и сформировавшихся из них популяций. Полное прекращение реактивации покоящихся яиц наблюдается при дозах облучения 200 Гр; снижение значений репродуктивных параметров в два раза по сравнению с контролем у вылупившихся рачков – при дозах облучения 50 Гр и выше; снижение численности популяции – при дозах облучения 100 Гр.

2. Показано, что в период реактивации покоящиеся яйца более уязвимы к действию гамма-излучения, чем в состоянии глубокой диапаузы. Облучение покоящихся яиц в период реактивации влияет на успешность их реактивации, ювенильную скорость роста и репродуктивные параметры вылупившихся рачков.

3. В экспериментах с ветвистоусым рачком *M. macroscopa* по определению острой и хронической токсичности получены значения полулетальных (ЛК₅₀: Cu – 0.009±0.0002, Cd – 0.17±0.02, Zn – 0.34±0.02, Ni – 5.01±0.58 мг/л) и полуэффективных для чистой скорости воспроизводства (ЭК₅₀: Cu – 0.007 мг/л, Cd – 0.005 мг/л, Zn – 0.25 мг/л, Ni – 0.25 мг/л) концентраций исследуемых тяжелых металлов.

4. Зафиксированы пределы устойчивости покоящихся яиц *M. macroscopa* к действию тяжелых металлов. Длительное экспонирование покоящихся яиц в воде (1 месяц) и искусственных донных отложениях (6 месяцев) с добавкой тяжелых металлов в широком диапазоне концентраций (до 100 г/л или г/кг) не оказывает воздействия на параметры жизненного цикла вылупившихся рачков и приводит к прекращению реактивации только при длительном воздействии высоких концентраций (от 34 г/кг) меди.

5. Показано, что концентрации металлов, не оказывающие воздействия на покоящиеся яйца *M. macroscopa*, в миллионы раз превышают ПДК, ЛК₅₀ и ЭК₅₀ для активных стадий рачков; дозы гамма-облучения, оказывающие прямые и отложенные эффекты на покоящиеся яйца, превышают полулетальные дозы для

активных стадий планктонных ракообразных, но в целом сопоставимы с критическими дозами для покоящихся стадий других живых организмов.

6. Выявлены различия в токсичном эффекте тяжелых металлов и гамма-излучения на покоящиеся яйца *M. macroscopa*. Влияние тяжелых металлов проявляется только в снижении способности яиц к реактивации, тогда как гамма-излучение также влияет на индивидуальные и популяционные параметры, вылупившихся из облученных яиц животных.

7. Полученные результаты демонстрируют потенциал восстановления природных популяций ветвистоусых ракообразных из банков покоящихся яиц, за счет высокой устойчивости яиц к действию тяжелых металлов и гамма-излучения в период глубокой диапаузы, даже в водоемах с высоким уровнем загрязнения в случае восстановления в них качества воды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении хотелось бы отметить несколько важных моментов. Как показал обзор литературы, несмотря на большое значение банков покоящихся яиц зоопланктона для экологии и эволюции природных сообществ, исследования негативного воздействия загрязненных донных отложений на покоящиеся яйца достаточно фрагментарны. При этом именно в последнее время стали появляться работы, посвященные оценке чувствительности покоящихся яиц к различным токсичным соединениям. Скорее всего этот интерес связан с возросшим пониманием роли покоящихся стадий для природных сообществ зоопланктона и динамики экосистем, а также с успехами в палеоолиминологических исследованиях. Однако во многих исследованиях, посвященных влиянию специфического токсиканта на покоящиеся яйца, отсутствуют количественные оценки в виде доза-ответ или оценки отложенных реакций организмов на токсикант после реактивации покоящейся стадии.

Представленная работа закрывает существенный пробел в этой области исследований. В работе выполнена оценка влияния гамма-излучения и солей тяжелых металлов на покоящиеся яйца рачков *Moina macroscopa*. Определены летальные дозы гамма-облучения для покоящихся яиц рачков. Показаны условия, при которых происходит гибель покоящихся яиц от солей тяжелых металлов. Оценены изменения в жизненном цикле рачков, вылупившихся из яиц подвергшихся воздействию солей тяжелых металлов и гамма-излучения. Впервые были проведены эксперименты с популяциями рачков, вылупившихся из яиц, облученных гамма-излучением. Выполнена оценка чувствительности покоящихся яиц к гамма-излучению на стадии реактивации.

Полученные данные, позволяют предположить, что накопление техногенных радионуклидов в донных осадках может оказывать существенное воздействие на водные экосистемы, через негативные отложенные эффекты на скопления покоящихся яиц (индивидуальный и популяционный отклик

вылупившихся рачков), тогда как действие тяжелых металлов критично для живых особей и относительно безопасно для покоящихся стадий.

Относительная устойчивость покоящихся яиц к воздействию тяжелых металлов и гамма-излучения не дает оснований говорить о применении покоящихся яиц в качестве тест-объекта в биотестировании качества донных отложений. Однако, можно подумать о разработке методики комплексной биоиндикации загрязнения системы грунт-вода на основании оценки способности покоящихся яиц рачков к реактивации после определенного периода покоя. Устойчивость покоящихся яиц к исследованным загрязнителям еще раз подчеркивает важность банков покоящихся яиц для природных экосистем. В случае проведения мероприятий по очистке водных объектов после их загрязнения, именно устойчивый банк яиц будет способствовать восстановлению экосистемы.

Необходимо отметить, что чувствительность покоящихся яиц к разным токсикантам существенно различается. Ранее на это в своей работе обратил внимание Алексеев с соавторами (Akekseev et al., 2010). Сравнивая токсичность тяжелых металлов, органических веществ и низкомолекулярных соединений, исследователи предположили, что низкомолекулярные соединения при прочих равных условиях более токсичны для покоящихся яиц. В нашей работе мы не тестировали воздействие на покоящиеся яйца органических загрязнителей. В случае ионизирующей радиации, для которой защитная оболочка покоящегося яйца не является преградой, воздействие и на яйца, и на активную стадию животного после реактивации еще более выражено. С учетом данных представленных в этой работе и литературных данных можно представить следующую концептуальную диаграмму воздействия различных антропогенных загрязняющих веществ на покоящиеся яйца (Рисунок 21).

В случае тяжелых металлов и органических загрязнителей чрезвычайно важно исследовать механизмы, которые отвечают за жизнеспособность покоящихся яиц при широком диапазоне концентраций различных токсикантов и различной продолжительности прямого контакта яиц с токсикантами. В будущем

необходимы детальные исследования как самой структуры эфиппиума, так и особенностей взаимодействия токсикантов с этими защитными структурами.



Рисунок 21. Схематическая диаграмма воздействия различных антропогенных загрязнителей на покоящиеся яйца ветвистоусых ракообразных.

Дальнейшие исследования в этой области должны оценивать влияние загрязняющих веществ совместно с другими факторами, встречающимися в природных условиях. Действие тяжелых металлов и ионизирующего излучения на покоящиеся яйца может зависеть от таких факторов как недостаток кислорода, изменение температуры или освещенности, присутствие других токсикантов. Определенный интерес представляет оценка морфологических изменений рачков, вылупившихся из облученных яиц и яиц, контактировавших с тяжелыми металлами. Также важно думать о переносе результатов лабораторных в природные экосистемы. Индивидуальные и популяционные отклики должны

оцениваться как в лабораторных экспериментах, так и в естественной среде обитания. Подобные исследования необходимы для оценки влияния загрязнения донных отложений на банки покоящихся яиц и функционирование водных экосистем.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1. ПДК – предельно допустимые концентрации
2. ЛК₅₀ – концентрация вещества при которой погибает 50% подопытных организмов.
3. ЛД₅₀ – в терминологии биотестирования: кратность разведения исследуемой среды при которой погибает 50% подопытных организмов. В общей терминологии – доза (радиоактивного излучения) при которой погибает 50% подопытных организмов.
4. PEG – группа планктонной экологии
5. SIL - международное общество лимнологии
6. ПДД – предельно допустимая доза (радиоактивного излучения)
7. ЭК₅₀ – концентрация вещества при котором у опытного организма наблюдается снижение параметра жизненного цикла в два раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.Р. Диапауза ракообразных: эколого-физиологические аспекты / В.Р. Алексеев. – Москва: Наука, 1990. – 142 с.
2. Алексеев В.Р. Трансформация сезонных циклов у ветвистоурых ракообразных при слабом температурном воздействии / В.Р. Алексеев, А.А. Хозяйкин // Труды Зоологического института РАН. – 2009. – Т. 313. – №. 1. – с. 10-22.
3. Алиева З. М. Кинетические параметры выживаемости дафний при загрязнении среды токсикантами / З. М. Алиева, А. А. Мунгиев, М. А. Мунгиева, А. Г. Юсуфов // Биология внутренних вод. – 2010. – № 3. – С. 91-96.
4. Анищенко О.В. Распределение и миграция металлов в трофических цепях экосистемы реки Енисей в район г. Красноярска / О.В. Анищенко, М.И. Гладышев, Е.С. Кравчук, Н.Н. Сущик, И.В. Грибовская // Водные ресурсы. – 2009. – Т.36. - С. 623-632.
5. Болсуновский А. Я. Радиоактивные частицы в бассейне реки Енисей / А. Я. Болсуновский, Д. В. Дементьев, Т. А. Зотина, М. С. Мельгунов, А. В. Чугуевский // Материалы V Международной конференции, г. Томск, - 2016. – 13-16 сентября.
6. Борисков, Д.Е. Накопление тяжелых металлов в донных отложениях и биоте в системе закрытого водоема / Д.Е. Борисков, А.А. Кузьмин, С.В. Зиновьев, А.А. Блинохватов // XXI Век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2016. - № 4(32). – С. 82-86.
7. Ваганова Е. С. Сезонная динамика распределения тяжелых металлов в компонентах малых рек ульяновской области / Е. С. Ваганова // Вестник нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – № 2 (2). – С. 29-34.
8. Воробейчик Е.А. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем (локальный уровень) / Е. А. Воробейчик, О.Ф. Садыков, М.Г. Фарафонов // Екатеринбург, Наука. – 1984. – 280с.

9. Воробьева О.В. Изменения плодовитости лабораторной культуры *Daphnia magna* / О.В. Воробьева, О.Ф. Филенко, Е.Ф. Исакова // Перспективы науки, биологические науки. – 2013. - №9(48). – С. 11-14.
10. Гиляров А.М. Динамика численности пресноводных планктонных ракообразных / Москва, «Наука», 1987.
11. Гост ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний (*Daphnia magna* Straus) / Ю.С. Григорьев, Т.Л. Шашкова, ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» Кафедра экологии и природопользования // Москва: 2006.
12. ГОСТ Р 56236-2014 (ИСО 6341:2012) Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных *Daphnia magna* Straus // Москва: Стандартиформ. – 2016.
13. ГОСТ Р 57166-2016 Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg // Москва. – 2016. – 24с.
14. ГОСТ Р ИСО 22030-2009. Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений // ГНУ ВНИИАгрохимии им. Д. Н. Прянишникова. – 2010.
15. Григорьев Ю.С. Влияние связывания тяжелых металлов на результаты биотестирования токсичности природных и сточных вод / Ю.С. Григорьев, В.Н. Бурмакин, Н.С. Бондарев // Вестник Красноярского Государственного Университета. Естественные науки. – 2005. - №. 5. – С. 125-128.
16. Дятлова Е.С. Сравнительная чувствительность ветвистоусых ракообразных к бихромату калия / Е.С. Дятлова // Методы гидробиологических исследований. – 2001. – С. 79-83.
17. Задереев Е.С. Роль плотности популяции в индукции гамогенеза у *Moina macroscopa* (Crustacea:Cladocera) / Е.С. Задереев, В.Г. Губанов // Журнал Общей Биологии. – 1996. – Т. 57. – № 3. – С. 360-367.

18. Заличева И.Н. Влияние сезонного фактора на устойчивость гидробионтов к токсическому воздействию / И. Н. Заличева, В. С. Ганина // Экология. – 2015. - № 4. - С. 288-293.

19. Зотина Т. А. Экспериментальная оценка возможности использования погруженных макрофитов для биотестирования донных отложений р. Енисей /Сибирский экологический журнал. – 2014. – №4. – С. 547-560.

20. Изюмова Е. И. Остатки водных и наземных беспозвоночных из шерсти мамонта с реки Аллаиха (Республика Саха, Российская Федерация) / Е. И. Изюмова, А. А. Жаров // Материалы конференции «Ломоносов 2016», биология, гидробиология и общая экология. – 2016. - №9. – С. 2.

21. Калинкина Н.М. Биотестирование токсичности донных отложений крупных водоемов северо-запада России с использованием ракообразных / Н.М. Калинкина, Н.А. Березина, А.И. Сидорова, Н.А. Белкина, А.К. Морозов // Водные ресурсы. – 2013. – Т.40. – №6. – С. 612-622.

22. Кокова В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / Новосибирск, сибирское отделение «Наука», 1982.

23. Крышев И.И. Радиоэкологическая обстановка в биосфере и реальность ее оптимизации / Крышев И.И * Сазыкина Т.Г. // Биосфера. – 2009. – С. 203-212.

24. Крышев И.И. Оценка и прогнозирование радиационно-экологического воздействия хранилищ радиоактивных отходов ленинградского отделения филиала «Северо-Западный территориальный округ» ФГУП «РосРАО» / И.И. Крышев, А.Ю. Пахомов, С.Н. Брыкин, В.Г. Булгаков, Т.Г. Сазыкина, И.А. Пахомова, И.С. Серебряков, Н.С. Рознова, А.И. Крышев, И.Я. Газиев, К.В. Лунева, М.А. Дмитриева // Известия вузов, Ядерная энергетика. – 2012. – № 3. – С. 44-52.

25. Крышев И.И. Радиационная безопасность окружающей среды: необходимость гармонизации российских и международных нормативно-методических документов с учетом требований федерального законодательства и новых международных основных норм безопасности ОНБ-2011 / И.И. Крышев, Т.Г. Сазыкина // Радиация и риск. – 2013. – Т.22 – №1. – С. 47-61.

26. Курбатова С.А. Реакция зоопланктона микрокосмов на отдельное и совместное поступление хлорпирифоса и смеси тяжелых металлов / С.А. Курбатова, Е.А. Корнеева, Г.А. Виноградов // Биология внутренних вод. – 2007. – №3. – С. 87-94.
27. Курилов П.И. Фракционирование и определение форм тяжелых металлов в донных отложениях Азовского моря / П.И. Курилов, Р.П. Круглякова, Н.И. Савицкая, П.С. Федотов // Журнал Аналитической химии. – 2009. – Т.64. – №7. – С. 757-765.
28. Кучко Я.А. Зоопланктон водоемов верхнего течения системы реки Кенти (северная Карелия) в условиях длительного промышленного загрязнения / Я.А. Кучко, Н.В. Ильмаст, Т.Ю. Кучко // Известия Российской академии наук. Серия биологическая – 2015. – №5. – С. 552-560.
29. Лопатина Т.С. Межвидовые различия в реакции на действие пищевой обеспеченности и продуктов жизнедеятельности как основа для совместного обитания двух видов ветвистоусых ракообразных *Moina macroscopa* и *Moina brachiata* (Crustacea: Cladocera) / Лопатина Татьяна Станиславовна // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата наук. – Красноярск. – 2013.
30. Лопатина Т.С. Оценка летучести и термической стабильности веществ стимулирующих самок *Moina macroscopa* (Cladocera) к образованию покоящихся яиц / Т.С. Лопатина, Е.С. Задереев // Экология. – 2015. - №1. – С. 71-76.
31. Лунева К.В. Современные дозовые нагрузки на население и речную биоту в районе расположения Сибирского химического комбината (2000-2010 гг.) / К.В. Лунева, А.И. Крышев, А.Ю. Пахомов, И.А. Пахомова // Радиация и риск. – 2012. – Т.21. – №4. – С. 24-30.
32. Макрушин А. В. Избирательная реактивность семян растений и латентных яиц ракообразных / А. В. Макрушин // Успехи современной биологии. – 2009. – Т.129. – № 4. – С. 386-391.
33. Макрушин А.В. Ангидробиоз первичноводных беспозвоночных : Сохранение жизнеспособности в высушенном состоянии / А. В. Макрушин; Отв. ред. Я. И. Старобогатов // Л. : Наука : Ленингр. отделение. – 1985. - 104 с.

34. Макрушин А.В. Значение некоторых особенностей структуры желтка латентных яиц для процветания ветвистоусых ракообразных в пресных водах / А. В. Макрушин // Журнал общей биологии. – 1991. – Т.52. – №1. – С. 62-74.
35. Макрушин А.В. Эволюция воспроизводительной системы ветвистоусых ракообразных // В сб. “Современные проблемы изучения ветвистоусых ракообразных”. С.-Петербург.: Гидрометеоиздат. 1992. С. 46-65.
36. Максимов А.А. Крупномасштабная инвазия *Marenzelleria spp.* (Polychaeta, Spionidae) в восточной части финского залива балтийского моря / А.А. Максимов // Российский журнал биологических инвазий. – 2010. – № 4. – С. 19-31.
37. Манихин В.И., Никаноров А.М. Растворенные и подвижные формы тяжелых металлов в донных отложениях пресноводных экосистем // Санкт-Петербург. – Гидрометеоздат. – 2001.
38. Медведева М. Ю. Цитогенетические нарушения у водного растения *Elodea canadensis* в зоне техногенного загрязнения р. Енисей / М.Ю. Медведева, А.Я. Болсуновский, Т.А. Зотина // Сибирский экологический журнал. – 2014. - № 4. – С. 561-572.
39. Моисеенко Т.И. Распределение микроэлементов в поверхностных водах суши и особенности их водной миграции¹ / Т.И. Моисеенко, Н.А. Гашкина // Водные ресурсы (качество и охрана вод, экологические аспекты). – 2007. – Т. 34. - № 4. – С. 454-468.
40. Моисеенко Т.И. Формы нахождения металлов в природных водах в зависимости от их химического состава / Т.И. Моисеенко, М.И. Дину, Н.А. Гашкина, Т.А. Кремлева // Водные ресурсы. – 2013. – Т.40. - №4. – С. 375-385.
41. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния // Москва. – Мир. – 1987.
42. Никаноров А. М. Хроническое загрязнение пресноводных объектов по данным о накоплении пестицидов, нефтепродуктов и других токсичных веществ в донных отложениях / А.М. Никаноров, А.Г. Страдомская // Водные ресурсы. – 2007. – Т.34. – № 3. – С. 337-344.

43. Папина Т.С. Транспорт и особенности распределения тяжелых металлов в ряду : вода – взвешенное вещество – донные отложения речных экосистем / Т.С. Папина // Государственная публичная научно-техническая библиотека, институт водных экологических проблем СО РАН. – Новосибирск. – 2001. – 58 с.

44. Пяткова С.В. Биотестирование подземных и поверхностных вод в районе хранилища отходов ядерного производства / С.В. Пяткова, Е.В. Бахвалова, Е.И. Егорова, Г.В. Козьмин // Известия вузов, ядерная энергетика. – 2007. – № 2. – С. 75-83.

45. Решетняк О.С. Донные отложения как источник вторичного загрязнения речных вод металлами / О.С. Решетняк, В.Е. Закруткин // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. – 2016. - №4. – С. 102-109.

46. Романова Е.П. Многолетняя динамика инвазивных видов зоопланктона в Саратовском водохранилище / Е.П. Романова, С.В. Горюнова, С.П. Кузнецова // Труды Института Биологии Внутренних Вод РАН. – 2016. – Т. 74(77). – С. 93-98.

47. Рыжков Л.А. Токсичность хрома трехвалентного для *Daphnia magna* Straus / Л.А. Рыжков, Н.В. Артемьева, М.А. Канская // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2011. – № 6. – С. 28-31.

48. Сарапульцева Е.И. Изменение жизнеспособности *Daphnia magna* после γ -облучения в диапазоне относительно малых доз / Е.И. Сарапульцева, Ю.Ю. Малина // Радиационная биология, радиоэкология. – 2009. – Т.49. – №1. – С. 82-84.

49. Сарапульцева Е.И. Биологические эффекты радиационного воздействия у низших ракообразных *Daphnia magna* аналитический обзор / Е.И. Сарапульцева // Радиационная биология, радиоэкология. – 2017. – Т.57. – №4. – С. 414 - 428.

50. Сарапульцева Е.И. Линейно-пороговые эффекты γ -облучения *Daphnia magna* в диапазоне малых доз / Е.И. Сарапульцева, Ю.Ю. Малина, Б.И. Сарапульцев // Радиация и риск. – 2007. – Т16. – № 2-4. – С. 33-38.

51. Сарапульцева Е.И. Наследование дозозависимых эффектов относительно малых доз радиации модельные опыты на *Daphnia magna* / Е.И.

Сарапульцева, И.Б. Бычковская, Р.Ф. Федорцева // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2009. – Т.54. – №6. – С. 11-15.

52. Сарапульцева Е.И. Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Сарапульцева Елена Игоревна // Москва: МГУ. – 2015. – 48с.

53. Семенова И.Н. Использование растительных тест-систем для оценки токсичности донных отложений / И.Н. Семенова, Г.Ш. Кужина, Ю.Ю. Серегина, Г.А. Ягафарова, А.Б. Зулкарнаев, Х.Г. Мусин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. - №10 (185). – С. 232-235.

54. Семенченко В.П. Чужеродные макробеспозвоночные и рыбы в бассейне реки Днепр / В.П Семенченко, М.О. Сон, Р.А. Новицкий, Ю.В. Квач, В.Е. Панов // Российский Журнал Биологических Инвазий. – 2014. – № 4. – С. 76-96.

55. Соколова С.А. Актуальные проблемы экологического нормирования качества воды рыбохозяйственных водных объектов / С.А. Соколова // Вопросы экологического нормирования и разработка системы оценки состояния водоемов. Материалы Объединенного Пленума Научного совета ОБН РАН по гидробиологии и ихтиологии, Гидробиологического общества при РАН и Межведомственной ихтиологической комиссии. – 2011. – С. 56-68.

56. Терехова В.А. Биотестирование почв: подходы и проблемы / В.А. Терехова // Почвоведение. – 2011. – № 2. – С. 190-198.

57. Томилина И.И. Токсикологическая и тератогенная оценка донных отложений Рыбинского водохранилища / И.И. Томилина, Л.П. Гребенюк, Г.М. Чуйко // Биология внутренних вод. – 2011. – № 3. – С. 78-87.

58. Филенко О.Ф. Влияние донных грунтов на токсичность загрязняющих веществ // О. Ф. Филенко, М. В. Медякина // Вестник Московского университета, серия 16, Биология. – 2010. – № 1. – С 27-31.

59. Халилова А. А. Сравнительная оценка токсичности сточных вод, содержащих ионы хрома и никеля с применением различных биотест-объектов / А. А. Халилова, А. В. Яковлева, А. С. Сироткин // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – № 10. – С. 392-400.

60. Чертопруд М.В. Краткий определитель беспозвоночных пресных вод центра Европейской России: определитель / М. В. Чертопруд, Е. С. Чертопруд // Москва. – 2005. – 185с.
61. Чеснокова С.М. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды, часть 1. Метды биоиндикации // Владимирский государственный университет. – Владимир: Издательство владимирского государственного университета. – 2007. – 84с.
62. Шашкова Т.Л. Действие тяжелых металлов на трофическую активность дафний в зависимости от условий питания и возраста рачков / Т.Л. Шашкова, Ю.С. Григорьев // Сибирский экологический журнал. – 2013. – № 6. – С. 885-890.
63. Шилова Н.А. Влияние биогенных металлов на жизнедеятельность *Daphnia magna* / Н. А. Шилова, С.М. Рогачева, Т.И. Губина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – Т.12. – №1(8). – С. 1951-1953.
64. Штамм Е.В. Методы биотестирования в интегральной оценке состояния объектов природной среды / Е.В. Штамм, И.С. Байкалова, В.О. Швыдкий, Ю.И. Скурлатов // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность. – 2017. – С. 1575-1583.
65. Alekseev V. Does the survivorship of activated resting stages in toxic environments provide cues for ballast water treatment / V. Alekseev, A. Makrushin, J-S. Hwang // Marine Pollution Bulletin. – 2010. – Vol.61. – P. 254-258.
66. Alekseev V.R. Diapause in Crustaceans: Peculiarities of induction / V.R. Alekseev, B. De Statio, J.J. Gilbert // Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use. – 2007. – Eds. Springer, Netherlands. – P. 29-63.
67. Alonzo F. Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna* / F. Alonzo, R. Gilbin, S. Bourrachot, M. Floriani, M. Morello // Aquatic Toxicology. – 2006. – No. 87. – P. 146-156.
68. Alonzo F. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations / F. Alonzo, R. Gilbin, F.A. Zeman, J. Garnier-Laplace // Aquatic toxicology. – 2008. – No 87. – P. 146-156.

69. Alonzo F. Population modelling to compare chronic external radiotoxicity between individual and population endpoints in four taxonomic groups / F. Alonzo, T. Hertel-Aas, A. Real, E. Lance, L. Garcia-Sanches, C. Bradshaw, J.V. Batlle, D.H. Oughton, J. Garnier-Laplace // *Journal Environmental Radioactivity*. – 2016. – No. 152. – P. 46-59.
70. Aranguiz-Acuna A. Metal stress in zooplankton diapause production: post-hatching response / A. Aranguiz-Acuna, P. Perez-Portilla // *Ecotoxicology*. – 2017. – No. 26. – pp. 329-339.
71. Beltrán-Pardo E. Effects of ionizing radiation on embryos of the *Tardigrade Milnesium cf. tardigradum* at different stages of development / E. Beltrán-Pardo, K. I. Jönsson, A. Wojcik, S. Haghdoost, M. Harms-Ringdahl, M. R. Bermúdez-Cruz, J.E.B. Villegas, // *PLoS ONE*. – 2013. -<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072098>.
72. Bjerregaard P. Handbook on the toxicology of metals / Bjerregaard P., Andersen O. // *Ecotoxicology of metals: sources, transport, and effect of ecosystem*. – 2007.
73. Brendonck L. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment / L. Brendonck, L. De Meester // *Hydrobiologia*. – 2003. – No. 491. – P. 65-84.
74. Butler B.A. Direct versus indirect determination of suspended sediment associated metals in a mining-influenced watershed / B.A. Butler, J.F. Ranville, P.E. Ross // *Appl Geochem*. – 2008. – P. 1218-1231.
75. Cao L. Vertical distributions of Pu and radiocesium isotopes in sediments from lake Inba after the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident: source identification and accumulation / L. Cao, N. Ishii, J. Zheng, M. Kagami, S. Pan, K. Tagami, S. Uchida // *Applied Geochemistry*. – 2017. – No. 78. – P. 287-294.
76. Champan P.M. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment / P.M. Champan, K.T. Ho, W.R. Munns Jr., K. Solomon, M.P. Weinstein // *Marine Pollution Bulletin* – 2002. – No. 44. – P. 271-278.

77. Chen C.Y. Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes / C.Y. Chen, R.S. Stemberger, B. Klaue, J.D. Blum, P.C. Pickhardt, C.L.Folt // *Limnology and Oceanography*. – 2000. – No.45. – P. 1525-1536.
78. Chen G. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review / G.Chen, P.A. White // *Mutation Research*. – 2004. – Vol. 567. – P. 151-225.
79. Dallas L.J Assessing the impact of ionizing Radiation on Aquatic Invertebrates : a critical review / L.J Dallas, M Keith-Roach, B.P. Lyons, A.N Jha // *Radiation research*. – 2012. – No. 177. – P. 693-716.
80. Deng H. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant contamination sites in China / H. Deng, Z.H. Ye, M.H. Wong // *Environmental pollution*. – 2004. – No. 132. – P. 29-40.
81. Donaldson L.R., Foster R.F. Effects of radiation on aquatic organisms. The Effects of Atomic Radiation on Oceanography and Fisheries / Donaldson, L.R., Foster, R.F. // National Academy of Sciences. – 1957. – Publication 551.
82. Eisler, R., 1994. Radiation Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: a Synoptic Review (No. 29). US Department of the Interior, National Biological Service.
83. Fuller N. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review / N. Fuller, A. Lerebours, J.T. Smith, A.T. Ford // *Aquatic toxicology*. – 2015. – No 167. – P. 55-67.
84. Garcia G.G. Effect of cadmium on the population dynamics of *Moina macrocopa* and *Macrothrix triserialis* (Cladocera) / G.G. Garcia, S. Nadini, S.S.S. Sarma // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2004. – No.72. – P. 717-724.
85. Gilbin R. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna* / R. Gilbin, F. Alonzo, J. Garnier-Laplace // *Journal Environmental Radioactivity*. – 2008. – No 99. – P. 134-145.
86. Gladyshev E. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation / E. Gladyshev, M Meselson // *PNAS*. – 2008. - №. 105. – P. 5139-5144.

87. Gutierrez M.F. Disruption of the hatching dynamics of zooplankton egg banks due to glyphosate application / M.F. Gutierrez, Y. Battauz, B. Caisso // *Chemosphere*. – 2017. – Vol. 171. – P. 644-653.
88. Hairston Jr. N.G. The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage / Jr. N.G. Hairston, A.M. Hansen, W.R. Schaffner // *Freshwater Biology*. – 2000. – №. 45. – P. 133-145.
89. Hairston N.G. Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank / N.G. Hairston, R.A. Van Brunt, C.M. Kearns, D.R. Engstrom // *Ecology*. – 1995. – № 76. – P. 1706-1711.
90. Hairston N.G. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environment / N.G. Hairston // *Limnology and Oceanography*. – 1996. – №. 41. – P. 1087-1092.
91. Hatakeyama S. Effects of cadmium on the periodicity of parturition and brood size of *Moina macrocopa* (Cladocera) / S. Hatakeyama, M. Yasuno // *Environmental Pollution (series A)*. – 1981. – No. 26. – P. 111-120.
92. Horikawa D.D. Tolerance of anhydrobiotic eggs of the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* to extreme environments / D.D. Horikawa, A. Yamaguchi, T. Sakashita, D. Tanaka, N. Hamada, F. Yukuhiro, H. Kuwahara, T. Kunieda, M. Watanade, Y. Nakahara, S. Wada, T. Funayama, C. Katagiri, S. Higashi, S-I. Yokobori, M. Kuwabara, L.J. Rothschild, T. Okuda, H. Hashimoto, Y. Kobayashi // *Astrobiology*. – 2012. – Vol.12. – No. 4. – P. 283-289.
93. Inoue K. Dispersion of radiocesium-contaminated bottom sediment caused by heavy rainfall in Joso City, Japan / K. Inoue, M. Arai, M.Fukushi // *PLOS ONE*. – 2017. – P. 1-12.
94. Islam M.S. Heavy metal pollution in surface water and sediment: A preliminary assessment of an urban river in a developing country / M.S. Islam, M.K. Ahmed, M. Raknuzzaman, M. Habibullah-Al-Mamun, M.K. Islam // *Ecological indicators*. – 2015. – No 48. – P. 282-291.

95. Iwasaki T. Sensitivity of artemia eggs to the γ -irradiation 1 Hatchability of encysted dry eggs / T. Iwasaki // Journal of Radiation Research. – 1964. – Vol. 5. – No. 1. – P. 69-75.
96. Jiang X. Heavy metal exposure reduces hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment / Jiang Xiao-dong, Wang Gui-zhong, Li Shao-jing, He Jian-feng // Journal of environmental Sciences. – 2007. – No. 19. – P. 733-737.
97. Khangarot B. S. Sensitivity of toad tadpoles, *Bufo melanostictus* (Schneider), to heavy metals / B. S. Khangarot, P. K. Ray // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1987. – No 38. – P. 523-527.
98. Khangarot B.S. Toxicity of mercury on in vitro development of partenogenetic eggs of a freshwater cladoceran *Daphnia carinata* / B.S. Khangarot, S. Das // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – No. 161. – P. 68-73.
99. Komulainen M. Seedling establishment from seeds and seed banks in forests under long-term pollution stress: a potential for vegetation recovery / M. Komulainen, M. Vieno, V.T. Yarmishko, T.D. Daletskaja, E.A. Maznaja // Canadian Journal Botany. – 1994. – Vol. 72. – P. 143-149.
100. Kotov. A.A. Study of the late embryogenesis of *Daphnia* (Anomopoda, Cladocera, Branchiopoda) and a comparison of development in Anomopoda and Ctenopoda / A.A. Kotov, O.S. Boikova // Hydrobiologia. – 2001. – V. 442. – № 1-3. – P. 127-143.
101. Kryshev I.I. Radioecological effects on aquatic organisms in the areas with high levels of radioactive contamination: environmental protection criteria / I.I. Kryshev, T.G. Sazykina // Radiat. Prot. Dosim. – 1998. - №. 75. – P. 187-191.
102. Lopatina T.S. The effect of food concentration on the juvenile somatic growth rate of body length, fecundity and the production of resting eggs by *Moina brachiata* (Crustacea: Cladocera) single females / T.S. Lopatina, E.S. Zadereev // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2012. – Vol. 4. – No. 5. – P. 427-438.
103. Madoni P. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists / P. Madoni, M.G. Romeo // Environmental Pollution. – 2006. – No 141. – P. 1-7.

104. Marcu D. Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata) seedlings / D. Marcu, V. Cristea, L. Daraban // International Journal of Radiation Biology. – 2012. – Vol. 89(3). – P. 219-223.

105. Maringer F.J. Long-term environmental radioactive contamination of Europe due to the Chernobyl accident – Results of the Joint Danube Survey 2013 / F.J. Maringer, C. Ackerl, A. Baumgartner, C. Burger-Scheidlin, M. Kocadag, J.H. Sterba, M. Stietka, J. M. Welch // Applied Radiation and Isotopes. – 2017. – No. 126. – P. 100-105.

106. Marshall J. S. The Effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex* / J. S. Marshall // Ecology. – 1962. – Vol. 43. – No. 4. – P. 598-607.

107. Martinez-Tabche L. Toxicity of nickel in artificial sediment on acetylcholinesterase activity and hemoglobin concentration of the aquatic flea, *Moina macrocopa* / L. Martinez-Tabche, L. Gomez-Olivan, M. Galar Martinez, C. Romero Castillo, A. Montero Santiago // Journal of Environmental Hydrology. – 2000. – Vol. 8. – No. 4. – P. 1-10.

108. Massarin S. Effects of uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations / S. Massarin, F. Alonzo, L. Garcia-Sanches, R. Gilbin, J. Garnier-Laplace, J-C. Poggiale // Aquatic toxicology. – 2010. – No. 99. – P. 309-319.

109. May R.M. Action differentielle des rayons x et ultraviolets sur le tardigrade *Macrobiotus areolatus*, al'etat actif et desseche / R.M. May, M. Maria, J. Guimard // Bull. Biol. Fr. Belg. – 1964. - № 98. – P. 349-367.

110. Möst M. A mixture of environmental organic contaminants in lake sediments affects hatching from *Daphnia* resting eggs / M. Möst, A. C. Chiala-Hernandez, M.P. Frey, J. Hollender, P. Spaak // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2015. – Vol. 34. – No. 2. – P. 338-345.

111. Nadini S. The combined effects of heavy metals (copper and zinc), temperature and food (*Chlorella vulgaris*) level on the demographic characters of *Moina macrocopa* (Crustacea : Cladocera) / S. Nadini, E.A. Picazo-Paez, S.S.S. Sarma // Journal of Environmental Science and Health, part A. – 2007. – No. 42. – P. 1433-1442.

112. Navis S. Pesticide exposure impacts not only hatching of dormant eggs, but also hatchling survival and performance in the water flea *Daphnia magna* / S. Navis, A. Waterkeyn, T. Voet, L. De Meester, L. Brendonck // *Ecotoxicology*. – 2013. – No 22. – P. 803-814.

113. Navis S. Timing matters: Sensitivity of *Daphnia magna* dormant eggs to fenoxycarb exposure depends on embryonic developmental stage / S. Navis, A. Waterkeyn, A. Putman, L. De Meester, G. Vanermen, L. Brendonck // *Aquatic toxicology*. – 2015. – No 159. – P. 176-183.

114. Nikitin O.V. Toxicity of polluted sediments using swimming behavior alteration test with *Daphnia magna* / O. V. Nikitin, E. I. Nasyrova, V. R. Nuriakhmetova, N. V. Danilova, V. Z. Latypova // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. – 2018. – No. 107. – P. 1-6.

115. Norfadzrin F. A preliminary study on gamma radiosensitivity of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and okra (*Abelmoschus esculentus*) / F. Norfadzrin, O.H. Ahmed, S. Shaharudin, D. Abdul Rahman // *International Journal of Agricultural Research*. – 2007. – Vol. 2(7). – P. 620-625.

116. Novikova N. Survival of dormant organisms after long-term exposure to the space environment / N. Novikova, O. Gusev, N. Polikarpov, E. Deshevaya, M. Levinskikh, V. Alekseev, T. Okuda, M. Sugimoto, V. Sychev, A. Grigoriev // *Acta Astronautica*. – 2011. – No. 68. – P. 1574-1580.

117. Nystrand M. I. Metal speciation in rivers affected by enhanced soil erosion and acidity / M. I. Nystrand, P. Österholm, M. E. Nyberg, J. P. Gustafsson // *Appl Geochem*. – 2012. – P. 906-916.

118. OECD Test Guideline 170. Workshop on effects assessment of chemicals in sediment. – 1993.

119. OECD Test Guideline 207. Earthworm, acute toxicity test. – 1984.

120. Oskina N. High resistance of resting eggs of Cladoceran *Moina macrocopa* to the effect of heavy metals / N. Oskina, T. Lopatina, O. Anishchenko, E. Zadereev // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2018. - V. 102. – P. 335-340.

121. Paiva M.D. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters / M. D. Paiva, M. R. da Costa Marques, D. F. Baptista, D. F. Buss // *Environmental Chemistry Letters*. – 2015. – No 13. – P. 69-87.

122. Phoungthong K. Variation of the phytotoxicity of municipal solid waste incinerator bottom ash on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination with leaching conditions / K. Phoungthong, H. Zhang, Li-M. Shao, Pin-J He // *Chemosphere*. – 2015. – Vol.146. – P. 547-554.

123. Pinto P. X. Biosorbption of heavy metals from mining influenced water onto chitin products / P. X. Pinto, S. R. Al-Abed, D. J. Reisman // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – No. 166. – P. 1002-1009.

124. Piscia R. Dynamics of rotifer and cladoceran resting stages during copper pollution and recovery in a subalpine lake / R. Piscia, P. Guilizzoni, D. Fontaneto, D. A. L. Vignati, P. G. Appleby, M. Manca // *Limnology*. – 2012. – Vol. 48. – P. 151-160.

125. Pokethitiyook P. Acute toxicity of various metals to *Moina macrocopa* / P. Pokethitiyook, E. S. Upatham, O. Leelhaphunt // *Nat Hist Bull Saim Soc*. – 1987. – No. 35. – P. 47–56.

126. Polikarpov G.G. Conceptual model of responses of organisms, populations and ecosystems to all possible dose rates of ionizing radiation in the environment / Polikarpov G.G. // *Radiat. Prot. Dosim*. – 1998. – № 75. – P. 181-185.

127. Putyrskaya V. Migration of ¹³⁷Cs in tributaries, lake water and sediment of Lago Maggiore (Italy, Switzerland) - analysis and comparison with Lago di Lugano and other lakes / V. Putyrskaya, E. Klemm, S. Rollin // *J. Environ. Radioact*. – 2009. – № 100. – P. 35-48.

128. Qu R.-J. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels / R.-J Qu, X.-H.Wang, M.-B. Feng, Y. Li, H.-X. Liu, L.-S. Wang, Z.-Y. Wang // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2013. – P. 83-90.

129. Radzikowski J. Resistance of dormant stages of planktonic invertebrates to adverse environmental conditions / J. Radzikowski // *Journal of Plankton Research*. – 2013. – Vol. 0. – No. 0. – P. 1-17.

130. Raikov D. R. Aquatic invertebrate resting egg sensitivity to glutaraldehyde and sodium hypochlorite / D. R. Raikov, P.F. Landrum, D.F. Reid // *Environmental toxicology and chemistry*. – 2007. – No. 26. – P. 1770-1773.

131. Rajeshkumar S. Studies on seasonal pollution of heavy metals in water, sediment, fish and oyster from the *Meiliang Bay* of Taihu Lake in China / S. Rajeshkumar, Y. Liu, B. Ravikumar, G. Bai, X. Li // *Chemosphere*. – 2018. – No. 191. – P. 626-638.

132. Razo I. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico // I. Razo, L. Carrizales, J. Castro, F. Diaz-Barriga, M. Monroy, // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2004. – No. 152. – P. 129-152.

133. Ritz C. Dose-Response Analysis Using R / C. Ritz, F. Baty, J.C. Streibig, D. Gerhard, // *PlosOne*. – 2015. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>

134. Rogalski M. A. Tainted resurrection: metal pollution is linked with reduced hatching and high juvenile mortality in *Daphnia* egg banks / M. A. Rogalski // *Ecology*. – 2015. – No. 96 (5). – P. 1166-1173.

135. Rother A. The importance of hatching from resting eggs for population dynamics and genetic composition of *Daphnia* in a deep reservoir / A. Rother, M. Pitsch, S. Hülsmann // *Freshwater biology*. – 2010. – Vol. 55. – Iss. 11. – P. 2319-2331.

136. Ruangsomboon S. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and predatory catfish *Clarias macrocephalus* * *C. garienpinus* / S. Ruangsomboon, L. Wongrat // *Aquatic Toxicology*. – 2006. – No. 78. – P. 15-20.

137. Sacmaci S. Resting eggs as new biosorbent for preconcentration of trace elements in various samples to their determination by FAAS / S. Sacmaci, Y. Yilmaz, S. Kartal, M. Kaya, F. Duman // *Biology Trace Elementary Research* – 2014. – No. 159. – P. 254-262.

138. Salemaa M. Seed bank composition and seedling survival in forest soil polluted with heavy metals / M. Salemaa, T. Uotila // *Basic and Applied Ecology*. – 2001. – Vol. 2. – P. 251-263.

139. Sarabia R. Sublethal zinc exposure has a detrimental effect on reproductive performance but not on the cyst hatching success of *Artemia partenogenetica* / R. Sarabia,

J. Del Ramo, I. Varó, J. Diaz-Mayans, A. Torreblanca // Science of the Total Environment. – 2008. – Vol. 398. – Iss. 1-3. – P. 48-52.

140. Sarapultseva E. I. Low-dose γ -irradiation affects the survival of exposed *Daphnia* and their offspring / E. I. Sarapultseva, A.I. Gorski // Dose-response. – 2013. – No 11. – P. 460-468.

141. Sarapultseva E. I. The long-term effects of acute exposure to ionising radiation on survival and fertility in *Daphnia magna* / E. I. Sarapultseva, Y. I. Dubrova // Environmental research. – 2016. – P. 138-143.

142. Sarapultseva E.I. Peculiar low radiation effects as a risk factor. Assessment of organism viability in the model experiments with *Daphnia magna* / E.I. Sarapultseva, I.B. Bychkovskaya // International Journal of Low Radiation. – 2010. – Vol.7. – No.1. – P. 1-9.

143. Schamphelaere K. A. C. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna* / K. A. C De Schamphelaere, M. Canli, V. Van Lierde, I. Forrez, F. Vanhaecke, C.R. Janssen // Aquatic Toxicology. – 2004. – No. 70. – P. 233-244.

144. Schwartz, S.S., Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia* / S.S. Schwartz, P.D.N. Hebert // Freshwater Biology. – 1987. – V. 17. – P. 373-379.

145. Seco J.I. A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*/ J.I. Seco, C. Fernandes-Pereira, J. Vale // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2003. – No 56. – P. 339-350.

146. Shyong W-J. Acute toxicity of copper, cadmium, and mercury to the freshwater fish *Varicorhinus barbatus* and *Zacco barbata* / W-J.Shyong, H-C. Chen // Acta Zoologica Taiwanica. – 2000. – No 11(1). – P. 33-45.

147. Sommer U. Beyond the plankton ecology group (PEG) model: mechanisms driving plankton succession / U. Sommer, R. Adrian, L. De S. Domis, J. J. Elser, U. Gaedke, Bas Ibelings, E. Jeppesen, M. Lüring, J. C. Molinero, W. M. Mooij, Ellen van Donk, M. Winder // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. – 2012. – Vol. 43. – P. 429-448.

148. Sommer U. The PEG model of a seasonal succession of planktonic events in fresh waters / U Sommer, Z. M. Gliwicz, W. Lampert, A. Duncan // Archiv fur Hydrobiologie. – 1986. – Vol. 106. – P. 433–471.

149. Sounrapandian S. Effect of heavy metal salts on the life history of *Daphnia similis* Claus (Crustacea: Cladocera) / S. Sounrapandian, K. Venkataraman // Proceedings of the Indian Academy of Sciences. – 1990. – Vol. 99. – No. 5. – P. 411-418.

150. Stankovic S. Biota as toxic metal indicators / S. Stankovic, P. Kalaba, A. R. Stankovic // Environ Chemistry Letters. – 2014. – P. 63-84.

151. Suyama I. Effects of ionizing radiation on the early development of *Oryzias* eggs / I. Suyama, H. Etoh, T. Maruyama, Y. Kato, R. Ichikawa // Journal of Radiation Research. – 1981. – № 25. – P. 125-133.

152. Tamiya H. Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella* / Tamiya H, Ywamura T, Shibata K, Hase E, Nihei T // Biochimia Biophysica Acta. – 1953. – No 1. – P. 25–40.

153. Teodorovic I. Sensitivity of bacterial vs. acute *Daphnia magna* toxicity tests to metals / I. Teodorovic, I. Planojevic, P. Knezevic, S. Radak, I. Nemet // Central European Journal of Biology. – 2009. – No 4(4). – P. 482-492.

154. Toker C. Effects of gamma irradiation on the shoot length of Cicer seeds / C. Toker, B. Uzun, H. Canci, F.O. Ceylan // Radiation Physics and Chemistry. – 2005. – V. 73. – No. 6. – P. 365-367.

155. Tsui M. T. K. Material transfer efficiency and transgenerational toxicity of methylmercury in *Daphnia magna* / M. T. K. Tsui, W. Wang // Environmental Technology and Chemistry. – 2004. – No. 23. – P. 1504-1511.

156. Tuikka A. I. Toxicity assessment of sediment from three European river basins using a sediment contact test battery / A. I. Tuikka, C. Schmitt, S. Höss, N. Bandow, P. C. von der Ohe, D. de Zwart, E. de Deckere, G. Streck, S. Mothes, B. van Hattum, A. Kocan, R. Brix, W. Brack, D. Barceló, A. J. Sorumnen, J. V. K. Kukkonen // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2011. – No. 74. – P. 123-131.

157. Turko P. Rapid evolutionary loss of metal resistance revealed by hatching decades-old eggs / P. Turko, L. Sigg, J. Hollender, P. Spaak // *International Journal of Organic Evolution*. – 2016. – Vol. 70(2). – P. 398-407.
158. Vesik P.A. Spatial variation of copper and lead concentrations of water hyacinth plants in a wetland receiving urban run-off / P. A. Vesik, W. G. Allaway // *Aquatic Botany*. – 1997. – No. 59. – P. 33-44.
159. Wang J. Biosorbents for heavy metals removal and their future / J. Wang, C. Chen // *Biotechnology Advances*. – 2009. – No. 27. – P. 195-226.
160. Wang Z. S. Acute and chronic cadmium toxicity to a saltwater cladoceran *Moina monogolica* (Daday) and its relative importance / Z. S. Wang, C. Z. Yan, X. Zhang // *Ecotoxicology*. – 2009. – No. 18. – P. 47-54.
161. Ward D. M. Assessing element-specific patterns of bioaccumulation across New England lakes / D. M. Ward, B. M. S. Sturup, C. L. Folt, C. Y. Chen // *Science of the Total Environment*. – 2012. – No. 421. – P. 230-237.
162. Ward T. J. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna* / T. J. Ward, W. E. Robinson // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2005. – Vol. 24 – No. 9. – P. 2341-2349.
163. Watanabe M. Anhydrobiosis in invertebrates / Watanabe M. // *Appl. Entomol. Zool.* – 2006. – №. 41. – P. 15-31.
164. Won E-J. Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclops nana* / E-J. Won, J-S. Lee // *Aquatic Toxicology*. – 2014. – No. 150. – P. 17-26.
165. Wong C. K. Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and mixture, to the freshwater Copepod *Mesocyclops pehpeiensis* / C. K. Wong, A. P. Pak // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2004. – No. 73. – P. 190-196.
166. Wong C.K. Effects of chromium, copper, nickel, and zinc on longevity and reproduction of the Cladoceran *Moina macrocopa* / C.K. Wong // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1993. – No. 50. – P. 633-639.

167. Wong C.K. Effects of chromium, copper, nickel, and zinc on survival and feeding of the Cladoceran *Moina macrocopa* / C.K. Wong // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1992. – No. 49. – P. 593-599.

168. Wong C.K. Life table evaluation of the effects of cadmium exposure on the freshwater cladoceran, *Moina macrocopa* / C.K. Wong, P.K. Wong // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1990. - № 44. – P. 135–141.

169. Wong C.K. Toxicity of zinc and nickel electroplating water to the freshwater Cladoceran *Moina macrocopa* / C.K. Wong, P.K. Wong, H. Tao // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1991. – No. 47. – P. 448-454.

170. Zaffagnini F. Ultrastructural investigations on the labral glands of *Daphnia obtusa* (Crustacea, Cladocera) / F. Zaffagnini, C. Zeni // Journal of Morphology. – 1987. – Vol. 193. – Iss.1. – P. 23-33.

171. Zampi M. Effects of ionizing radiation on the eggs of *Milax nigricans* (Schultz) Mollusca *Gastropoda pulmonata* / M. Zampi, S. Focardi // Bolletino di zoologia. – 1973. – № 40. – P. 291-303.

172. Zhang Y. Toxicities and risk assessment of heavy metals in sediments of Taihu Lake, China, based on sediment quality guidelines / Y. Zhang, Y. Han, J. Zhu, W.Zhong // Journal of Environmental Sciences. – 2017. – No. 62. – P. 31-38.

173. Zou E. Acute toxicity of copper, cadmium, and zinc to the water flea, *Moina irrasa* (Cladocera) / E. Zou, S. Bu // Environmental Contamination and Toxicology. – 1994. – No 52. – P. 742-748.