

Сравнительная токсичность азиновых красителей для брюхоногих моллюсков *Planorbis corneus*

Исследовали токсичность метиленового синего и профлавина на брюхоногих моллюсков *Planorbis corneus* в хронических испытаниях. Метиленовый синий оказывал летальное действие в концентрациях от 1 мг/л, а профлавин – от 10 мг/л. Отмечен узкий диапазон перехода концентраций от остролетальных к недействующим. Оба токсиканта достоверно замедляли рост и снижали плодовитость моллюсков в концентрациях 0,1 и выше. Максимальной допустимой для тест-объекта была признана концентрация профлавина и метиленового синего 0,01 мг/л. Выявлен эмбриотропный эффект

обоих соединений.

Ключевые слова: токсичность, брюхоногие моллюски

Введение. Полициклические азотсодержащие красители акридинового и тиазинового ряда давно используются с разнообразными хозяйственными и санитарно – гигиеническими целями и исследуются в медицинском и биологическом ракурсах [7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Внесение таких веществ в водную среду может быть как случайным, так и преднамеренным. В частности, они рассматриваются в качестве средств обеззараживания воды. Принцип обеззараживающего действия основан на фотодинамической активности красителей, которые под действием света в присутствии кислорода генерируют синглетный кислород и другие его активные формы, окисляющие биомолекулы и вызывающие гибель микроорганизмов [1, 4, 5, 6, 10]. Одними из наиболее эффективных дезинфектантов для фотодинамического обеззараживания воды являются красители метиленовый синий (N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорида тригидрат) и профлавин (диаминоакридин). Эффект на животных обусловлен способностью таких веществ к образованию метгемоглобина [2].

Несмотря на относительно длительное использование в практике этих соединений ни в нашей стране, ни за рубежом они не исследовались в экологическом аспекте. Ограничен фонд сведений по эффекту этих соединений на обитателей водной среды. Имеющаяся информация преимущественно посвящена оценке кратковременных воздействий относительно больших концентраций, хотя основной экологический эффект от веществ, способных загрязнять водную среду, следует ожидать в более поздние периоды после начала экспозиции. Не установлено критериев содержания этих соединений в водной среде.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы является сравнительная оценка токсичности метиленового синего и профлавина для моллюсков *Planorbis corneus* в качестве тест - объекта. Брюхоногие моллюски играют важную роль в круговороте органического вещества в водных системах и являются важным звеном в исследованиях по разработке ПДК, как организм, представляющий зообентос. В отличие от других беспозвоночных, используемых в токсикометрии, применение брюхоногих моллюсков предоставляет возможность оценить эмбриотропное действие потенциально токсичных соединений.

Материалы и методы исследования. Испытывали действие соединения профлавин (акридинового производного) и метиленового синего (тиазинового производного) на брюхоногого моллюска катушку (*Planorbis corneus*) (табл. 1).

Исследование проводили в соответствии с методическими указаниями [3]. Молодые половозрелые особи из лабораторной культуры в возрасте 3-х месяцев по 5 особей были помещены в стеклянные емкости объемом 1 литр в трех-

кратной повторности для каждой концентрации исследуемых веществ. Кормили моллюсков сухим кормом «Тетра» через день. Температура воды в опыте составляла 22±1°C. Для освещения были использованы лампы «Power-Glo» со спектром излучения, приближенным к солнечному, продолжительность освещения составляла 10 часов в сутки. Смену растворов в отстоянной в течение 2х недель водопроводной воде производили 1 раз в 5 дней.

Для оценки токсичности метиленового синего и профлавина были проведены острые и хронические (до 30 суток) испытания с концентрациями 0,01 мг/л, 0,1 мг/л, 1,0 мг/л, 10 мг/л для обоих веществ.

В ходе исследования учитывали параметры смертность особей, прирост длины, ширины и высоты раковины, прирост массы моллюсков, количество кладок, количество молоди и яйца с нарушением развития. Наличие кладок и погибших особей контролировали ежедневно. В кладках просчитывали количество яиц, фиксировали сроки вылупления и количество выклюнувшейся молоди. Замеры линейных размеров раковины и массы моллюсков проводили 1 раз в 10 дней. Взвешивание производили на торсионных весах, предварительно удалив лишнюю влагу с раковин с помощью фильтровальной бумаги.

Достоверность отличия результатов в токсичной среде и в контроле оценивали традиционными методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. В остром опыте было установлено, что для молодых особей моллюсков летальной является концентрация 10 мг/л. ЛВ₅₀ и ЛВ₁₀₀ составили 36 и 48 часов, соответственно, как профлавин так и метиленового

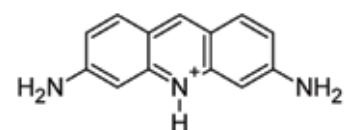
Таблица 1

Вещества, оцениваемые по токсичности

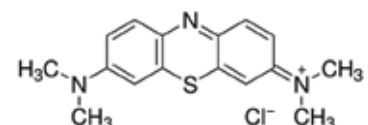
Соединение

Формула

Профлавин
(диаминоакридин)
М.м. = 209,25



Метиленовый синий
(N,N,N',N'-тетраметил-
тионина хлорида
тригидрат)
М. м. = 373,9



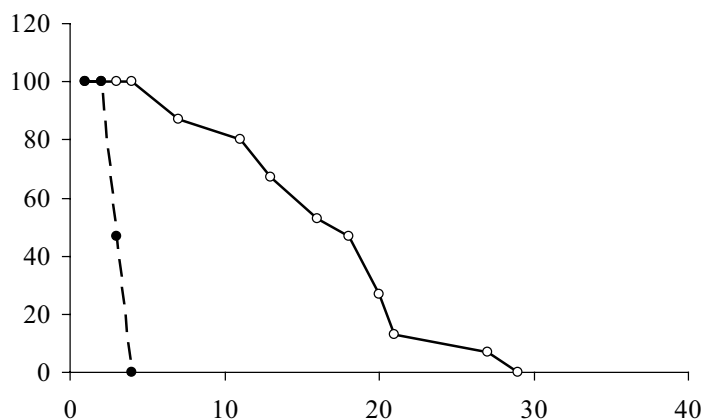


Рис.1. Смертность моллюсков в растворах метиленового синего. По оси абсцисс – срок в сутках, по оси ординат – количество выживших моллюсков (в % от исходного числа). 1 – 10 мг/л, 2 – 1 мг/л.

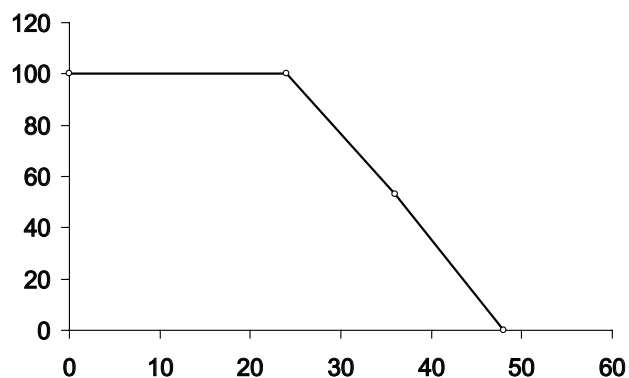


Рис.2. Смертность моллюсков при действии профлавина в концентрации 10 мг/л. По оси абсцисс – срок в часах, по оси ординат – количество выживших моллюсков (в % от исходного числа).

Таблица 2

Линейные размеры и масса моллюсков под воздействием метиленового синего

Концентрация метиленового синего	Показатель, мм, мг	0 суток	10 суток	20 суток	30 суток
Контроль	Длина	5.1±0.21	6.27±0.17	7.5±0.17	8.97±0.34
	Ширина	4.27±0.17	4.77±0.03	5.2±0.12	6.03±0.07
	Высота	4.3±0.22	5.47±0.07	6.33±0.27	7.6±0.20
	Масса	43.13±5.35	69.13±2.44	116.53±8.10	197.27±12.2
мг/л 0,01	Длина	4.67±0.06	6.23±0.09	7.6±0.23	8.53±0.43
	Ширина	3.83±0.09	4.73±0.18	5.43±0.12	5.93±0.32
	Высота	4.1±0.06	5.3±0.29	6.53±0.17	7.63±0.15
	Масса	32.73±2.43	69.33±2.43	120.1±9.5	170.33±16.44
мг/л 0.1	Длина	4.63±0.09	5.73*±0.12	7.07±0.15	8.77±1.11
	Ширина	4.03±0.09	4.53±0.03	5.3±0.12	5.87±0.20
	Высота	3.85±0.24	4.9*±0	6.0±0.17	7.3±0.3
	Масса	33.0±2.95	58.5±4.94	101.33±4.24	160.53±14.19
мг/л 1.0	Длина	4.8±1.0	5.17*±0.22	5.4*±0.21	-
	Ширина	3.97±0.06	4.19*±0.04	4.33±0.09	-
	Высота	4.2±0.15	4.24*±0.13	4.33*±0.13	-
	Масса	38.73±1.56	40.05*±1.75	39.6*±2.97	-

*- достоверное отличие от контроля

Таблица 3

Общая плодовитость и выклев моллюсков при действии метиленового синего.

Концентрация, мг/л	Единицы	Общая плодовитость			Общий выход молоди	
		Общее кол-во яиц	Общее кол-во кладок	Яиц на одну кладку, (в среднем)	шт	% от исх.
контроль	шт	653	85	7.68	98	15
	%	100	100	100	-	-
0.01	шт	505	65	7.77	77	15
	% от контр.	77.3	76.5	101.2	-	-
0.1	шт	323	46	7.02	36	11
	% от контр.	49.5	54.1	91.4	-	-

Таблица 4

Средние показатели плодовитости в расчете на отдельную особь моллюсков при хроническом воздействии метиленового синего

Сроки опыта (сут.)	Контроль		0.01 мг/л		0.1 мг/л	
	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку
8 - 15	6.4±13.65	6.0±2.19	3.06±8.41	5.1±1.53	1.6±8.0	6.2±1.33
16- 23	10.0±4.93	6.5±1.67	8.74±17.53	7.28±2.078	7.0±8.74	7.0±2.0
24- 30	27.14±28.9	8.87±28.9	21.86±30.2	8.60±0.88	12.94±6.49	7.19±1.0

синего.

В хроническом опыте выживаемость в концентрациях профлавина 1.0 мг/л и ниже не отличалась от таковой в контроле. В концентрации метиленового синего 1.0 мг/л ЛВ₅₀ и ЛВ₁₀₀ составили 17 и 29 суток, соответственно, а в 0.01 и 0.1 мг/л выживали все моллюски.

В самой большой из концентрациях метиленового синего 0.1 и 1.0 мг/л размеры и масса тела моллюсков достоверно отличались от контрольных в отдельные сроки опыта, тогда как в 0.01 мг/л достоверных отличий не обнаружено (табл.2).

При оценке действия токсиканта на показатели размножения появление кладок моллюсков было отмечено на 8-е сутки в концентрации 0.01 мг/л и в контроле, в 0.1 мг/л - на 13-е сутки опыта, а в 1.0 мг/л кладок не было вообще. Общая плодовитость моллюсков за срок наблюдения представлена в табл.3. Снижение общей плодовитости моллюсков отразилось и в общем количестве яиц и кладок. Среднее количество кладок на одну особь в присутствии 0.1 мг/л было снижено почти на 50%. В итоге, общий выход молоди при этой концентрации составил менее 40% по сравнению с величиной в контроле.

В расчете на отдельную особь установлено снижение количества кладок и яиц при действии обеих концентраций в третьей декаде наблюдения (табл. 4).

Нарушения развития яиц в кладках отмечены также в обеих концентрациях вещества, максимальное количество

пораженных яиц было отмечено на 8-е сутки их индивидуального развития. В результате происходила гибель сформированных эмбрионов.

Профлавин также влиял на рост моллюсков. Измерение линейных размеров показало, что уже на 10-е сутки в концентрации 0.1 мг/л проявлялись отличия от контроля по высоте раковины и массе тела (табл. 5.). В концентрации 1.0 мг/л прирост массы тела к 10 суткам был достоверно ниже, чем в контроле.

Появление первых кладок отмечено на 8-е сутки в контроле, на 5-е сутки в концентрации 0.01 мг/л, на 6-е - в 0,1 мг/л и на 7-е - в 1,0 мг/л. Общий выход молоди и процент выклева был наибольшим в концентрации 0.1 мг/л, в то время, как в 0.1 и 1.0 мг/л эти показатели были заметно ниже (табл. 6).

Замедление и отставание в росте и развитии яиц в кладках отмечено во всех 3-х концентрациях профлавина при отсутствии таких нарушений развития в контроле. В концентрациях 1.0 и 0.1 мг/л за все время опыта обнаружено по 5 кладок с нарушениями развития яиц, а в 0.01 мг/л выявлена только одна такая кладка. В таких кладках развитие большинства эмбрионов остановилось на 2-е сутки развития.

Среднее количество яиц на кладку с увеличением времени опыта возрастало в контроле и во всех концентрациях профлавина, кроме 0.01 мг/л, где максимум этого показателя пришелся на период с 8 по 15 сут. (табл. 7.). В 0.01 мг/л и в контроле показатели размножения различались не-

Изменение линейных размеров и массы моллюсков, под воздействием профлавина

Концентрация	Показатель, мм, мг	0 суток	10 суток	20 суток	30 суток
Контроль	длина	4.83±0.07	6.8±0.27	8.1±0.34	9.0±0.23
	ширина	3.73±0.03	4.6±0.21	5.7±0.18	5.9±0.15
	высота	4.0±0.17	5.9±0.06	6.9±0.27	7.5±0.24
	масса	36.13±2.1	103.0±7.6	153.5±13.1	187.6±13.4
0,01 мг/л	длина	4.4±0.25	5.83±0.20	7.2±0.43	8.2±0.55
	ширина	3.43*±0.09	4.5±0.06	5.2±0.064	5.78±0.06
	высота	3.6±0.21	5.0±0.27	6.11±0.23	6.72±0.21
	масса	29.9±5.9	69.2±13.8	125.1±12.51	165.9±21.6
0.1 мг/л	длина	5.3±0.36	6.2±0.10	7.6±0.39	8.4±0.44
	ширина	3.87±0.03	4.73±0.07	5.2±0.20	5.7±0.35
	высота	4.2±0	5.3*±0.11	6.3±0.40	6.8±0.31
	масса	43.6±0.70	72.2*±4.5	131.4±18.6	199.1±34.0
1.0 мг/л	длина	4.9±0.28	6.3±0.30	8.1±0.07	8.77±0.27
	ширина	3.87±0.18	4.7±0.06	5.5±0.06	5.5±0.06
	высота	4.2±0.06	5.4*±0.15	7.0±0.09	7.2±0.20
	масса	42.7±6.13	74.1*±6.63	151.3±6.87	175.5±7.43

достоверно. В концентрации 0.1 мг/л в период с 4-х по 7-е сутки количества яиц на особь и яиц на кладку достоверно отличались от значений в контроле. В концентрации 1.0 мг/л отличие этих показателей от величин в контроле было достоверным в период с 16 по 30-е сут..

Таким образом, установлено, что летальное действие на моллюсков профлавина и метиленового синего характеризуется относительно круглой концентрационной зависимостью. Особенно наглядно это просматривается для профлавина, у которого переход от недействующей концентрации к остролетальной находится в пределах одного порядка концентраций. В результате, по крайней мере профлавин, может быть отнесен к ядам с пороговым механизмом действия, что подтверждает возможность эффекта через связывания дыхательных пигментов [2,15]. При нелетальных концентрациях оба вещества в хроническом режиме оказывали эффект на рост и размножение моллюсков.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что размножение и рост при действии испытанных веществ оказываются на 1-2 порядка более чувствительными показателями токсичности, чем выживаемость. Несмотря на различие в величине летальных концентраций метиленовый синий и профлавин имеют одинаковые пороговые значения концентраций по величине хронических эффектов (табл. 8).

Выводы. 1. Для *Planorbis corneus* остролетальной является концентрация профлавина и метиленового синего 10 мг/л, а ЛВ₅₀ и ЛВ₁₀₀ составили 36 и 48 часов, соответственно. Метиленовый синий является более токсичным соединением для моллюсков, чем профлавин, по показателю смертности при хроническом действии.

2. Влияние обоих токсикантов на показатели роста раковины моллюсков было незначительным, но статистически достоверным оказалось в концентрациях, превышающих 0,01 мг/л.

3. Оба токсиканта вызывали нарушения эмбрионального развития моллюсков, причем метиленовый синий вызывал нарушения развития на последних стадиях, тогда как профлавин влиял на первые этапы развития эмбрионов.

4. В качестве максимально допустимой концентрации для моллюсков, как организмов бентоса, может рассматриваться концентрация профлавина и метиленового синего, равная 0,01 мг/л.

Таблица 6

Общая плодовитость и выклев моллюсков при действии профлавина

Концентрация, мг/л	Единицы	Общая плодовитость			Общий выход молоди	
		Общее кол-во яиц	Общее кол-во кладок	Яиц на одну кладку, (в среднем)	шт	% от исх.
Контроль	шт	638	60	10.6	96	15
	%	100	100	100		
0.01	шт	818	83	9.9	47	5.7
	% от контр.	128.2	139.3	93.4		
0.1	шт	469	51	9.2	168	35.8
	% от контр.	73.5	85	86.8		
1,0	шт	246	29	8.5	29	11.8
	% от контр.	38.6	48.3	80.2		

Таблица 7

Средние показатели плодовитости при действии профлавина в расчете на особь

Срок опыта (сут.)	Контроль		0.01 мг/л		0.1 мг/л		1.0 мг/л	
	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку	Среднее кол-во яиц на особь	Среднее кол-во яиц на кладку
4 - 7	-	-	0.6±2.5	10±0.29	3.1*±5.2	7.7*±0.6	0.8±3.3	5.7±0.53
8 - 15	4.26±6.8	7.9±0.8	3.1±12.8	12.1±1.1	6.4±17.8	8.0±2.1	3.1±10.0	6.8±1.6
16 - 23	21.86±11.3	10.9±2.0	22.8±47.0	9.7±4.5	13.5±11.0	10.0±1.5	7.9*±10.9	9.9*±1.0
24 - 30	16.4±18.2	11.7±1.5	28.54±40.0	10.4±3.9	9.0±24.4	10.5±2.9	4.5*±2.0	11.4*±0.4

* - достоверное отличие от контроля.

Максимальные допустимые концентрации (МДК) профлавина и метиленового синего для моллюсков *Planorbis corneus*

Показатель	Максимально допустимая концентрация в мг/л	
	Метиленовый синий	Профлавин
В ы ж и в а е - м о с т ь	0,1	1,0
Размножение	0,01	0,01
Рост	0,01	0,01
МДК	0,01	0,01

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. Кузнецова Н.А., Каляя О. Л. Фотокаталитическая генерация активных форм кислорода в биологических средах в методе фотодинамической терапии // Российский химический журнал. - 1998. - Т. 42. - С. 36-49.

2. 2. Куценко С. А.. Основы токсикологии. – СПб.: Фолиант, 2004. -570 с.

3. 3. Методические указания по установлению эколого – рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. - М.: ВНИРО, 1998. - 145 с.

4. 4. Патент РФ на изобретение №2235688 от 10.09.2004 г. Способ фотообеззараживания воды, патентообладатель — ФГУП «ГНЦ «НИОПИК».

5. 5. Синицына О.О., Жолдакова З.И., Полякова Е.Е. и др. Сравнительная токсичность фотосенсибилизаторов при разной степени деструкции // Гигиена и санитария. – 2007. - №5. – С.57-60.

6. 6. Brendel, M. Different Photodynamic Action of Proflavine and Methylene Blue on Bacteriophage // Molecular and General Genetics. - 1973.- Vol. 120 - No. 2. - P. 171-180.

7. 7. Burrows, G.E. Methylene Blue. Effects and Disposition in Sheep // Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy.- 1984.- Vol. 7.- No. 3.- P. 225-231.

8. 8. Christiansen, G. The Toxicity of Selected Therapeutic Agents Used in Cats // Veterinary Medicine-Small Animal Clinician.- July, 1980.- Vol. 75.- No. 7. - P. 1133-1141.

9. 9. DiSanto, A.R. and Wagner, J.G. Pharmacokinetics of Highly Ionized Drugs II. Methylene Blue-Absorption, Metabolism, and Excretion in Man and Dog after Oral Administration // Journal of Pharmaceutical Sciences.- 1972.- Vol. 61.- No. 7.- P. 1086-1090.

10. 10. Drabkova M., Marsalek B. Admiral W. Photodynamic therapy against cyanobacteria // Environ Toxicol.- 2007.-№ 22 (1).- P. 112-115.

11. 11. Gutter, B., Speck, W.T. and Rosenkranz, H.S. A Study of the Photoinduced Mutagenicity of Methylene Blue: Mutation Research. - 1977.- Vol. 44. - P. 177-182.

12. 12. Macht, D.I., Harden, W.C., Toxicology and Assay of Methylene Blue: Annals of Internal Medicine.- Vol. 7(1933).- P. 738-745.

13. 13. Rifici, L.M., D.S. Cherry, J.L. Farris, and J. Cairns Jr. Acute and Subchronic Toxicity of Methylene Blue to Larval Fathead Minnows (*Pimephales promelas*): Implications for Aquatic Toxicity Testing // Environ.Toxicol.Chem.-1996. - №15(8).- P.1304-1308.

14. 14. Schirmer H, Coulibaly B, Stich A, et al. (2003). Methylene blue as an antimalarial agent—past and future // Redox Rep 8 (5).- P. 272–276.

15. 15. Stossel, T.P., Effects of Methylene Blue on Blood pH, Oxygen, and Carbon Dioxide Content // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. - 1968b.- Vol. 128.- No.- P. 96-97.

16. 16. Williams J.R, Little J.B. Selective protection of cultured human cells from the toxic effects of ultraviolet light by proflavine pretreatment // Radiat Res.- 1977.- Oct; 72(1).- P.154-63.

Oganesova Ye.V., Filenko O.F.

Comparative toxicity of azine dyes to gastropod mollusks (*Planorbis Corneus*)

M.V. Lomonosov Moscow State University

Toxicity of methylene blue and proflavine to gastropod mollusks (*Planorbis Corneus*) was studied in chronic tests. Methylene blue produced a lethal action at a concentration of 1 mg/l and higher and proflavine up from 10 mg/l. A narrow transition range of concentrations between acute lethal to no effective was noted. Both toxicants authentically slowed down the growth and decreased the fertility of mollusks at concentrations of 0.1 mg/l and higher. A concentration of 0.01 mg/l of proflavine and methylene blue was recognized a maximum allowable for the test-object. Embryotropic effect was revealed for both compounds.

Материал поступил в редакцию 2.12.2011 г.