

УДК 595.3 : 615.099

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ АМПИЦИЛЛИНА ДЛЯ РАЧКОВ *DAPHNIA* MAGNA И СООБЩЕСТВО АКТИВНОГО ИЛА

З.Е. Мащенко¹, Е.В. Маслова¹, П.Г. Мизина²,
Ю.Л. Герасимов³, И.Ф. Шаталаев⁴, П.П. Пурьгин³

¹ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет, 443100, г. Самара, Российская Федерация

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, г. Москва, Российская Федерация

³ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева», 443086, г. Самара, Российская Федерация

⁴ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, 443079, г. Самара, Российская Федерация

Несмотря на то, что общее содержание органических соединений в воде нормируется, сформулировать и установить стандарты для индивидуальных органических соединений, поступающих на сооружения биологической очистки городских станций аэрации, довольно трудно. Многие авторы считают необходимым проведение дополнительных экспериментальных исследований с целью установления их допустимых концентраций и предупреждения торможения процессов биологической очистки. Одним из принятых экспериментальных методов контроля токсичности является метод биотестирования. В ходе данной работы было проведено исследование токсичности ампициллина для тест-объектов: дафний и сообщества микроорганизмов активного ила. Эксперименты на рачках проводили по стандартной методике Н.С. Строганова. Влияние антибиотика на активный ил оценивали по изменению активности дегидрогеназ микроорганизмов. Результаты исследований позволяют охарактеризовать ампициллин для дафний как очень слаботоксичный, а для сообщества микроорганизмов активного ила токсическое действие антибиотика установлено в концентрациях 200-400 мг/л.

Ключевые слова: ампициллин, токсичность, дафнии, активный ил, дегидрогеназная активность.

Введение. Научное обоснование предельно допустимые концентрации токсических веществ в водоемах и сточных водах, поступающих на биологическую очистку, является необходимым условием эффективной работы очистных сооружений. Всемирная организация здравоохранения в «Руководстве по обеспечению качества питьевой воды» предлагает норматив общего содержания органических соединений в сточных водах [1]. В то же время весьма трудно сформулировать и установить стандарты для индивидуальных органических соединений, поступающих на сооружения биологической очистки городских станций аэрации. В таких ситуациях необходимо проведение дополнительных экспериментальных исследо-

ваний с целью установления их допустимых концентраций и предупреждения торможения процессов биологической очистки [2, 3].

Одним из принятых экспериментальных методов контроля токсичности является метод биотестирования. В качестве тест-организмов используются рачки вида *Daphnia magna* [4, 5]. Интегральными показателями загрязнения служат подавление жизнеспособности дафний, их способность к размножению и другие функциональные характеристики [6].

Определение функционального состояния активных илов сооружений биологической очистки также возможно с помощью биохимических тестов. В частности, могут быть использованы параметры изменения общей дегидро-

Мащенко Зинаида Евгеньевна (Mashchenko Zinaida Evgenyevna), кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии пищевых производств и парфюмерно-косметических продуктов ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет, г. Самара, mzinaida@yandex.ru

Маслова Евгения Владимировна (Maslova Evgeniya Vladimirovna), аспирант кафедры технологии пищевых производств и парфюмерно-косметических продуктов ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет, г. Самара, maslenok.08@mail.ru

Мизина Прасковья Георгиевна (Mizina Praskovia Georgievna), доктор фармацевтических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», г. Москва, mizina-pg@yandex.ru

Герасимов Юрий Леонидович (Gerasimov Yuri Leonidovich), кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой зоологии, генетики и общей экологии ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева», г. Самара, yuger55@list.ru

Шаталаев Иван Федорович (Shatalaev Ivan Fedorovich), доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, shatalaev@list.ru

Пурьгин Петр Петрович (Purygin Petr Petrovich), доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической, биоорганической и медицинской химии ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева», г. Самара, puryginpp2002@mail.ru

геназной активности ила, снижение которой более чем на 20 % по отношению к контролю свидетельствует об ингибирующем влиянии компонентов сточных вод на ферментные системы микроорганизмов активного ила [7].

Широкое использование лекарственных препаратов в медицине и ветеринарии приводит к появлению и накоплению их в объектах окружающей среды [2, 3]. Исследование токсичности на гидробионтах позволяет определить влияние фармацевтических препаратов на процессы естественного самоочищения водных объектов, а также установить токсикологические параметры действия изучаемых веществ на гидробионты для прогноза экологических последствий попадания этих веществ в окружающую среду [6].

Таким образом, актуальными являются исследования по оценке токсичности лекарственных веществ, содержащихся в сточных водах городов, химико-фармацевтических и агропромышленных предприятий.

Целью работы является исследование токсичности ампициллина для тест – объектов.

Материалы и методы исследования. Ампициллин – полусинтетический антибиотик широкого спектра действия группы пенициллинов, часто применяется в лечебной практике. Этот антибиотик был обнаружен в городских сточных водах [2, 3, 8], антибиотик характеризуется санитарно-токсикологическим лимитирующим показателем вредности и принадлежит ко 2 классу опасности [9]. Структурная формула ампициллина представлена на рисунке 1.

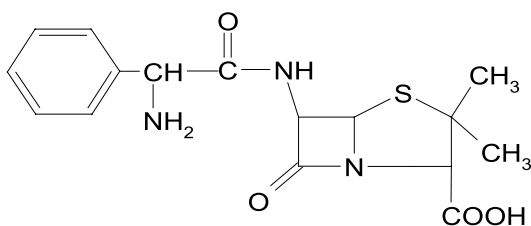


Рис. 1. Структурная формула ампициллина

В эксперименте использовали порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения «Ампициллин» (ОАО «Биосинтез», Россия).

Оценивали действие антибиотика на рачков вида *Daphnia magna* в возрасте до 24 часов, и на активный ил аэротенка очистных сооружений г. о. Самара.

Влияние ампициллина на *Daphnia magna*

Испытание на рачках проводили в соответствии с методикой, предложенной Н. С. Строгановым [10]. Среду для экспериментов готовили на основе отстоянной водопроводной воды,

в которую добавляли до необходимых концентраций исследуемое вещество и корм – 1% суспензию пекарских дрожжей. В сосуд объемом 0,75 л сажали по 10 рачков в возрасте до 24 часов. В качестве контроля использовали отстоянную водопроводную воду. Эксперименты проводили в течение 21 суток в термостате со стеклянной дверцей при температуре 21-22°C и естественном освещении на 3-х поколениях рачков в трех повторностях. Корм вносили через 1 сутки.

Исследовали действие антибиотика в виде водных растворов в концентрациях: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 и 6000 мг/л.

Дозы растворов отмеряли пипетками. Один раз в неделю дафнии пересаживали в свежеприготовленную среду.

В ходе экспериментов учитывали: количество живых рачков, время появления яиц в выводковых камерах, время выхода молоди в воду, ее количество. Молодь удаляли. Часть молоди 1-го выводка пересаживали в такие же сосуды и содержали в таких же условиях, как и их родителей. По полученным результатам рассчитывали выживаемость и плодовитость дафний. Достоверность различий оценивали по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни [11]. Величины полуметальных концентраций рассчитывали по критериям Миллера-Тейтнера [12], для этого использовали авторскую компьютерную программу.

Исследование дегидрогеназной активности ила

В основе метода определения дегидрогеназной активности ила лежит способность индикатора – 2,3,5-трифенил-2Н-тетразолия хлорида (ТТХ) образовывать при восстановлении формазан красного цвета.

- без предварительной инкубации

В серию пробирок вносили по 5 мл перемешанной иловой суспензии, одну пробирку оставляли в качестве контроля, в другие добавляли водный раствор антибиотика до концентраций 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 и 5000 мг/л, добавляли по 1 мл фосфатного буфера (рН 7,4) и 0,1 мл 1 % раствора ТТХ. Содержимое пробирок тщательно перемешивали, предварительно закрыв их стеклянными притертыми пробками. Пробы инкубировали при 37°C на водяной бане в течение 30 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 3 мин при скорости вращения барабана центрифуги 3000 об/мин, супернатант сливали, а к осадку добавляли по 10 мл этанола. Содержимое пробирок энергично встряхивали до полного обесцвечивания хлопьев ила. После обесцвечивания пробы центрифуги-

ровали в течение 3 мин. при той же скорости вращения барабана центрифуги. Экстинкцию окрашенного в красный цвет спиртового раствора определяли с помощью колориметра фотоэлектрического концентрационного КФК-2 (Россия) при длине волны 490 нм в кювете с толщиной слоя 0,5 см. Раствором сравнения служил спирт этиловый [7]. Все эксперименты проводили в 3-х повторностях.

Изменение дегидрогеназной активности ила в % (ДАИ) рассчитывали по формуле (1):

$$ДАИ = \frac{D_0 - D_k}{D_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

где ДАИ – изменение дегидрогеназной активности ила, %;

D_0 – оптическая плотность опытной пробы;

D_k – оптическая плотность контрольной пробы.

– после инкубации в течение 24 часов

В серию пробирок вносили по 5 мл пере-

мешанной иловой суспензии, одну пробирку оставляли в качестве контроля, в другие добавляли водный раствор антибиотика до концентраций 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 и 5000 мг/л и оставляли на сутки. Через 24 часа в каждую пробирку добавляли по 1 мл фосфатного буфера (рН 7,4) и 0,1 мл 1 % ТТХ, а затем проводили испытание аналогично серии экспериментов без предварительной инкубации.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 приведены результаты исследования выживаемости дафний в средах с различными концентрациями ампициллина.

Из данных таблицы видно, что к завершению эксперимента ампициллин вызвал гибель 25% дафний в растворе с концентрацией 5000 мг/л и 67% дафний в растворе с концентрацией 6000 мг/л. В растворах с концентрациями от 50 до 4000 мг/л, так же как и в контроле, гибели дафний до завершения экспериментов не наблюдали.

Размножение дафний при воздействии ампициллина происходило во всех сериях эксперимента. Яйца в выводковых камерах дафний

Таблица 1

Выживаемость дафний (%) при воздействии растворов ампициллина

Время опыта (сутки)	Концентрация ампициллина, мг/л											
	50	100	200	300	400	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	73
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	73
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	73
8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	73
10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	67
12	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	63
14	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	53
16	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	33
18	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	33
20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	33
21	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	33

Примечание: величина дисперсии в диапазоне от 1% до 3%.

в растворах с концентрациями 50 – 5000 мг/л появлялись одновременно с контролем, в растворе с концентрацией 6000 мг/л; – на двое суток позже. Достоверные различия величин плодovitости дафний в экспериментах по сравнению с контролем наблюдали в растворах с концентрациями 5000 мг/л ($U_{\text{оп}} = 0$ $U_{\text{ст}} = 6$ при $P=0,01$) и 6000 мг/л ($U_{\text{оп}} = 0$ $U_{\text{ст}} = 6$ при $P=0,01$). Различия величин плодovitости в контроле и опытной серии с концентрациями ампициллина 50-4000 мг/л недостоверны.

Исследование влияния антибиотика на сообщество микроорганизмов активного ила проводили непосредственно после добавления антибиотика к пробе активного ила и после инкубации в течение суток. Результаты эксперимента представлены на рисунке 2.

В серии опытов без предварительной инкубации ДАИ уменьшалась во всех пробах под действием ампициллина. Концентрации антибиотика 300-5000 мг/л вызывали снижение дегидрогеназной активности ила более чем на 20 %.

При инкубации в течение суток в пробах с концентрацией ампициллина до 400 мг/л образование формазана уменьшалось, что указывает на ингибирование антибиотиком фер-

ментной системы микроценоза активного ила. Дальнейшее увеличение концентрации ампициллина приводило к росту содержания формазана в пробе. Полученные данные могут быть следствием раскрытия β -лактамно-го кольца лекарственного вещества и образования продуктов окисления, способствующих образованию формазана.

Заключение. Ампициллин оказывает влияние на выживаемость дафний, начиная с концентрации 5000 мг/л. Плодovitость в ряду трёх поколений *Daphnia magna* Straus при действии антибиотика не меняется. Полученные результаты позволяют отнести ампициллин к классу очень слаботоксичных веществ для водных организмов в соответствии с классификацией Л.А. Лесникова и К.К. Врочинского [13].

Ампициллин проявляет токсическое действие на сообщество микроорганизмов активного ила в концентрациях 200-400 мг/л. После инкубации в течение 24 часов в интервале концентраций 500-5000 мг/л наблюдается увеличение образования формазана, что может быть связано с прямым взаимодействием ТТХ с увеличивающимся количеством продуктов окисления ампициллина.

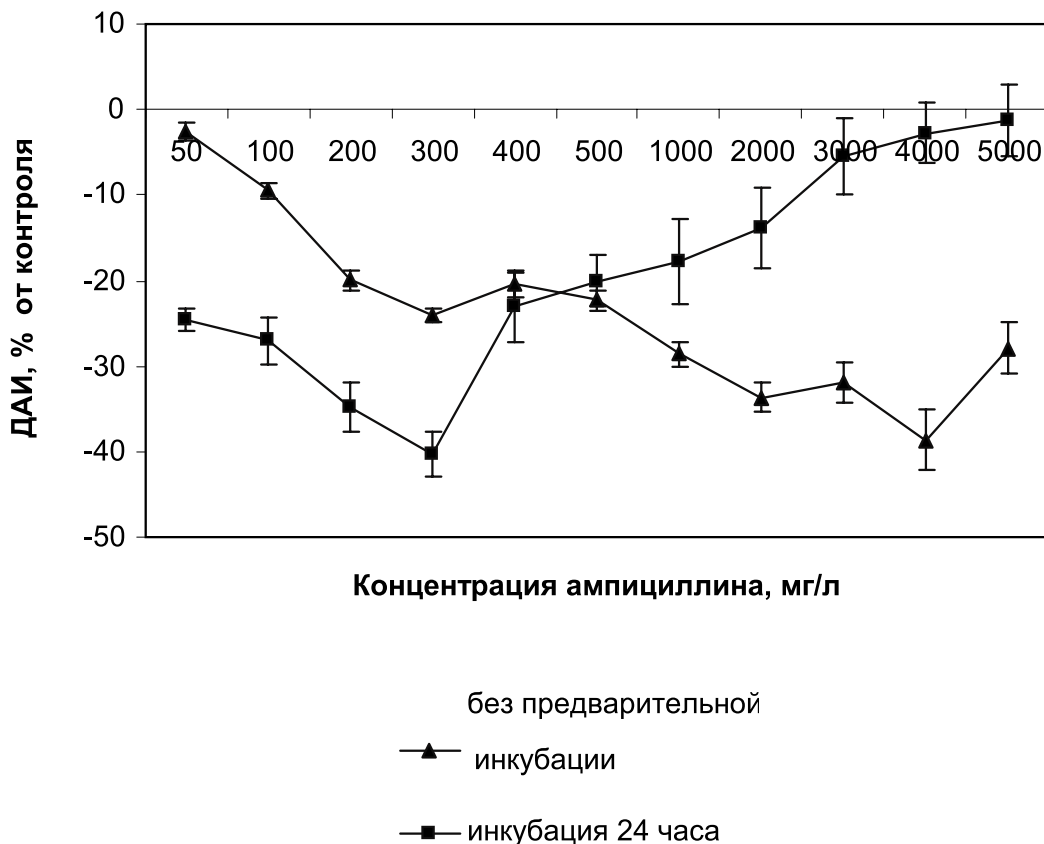


Рис 2. Изменение дегидрогеназной активности ила при действии ампициллина

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство по обеспечению качества питьевой воды. Третье издание. Том 1 Рекомендации. Available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3ruprelim_1to5.pdf?ua=1
2. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I // *Chemosphere*. 75. 2009; 417-434.
3. Jelic A., Gros M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*. 10. 2010; 45-84.
4. Мизина П.Г., Симанина А.А., Герасимов Ю.Л., Пурыгин П.П., Использование клеточных тест-объектов в предварительной оценке токсичности экспериментальных составов сорбционно-активных средств медицинского назначения // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012. № 1. С. 209-214.
5. Mashchenko Z.E., Maslova E.V., Mizina P.G., Gerasimov Yu.L., Shatalaev I.F., Purygin P.P. Сравнительное исследование токсичности бензилпенициллина натриевой соли на клеточных тест-объектах // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015. № 1. С. 3-8
6. Методические указания МУ 1.1.726-98 Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов. М., 1998. 38 с.
7. Шаталаев И.Ф. Биотестирование токсичности сточных вод по дегидрогеназной активности ила. Методические рекомендации. Самара: СамГМУ; 1998. 6с.
8. Рачина С.А., Козлов Р.С., Шаль Е.П. и др. Анализ антибактериальной терапии госпитализированных пациентов с внебольничной пневмонией в различных регионах: уроки многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования. // *Клин микробиол. Антимикроб. Химиотер.* 2009. Т. 11. № 1. С. 66-78.
9. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования: Гигиенические нормативы. ГН 2.1.5.1315-03. – М: Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2003. 100 с.
10. Стрганов Н.С. Методика определения токсичности водной среды. В кн. *Методики биологических исследований по водной токсикологии*. М.: Наука; 1971: 210 – 216.
11. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов Л.: Медицина; 1978.
12. Экологический мониторинг. Методы биомониторинга. Ч 2. Н.Новгород: ННГУ; 1995.
13. Лесников Л.А., Врочинский К.К. Классификация пестицидов с рыбохозяйственных позиций // *Изв. ГосНИОРХ*. 1974. Вып. 98. С. 9-13.

REFERENCES:

1. Guidelines for drinking water quality. Third edition. Volume 1 Recommendations. Available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3ruprelim_1to5.pdf?ua=1
2. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I // *Chemosphere*. 2009; 417-434.
3. Jelic A., Gros M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*. 2010; 45-84.
4. Mizina P.G., Simakina A.A., Gerasimov Yu.L., Purygin P.P. Using of a cellular test subjects in the preliminary assessment of the toxicity of experimental compounds sorption-active medical supplies // *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii*. 2012. № 1. С. 209-214 (In Russian)
5. Mashchenko Z.E., Maslova E.V., Mizina P.G., Gerasimov Yu.L., Shatalaev I.F., Purygin P.P. Comparative study on the toxicity of benzylpenicillin sodium salt at a cellular test objects // *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii*. 2015. № 1. С. 3-8 (In Russian)
6. Methodical instructions MI 1.1.726-98 Hygienic regulation of pharmaceuticals in the air of working zone, atmospheric air of populated areas and water of water objects. М., 1938 p. (In Russian)
7. Shatalaev I.F. Biotestirovanie toksichnosti stochnykh vod po degidrogenaznoj aktivnosti iila. Metodicheskie rekomendatsii. Samara: SamGМУ; 196 p. (In Russian)
8. Rachina C.A., Kozlov R.S., Shal' E.P. et al. Analysis of antibacterial therapy in hospitalized patients with community-acquired pneumonia in different regions: lessons from a multicenter pharmacoepidemiological studies // *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* 2010. № 1. С. 66-78 (In Russian)
9. Maximum permissible concentration (MPC) of chemical substances in water of water objects of drinking and cultural-domestic water use: Hygienic standards. GN 2.1.5.1315-03. – М: Rossiyskiy registr potentsial'no opasnykh khimicheskikh i biologicheskikh veshchestv Ministerstva zdavookhraneniya Rossiyskoy Federatsii, 2010 p. (In Russian)
10. Stroganov N.S. The method of determining the toxicity of aquatic environment. In proc. *Methods of biological research on aquatic toxicology*. М.: Nauka; 1971: 210 – 216 (In Russian)
11. Gubler E.V. Computational methods of analysis and recognition of pathological processes L.: Meditsina; 1978 (In Russian)
12. Environmental monitoring. Methods of biomonitoring. P. N.Novgorod: NNGU; 1995 (In Russian)
13. Lesnikov L. A., Wroczynski K. K. Classification of pesticides with fisheries management positions // *Izv. GosNIORKh*. 1974. Vol. 98. P. 9-13.

Z.E. Mashchenko¹, E.V. Maslova¹, P.G. Mizina², Y.L. Gerasimov³, P.P. Purygin³, I.F. Shatalaev⁴.

STUDY OF AMPICILLIN TOXICITY TO DAPHNIA MAGNA CRUSTACEANS AND ACTIVATED SILT COMMUNITY

¹Samara State Technical University, 443100 Samara, Russian Federation

²All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 117216 Moscow, Russian Federation

³S.P. Korolev Samara National Research University, 443086 Samara, Russian Federation

⁴Samara State Medical University, 443079 Samara, Russian Federation

Although the total content of organic compounds in water is regulated, it is rather difficult to formulate and set standards for individual organic substances coming to the biological treatment facilities of urban aeration stations. Many experts believe it necessary to conduct further experimental studies to set their permissible concentrations and prevent slowing down biological treatment. One of the accepted experimental control methods for toxicity is a bio testing method. In the course of the present study, an investigation into ampicillin toxicity was performed for the test-objects daphnia and community of microorganisms in active silt. The experiment was carried out on crustaceans using N.S. Stroganov standard technique. The impact of antibiotics on active silt was assessed by changes in the microorganisms' dehydrogenases activity. The research results allow to characterize ampicillin as very low toxic to *Daphnia* and to active silt community of microorganisms, toxic effect of the antibiotics was established in concentrations of 200 to 400 mg/l.

Keywords: ampicillin, toxicity, daphnia, activated sludge, dehydrogenase

Переработанный материал поступил в редакцию 11.01.2018 г.