

УДК 579.852.11

UDC 579.852.11

4.3.1. Технологии, машины и оборудование для агропромышленного комплекса (технические науки)

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ШТАММОВ *BACILLUS SP. (T5, D4, O6)* НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ *DAPHNIA MAGNA* STRAUS, 1820

Ольшевская Анастасия Владимировна
к.тех.н., доцент кафедры Технологии и
оборудование переработки продукции
агропромышленного комплекса
SPIN РИНЦ: 8026-6860
Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1
e-mail: olshevskaya.av@gs.donstu.ru

Саркисян Диана Славиковна
студент, лаборант кафедры «Проектирование и
технический сервис транспортно-
технологических систем»
SPIN РИНЦ: 8500-8112; AuthorID: 1180124
Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1
e-mail: dianassarkisyan@mail.ru

Чолугаева Энкрина Эренценовна
Студент 4 курса
Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1
e-mail: chilutaevaa@mail.ru

Шевченко Виктория Николаевна
к.б.н., доцент кафедры Технологии и
оборудование переработки продукции
агропромышленного комплекса
SPIN РИНЦ: 5860-1478 ORCID: 0000-0002-5001-
4959
Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1
e-mail: vshevchenko@donstu.ru

Мазанко Мария Сергеевна
Кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник научно-исследовательской
лаборатории «Центр агробиотехнологии».
Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1
e-mail: mmazanko@sfedu.ru

Козырев Денис Андреевич
к.б.н.

4.3.1. Technologies, machinery and equipment for the agro-industrial complex (technical sciences)

IMPACT OF *BACILLUS SP. STRAINS (T5, D4, O6)* ON THE SURVIVAL OF *DAPHNIA MAGNA* STRAUS, 1820

Olshevskaya Anastasiya Vladimirovna
Cand.Sci.Tech., Associate Professor of the
Department of Technology and Equipment for
Processing Agricultural Products
SPIN RSCI: 8026-6860
Don State Technical University, 1 Gagarin Sq.,
Rostov-on-Don, 344010, Russia
email: olshevskaya.av@gs.donstu.ru

Sarkisyan Diana Slavikovna
4th Year Student, Laboratory Assistant of the
Department of Design and Technical Service of
Transport and Technological Systems
SPIN РИНЦ: 8500-8112; AuthorID: 1180124

Don State Technical University, 1 pl.Gagarina,
Rostov-on-Don, 344010, Russia
e-mail: dianassarkisyan@mail.ru

Cholutaeva Enkrina Erentsenovna
4th Year Student
Don State Technical University, 1 pl.Gagarin,
Rostov-on-Don, 344010, Russia
e-mail: chilutaevaa@mail.ru

Shevchenko Viktoria Nikolaevna
Cand.Sci.Biol., Associate Professor of the
Department of Technology and Equipment for
Processing Agricultural Products
SPIN RSCI: 5860-1478 ORCID: 0000-0002-5001-
4959
Don State Technical University, 1 pl.Gagarin,
Rostov-on-Don, 344010, Russia
e-mail: vshevchenko@donstu.ru

Mazanko Maria Sergeevna
Cand.Sci.Biol., senior research scientist «Center of
Agrobiotechnology»
Don State Technical University, 1 pl.Gagarina,
Rostov-on-Don, 344010, Russia
e-mail: mimazanko@sfedu.ru

Kozyrev Denis Andreevich
Cand.Sci.Biol.

SPIN РИНЦ: 1871-6987; ORCID: 0000-0003-1202-6622; ResearcherID: E-9058-2019
 Донской государственный технический университет, Россия, 344010, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1
 e-mail: dinis.kozyrev@bk.ru

Поиск экологически безопасных альтернатив антибиотикам для контроля патогенов в аквакультуре требует всесторонней оценки потенциального воздействия применяемых штаммов бактерий на нецелевые организмы водных экосистем. *Daphnia magna* Straus, 1820, как ключевой зоопланктонный вид и стандартный тест-объект, является идеальной моделью для подобных исследований. В рамках настоящего исследования проведена оценка воздействия штаммов бактерий рода *Bacillus* (T5, D4, O6), продуцирующих бактериоцины, на выживаемость *D. magna*. Работа выполнена на культуре дафний 26-го лабораторного поколения в условиях хронического 7-суточного эксперимента при концентрации тестируемых штаммов бактерий 10^6 КОЕ/мл. Установлены статистически значимые штамм-специфические эффекты. Штамм D4 вызвал снижение выживаемости до 33,3%. Штамм O6 продемонстрировал снижение выживаемости до 56,7% при одновременном увеличении репродуктивного выхода до 13,1 экз. молоди на выжившую самку. Штамм T5 показал сохранение выживаемости на уровне 96,7% при снижении репродуктивной функции до 5,7 экз. молоди на самку. Результаты свидетельствуют о необходимости обязательного токсикологического тестирования штаммов-продуцентов бактериоцинов на стандартных гидробионтах перед их потенциальным применением в аквакультуре. Выявленные разнонаправленные эффекты подчеркивают важность видовой и штаммовой специфичности при оценке экологической безопасности бактериальных препаратов

Ключевые слова: *DAPHNIA MAGNA*, *BACILLUS*, БАКТЕРИОЦИНЫ, ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ, ПРОБИОТИКИ

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-213-011>

SPIN RSCI: 1871-6987; ORCID: 0000-0003-1202-6622; ResearcherID: E-9058-2019
 Don State Technical University, 1 pl. Gagarina, Rostov-on-Don, 344010, Russia
 e-mail: dinis.kozyrev@bk.ru

The search for environmentally safe alternatives to antibiotics for pathogen control in aquaculture requires a comprehensive assessment of the potential impact of utilised bacterial strains on non-target aquatic organisms. *Daphnia magna* Straus, 1820, as a key zooplankton species and a standard test organism, represents an ideal model for such studies. This study aimed to evaluate the effects of bacteriocin-producing *Bacillus* sp. strains (T5, D4, and O6) on the survival of *D. magna*. The experiment was conducted on a 26th-generation laboratory culture of daphnids in a chronic 7-day bioassay with a concentration of 10^6 CFU/mL for each tested bacterial strain. Statistically significant strain-specific effects were established. Strain D4 induced a reduction in survival to 33.3%. Strain O6 demonstrated a decrease in survival to 56.7%, while simultaneously increasing the reproductive output to 13.1 offspring per surviving female. Strain T5 showed a high survival rate of 96.7%, but a reduction in reproductive function to 5.7 offspring per female. The results indicate the necessity of mandatory toxicological testing of bacteriocin-producing strains on standard aquatic bioindicators prior to their potential application in aquaculture. The observed multidirectional effects underscore the importance of species and strain specificity when assessing the environmental safety of bacterial preparations

Keywords: *DAPHNIA MAGNA*, *BACILLUS*, BACTERIOCINS, ECOTOXICOLOGY, PROBIOTICS

Введение

Daphnia magna Straus, 1820 является одним из наиболее широко используемых модельных организмов для оценки токсичности широкого спектра фармацевтических и ветеринарных препаратов, включая антибиотики, противоопухолевые средства, антидепрессанты,

противовоспалительные препараты, бета-блокаторы, гиполипидемические средства и др. [1].

Применение *D. magna* в токсикологических исследованиях было впервые описано Андерсоном в 1944 г. для оценки токсичности веществ в промышленных сточных водах [2]. Стандартизация методов тестирования, начавшаяся в 1960-х годах, способствовала повсеместному принятию этого модельного организма [3]. На сегодняшний день тесты на основе *D. magna* являются одним из наиболее распространенных подходов в оценке токсичности химических соединений, включая лекарственные препараты [4].

Популярность *D. magna* в качестве модельного объекта обусловлена рядом практических преимуществ: небольшими размерами тела (взрослая особь от 0,5 до 6 мм), коротким жизненным циклом, высокой плодовитостью и партеногенетическим размножением, что позволяет быстро получать большое количество генетически идентичных организмов [5]. Кроме того, культивирование дафний отличается простотой, низкой стоимостью и соответствует принципам 3R (Replacement, Reduction, Refinement) в этике научных исследований [1, 6]. Среди различных видов дафний *D. magna*, как относительно крупный вид, стал наиболее предпочтительной моделью благодаря своей чувствительности к токсикантам и обширной истории использования в биологических исследованиях [3, 5, 6].

В настоящее время токсикологические исследования на *D. magna* в основном основаны на стандартизованных OECD тестах, оценивающих летальные и иммобилизационные эффекты, такие как острый тест на иммобилизацию (OECD 202) и хронический тест на репродукцию (OECD 211), продолжительностью 21 день [7, 8]. В то время как острые тесты фокусируются на таких параметрах, как смертность и иммобилизация, репродуктивный тест позволяет оценивать более широкий спектр

сублетальных эффектов. К ним относятся: продолжительность жизни половозрелых особей, продукция потомства каждой родительской особью, время до появления первого потомства, количество и размер потомства, кумулятивная линька, а также эмбриотоксические параметры (количество абортированных яиц, аномалии развития потомства и др.) [9]. Репродуктивный тест успешно применяется для изучения токсичности антибиотиков [10], противоэпилептических [8], противовоспалительных препаратов [11] и репродуктивных гормонов [9]. Существуют также модификации стандартного OECD теста с сокращенной продолжительностью до 10 или 14 дней [12, 13].

Несмотря на обширные данные о летальных эффектах, сублетальное воздействие лекарственных препаратов на *D. magna* изучено в значительно меньшей степени [14]. Таким образом, актуальным направлением является расширение спектра оцениваемых параметров (поведенческих, физиологических и биохимических) для всесторонней оценки экологического риска, представляемого лекарственными средствами [15]. В последние годы объектом пристального внимания экотоксикологии становятся не только токсичные вещества, но и соединения, потенциально способные модулировать токсический эффект. В частности, перспективным направлением является изучение воздействия пробиотиков на физиологию гидробионтов и их устойчивость к загрязнителям. Исследования на *D. magna* демонстрируют, что пробиотики могут оказывать положительное влияние на выживаемость, темпы роста и репродуктивную функцию ракообразных, а также влиять на их микробиом, что потенциально может модифицировать ответ на токсическую нагрузку [16]. Это открывает новые возможности для использования дафний в качестве модели для изучения сложных взаимодействий в системе «хозяин-микробиом-ксенобиотик». Целью настоящего исследования явилась комплексная оценка воздействия новых штаммов *Bacillus* spp. T5, Д4 и О6,

являющимися продуцентами бактериоцинов, на выживаемость и репродуктивную функцию *D. magna* в условиях хронического эксперимента. В задачи работы входило: установление показателей выживаемости дафний при 7-суточной экспозиции с исследуемыми штаммами; оценка влияния на репродуктивные параметры (общая плодовитость и плодовитость на выжившую самку); статистический анализ полученных данных для выявления значимых различий между опытными группами.

Материалы и методы

Культура дафний 26-го лабораторного поколения содержались в условиях стандартного режима культивирования: температура 20 ± 1 °C, фотопериод 16:8, плотность посадки в период культивирования составляла не более 50 особей на 1 л среды. В качестве среды использовалась отстоянная в течение 24 часов водопроводная вода, аэрированная и обогащенная солями согласно стандарту ISO 6341 [17]. Кормление особей осуществлялось суспензией зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* (концентрация $\sim 5 \times 10^5$ клеток/мл) и дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* (концентрация $\sim 2 \times 10^5$ клеток/мл) один раз в сутки. Все эксперименты проводились на партеногенетических самках возраста 7-10 дней, отобранных из синхронизированной культуры.

В работе использовались новые штаммы бактерий рода *Bacillus* sp. Т5, Д4, О6, являющиеся продуцентами бактериоцинов. Исходным материалом для выделения штаммов являлись пробы донных отложений, отобранных из р. Дон в районе г. Ростов-на-Дону, а также в карьере, используемом в качестве водоема для садковой аквакультуры осетровых рыб (Азовский район, Ростовская область). Необходимость поисковых исследований новых штаммов-продуцентов бактериоцинов обусловлена острой потребностью в аквакультуре и других отраслях сельского хозяйства в новых альтернативных способах профилактики и лечения

инфекционных заболеваний в виду регистрируемой резистентности циркулируемых патогенных штаммов.

Перед экспериментом каждый штамм культивировали в жидкой питательной среде LB (Luria-Bertani) в течение 24 часов при температуре 37 °C и постоянном встряхивании (240 об/мин). Клетки собирали центрифугированием (4000 g, 10 мин), трижды отмывали стерильным физиологическим раствором (0,89% NaCl) для удаления метаболитов культуральной среды и ресуспенсировали в стерильной воде. Концентрацию клеток в полученной суспензии устанавливали спектрофотометрически (при длине волны 600 нм) и доводили до рабочей концентрации 1×10^6 КОЕ/мл с последующим подтверждением методами серийных разведений и высея на чашки Петри со средой LB.

Хронический эксперимент продолжительностью 7 суток был проведен в соответствии с руководством OECD с модификациями. Опыт включал 4 группы: *контрольная группа* (1 л тестовой среды); *опытная группа Т5*: 1 л тестовой среды + суспензия *Bacillus* sp. Т5 (до конечной концентрации 1×10^6 КОЕ/мл); *опытная группа Д4*: 1 л тестовой среды + суспензия *Bacillus* sp. Д4 (до конечной концентрации 1×10^6 КОЕ/мл); *опытная группа О6*: 1 л тестовой среды + суспензия *Bacillus* sp. О6 (до конечной концентрации 1×10^6 КОЕ/мл).

В каждый сосуд (объемом 1 л) помещали по 10 ювенильных дафний (возраст <24 ч). Для каждой группы было использовано 3 независимых повторности (всего 12 сосудов, 120 дафний). Эксперимент проводился в климатической камере при стандартных условиях культивирования (20 ± 1 °C, фотопериод 16:8).

Учет параметров проводился ежедневно методом визуального наблюдения. Фиксации подлежали два основных показателя: выживаемость и плодовитость. Подсчет живых особей в каждой повторности осуществлялся в соответствии со стандартным протоколом:

особь считали погибшей при отсутствии любой двигательной активности в течение 15 секунд непрерывного наблюдения после легкого встряхивания экспериментального сосуда. Учет репродуктивной функции проводили путем ежедневного подсчета количества ювенильных особей, выпущенных каждой самкой за предыдущие 24 часа. Для предотвращения каннибализма и исключения повторного учета новорожденных дафний извлекали из экспериментальных сосудов после регистрации. По окончании 7-суточного эксперимента были рассчитаны следующие показатели: общая выживаемость (в процентах от начального количества особей), совокупная плодовитость (общее количество потомков, произведенное всеми выжившими самками в каждой группе) и среднее количество потомков на одну выжившую самку.

Для проверки статистической значимости различий был применен непараметрический критерий Краскела-Уоллиса в связи с неравномерностью распределения данных.

Результаты

Полученные данные демонстрируют выраженные различия между опытными группами и контрольной группой. Анализ выживаемости показал существенные различия между группами. Наибольшая выживаемость была зарегистрирована в группе Т5 ($96,7 \pm 0,3\%$), где значения достоверно не отличались от стандартных показателей для лабораторных культур дафний в оптимальных условиях. В группе О6 выживаемость составила $56,7 \pm 4,4\%$, что ниже, чем в группе Т5. Наименьшая выживаемость была отмечена в группе Д4 ($33,3 \pm 5,7\%$), где в двух из трех повторностей была зафиксирована полная гибель особей к концу эксперимента. В контрольной группе выживаемость оказалась низкой ($43,3 \pm 0,9\%$), что указывает на наличие стресс-факторов в контрольной среде, не связанных с действием бактериальных штаммов. Попарное сравнение показало, что выживаемость в группе Т5 была

достоверно выше, чем в группах Д4 и О6 ($p < 0,05$). Различия между группами Д4, О6 и контролем были статистически незначимы ($p > 0,05$).

Количество потомства варьировало между группами. Максимальные значения были зарегистрированы в группе Т5 ($54,7 \pm 5,5$ экз. на повторность) и группе О6 ($48,7 \pm 11,7$ экз. на повторность). В группе Д4 этот показатель был значительно ниже ($30,7 \pm 24,0$ экз. на повторность), что, вероятно, связано с низкой выживаемостью. В контрольной группе общее количество молодых особей составило $35,7 \pm 26,8$ экз. на повторность. Различия между группами не достигли уровня статистической значимости ($p > 0,05$) из-за к высокой вариабельности внутри групп.

Плодовитость на одну выжившую самку показала наибольшие различия. Наибольшая плодовитость была отмечена в группе О6 ($13,1 \pm 4,8$ экз. молоди на самку), что превышало показатели контрольной группы ($11,4 \pm 9,1$ экз. молоди на самку). В группе Т5 плодовитость была достоверно ниже ($5,7 \pm 0,7$ экз. молоди на самку). В группе Д4 расчет данного показателя был возможен только для одной повторности ($8,2$ экз. молоди на самку) в связи с полной гибелью особей в других повторностях. Плодовитость в группе О6 была достоверно выше, чем в группе Т5 ($p < 0,05$).

Таким образом, показано, что воздействие штаммов носило разнонаправленный характер. Штамм Т5 показал нейтральное воздействие на репродуктивную функцию при высокой выживаемости. Штамм О6 стимулировал плодовитость при умеренной выживаемости. Штамм Д4 оказал выраженное негативное влияние на выживаемость диффий.

Проведенное исследование выявило штамм-специфическое влияние продуцентов бактериоцинов *Bacillus* sp. на параметры *D. magna*. Ключевым результатом является демонстрация разнонаправленности эффектов: от выраженного негативного (штамм Д4) до потенциально стимулирующего репродуктивную функцию (штамм О6) и нейтрального в

отношении выживаемости при одновременном подавлении плодовитости (штамм Т5). Воздействие пробиотических штаммов на зоопланктон является результатом взаимодействия между их метаболической активностью, состоянием организма-хозяина и условиями среды.

Наиболее значимым результатом является полная или почти полная гибель дафний в двух из трех реплик в группе Д4. Данный эффект может быть следствием продукции высокоактивных бактериоцинов или иных биологически активных метаболитов (например, поверхностно-активных веществ наподобие сурфактина), оказывающих прямое токсическое действие на кишечный эпителий или нервную систему раков.

Показательным является результат по штамму Об. Несмотря на снижение выживаемости, была зафиксирована максимальная плодовитость на одну выжившую самку ($13,1 \pm 4,8$ молоди). Возможное объяснение может заключаться в способности некоторых штаммов *Bacillus* продуцировать экзоферменты, повышающие биодоступность питательных веществ из корма для дафний.

Штамм Т5 показал высокую выживаемость (96,7%), но наименьшую плодовитость на самку ($5,7 \pm 0,7$ экз. молоди). Данный диссоциированный эффект может указывать на то, что метаболиты этого штамма не являются остротоксичными, но вызывают хронический физиологический стресс, перераспределяя энергетические ресурсы организма с репродуктивной функции на поддержание гомеостаза и детоксикацию.

Заключение

Проведенное исследование позволило дать комплексную оценку влияния новых штаммов-продуцентов бактериоцинов *Bacillus* sp. Т5, Д4 и Об на параметры *D. magna* в условиях хронического эксперимента. Анализ выживаемости и плодовитости выявил статистически значимую, разнонаправленную и штамм-специфическую реакцию тест-объекта на воздействие исследуемых микроорганизмов.

Установлено, что штамм *Bacillus* sp. Д4 проявил свойства острого токсиканта, вызвав достоверное снижение выживаемости до 33,3%. Данный факт указывает на высокую экологическую опасность и исключает возможность его применения в биотехнологиях, связанных с водными экосистемами.

Штамм *Bacillus* sp. О6 продемонстрировал комплексный физиологический эффект: на фоне умеренного снижения выживаемости (56,7%) было зафиксировано статистически значимое увеличение репродуктивного выхода на одну выжившую самку (13,1 экз. молоди). Это позволяет классифицировать его действие как модулирующее и предполагает наличие механизмов компенсаторного увеличения плодовитости в условиях стресса.

Штамм *Bacillus* sp. Т5 показал положительное воздействие на выживаемость (96,7%), сопоставимое с оптимальными лабораторными условиями, однако при этом было отмечено подавление репродуктивной функции (5,7 экз. молоди на самку).

Полученные результаты подчеркивают критическую необходимость обязательной и комплексной токсикологической оценки на стандартных гидробионтах для всех штаммов, предполагаемых к использованию в качестве пробиотиков или иных кормовых добавок в аквакультуре.

Благодарности: Работа проведена в рамках выполнения проекта «Разработка персонализированных кормов нового поколения с растительными и пробиотическими добавками для повышения выживаемости и улучшения здоровья рыб» (FZNE-2023-0003).

Список литературы

1. Tkaczyk A, Bownik A, Dudka J, Kowal K, Ślaska B. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 763. – Art. 143038.
2. Anderson B G. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna* // *Sewage Works Journal*. – 1944. – Vol. 16. – No. 6. – P. 1156-1165.
3. Persoone G, Baudo R, Cotman M, Blaise C, Thompson K C, Moreira-Santos M, Han T et al. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test–Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs // *Knowledge and management of aquatic ecosystems*. – 2009. – No. 393. – Art. 01.
4. Villegas-Navarro A, Rosas-L E, Reyes J L. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2003. – Vol. 136. – No. 2. – P. 127-134.
5. Liu Z, Yu P, Cai M, Wu D, Zhang M, Huang Y, Zhao Y. Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex* // *Chemosphere*. – 2019. – Vol. 215. – P. 74-81.
6. Bownik A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 700. – Art. 134400.
7. OECD. Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test // *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. – Paris: OECD Publishing, 2004.
8. OECD. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test // *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. – Paris: OECD Publishing, 2012.
9. Oropesa A L, Floro A M, Palma P. Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of *Daphnia magna* // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23. – No. 17. – P. 17311-17321.
10. Constantine L A, Huggett D B. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* // *Chemosphere*. – 2010. – Vol. 80. – No. 9. – P. 1069-1074.
11. de Oliveira L L D, Antunes S C, Gonçalves F, Rocha O, Nunes B. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna* // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2016. – Vol. 39. – No. 1. – P. 13-21.
12. Hayashi Y, Heckmann L H, Callaghan A, Sibly R M. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen // *Ecotoxicology*. – 2008. – Vol. 17. – No. 4. – P. 246-251.
13. Borgatta M, Waridel P, Decosterd L A, Buclin T, Chèvre N. Multigenerational effects of the anticancer drug tamoxifen and its metabolite 4-hydroxy-tamoxifen on *Daphnia pulex* // *Science of The Total Environment*. – 2016. – Vol. 545. – P. 21-29.
14. Rocha R, Gonçalves F, Marques C, Nunes B. Environmental effects of anticholinesterasic therapeutic drugs on a crustacean species, *Daphnia magna* // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – Vol. 21. – No. 6. – P. 4418-4429.
15. Goodrich M S, Lech J J. A behavioral screening assay for *Daphnia magna*: a method to assess the effects of xenobiotics on spacial orientation // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. – 1990. – Vol. 9. – No. 1. – P. 21-30.
16. Djalil M, Koniyo Y, Mulis M. Increasing Population of *Daphnia Magna* Natural Feed Using the Probiotic Effective Microorganisms-4 (EM4) // *The NIKÉ Journal*. – 2020. – Vol. 8. – No. 3. – P. 96-103.

17. ISO 6341:2012. Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. – Geneva: International Organization for Standardization (ISO), 2012.

Reference

18. Tkaczyk A, Bownik A, Dudka J, Kowal K, Ślaska B. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 763. – Art. 143038.
19. Anderson B G. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna* // *Sewage Works Journal*. – 1944. – Vol. 16. – No. 6. – P. 1156-1165.
20. Persoone G, Baudo R, Cotman M, Blaise C, Thompson K C, Moreira-Santos M, Han T et al. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test—Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs // *Knowledge and management of aquatic ecosystems*. – 2009. – No. 393. – Art. 01.
21. Villegas-Navarro A, Rosas-L E, Reyes J L. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2003. – Vol. 136. – No. 2. – P. 127-134.
22. Liu Z, Yu P, Cai M, Wu D, Zhang M, Huang Y, Zhao Y. Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex* // *Chemosphere*. – 2019. – Vol. 215. – P. 74-81.
23. Bownik A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 700. – Art. 134400.
24. OECD. Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test // *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. – Paris: OECD Publishing, 2004.
25. OECD. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test // *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. – Paris: OECD Publishing, 2012.
26. Oropesa A L, Floro A M, Palma P. Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of *Daphnia magna* // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23. – No. 17. – P. 17311-17321.
27. Constantine L A, Huggett D B. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* // *Chemosphere*. – 2010. – Vol. 80. – No. 9. – P. 1069-1074.
28. de Oliveira L L D, Antunes S C, Gonçalves F, Rocha O, Nunes B. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna* // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2016. – Vol. 39. – No. 1. – P. 13-21.
29. Hayashi Y, Heckmann L H, Callaghan A, Sibyl R M. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen // *Ecotoxicology*. – 2008. – Vol. 17. – No. 4. – P. 246-251.
30. Borgatta M, Waridel P, Decosterd L A, Buclin T, Chèvre N. Multigenerational effects of the anticancer drug tamoxifen and its metabolite 4-hydroxy-tamoxifen on *Daphnia pulex* // *Science of The Total Environment*. – 2016. – Vol. 545. – P. 21-29.
31. Rocha R, Gonçalves F, Marques C, Nunes B. Environmental effects of anticholinesterasic therapeutic drugs on a crustacean species, *Daphnia magna* // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – Vol. 21. – No. 6. – P. 4418-4429.
32. Goodrich M S, Lech J J. A behavioral screening assay for *Daphnia magna*: a method to assess the effects of xenobiotics on spacial orientation // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. – 1990. – Vol. 9. – No. 1. – P. 21-30.

33. Djalil M, Koniyo Y, Mulis M. Increasing Population of Daphnia Magna Natural Feed Using the Probiotic Effective Microorganisms-4 (EM4) // The NIKÉ Journal. – 2020. – Vol. 8. – No. 3. – P. 96-103.

34. ISO 6341:2012. Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. – Geneva: International Organization for Standardization (ISO), 2012.