The background of the cover is a photograph of a waterfall cascading over dark, mossy rocks. Two fish are captured mid-jump, leaping over the white, frothy water of the falls. The surrounding area is lush with green vegetation and trees.

# **АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ**

**МАТЕРИАЛЫ V ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
ПО ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ,  
ПОСВЯЩЕННОЙ ПАМЯТИ Б. А. ФЛЕРОВА,  
С ПРИГЛАШЕНИЕМ СПЕЦИАЛИСТОВ  
ИЗ СТРАН БЛИЖНЕГО ЗАРУБЕЖЬЯ**

## **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

**ШКОЛА–СЕМИНАР ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ,  
АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ**

**ТОМ I**

**28 октября – 1 ноября 2014 г.**

**БОРОК  
2014**



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД  
ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН



РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ



ДЕПАРТАМЕНТ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ  
ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛАСТИ

## **АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ**

**МАТЕРИАЛЫ**

V ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ,  
ПОСВЯЩЕННОЙ ПАМЯТИ Б.А. ФЛЕРОВА

И

## **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

**МАТЕРИАЛЫ**

ШКОЛЫ-СЕМИНАРА ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ  
Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.

ТОМ 2

УДК 504.4.064(063)

ББК28.082

А-72

**Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы: материалы V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, с приглашением специалистов из стран ближнего зарубежья; Современные методы исследования состояния поверхностных вод в условиях антропогенной нагрузки: материалы школы-семинара для молодых ученых, аспирантов и студентов. (Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.). В двух томах. Том 2.– Ярославль: Филигрань, 2014. – 204 с.**

**ISBN 978-5-906682-13-0**

Сборник материалов опубликован при финансовой поддержке:  
Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 14-04-20214-г)  
Федерального агентства научных организаций России  
Департамента охраны окружающей среды и природопользования Ярославской области

В книге опубликованы материалы докладов конференции и школы–семинара по широкому кругу теоретических и практических вопросов водной экотоксикологии и охраны окружающей среды.

В части 2 материалов рассматриваются биохимические, физиологические, поведенческие реакции гидробионтов на действие антропогенных факторов; приведены тексты и конспекты, прочитанных лекций.

Для широкого круга специалистов: токсикологов, гидробиологов, экологов, гидрохимиков, ихтиологов, зоологов, альгологов, гидроботаников.

Материалы печатаются в авторской редакции

Компьютерная верстка: И.В. Чалова, Е.А. Заботкина

Фото на обложке:

на лицевой – нерестовый ход лососевых рыб на одной из рек п-ва Камчатка, автор А.В. Улатов, 2014 г.;

на обороте – замор рыбы в результате сброса сточных вод на р.Лухта, Грязовецкий район, Вологодская область, автор Г.М. Чуйко, лето 2009 г.

ISBN 978-5-906682-13-0

© Институт биологии внутренних вод РАН, 2014

# БИОХИМИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ НА ДЕЙСТВИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

УДК 574.5; 574.2; 574.24

## ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТРЕСС-ОТВЕТА И ТЕРМОПРЕФЕРЕНЦИИ У БАЙКАЛЬСКИХ И ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД И ГАСТРОПОД В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Д.В. Аксенов - Грибанов<sup>1</sup>, Ю.А. Лубяга<sup>2</sup>, Д.С. Бедулина<sup>1</sup>, А.Н. Гурков<sup>2</sup>, И.В. Войцеховская<sup>2</sup>, Ж.М. Шатилина<sup>1</sup>, С.О. Прокозов<sup>2</sup>, М.А. Тимофеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ биологии ФГБОУ ВПО «ИГУ»

г. Иркутск 664003, Россия, denis.axengri@gmail.com

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «ИГУ» г. Иркутск 664003, Россия

Выявлена специфика стресс-ответа байкальских и палеарктических амфипод и гастропод в условиях повышенной антропогенной нагрузки и определена связь ширины диапазона метаболической стабильности с экологическими характеристиками видов.

**Ключевые слова:** Амфиподы, Байкал, гастроподы, термопреференция

Температура является важнейшим экологическим фактором среды, от которого напрямую зависят обмен веществ и развитие гидробионтов. Повышенная температура воды может усилить негативное влияние токсикантов на организмы, населяющие водные экосистемы. В связи с этим, большую актуальность представляет исследование неспецифических показателей терморезистентности и термопреференции видов.

Большинство пойкилотермных водных организмов приспособлено к обитанию в определенном температурном диапазоне, в пределах которого их метаболические процессы функционируют с наибольшей эффективностью. Отклонение параметров среды от оптимальных значений ведет к развитию стрессовой реакции и активации ряда защитных механизмов [1]. У гидробионтов, способных к активному перемещению, выработались выраженные термопреферентные поведенческие реакции, позволяющие организмам выбирать ту или иную оптимальную температурную зону [2]. В случае невозможности избегания критических температур, у гидробионтов активируются комплексные метаболические процессы, направленные на адаптацию к последствиям изменения температуры среды [3].

Целью исследования было выявление специфика стресс-ответа байкальских и палеарктических амфипод и гастропод в условиях повышенной антропогенной нагрузки и определение связи ширины диапазона метаболической стабильности с экологическими (термо- и токсикорезистентными) характеристиками видов.

В исследовании использовали представителей байкальских термочувствительных амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) и *Ommatogammarus flavus* (Dyb., 1874), а также термочувствительных гастропод вида *Benedictia limnaeoides ongurensis* (Kozhov, 1936). В качестве представителей термоустойчивой палеарктической фауны были выбраны амфиподы вида *Gammarus lacustris* Sars (1863) и гастроподы вида *Lymnaea stagnalis* (Linneus, 1758) - типичные обитатели мелководных водоемов Палеарктики. Материалы, характеризующие токсикорезистентные характеристики амфипод, представлены в работе [4].

Экспозицию организмов в широком градиенте температур проводили в соответствии с методикой экспериментальной акклиматизации, рекомендованной Pörtner, Kunst (2008). В ходе исследования проводили 2 типа экспериментов: первый – экспозиция амфипод и гастропод в условиях градиентного (постепенного, непрерывного) повышения температуры среды от 6 (4)°C (принимаемой за контрольный показатель) до температуры, при которой отмечали гибель 50% особей; второй – экспозиция в условиях градиентного понижения температуры среды от контрольного уровня (6 (4)°C) до минимальных положительных температур (0,5°C). Скорость изменения температуры в эксперименте составила 1°C/ч. Фиксацию материалов проводили в жидком азоте. Контрольные образцы фиксировали непосредственно в начале эксперимента при температуре 6°C для литоральных видов и при 4°C для глубоководных. Для оценки влияния изменения температуры среды на показатели клеточного метаболизма (в том числе стресс-маркеров) определяли изменения маркеров энергетического обмена (содержание лактата, ряда других энергетических метаболитов и активности лактатдегидрогеназы), содержания белков теплового шока БТШ70 и активности антиоксидантных ферментов (пероксидазы и каталазы).

Оценку изменения содержания энергетических метаболитов проводили энзиматическими спектрофотометрическими методами с применением стандарт-наборов «Лактат-витал» и «ЛДГ-витал» и согласно методикам Grieshaberetal. (1987), Bergeymer (1985) с модификациями Ivaninaetal. (2010), Sokolovaetal. (2012). Изменение содержания БТШ70 определяли с использованием стандартного метода денатурирующего электрофореза с ДДС-На в 10 % полиакриламидном геле с последующим Вестерн-блоттингом (Willmeretal., 2000) и инкубацией мембран в антителах к БТШ70 и антителах к актину. Последний применяли в качестве референтного белка. Оценку изменения активности ферментов антиоксидантной системы – пероксидазы и каталазы – проводили согласно модифицированным спектрофотометрическим методикам Drotar (1985) и Aebi (1984) соответственно [4].

Результаты проведенного исследования указывают на то, что экспозиция байкальских и палеарктических амфипод и гастропод в широком градиенте температур вызывает перестройки в энергетическом метаболизме и влияет на характер показателей неспецифического стресс-ответа. Описанные особенности исследуемых стресс-маркеров связаны с экологическими характеристиками исследованных видов, и, в частности, с их различными терморезистентными и термопреферентными характеристиками. Полученные материалы согласуются с данными о терморезистентности видов [4].

При оценке показателей энергетического обмена у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод показано, что экспозиция организмов в условиях температуры среды, выходящей за пределы диапазона оптимальных значений, приводила к накоплению лактата. При этом у амфипод и гастропод различалась направленность изменений активности лактатдегидрогеназы. Так, у всех представленных в работе амфипод в ответ на повышение температуры активность лактатдегидрогеназы снижалась, а у обоих видов гастропод, напротив, увеличивалась. Понижение температуры среды вызывало рост активности лактатдегидрогеназы у термочувствительных видов амфипод *E. verrucosus* и *O. flavus* и ее снижение у палеарктических гастропод *L. stagnalis*. Данные особенности, по-видимому, связаны с увеличением энергодефицита в клетках при экспозиции в условиях не оптимальных температур.

При критических отклонениях температур среды у исследованных видов происходит снижение потребления кислорода и, согласно нашим материалам, накопление продуктов анаэробного обмена – лактата, снижение содержания продуктов аэробного обмена - АТФ и энергии аденилатов (показано на примере амфипод видов *E. verrucosus*, *E. cyaneus*), изменение активности лактатдегидрогеназы, что может указывать на увеличении доли анаэробного метаболизма, необходимого для поддержания энергетического гомеостаза в условиях стрессового воздействия [3] и, соответственно, в условиях повышенной антропогенной нагрузки.

На примере байкальских гастропод *B. ongurensis* показано, что при повышении температуры происходит ряд метаболических перестроек, вследствие чего энергии свободных фосфагенов становится, по-видимому, недостаточно, и байкальские гастроподы используют запасы депонированных фосфагенов, таких как аргининфосфат. Высвобождение энергии из депонированных фосфагенов может приводить не только к синтезу новых БТШ70 и обеспечению их успешного функционирования, но и к обеспечению энергией ряда других метаболических. Снижение содержания глюкозы и гликогена при этом (в настоящем исследовании показано на примере гастропод) указывает на повышение интенсивности метаболизма и возрастающее расходование энергии в условиях температурного стресса [3]. На угнетение физиологического и энергетического состояния у байкальских гастропод может указывать и увеличение содержания аланина, снижение содержания БТШ70 и лактата (на поздних сроках экспозиции), что, по-видимому, также обусловлено происходящими изменениями в метаболизме.

Одной из возможных причин накопления продуктов анаэробноза, помимо температурного стресса, может быть нарастание окислительных процессов в клетках и развитие оксидативного стресса, сопровождающегося накоплением активных форм кислорода - АФК, на что указывают представленные выше изменения активности антиоксидантных ферментов – пероксидазы и каталазы у всех исследованных в работе видов, увеличение потребления кислорода амфиподами в условиях градиентной гипертермии и изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Экспозиция амфипод и гастропод в условиях повышенной антропогенной нагрузки ведет к изменению активности ферментов АОС, что вероятно указывает на нарушение системы контроля за эндогенно-образованными АФК. Так, повышение активности пероксидазы у всех исследованных байкальских видов амфипод и гастропод, а также каталазы (у байкальских и палеарктических видов) свидетельствует в пользу активации АОС для борьбы с процессами свободно-радикального окисления. Описанные межвидовые различия активности антиоксидантных ферментов тесно связаны с экологическими характеристиками исследованных видов, в частности, с их различными терморезистентными и термопреферентными особенностями [5].

В ходе оценки изменения содержания стрессовых белков у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод показано, что экспозиция видов в широком градиенте температур ведет к увеличению

содержания стрессовых белков семейства БТШ70. БТШ70 являются одними из наиболее изученных маркеров стрессовых состояний. Будучи молекулярными шаперонами, они восстанавливают нативную конформацию и функциональную активность белков. Таким образом, синтез БТШ70 направлен на противодействие и (или) компенсацию негативных последствий процессов, связанных с изменением температуры среды. Накопление БТШ70 у исследованных видов при отклонении температуры среды от оптимальной направлено на защиту от стрессового воздействия. Снижение же содержания БТШ70, наблюдаемое при высоких температурах экспозиции у термочувствительного *B. ongurensis* может указывать на угнетение метаболизма, деградацию БТШ70 и возрастающий энергодефицит клеток [3].

Оценивая связь полученных данных с экологическими характеристиками видов, следует сопоставить их с ранее опубликованными материалами оценки температурного предпочтения. Из приведенных в работе данных хорошо видно, что наиболее выраженные изменения показателей клеточного метаболизма у амфипод *E. verrucosus* наступают при превышении температурного порога в  $9.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$  и при снижении температуры ниже  $2.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ; у *O. flavus* - при превышении температурного порога в  $8.5 \pm 0.9^\circ\text{C}$  и при снижении температуры ниже  $1.8 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ; а у палеарктического *G. lacustris* – при температуре выше  $19 \pm 5.2^\circ\text{C}$  и ниже  $2.3 \pm 1.7^\circ\text{C}$ . Таким образом, видно, что установленные температурные диапазоны отражают зону стабильности показателей клеточного метаболизма у видов. Следует особо отметить то, что эти зоны совпадают с ранее опубликованными данными о диапазонах предпочитаемых видами температур в условиях температурного градиента, выявленных в поведенческих экспериментах [4].

Близкая картина наблюдается и у гастропод. Так, у вида *B. ongurensis* наиболее выраженные изменения показателей клеточного метаболизма наступают при превышении температурного порога в  $10^\circ\text{C}$ , что позволяет предположить, что пик термопредпочтения данного вида смещен в сторону низких положительных температур и вероятным температурным оптимумом вида является температура  $3 - 11.1 \pm 1.2^\circ\text{C}$ . У *L. stagnalis* выраженные изменения показателей клеточного метаболизма наступают при превышении температуры среды в  $14.5 \pm 2.2^\circ\text{C}$  и при снижении температуры ниже  $5.3 \pm 1.2^\circ\text{C}$ .

Как следует из представленных выше данных, у палеарктических видов *G. lacustris* и *L. stagnalis* активация стрессового ответа и накопление продуктов анаэробного дыхания происходят при больших отклонениях температуры среды от оптимальных значений, чем у байкальских видов. Различия в экологии байкальских и палеарктических организмов обусловлены термо- и токсикорезистентными особенностями видов, их термопредпочтениями и другими экологическими и физиологическими характеристиками [4].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-00501\_a, РФФИ 14-14-00400, программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «ИГУ» и совместной программы академических обменов DAAD - Минобрнауки РФ М. Ломоносов 2014-2015.

#### Список литературы

1. Чуйко Г.М. Биомаркеры оксидативного стресса и биотрансформации ксенобиотиков у леща рыбного водохранилища из зон с различной антропогенной нагрузкой // Г.М. Чуйко, А.А. Морозов, В.В. Юрченко // Бассейн Волги в XXI-м веке: структура и функционирование экосистем водохранилищ. – 2012. – С. 338.
2. Немова Н.Н. Биохимические адаптации гидробионтов белого моря // Изучение рационального использования и охраны природных ресурсов белого моря. – 2010. – с. 125.
3. Pörtner Н.О. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance/ Н. О. Pörtner, R. Knust // Science. – 2007. – Vol. 315. – p. 95–97.
4. Тимофеев М.А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р.биол. Наук: 030208 / М.А. Тимофеев; ТГУ; Томск. – 2010. – 384 с.
5. Barata С. Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. / С. Barata, J. Navarro, I. Varo, M. Riva, S. Arun, С. Porte // Comp. Biochem. Physiol. В. – 2005. – Vol. 140. – p. 81–90.

А.И. Аминов

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок,  
152742 Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, alexsis89@rambler.ru

Исследована амилолитическая активность в кишечнике рыб-ихтиофагов и в целом организме молоди рыб в широком диапазоне концентраций Раундапа, а также при различных значениях рН и температуры в присутствии Раундапа в концентрации 25 мкг/л.

*Ключевые слова:* рыбы, Раундап, амилолитическая активность.

Среди антропогенных факторов, влияющих на функционирование водных экосистем, важная роль принадлежит ксенобиотикам, количество которых увеличивается с ростом уровня антропогенного загрязнения. Одним из них является высокотехнологичный системный гербицид глифосат, широко используемый в мире с середины 70-х годов прошлого века. На основе изопропиламиновой соли глифосата создано много гербицидов, самый известный из которых Раундап. Он широко используется для уничтожения сорной растительности на полях, в коллекторно-дренажных каналах, оросительных системах и прудах. Раундап ингибирует рост растений, препятствуя синтезу 3 ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана [1]. Попадая в организм гидробионтов, гербицид включается в метаболизм и может вызывать нарушения различных функций. Значения ЛК<sub>50</sub> (96-ч) Раундапа для рыб и дафний варьируют от 2 до 168 мг/л [2], а ПДК для воды рыбохозяйственных водоемов составляет 0.001 мг/л.

В последние годы накоплено большое количество сведений о токсичности Раундапа для беспозвоночных и рыб [2; 3; 4; 5]. Механизм его действия на организм животных до сих пор не изучен, в то же время токсичность глифосата связывают, главным образом, с его высокой кислотностью [3]. Раундап изменяет многие метаболические и энзиматические параметры рыб [1; 5], однако его действие на активность ферментов, гидролизующих углеводы у рыб различных экологических групп, изучено крайне слабо [2; 4]. Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, а гидролазы жертвы могут принимать участие в пищеварении у рыб и обеспечивать аутодеградацию собственных тканей [6], изучение характеристик гликозидаз при действии Раундапа представляет значительный интерес не только для экологической физиологии, но и для практики рыбного хозяйства. В то же время, температура и рН – важнейшие абиотические факторы, не только определяющие скорость различных физиолого-биохимических процессов у водных животных, но и меняющее степень влияния различных антропогенных факторов.

В связи с этим цель работы состояла в изучении *in vitro* влияния гербицида Раундап в широком диапазоне концентраций на активность гликозидаз в кишечнике взрослых рыб, а также в целом организме молоди рыб при различных значениях рН и температуры.

В качестве консументов исследованы щука *Esox lucius* L. (масса тела 91 ± 25 г), налим *Lota lota* (L.) (848 ± 131 г) и обыкновенный сом *Silurus glanis* L. (16275 ± 1907 г). В качестве объектов питания исследована молодь тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nord.) (0.55 ± 0.03 г), плотвы *Rutilus rutilus* (L.) (0.25 ± 0.01 г) и речного окуня *Perca fluviatilis* L. (0.63 ± 0.05 г).

В суммарных гомогенатах целого организма или слизистой оболочки медиального отдела кишечника рыб определяли амилолитическую активность (АА), отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал – α-амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20, модифицированным методом Нельсона [7]. Инкубацию гомогенатов и субстрата (растворимый крахмал в концентрации 18 г/л) проводили в течение 30 мин с использованием 6 концентраций Раундапа (0, 0.1, 1, 10, 25, 50 мкг/л) либо в 18 вариантах экспериментальных условий с использованием двух концентраций Раундапа (0 и 25 мг/л), трех значений температуры (0, 10 и 20 °С) и трех значений рН (5.0, 7.4, 8.3). Выбор этих значений был обусловлен тем, что средняя сезонная температура для водоёмов умеренных широт России составляет 0–3 °С зимой, 10 °С весной и осенью, 20 °С летом, а значения рН в пищеварительном тракте рыб в зависимости от стадии пищеварения варьируют от кислых до слабо щелочных значений. Концентрация Раундапа 25 мкг/л выбрана как действующая на активность гликозидаз, исходя из результатов проведенных ранее экспериментов [4].

Максимальный уровень активности гликозидаз отмечен в кишечнике налима, минимальный в кишечнике окуня и щуки (табл. 1).

У налима достоверное повышение уровня АА на 9–56% от контроля отмечено в диапазоне концентраций Раундапа 0.1–25 мкг/л. В кишечнике сома и щуки достоверных изменений уровня АА при действии Раундапа не выявлено.

Максимальная активность гликозидаз в химусе отмечена у сома, минимальная – у налима и щуки (табл. 1). Достоверное повышение АА в химусе щуки на 7% отмечено лишь при концентрации гербицида 10 мкг/л. У налима отмечено снижение АА на 9–13% от контроля при всех концентрациях Раундапа, исключая 10 мкг/л. У сома достоверных изменений ферментативной активности в химусе по сравнению с контролем не выявлено.

**Таблица 1.** Влияние гербицида Раундап на амилалитическую активность (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника рыб

Вид рыб	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Слизистая оболочка кишечника						
Щука	0.43±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>a</sup>	0.45±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>a</sup>
Налим	0.81±0.01 <sup>a</sup>	1.09±0.02 <sup>b</sup>	0.89±0.01 <sup>b</sup>	1.27±0.02 <sup>r</sup>	0.89±0.01 <sup>b</sup>	0.86±0.02 <sup>b</sup>
Сом	0.59±0.03 <sup>a</sup>	0.60±0.01 <sup>a</sup>	0.58±0.02 <sup>a</sup>	0.57±0.02 <sup>a</sup>	0.56±0.02 <sup>a</sup>	0.58±0.01 <sup>a</sup>
Химус						
Щука	1.15±0.01 <sup>a</sup>	1.19±0.02 <sup>a,b</sup>	1.19±0.02 <sup>a,b</sup>	1.23±0.02 <sup>b</sup>	1.16±0.03 <sup>a</sup>	1.23±0.02 <sup>b</sup>
Налим	1.25±0.01 <sup>a</sup>	1.11±0.02 <sup>b</sup>	1.08±0.01 <sup>b</sup>	1.15±0.04 <sup>b</sup>	1.14±0.03 <sup>b</sup>	1.08±0.05 <sup>b</sup>
Сом	1.69±0.04 <sup>a,b</sup>	1.59±0.01 <sup>b</sup>	1.68±0.04 <sup>a,b</sup>	1.68±0.02 <sup>a,b,b</sup>	1.71±0.03 <sup>a</sup>	1.61±0.03 <sup>b,b</sup>

*Примечание.* Здесь и в табл. 3:  $M \pm m$  – среднее значение показателя и его ошибка; разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые отличия между показателями в строке,  $p < 0.05$ .

Максимальный уровень АА в кишечнике взрослых рыб отмечен при pH 7.4 и температуре 20 °С (табл. 2). В этих условиях Раундап достоверно снижает АА у налима и сома соответственно на 18 и 21% от контроля, у щуки достоверных изменений нет. При смещении pH в кислую сторону, как и при снижении температуры, уровень АА достоверно снижается. Максимальное торможение АА наблюдается у всех видов рыб при pH 5 и температуре 0 °С и составляет 89% у щуки и налима, и 59% от контроля у сома. В зоне щелочных значений pH эффекты сходны.

При температуре 20 °С, pH 7.4 в присутствии Раундапа (25 мкг/л) уровень АА в химусе снижается на 9% от контроля лишь у щуки. При смещении pH в кислую сторону и снижении температуры эффекты Раундапа усиливаются. Торможение АА при pH 5 и температуре 0 °С составляет 95% у щуки, 80% у налима и 71% от контроля у сома.

В целом организме молоди рыб максимальный уровень АА отмечен у плотвы, минимальный – у тюльки (табл. 3). Однако достоверных эффектов Раундапа на уровень АА у плотвы и тюльки не выявлено. У окуня отмечено повышение АА на 17% от контроля лишь при максимальной из исследованных концентраций Раундапа.

При температуре 20 °С и pH 7.4 тормозящий эффект Раундапа на АА в целом организме молоди окуня составляет 16% от контроля, в то время как у молоди плотвы отмечен стимулирующий эффект – увеличение на 11% от контроля (табл. 4). У молоди плотвы при pH 5 уровень АА снижается на 24% от контроля, у окуня снижение pH не влияет на величину эффекта. Снижение температуры с 20 °С до 0 °С у плотвы увеличивает стимулирующий эффект Раундапа до 55%, у окуня не изменяет его.

Наибольшее снижение АА отмечено при 0 °С и pH 5 в присутствии Раундапа: на 97 и 54% у плотвы и окуня соответственно. Этот эффект, главным образом, обусловлен совместным действием pH и температуры.

Полученные результаты свидетельствуют о разной устойчивости гликозидаз, гидролизующих полисахариды в кишечнике взрослых рыб-ихтиофагов и в целом организме молоди рыб, входящих в состав их кормовой базы, к *in vitro* действию Раундапа в широком диапазоне концентраций, а также в диапазоне температуры 0–20 °С и pH 5.0–8.3. При температуре 20 °С и pH 7.4 уровень АА в слизистой оболочке кишечника налима в присутствии Раундапа (0.1–50 мкг/л) повышается на 9–56% от контроля, у щуки и сома достоверных эффектов не обнаружено. В химусе щуки отмечено достоверное повышение АА на 7% от контроля при концентрации 10 мкг/л, у налима наблюдается противоположный эффект – снижение АА на 9–13% от контроля практически при всех исследованных концентрациях. У сома достоверных эффектов Раундапа на АА в химусе не установлено. Кислые pH усиливают тормозящий эффект Раундапа в химусе у щуки (снижение на 95% от контроля), в меньшей степени – в слизистой кишечника сома (снижение на 59% от контроля). При температуре 20 °С и pH 7.4 в целом организме

молоди окуня отмечено повышение АА на 17% от контроля лишь при максимальной концентрации Раундапа, у других видов значимых эффектов нет. Однако Раундап в концентрации 25 мкг/л при температуре 0 °С и рН 5 снижает уровень АА в организме всех исследованных видов на 54–97% от контроля.

**Таблица 2.** Влияние Раундапа на амилалитическую активность (мкмоль/г·мин) слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб при разных значениях рН и температуры

Температура, °С	Концентрация Раундапа, мкг/л	рН		
		5.0	7.4	8.3
Слизистая оболочка кишечника				
Щука				
0	0	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01
	25	0.08±0.01	0.20±0.01	0.18±0.01
10	0	0.36±0.00	0.47±0.01	0.37±0.00
	25	0.32±0.01	0.52±0.01	0.31±0.01*
20	0	0.70±0.01	0.71±0.02	0.71±0.00
	25	0.62±0.02	0.68±0.01	0.60±0.02*
Налим				
0	0	0.23±0.01	0.24±0.02	0.22±0.01
	25	0.10±0.01*	0.26±0.01	0.25±0.01
10	0	0.50±0.00	0.54±0.02	0.55±0.01
	25	0.37±0.01*	0.54±0.02	0.59±0.01
20	0	0.79±0.02	0.88±0.02	0.86±0.01
	25	0.56±0.01*	0.72±0.01*	0.89±0.01
Сом				
0	0	0.13±0.01	0.22±0.01	0.20±0.01
	25	0.14±0.01	0.19±0.00	0.15±0.01
10	0	0.18±0.00	0.27±0.01	0.21±0.01
	25	0.22±0.01	0.27±0.01	0.25±0.01
20	0	0.28±0.00	0.34±0.01	0.30±0.01
	25	0.24±0.01	0.27±0.01	0.25±0.01
Химус				
Щука				
0	0	0.17±0.00	0.36±0.01	0.33±0.01
	25	0.05±0.01*	0.27±0.01*	0.11±0.01*
10	0	0.37±0.02	0.49±0.01	0.47±0.00
	25	0.17±0.01*	0.44±0.01	0.31±0.01*
20	0	0.77±0.01	1.03±0.01	0.79±0.01
	25	0.45±0.02*	0.94±0.01*	0.54±0.02*
Налим				
0	0	0.30±0.02	0.21±0.00	0.15±0.01
	25	0.14±0.01*	0.18±0.01	0.16±0.01
10	0	0.45±0.01	0.43±0.00	0.38±0.01
	25	0.22±0.01*	0.42±0.01	0.33±0.01
20	0	0.74±0.02	0.71±0.02	0.58±0.01
	25	0.37±0.02*	0.69±0.01	0.58±0.01
Сом				
0	0	0.49±0.00	0.62±0.01	0.52±0.01
	25	0.39±0.00*	0.62±0.01	0.44±0.02
10	0	0.69±0.01	0.77±0.01	0.74±0.01
	25	0.62±0.01*	0.81±0.01	0.69±0.01
20	0	1.28±0.02	1.33±0.00	1.30±0.02
	25	1.08±0.01*	1.27±0.02	1.20±0.02

\*– различия показателей в присутствии и в отсутствие Раундапа статистически достоверны при одних и тех же значениях температуры и рН,  $p < 0.05$ .

**Таблица 3.** Амилолитическая активность (мкмоль/г·мин) в целом организме молоди рыб при действии *in vitro* гербицида Раундап

Вид рыб	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Плотва	8.22±0.32 <sup>а,б</sup>	8.23±0.34 <sup>а,б</sup>	8.40±0.13 <sup>а,б</sup>	8.78±0.25 <sup>б</sup>	8.18±0.09 <sup>а,б</sup>	7.74±0.13 <sup>а</sup>
Окунь	4.11±0.07 <sup>а,б</sup>	3.79±0.32 <sup>а,б</sup>	4.27±0.17 <sup>б,в</sup>	3.57±0.20 <sup>а</sup>	3.95±0.20 <sup>а,б</sup>	4.80±0.24 <sup>г</sup>
Тюлька	0.51±0.03 <sup>а</sup>	0.52±0.03 <sup>а</sup>	0.47±0.03 <sup>а</sup>	0.47±0.02 <sup>а</sup>	0.49±0.03 <sup>а</sup>	0.46±0.02 <sup>а</sup>

**Таблица 4.** Амилолитическая активность (мкмоль/г·мин) в целом организме молоди рыб при действии *in vitro* гербицида Раундап при разных значениях рН и температуры

Температура, °С	Концентрация Раундапа, мкг/л	рН		
		5.0	7.4	8.3
Плотва				
0	0	0.25±0.01	1.49±0.10	1.02±0.11
	25	0.39±0.11	1.78±0.12	1.62±0.07*
10	0	2.36±0.29	6.96±0.30	7.04±0.10
	25	2.36±0.24	7.40±0.17	6.72±0.19
20	0	4.60±0.28	14.08±0.48	12.48±0.43
	25	3.48±0.10*	15.60±0.60	13.24±0.47
Окунь				
0	0	0.75±0.13	0.59±0.14	0.61±0.07
	25	0.69±0.10	0.72±0.09	0.59±0.11
10	0	1.13±0.13	0.88±0.11	0.92±0.10
	25	0.94±0.15	0.84±0.12	1.17±0.15
20	0	1.13±0.11	1.49±0.04	1.21±0.16
	25	1.02±0.13	1.24±0.08*	1.20±0.10
Тюлька				
0	0	0.26±0.02	0.26±0.01	0.08±0.02
	25	0.12±0.02*	0.12±0.03*	0.13±0.02
10	0	0.38±0.03	0.43±0.04	0.17±0.03
	25	0.40±0.01	0.30±0.02*	0.14±0.03
20	0	0.66±0.04	0.62±0.03	0.31±0.06
	25	0.63±0.03	0.60±0.03	0.34±0.01

\*– различия показателей в присутствии и в отсутствие Раундапа статистически достоверны при одних и тех же значениях температуры и рН,  $p < 0.05$ .

Таким образом, ферменты целого организма молоди рыб менее подвержены действию Раундапа, как в широком диапазоне концентраций гербицида, так и при совместном действии низкой температуры и рН, по сравнению с одноименными ферментами кишечника взрослых рыб.

#### Список литературы

- Lushchak O.V., Kubrak O.I., Storey J.M., et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues // *Chemosphere*. 2009. V. 52. № 7. P. 932–937.
- Папченкова Г.А., Голованова И.Л., Ушакова Н.В. Репродуктивные показатели, размеры и активность гидролаз у *Daphnia magna* в ряду поколений при действии гербицида “Раундап” // *Биология внутр. вод*. 2009. № 3. С. 105–110.
- Tsui M.T.K., Chu L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors // *Chemosphere*. 2003. V. 52. № 7. P. 1189–1197.
- Голованова И.Л., Филиппов А.А., Аминов А.И. Влияние гербицида Раундап *in vitro* на активность карбогидраз молоди рыб // *Токсикол. вестник*. 2011. № 5. С. 31 – 35.

5. Cattaneo R., Clasen B., Loro V.L. et al. Toxicological responses of cyprinus carpio exposed to a commercial formulation containing glyphosate // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2011. V. 87. № 6. P. 597–602.
6. Кузьмина В.В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Докл. РАН. 2000. Т. 339. № 1. С. 172–174.
7. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С. 192–196.

УДК 591.428.4:556.555.8

## **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖАБЕРНОГО АППАРАТА РЫБ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ (НА ПРИМЕРЕ ВЫГОЗЕРСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА)**

Л.А. Беличева, Ю.Н. Лукина

*Институт водных проблем Севера Карельского Научного Центра РАН  
185000, г. Петрозаводск, респ. Карелия, Россия, belicheva.lida@yandex.ru*

Дана характеристика состояния жаберного аппарата рыб, обитающих в условиях хронического загрязнения. Гистологическое исследование выявило широкий спектр изменений, позволило оценить характер происходящих процессов и степень повреждения органа.

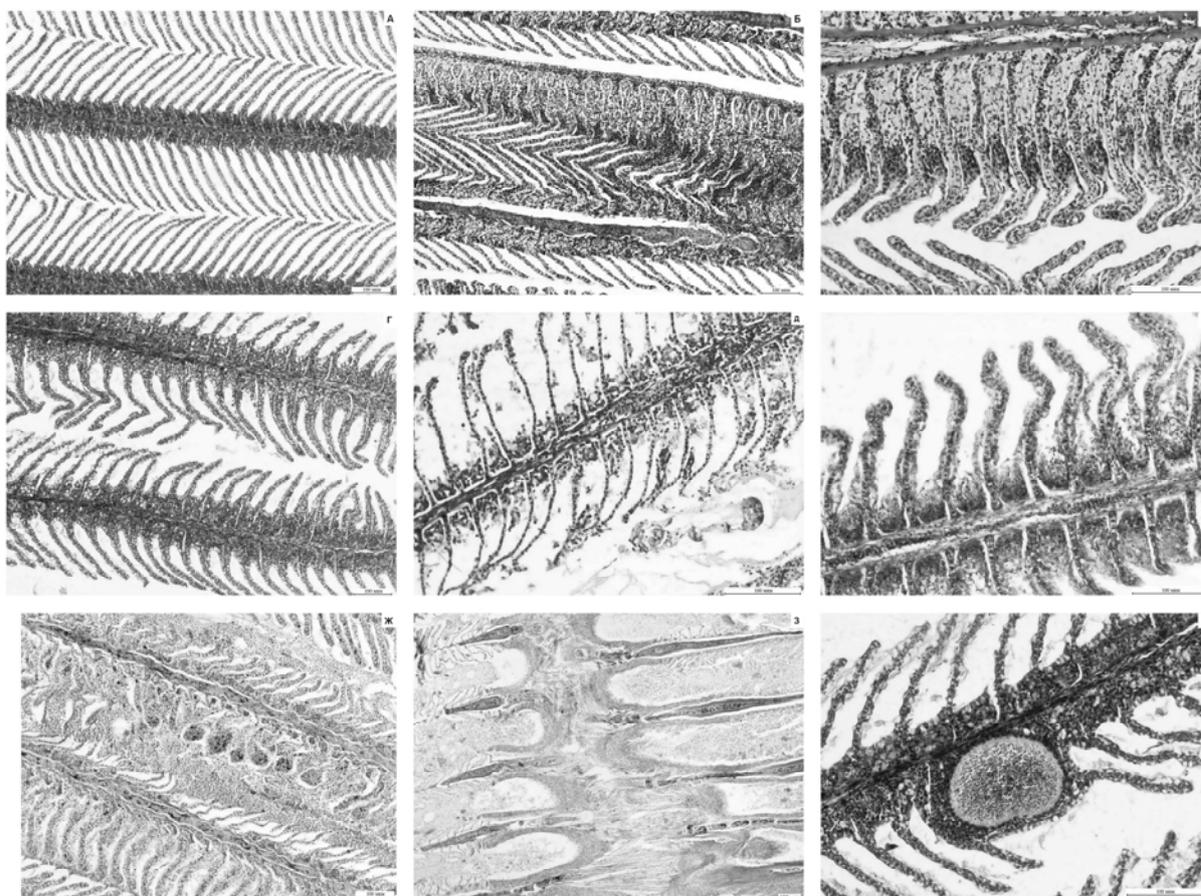
*Ключевые слова:* гистопатологические изменения, жабры, загрязнение

Исследования, посвященные оценке влияния загрязняющих веществ на водные и наземные экосистемы, привлекают пристальное внимание во всем мире. Несмотря на достигнутый прогресс в познании последствий загрязнения для живых организмов, поиск новых, чувствительных индикаторов, которые позволяют раскрывать механизмы антропогенного воздействия, до сих пор актуален. С этой точки зрения наиболее перспективными являются гистопатологические индикаторы, среди которых морфофункциональные изменения жаберного аппарата занимают особое место. Влияние длительного загрязнения на состояние жабр рыб изучалось на акватории Выгозерского водохранилища, испытывающего интенсивную антропогенную нагрузку более 70 лет. Основную роль в трансформации экосистемы водохранилища сыграло строительство Сеgezского целлюлозно-бумажного комбината (ЦБК) в 1940 г. – основного источника загрязнения водоема. В настоящее время Выгозерское водохранилище имеет многоцелевое использование, связанное с водным хозяйством, энергетической отраслью, целлюлозно-бумажным и металлургическим производством. Кроме того, данный водоем является составной частью Беломоро-Балтийского канала, в связи с чем, испытывает интенсивную нагрузку от судоходства. Современный этап характеризуется снижением токсичности сточных вод Сеgezского ЦБК, однако биотестирование донных отложений Выгозера с использованием рачков *Gmelinoides fasciatus* Stebbing 1899 свидетельствует о высокой токсичности донных отложений водоема, которые являются источником негативного воздействия на водные сообщества.

Цель данного исследования – изучение морфофункционального состояния жаберного аппарата рыб в условиях хронического воздействия сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности. Исследования проводились в 2007-2011 гг. В качестве тест-объекта был выбран лещ *Abramis brama* (L.) – типичный бентофаг, ведущий оседлый образ жизни, для которого качественный состав донных отложений является определяющим для нормальной жизнедеятельности. Отбор проб для гистологического анализа прекращался через 20 минут после извлечения рыбы из воды для того, чтобы сохранить картину тканевой структуры, соответствующую исходному состоянию. В качестве фиксатора использовалась жидкость Буэна. Обработка проб проводилась по общепринятым гистологическим методикам: гистологические препараты готовились методом заливки органов и тканей в парафин, с последующим изготовлением парафиновых блоков и гистологических срезов с использованием санного микротомата [1]. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопирование осуществлялось при увеличении x50, x100, x200.

Появление патологических изменений в жабрах может приводить к нарушению их функции и, как следствие, влиять на состояние организма рыб в целом. Находясь в постоянном контакте с внешней средой, они подвергаются непосредственному воздействию факторов окружающей среды и являются одним из основных путей проникновения загрязняющих веществ в организм рыб. При этом жабры высокочувствительны к действию токсических веществ, чему способствует менее развитая по

сравнению с печенью система детоксификации [2, 3]. Кроме того, высокая скорость абсорбции токсикантов через данный орган определяет быстроту проявления ответной реакции в жабрах.



**Рис. 1.** Гистопатологические изменения в жабрах рыб: а) структура жабр, соответствующая норме; б) гиперплазия эпителиальных клеток, искривление респираторных ламелл; в) гиперплазия слизистых клеток; г) гиперплазия эозинофильных клеток; д) некроз; е) отек эпителия; ж) кровоизлияния и аневризмы; з) фиброз; и) ксенома.

В широком спектре диагностированных гистопатологий доминировали изменения прогрессивного типа: гиперплазия эпителиальных клеток (78% особей), слизистых и хлоридных клеток (40% особей), эозинофильных клеток (24% особей) (рис. 1). По мнению ряда авторов [4, 5 и др.] пролиферация хлоридных клеток является ранним признаком стрессовой реакции на ухудшение условий обитания. Эозинофильные клетки в норме не наблюдаются у рыб в респираторных ламеллах и данный процесс также может рассматриваться в качестве индикатора загрязнения и стойкой воспалительной реакции в организме рыб [6]. Выявленные гиперплазия клеток и преципитация слизи на поверхности жабр являются компенсаторно-приспособительными ответными реакциями на изменение условий обитания. Однако прогрессирование данных процессов приводило к сокращению общей диффузной поверхности жабр, что может быть причиной острого респираторного стресса (ингибирование респираторных функций) и сопряженного с ним кислотно-щелочного и ионного дисбаланса.

Среди дегенеративных нарушений наиболее тяжелыми патологиями были некроз (38% особей) и гемолиз эритроцитов (28% особей). Очаговый некроз сопровождался полной деструкцией респираторных ламелл (рис. 1), что свидетельствует о тяжелом, прогрессирующем течении патологического процесса. На развитие воспалительной реакции в жабрах указывали единичные очаги инфильтрации лейкоцитами (5% особей) и отеки различной степени тяжести, которые представляли собой наиболее часто встречаемую аномалию в жабрах рыб (83%) (рис. 1). Подобные изменения являются наиболее распространенными нарушениями и появляются у особей, обитающих не только в условиях загрязнения сточными водами целлюлозно-бумажной промышленности, но также под влиянием других токсических агентов [2, 3, 5]. Их адаптивная роль состоит в предотвращении (или снижении степени) распространения токсичных веществ по организму и уменьшении содержания в крови веществ, оказывающих негативное действие на ткани. Следствием развития тяжелых форм данной

аномалии является нарушение обмена веществ между кровью и клетками, а также структурные изменения, ведущие к нарушению жизнедеятельности клеток.

Здоровье организма в целом также напрямую зависит от состояния системы кровообращения. Нарушение микроциркуляторного кровообращения проявлялось расширением капилляров и остановкой кровотока (52% особей), наличием аневризм (26%), гиперемии и кровоизлияний (19%), приводящих к разрушению эпителия респираторных ламелл (рис. 1). Диагностированные аневризмы способствуют появлению тромбов, фиброзу ткани, и резорбции респираторных ламелл, приводя в конечном итоге к атрофии органа. Вэйд с соавторами [7] выявил, что подобная патология развивается у рыб, подверженных влиянию сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности в течение первых 96 часов. Выявленное усиленное кровенаполнение органа относится к разряду адаптивных реакций, которые частично компенсируют отрицательное влияние прогрессирующих аномалий жаберного эпителия на газообмен.

Разрастание соединительной ткани, приводящее к развитию фиброза и нарушению структуры филамента, наблюдалось достаточно редко (14% особей). Данная аномалия приводила к слиянию филаментов и превращению строго организованного жаберного аппарата в бесструктурную массу (рис.1). Отмечены единичные случаи появления доброкачественных опухолей.

В дополнение к выше перечисленным изменениям в жабрах было диагностировано несколько видов эндо- и эктопаразитов. Микроспоридии приводили к образованию так называемых ксеном – гипертрофированных клеток, содержащих споры и другие стадии развития микроспоридий, которые локализовались вдоль кровеносных сосудов. Они стимулировали чрезмерную гипертрофию эпителиальных клеток и приводили к фрагментации ядра, изменению органелл и плазмолеммы, и как следствие, могли увеличивать активность слизистых клеток и приводить к гиперсекреции слизи, вызывать появление воспалительных инфильтратов и развитие фиброза. Инфузории не вызывали развитие морфологических нарушений. Можно предположить, что выявленные нами множественные случаи паразитарной инвазии также являются следствием, длительного воздействия поллютантов, которое привело к ослаблению иммунитета рыб данного водоема.

В целом, гистопатологический анализ состояния жаберного аппарата рыб, обитающих в Выгозерском водохранилище в условиях хронической антропогенной нагрузки, выявил широкий спектр структурно-функциональных нарушений и позволил оценить характер происходящих процессов, степень повреждения органа и их взаимосвязь с качеством вод. Следует отметить, что репаративные процессы в жабрах развиваются достаточно медленно, но восстановление структуры органа, если расстройства носили функциональный характер, возможно после ликвидации патогенного фактора. Однако выявленные в ходе исследования некротические и фиброзные преобразования относятся к разряду необратимых. При этом развивающиеся параллельно с ними гиперплазия, усиленное кровенаполнение, воспаление являются структурно-функциональными основами компенсаторно-приспособительных реакций, позволяющих организму перейти на новый уровень функционирования, и дают возможность выжить в изменяющихся условиях среды обитания.

Литература по влиянию хронического загрязнения сточными водами целлюлозно-бумажной промышленности на ихтиофауну довольно обширна и свидетельствует о том, что долговременное воздействие низких концентраций токсических веществ не вызывает непосредственно гибели организмов. Опасность заключается в поражении жизненно-важных органов, нарушении репродуктивной функции, росте и выживаемости особей, что, в конечном итоге, сказывается на благополучном существовании популяции и вида в целом.

Большинство выявленных морфологических нарушений в жабрах рыб Выгозерского водохранилища могут быть интерпретированы как неспецифические ответные реакции, которые проявляются под воздействием большого разнообразия поллютантов как при кратковременном воздействии, так и при хроническом загрязнении водоема [2, 3, 4, 5, 7 и др.]. Однако некоторые диагностированные в Выгозере морфофункциональные изменения жаберного аппарата (гиперемия кровеносных сосудов, аневризмы, кровоизлияния, искривление и укорочение респираторных ламелл, отек респираторного эпителия, пролиферация клеток) были выявлены в лабораторных и натурных исследованиях, посвященных непосредственно изучению влияния сточных вод предприятий целлюлозно-бумажной промышленности на организм рыб [5, 7 и др.]. Это позволяет нам делать предположение о том, что одним из приоритетных источников загрязнения Выгозерского водохранилища являются токсичные компоненты сточных вод Сегежского ЦБК. По ряду структурно-функциональных нарушений, выявленных у рыб Выгозерского водохранилища, можно судить о продолжительности негативного техногенного воздействия. Так, например, о хроническом воздействии свидетельствуют диагностированные гиперплазия жаберного эпителия, фиброзное перерождение, воспалительные реакции, неопластическая трансформация. К признакам острой токсичности следует

отнести аневризмы, кровоизлияния, которые могут быть вызваны недавними поступлениями загрязняющих веществ в водоем.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что выявленные гистопатологические изменения свидетельствуют о нарушении метаболизма, ослаблении иммунитета, усилении защитно-компенсаторных реакций и развитии функциональных нарушений в жизненно важном органе. При этом структурно-функциональные нарушения жаберного аппарата рыб отражают качество вод и продолжительность негативного воздействия.

#### Список литературы

1. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. – М.: Сов. наука, 1957. – 486 с.
2. Матей В.Е. Жабры пресноводных костистых рыб: Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция. – СПб.: Наука, 1996. – 204 с.
3. Mallatt J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1985. – Vol. 42. – P. 630-648.
4. Giari L., Simoni E., Manera M., Dezfuli B.S. Histocytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure // Ecotoxicol. Environ. Safety. – 2008. – Vol. 70. – P. 400-410.
5. Salamat N., Zarie M. Using of Fish Pathological Alterations to Assess Aquatic Pollution: A Review // World Journal of Fish and Marine Sciences. – 2012. – Vol. 4. – P. 223-231.
6. Poleksic V., Stojanovic Z., Markovic Z. Gill structure of carp fingerlings from Baranda fish farm // Ichthyol. – 2002. – Vol. 34. – P. 11-20.
7. Wade J. W. E., Omoregie E., Ezenwaks I. Toxicity of Cassava effluent of the Nile tilapia inder laboratory conditions // J. Aquatic Sci. – 2002. – Vol.17, № 2. – P. 22-32.

УДК 574.52+595.771

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ДЕФОРМАЦИИ ЛИЧИНОК ХИРОНОМИД, КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДОЕМОВ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

В.П. Беляков, И.В. Сотников

*ФГБУН «Институт озераведения РАН»*

*г. Санкт-Петербург, 196105, Севастьянова, 9, victor\_beliakov@mail.ru*

Исследовались псевдопопуляции личинок хирономид ряда городских водоемов Санкт-Петербурга для выявления зависимости частоты встречаемости особей с морфологическими отклонениями от уровня и вида загрязнения в результате антропогенных воздействий.

*Ключевые слова:* водоемы Санкт-Петербурга, биоиндикация, антропогенное загрязнение водоемов, Chironomidae, морфологические отклонения личинок.

Состояние водоемов, расположенных в зоне воздействия крупных городов и промышленных центров, как правило, характеризуется как неблагоприятное, не являются исключением и водоемы Санкт-Петербурга. Они испытывают значительную антропогенную нагрузку, которая носит комплексный характер. Загрязняющие вещества поступают из разнообразных источников и имеют разные химические свойства. В число загрязнителей входят бытовые отходы, нефтепродукты, тяжелые и цветные металлы, СПАВ, а также другие виды загрязнителей. Среди аллохтонных веществ есть органические и неорганические соединения, в том числе биогенные элементы, вызывающие антропогенное эвтрофирование. Кроме того, в результате хозяйственной деятельности нарушается термический и газовый режим, изменяется рН воды. Под действием этих факторов биотические сообщества демонстрируют существенные нарушения состава, структуры и количественного развития по сравнению с природночистыми водоемами. Эти нарушения проявляются как на уровне экосистемы, так и на уровне популяций и отдельных организмов. Поэтому при мониторинге экологического состояния водоемов все чаще используется биоиндикационный подход, в том числе с применением показателей развития зообентосного сообщества, как замыкающего аккумулирующего звена экосистемы. Но в условиях городских водоемов обычно видовой состав зообентоса крайне беден, и большинство из традиционных биотических индексов либо не работает, либо дает значения одного порядка. В этом случае в рамках отдельных популяций гидробионтов может помочь оценка наличия и доли различных отклонений на уровне отдельных организмов. Достаточно широко для этой цели используются личиночные псевдопопуляции различных видов хирономид [1; 2 и др.].

Цель нашего исследования - выявить наличие морфологических отклонений у личинок различных видов хирономид, встреченных в городских водоемах Петербурга и проанализировать возможную связь с условиями и видом загрязнения.

Исследования проводились в период открытой воды с апреля до сентября в 2012-13 гг на трех озерно-речных системах Санкт-Петербурга:

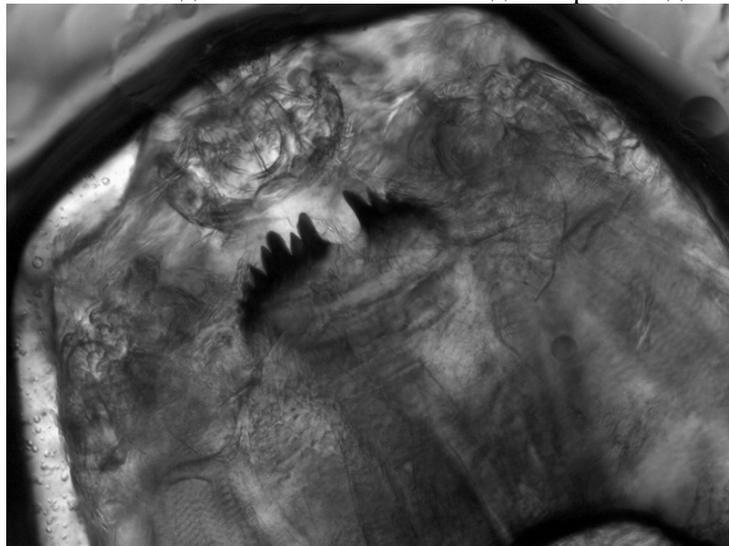
1- системе р. Сторожиловка- оз. Нижнее Суздальское – р. Каменка – Шуваловский карьер – р. Каменка;

2 – система Дудергофских озер – р. Дудергофки;

3 – система р. Охты, включая Охтинское вдхр.

Все исследованные системы находятся под существенным антропогенным воздействием. В каждой из систем загрязнение было комплексным, но в зонах максимального воздействия преобладали определенные его виды. В системе реки Охты выше водохранилища - стоки с полей и ферм, а также с береговых стихийных свалок промышленно-бытового мусора. Начиная от водохранилища преобладают загрязнения нефтепродуктами, тяжелыми металлами и нерегулярные, но частые сбросы стоков с некоторых химических предприятий: отмечаются превышение ПДК по нефтепродуктам, алюминию, марганцу, железу, меди и некоторым другим металлам. Загрязнение среднего течения реки носит явный токсичный характер. В системе р. Дудергофка максимальные нагрузки отмечены в среднем течении (пос. Горелово), где сочетаются промышленные (нефтепродукты) и бытовые загрязнения [3].

Пробы отбирались в различных донных биотопах, на разных грунтах и глубинах для оценки состояния организмов максимально возможного числа популяций. Для сбора использовали дночерпатель Петерсена и бентосный скребок. Общий объем проб, собранных в водоемах в разных биотопах составил 96. Количество обследованных личинок 93 видов хирономид - 4430 экз.

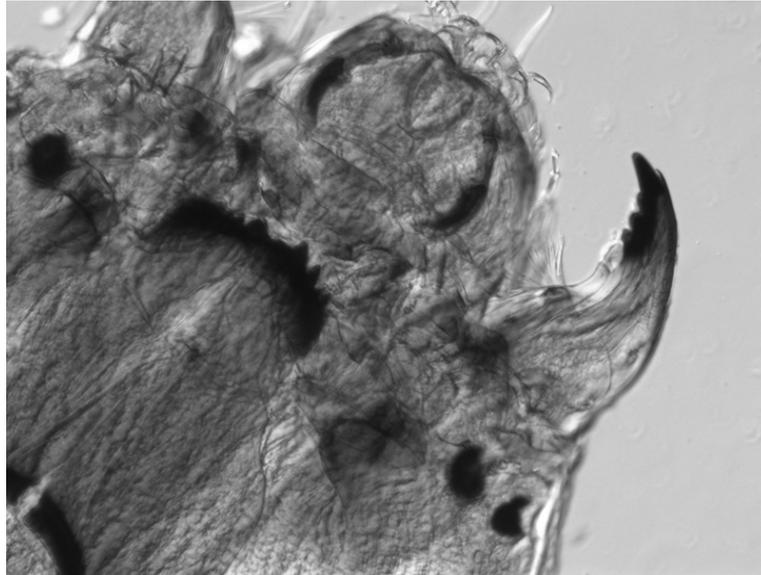


**Рис. 1.** Препарат головной капсулы с деформацией субментума личинки *Chironomus plumosus*, отобранной в р. Дудергофка.

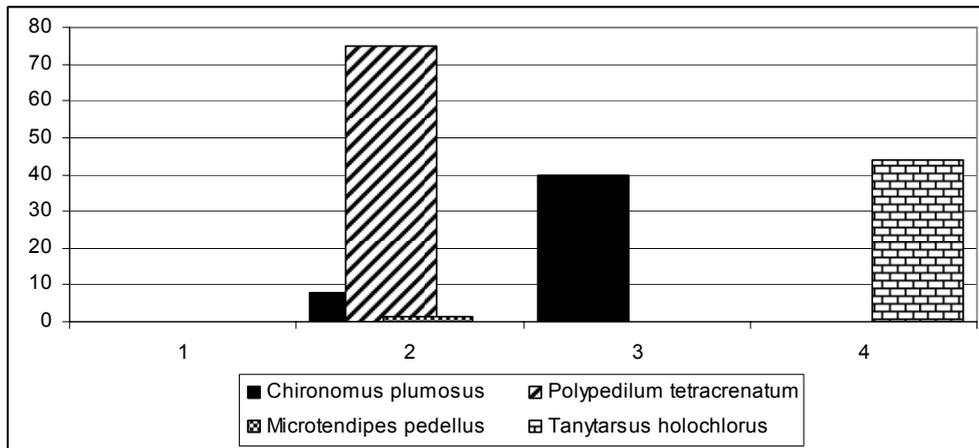
В результате исследования городских водоемов Санкт-Петербурга были обнаружены различные морфологические деформации личинок комаров 11 видов, принадлежащих сем. Chironomidae: *Chironomus plumosus*, *Glyptotendipes glaucus*, *Polypedilum nubeculosum*, *P. tetracrenatum*, *Microtendipes pedellus*, *Endochironomus albipennis*, *Parachironomus pararostratus*, *Tanytarsus holochlorus*, *Cricotopus silvestris*, *Procladius olivacea* и *Procladius choreus*. Большинство морфологических отклонений личинок представляли собой различные деформации субментума и мандибул – отсутствием, или гипертрофированным развитием зубцов, их асимметрией (Рисунки 1 и 2). В некоторых случаях отмечались также деформации антенн.

Обращает на себя внимание, что у личинок с деформациями субментума, которые готовятся к линьке, закладка новых структур субментума не сопровождается аналогичным отклонением.

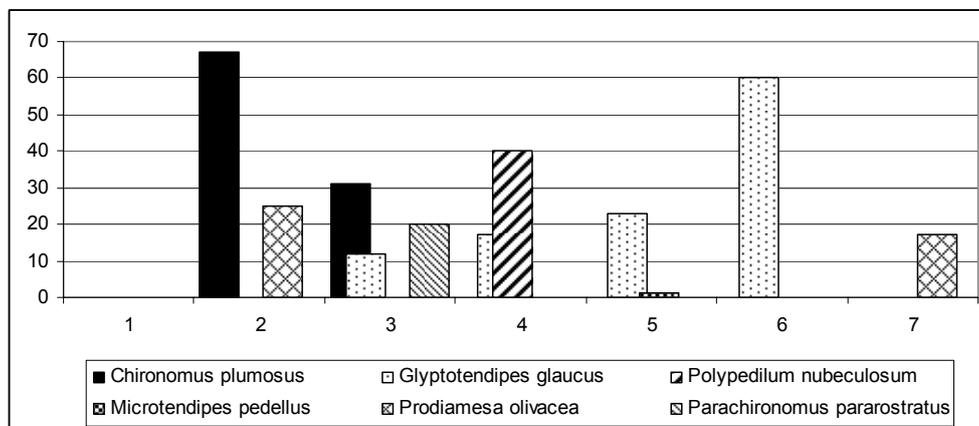
Максимальный процент встреченных особей с морфологическими отклонениями отмечался у трех видов, и как раз либо в зонах наибольших антропогенных загрязнений - если личинки являются детритофагами-собираателями, либо ниже по течению в зонах аккумуляции - если личинки являются фильтраторами (Рисунки 3-5). Среди личинок перифитонофагов, или хищников процент морфологических отклонений меньше, чем у собирателей и фильтраторов.



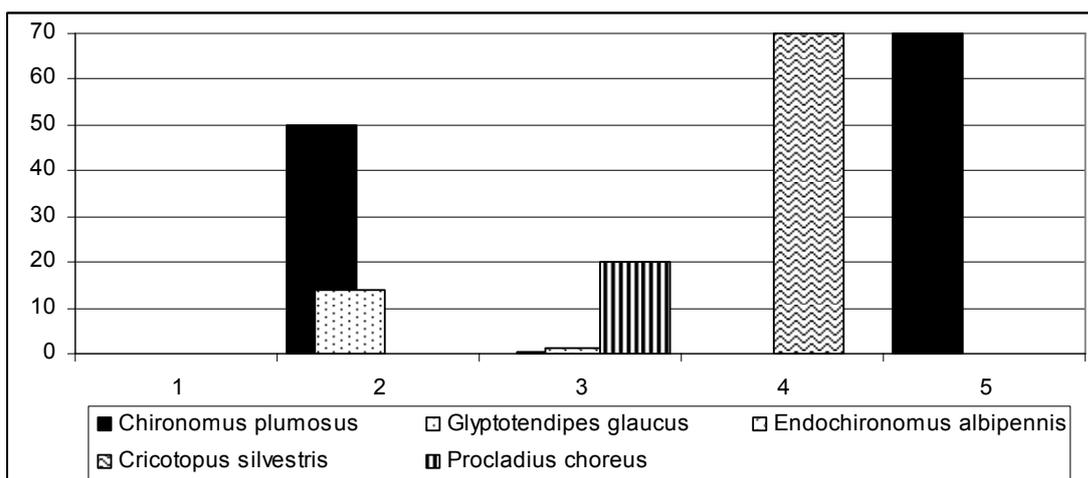
**Рис. 2.** Препарат головной капсулы с асимметрией субментума личинки *Glyptotendipes glaucus*, отобранной в Охтинском вдхр.



**Рис. 3.** Процент встречаемости личинок хирономид с морфологическими отклонениями в водоемах системы р. Охта  
 Примечание: 1. – верховье р. Охта, 2- выше водохранилища, 3 – Охтинское водохранилище, 4 ниже водохранилища, 5 – нижнее течение р. Охта



**Рис. 4.** Процент встречаемости личинок хирономид с морфологическими отклонениями в водоемах системы Нижнего Суздальского озера  
 Примечание: 1. – верховье р. Старожиловка, 2- устье р. Старожиловка, 3 – оз. Нижнее Суздальское, 4 исток р. Каменка, 5 – среднее течение р. Каменка, 6 – Шуваловский карьер, 7 – нижнее течение р. Каменка



**Рис. 5.** Процент встречаемости личинок хирономид с морфологическими отклонениями в водоемах системы р. Дудергофска

Примечание: 1. – Дудергофское озеро, 2- Безымянное озеро, 3 – – среднее течение р. Дудергофска (пос. Горелово), 4 – нижнее течение р. Дудергофска

Средневзвешенные значения процента встречаемости личинок с уродствами в двух системах растут в направлении устьевых зон: в р. Охта - 0; 25; 5.8; 70; 70 %, в р. Дудергофска – 0; 6.4; 40; 44 %, а в системе оз. Н. Суздальского максимум отмечен в озеровидном расширении реки Шуваловском карьере - 0; 43; 25; 27; 3.8; 60 и 17%.

Таким образом, в ряде загрязненных городских водоемов Санкт-Петербурга в результате исследований удалось выявить заметное количество личинок хирономид с морфологическими отклонениями, процент встречаемости которых растет по мере повышения уровня загрязнений. Вероятно, появление этих деформаций не связано с повышением мутагенности, поскольку отклонения не отмечены у 1 и 2 возрастных стадий развития личинок хирономид, а закладка структур ротовых органов у личинок с уродствами при подготовке к линьке не всегда сопровождается аналогичными отклонениями. Видимо, механизм формирования уродств носит соматический характер. Для подтверждения этого предположения, безусловно, требуется проведение экспериментальных работ. Не удалось выявить связь разных морфологических отклонений с отдельными видами загрязнителей, поскольку не было ситуаций, где существовали бы изолированно действующие факторы загрязнений. Тем не менее, удалось показать, что отклик различных популяций хирономид в виде морфологических уродств зависит от основного типа питания личинок, и в условиях исследованных водоемов загрязнители поступают к хирономидам, как правило, через детритную цепь.

Основным типом отклонений являются нарушения формы ротового аппарата личинок хирономид.

Исследованные городские водоемы, судя по использованному показателю - проценту морфологических отклонений, характеризуются как токсично-загрязненные в значительной степени, что подтверждает ранее сделанные выводы [4].

#### Список литературы

1. Warwick W.F., Fitchko J., McKee P.M. et al. The incidence of deformities in *Chironomus* spp. from Port Hope Harbour, Lake Ontario // J. Great Lakes Res. 1987. V. 13. N. 3. P. 88-92.
2. Назарова Л.Б. Морфологические деформации комаров-звонцов в связи с загрязнением водоемов. // Успехи современной биологии, 2002, Т. 122, № 5, С. 516-523.
3. Игнатьева Н.В., Беляков В.П., Загребин А.О. и др. Комплексная оценка экологического состояния городских водоемов при антропогенном воздействии // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем. II. Мат. междунар. конф. 10-14 октября 2011г., СПб. Изд-во «Любавич», 2011. С. 59-67
4. Беляков В.П., Сотников И.В., Бажора А.И. Характеристика зообентоса трех озерно-речных систем Санкт-Петербурга в связи с уровнем их антропогенной нагрузки // Нерешенные проблемы климатологии и экологии мегаполисов. Мат. межд. науч. конференции «Экология большого города». 20 марта 2013 г., Санкт-Петербург. СПб, 2013. С. 22-26.

**ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ТКАНЕЙ ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS* LINNAEUS, 1758  
ИЗ РАЗНЫХ АКВАТОРИЙ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА**

О.Б. Васильева<sup>1</sup>, М.А. Назарова<sup>2</sup>, Н.В. Ильмаст<sup>1</sup>, Н.Н. Немова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт биологии Карельского научного центра РАН  
185910 г. Петрозаводск, Россия, vasil@krc.karelia.ru*

<sup>2</sup> *Вологодский государственный университет  
160035 г. Вологда, Россия, marinamarina35@yandex.ru*

Проведено исследование фосфолипидного состава тканей окуня *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758. из двух акваторий промышленных центров Онежского озера с разной степенью антропогенного влияния. В результате проведенной работы установлены различия в содержании фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола, фосфатидилсерина и лизофосфатидилолина у рыб из Петрозаводской губы и Повенецкого залива. Наиболее выраженная количественная разница изученных показателей показана в печени и жабрах рыб.

*Ключевые слова:* фосфолипиды, окунь, антропогенное загрязнение

Онежское озеро является вторым по величине пресноводным водоемом Европы и служит важной водно-транспортной магистралью, широко используется для водоснабжения населенных пунктов Карелии, а также имеет большое рыбохозяйственное значение. Ареал ихтиофауны водоема пространственно неоднороден: наиболее многообразен видовой состав в центральной части Онежского озера, которая сохраняет черты олиготрофного водоема, а в загрязненных губах прослеживается тенденция к снижению разнообразия и численности гидробионтов [1]. Поэтому, в качестве водных биоресурсов особое значение приобретают не так массово используемые в промышленном рыболовстве виды – окуневые, карповые и другие.

Одним из основных источников загрязнения Онежского озера являются сточные воды промышленных центров, к которым относятся Петрозаводск и Медвежьегорск. Большой объем хозяйственно-бытовых сточных вод Петрозаводского промцентра обуславливает высокое содержание биогенных и взвешенных веществ в Петрозаводской губе Онежского озера, и, напротив, вклад Медвежьегорского промцентра в общее поступление антропогенных продуктов в Повенецкий залив незначителен. Локальное влияние на качество вод в губах оказывают дренажные и ливневые воды, поступающие с территорий данных городов [2].

В данной работе проведен сравнительный анализ фосфолипидного состава печени, мышц и жабр окуня *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758, выловленного из Петрозаводской губы, куда поступают сточные воды Петрозаводского промузла и из Повенецкого залива – акватория Медвежьегорского промузла. Фосфолипиды часто используются в качестве биомаркеров, поскольку их концентрация в органах и тканях рыб меняется уже на ранних этапах влияния различных факторов среды. Фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА) являются основными компонентами биологических мембран и играют не только структурообразующую роль, но и влияют на жидкостность бислоя, тем самым определяя функциональную активность многих мембрансвязанных ферментов. Минорные фосфолипиды, такие как фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилсерин (ФС) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ) относятся к биоэффекторам и выполняют моделирующую функцию в биомембранах. Анализ фракций фосфолипидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [3]. Исследование выполнено с использованием Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Районы отбора проб значительно отличаются по гидрохимическим показателям (табл. 1, 2). Анализ гидрохимических данных показывает, что Петрозаводская губа по сравнению с Повенецким заливом более загрязнена – в Петрозаводской губе Онежского озера наблюдается повышенное содержание (в 2-3 раза) биогенных элементов, нефтепродуктов в воде и донных отложениях (табл. 1, 2).

Установлены различия в содержании фосфолипидных показателей в печени и жабрах окуня из разных акваторий Онежского озера (табл. 3).

Показан более низкий уровень мажорных фосфолипидов (ФХ и ФЭА) и более высокое содержание лизофосфатидилолина в печени окуня из Петрозаводской губы, чем из Повенецкого залива. Лизофосфатидилолин играет моделирующую роль в биомембранах, и в небольших концентрациях выполняет медиаторную функцию, однако, значительное возрастание доли ЛФХ по отношению к своему метаболическому предшественнику (ФХ) может свидетельствовать о

деструктивных процессах, протекающих в биомембранах. Следует отметить высокое количество неидентифицированных фосфолипидов у окуня из акватории Петрозаводского промцентра (табл. 3), и, учитывая, что в состав данной группы соединений входят лизированные и окисленные ФЛ, можно предположить об активизации перекисного окисления липидов в жабрах и печени рыб. Следует отметить, что аналогичные модификации фосфолипидных компонентов в тканях рыб, обитающих в условиях техногенного загрязнения, нами были показаны в ранее проведенных исследованиях [4, 5].

Проведенный количественный анализ фосфолипидных показателей в мышцах окуня из разных акваторий Онежского озера существенных различий не выявил (табл. 3).

**Таблица 1.** Среднегодовые показатели водоотведения и выноса химических веществ со сточными водами основных промцентров в Онежское озеро в 1998-2003 гг. [2]

Показатель	Промцентр	
	Петрозаводский	Медвежьегорский
Водоотведение, млн. м <sup>3</sup>	49.2	0.9
Взвешенное вещество, тыс.т/год	1.2	0.2
Сухой остаток, тыс.т/год	9.1	0.5
БПК <sub>полн.</sub> тыс.т./год	0.5	0.2
Фосфор общ., т/год	103.6	4.8
Азот общ., т/год	543.0	17.8
Азот аммонийный, т/год	59.0	16.2

**Таблица 2.** Химический состав донных отложений исследуемых районов Онежского озера, % от верхней санитарной нормы [2]

Район	Показатели					
	N <sub>орг.</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P <sub>общ.</sub>	P <sub>лаб.</sub>	Fe	Mn
Петрозаводская губа	0.12-0.77	0.01-0.03	0.09-0.90	0.03-0.89	0.38-0.91	0.08-1.60
Повенецкий залив	0.09-0.51	0.01-0.03	0.05-0.27	0.02-0.15	0.11-0.90	0.05-0.32

**Таблица 3.** Содержание фосфолипидов липидов (% сухой массы) в тканях окуня *Perca fluviatilis* L. из разных акваторий Онежского озера

Показатели	Печень		Жабры		Мышцы	
	П**	М	П	М	П	М
Общие фосфолипиды	7.68	8.80	5.54	7.11*	3.01	3.75
Фосфатидилхолин	3.71	5.54*	2.69	4.47*	2.01	2.51
Фосфатидилэтаноламин	1.28	2.17*	0.91	1.92*	0.62	0.88*
Фосфатидилсерин	0.22	0.15*	0.09	0.07	0.11	0.10
Фосфатидилинозитол	0.30	0.21	0.03	0.04	0.15	0.20
Сфингомиелин	0.44	0.37	0.07	0.13*	0.03	0.02
Лизофосфатидилхолин	0.78	0.14*	0.56	0.31*	0.03	0.03
Неидентифицированные фосфолипиды	0.94	0.23*	1.19	0.17*	0.05	0.01

Примечание:

\* – различия достоверны при  $p \leq 0.05$  при сравнении показателей у окуня из двух акваторий,

\*\* – краткое обозначение промцентров: П – Петрозаводский, М – Медвежьегорский

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены различия в спектре фосфолипидных показателей тканей окуня из акваторий Онежского озера, причем степень модификации изученных параметров носит тканеспецифичный характер.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Обн РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» на 2012-2014 гг. № г.р. 01201262104, Программы фундаментальных исследований Обн РАН «Динамика и прогнозирование тенденций изменений состояния рыбных ресурсов Онежского озера» на 2012-2014 гг. № г.р. 01201262104 и программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ-1410.2014.4*

## Список литературы

1. Ильмаст Н.В., Стерлигова О.П., Первозванский В.Я. Ресурсные виды // Мониторинг и сохранение биоразнообразия таежных экосистем Европейского Севера России. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2010. С.81–85.
2. Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998-2006 гг. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2007. 2010 с.
3. Arduini A., Pescechera A., Dottori S. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. Lipid Res. 1996. V. 37. № 2. P. 684–689.
4. Васильева О.Б., Назарова М.А., Немова Н.Н. Влияние техногенных стоков Костомукшского ГОКа на некоторые липидные показатели тканей сига *Coregonus lavaretus* L. // Современное состояние биоресурсов внутренних водоемов: Материалы докладов I Всероссийской конференции с международным участием, Борок, 12-16 сентября 2011 г. – М.: АКВАРОС, 2011. Т. 1. С. 108–112.
5. Васильева О.Б., Назарова М.А., Рипатти П.О., Немова Н.Н. Липидный состав и некоторые показатели перекисного окисления липидов в печени рыб в условиях антропогенной нагрузки // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 22-27 сентября 2012 г.) – изд-во Борок, 2012. С. 60–65.

УДК: 577.125.33: 577.115.3: 57.042: 597.55

### ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ РЫБ, ОБИТАЮЩИХ В ВОДОЕМАХ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

О.Б. Васильева<sup>1</sup>, М.А. Назарова<sup>2</sup>, П.О. Рипатти<sup>1</sup>, Н.В. Ильмаст<sup>1</sup>, Н.Н. Немова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт биологии Карельского научного центра РАН  
185910 г. Петрозаводск, Россия, vasil@krc.karelia.ru*

<sup>2</sup>*Вологодский государственный университет,  
160035 г. Вологда, Россия, marinamarina35@yandex.ru*

В работе исследовали концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и диенкетонатов; и субстратов ПОЛ – жирных кислот. Оценку данных параметров проводили в печени, мышцах и жабрах плотвы, сига и щуки из водоемов озерно-речной системы р. Кенти с различной степенью антропогенной нагрузки. В ходе работы выявлена взаимосвязь интенсивности перекисных процессов в тканях рыб с гидрохимическими характеристиками водоема. Установлены тканеспецифичность и видоспецифичность перекисных процессов у рыб.

*Ключевые слова:* перекисное окисление липидов, жирные кислоты, антропогенная нагрузка, плотва, сиг, щука

В Институте биологии КарНЦ РАН в течении ряда лет проводится комплексное мониторинговое исследование водоемов озерно-речной системы реки Кенти. Данные водоемы служат природным модельным объектом для изучения влияния антропогенного загрязнения на гидробионтов, поскольку все озера находятся в непосредственной близости друг от друга, имеют одинаковое происхождение, но отличаются гидрохимическими показателями воды. Озеро Костомукшское является местом захоронения техногенных отходов переработки сырья одного из крупнейших промышленных предприятий Северо-Западного региона России – Костомукшского горно-обогатительного комбината (ГОК), деятельность которого и привела к изменению основных физико-химических характеристик водоема. Сточные воды Костомукшского ГОКа из оз. Костомукшское поступают в оз. Окуновое, расположенное в непосредственной близости от хвостохранилища, и затем, через ряд водоемов в оз. Койвас, которое находится гораздо ниже по течению реки Кенти.

Продукты перекисного окисления липидов традиционно относятся к классическим параметрам тканей гидробионтов, которые используются при оценке влияния техногенного загрязнения водоема на обитающих в нем рыб. Диеновых конъюгаты и диенкетонаты являются первичными продуктами ПОЛ, которые через цепь реакций переходят в один из конечных метаболитов окисления – малоновый диальдегид (МДА). При анализе данных показателей следует учитывать, что фиксируемый уровень продуктов ПОЛ может быть связан не только с реакцией гидробионтов на антропогенное загрязнение водоема, но и с содержанием в тканях рыб субстратов перекисного окисления – полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [1]. В данной работе определялась зависимость показателей ПОЛ от гидрохимических характеристик водоема и от концентрации жирных кислот в тканях рыб.

В качестве объектов исследования были выбраны щука *Esox lucius* Linnaeus, 1758, сиг *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758) и плотва *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), как наиболее распространенные виды рыб, обитающие в данной системе водоемов. Определение концентрации диеновых конъюгатов, диенкетонов, малонового диальдегида и жирных кислот в жабрах, печени и мышцах рыб проводили общепринятыми методами [2, 3, 4]. Исследование выполнено с использованием Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

В результате проведенных исследований установлен более высокий уровень продуктов перекисного окисления липидов в тканях плотвы, сига и щуки из озера Костомукшское, по сравнению с рыбами из других изученных озер (табл. 1, 2, 3).

К субстратам ПОЛ преимущественно относятся жирные кислоты с количеством двойных связей 4 и более, такие как: арахидоновая 20:4 $\omega$ 6 (АК), эйкозопентаеновая 20:5 $\omega$ 3 (ЭПК) и докозогексаеновая 22:6 $\omega$ 3 (ДГК) кислоты [5]. При анализе концентрации данных жирных кислот показано более низкое их содержание в тканях рыб из озера Костомукшское. Концентрации АК, ЭПК и ДГК отрицательно коррелировали с уровнем диеновых конъюгатов и диенкетонов в тканях плотвы, сига и щуки из всех изученных водоемов. В жабрах, печени и мышцах рыб из озера Костомукшское показан более высокий уровень насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, поскольку данные кислоты в гораздо меньшей степени подвержены перекисным процессам. Установлена меньшая степень перекисидации липидов и больший уровень ПНЖК в тканях рыб из озера Койвас, по сравнению с рыбами из других исследованных водоемов, что, вероятно связано с наибольшей удаленностью озера Койвас от ГОК.

**Таблица 1.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов (в нг/г ткани) и основных жирных кислот (в мг/г липида) в тканях плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758)

Показатели	Жабры			Печень			Мышцы		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Малоновый альдегид	164.2	96.8 <sup>a</sup>	94.3 <sup>a</sup>	122.6	80.4 <sup>a</sup>	71.3 <sup>a</sup>	25.4	22.7	21.7
Диеновые конъюгаты	124.9	107.6 <sup>a</sup>	100.8 <sup>a</sup>	100.7	67.3 <sup>a</sup>	39.7 <sup>a,b</sup>	29.6	27.3	24.9
Диенкетоны	100.8	91.3 <sup>a</sup>	82.6 <sup>a,b</sup>	106.3	91.7 <sup>a</sup>	68.1 <sup>a,b</sup>	28.1	25.9	25.7
22:6 $\omega$ 3	53.1	85.4 <sup>a</sup>	93.1 <sup>a,b</sup>	84.6	91.3	97.5 <sup>a</sup>	67.8	95.8 <sup>a</sup>	105.7 <sup>a</sup>
20:5 $\omega$ 3	8.1	18.5 <sup>a</sup>	15.4 <sup>a,b</sup>	34.3	38.6	41.3 <sup>a</sup>	34.2	36.1	42.3
20:4 $\omega$ 6	8.6	9.4	12.1 <sup>a,b</sup>	18.6	19.5	20.7 <sup>a</sup>	27.1	29.5	32.6
16:0	102.3	87.6 <sup>a</sup>	64.9 <sup>a,b</sup>	82.6	78.1	73.2 <sup>a,b</sup>	86.4	77.2 <sup>a</sup>	62.4 <sup>a,b</sup>
ПНЖК	117.6	184.6 <sup>a</sup>	227.9 <sup>a,b</sup>	125.2	142.9 <sup>a</sup>	179.4 <sup>a,b</sup>	199.1	225.5 <sup>a</sup>	245.3 <sup>a</sup>
НЖК	255.9	187.6 <sup>a</sup>	171.4 <sup>a,b</sup>	183.9	160.7 <sup>a</sup>	151.2 <sup>a</sup>	204.2	172.3 <sup>a</sup>	161.1 <sup>a</sup>

Примечание: здесь и далее 1 – озеро Костомукшское; 2 – озеро Окуновое; 3 – озеро Койвас;

a – различия достоверны при сравнении рыб из данного озера и озера Костомукшское, при  $p \leq 0,05$ ;

b – различия достоверны при сравнении рыб из озера Койвас и озера Окуновое, при  $p \leq 0,05$ .

**Таблица 2.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов (в нг/г ткани) и основных жирных кислот (в мг/г липида) в тканях сига *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758)

Показатели	Жабры			Печень			Мышцы		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Малоновый альдегид	152.3	99.7 <sup>a</sup>	91.7 <sup>a</sup>	98.2	72.6 <sup>a</sup>	65.7 <sup>a,b</sup>	22.6	21.9	20.9
Диеновые конъюгаты	125.2	105.6 <sup>a</sup>	103.5 <sup>a</sup>	70.6	54.1 <sup>a</sup>	33.6 <sup>a,b</sup>	25.4	30.4 <sup>a</sup>	28.6
Диенкетоны	99.6	80.3 <sup>a</sup>	76.1 <sup>a</sup>	89.4	80.7 <sup>a</sup>	75.2 <sup>a,b</sup>	23.8	25.5	24.1
22:6 $\omega$ 3	80.1	83.6	97.1 <sup>a,b</sup>	113.4	119.4	121.6 <sup>a</sup>	125.6	128.7	127.1
20:5 $\omega$ 3	8.8	9.4	10.1	9.2	10.1	10.7	9.8	10.8	10.9
20:4 $\omega$ 6	9.1	9.3	9.7	9.8	9.8	10.1	8.7	8.9	9.2
16:0	95.4	88.7	82.6 <sup>a</sup>	108.2	97.5	93.4 <sup>a</sup>	118.1	99.9 <sup>a</sup>	89.3 <sup>a,b</sup>
ПНЖК	134.8	186.2 <sup>a</sup>	217.3 <sup>a,b</sup>	163.2	206.4 <sup>a</sup>	237.2 <sup>a,b</sup>	154.3	197.2 <sup>a</sup>	212.1 <sup>a,b</sup>
НЖК	244.1	217.3 <sup>a</sup>	189.4 <sup>a</sup>	287.2	205.6 <sup>a</sup>	181.1 <sup>a,b</sup>	266.5	231.3 <sup>a</sup>	212.1 <sup>a,b</sup>

**Таблица 3.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов (в нг/г ткани) и основных жирных кислот (в мг/г липида) в тканях щуки *Esox lucius* Linnaeus, 1758,

Показатели	Жабры			Печень			Мышцы		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Малоновый альдегид	83.1	50.7 <sup>a</sup>	47.3 <sup>a</sup>	60.3	50.6 <sup>a</sup>	44.3 <sup>a,b</sup>	17.1	17.5	15.3
Диеновые конъюгаты	118.4	108.9	97.6 <sup>a</sup>	113.7	103.9	80.4 <sup>a,b</sup>	20.5	18.3	17.4
Диенкетоны	100.3	97.4	94.8 <sup>a</sup>	95.4	74.6 <sup>a</sup>	62.4 <sup>a,b</sup>	15.3	15.9	14.8
22:6 $\omega$ 3	87.3	92.4 <sup>a</sup>	99.9 <sup>a,b</sup>	90.7	92.5	95.4	93.2	92.1	94.0
20:5 $\omega$ 3	11.3	15.5 <sup>a</sup>	16.8 <sup>a,b</sup>	17.3	20.5 <sup>a</sup>	22.6	14.1	15.2	16.2
20:4 $\omega$ 6	7.3	8.1	8.9 <sup>a</sup>	9.1	9.9	10.3	7.8	8.1	8.5
16:0	102.7	98.1	96.3 <sup>a</sup>	98.9	95.1	94.3	91.5	87.1	88.2
ПНЖК	120.3	150.1 <sup>a</sup>	173.6 <sup>a,b</sup>	191.3	216.1 <sup>a</sup>	222.2 <sup>a</sup>	178.2	189.3 <sup>a</sup>	194.2 <sup>a,b</sup>
НЖК	224.1	200.1 <sup>a</sup>	193.5 <sup>a</sup>	200.5	185.3 <sup>a</sup>	180.3 <sup>a</sup>	197.5	183.6 <sup>a</sup>	187.2 <sup>a</sup>

Сравнительный анализ продуктов ПОЛ в различных тканях плотвы, сига и щуки, обитающих в одном водоеме, выявил более высокий уровень малонового диальдегида в жабрах, по сравнению с другими изученными тканями. Вероятно, это объясняется повышенной степенью оксигенации в данном органе, что, как следствие, приводит к усиленному окислению мембранных липидов жабр. Также установленные изменения в содержании изученных соединений в жабрах рыб из озера Костомукшское, могут быть связаны с регуляцией осмотического давления и ионообмена в условиях высокой минерализации хвостохранилища. Следует подчеркнуть, что наиболее выраженные различия в содержании липидных компонентов и степени ПОЛ обнаружены в печени рыб, что, возможно, определяется высокой метаболической активностью этого органа. В мышцах рыб установлено самое низкое содержание продуктов перекисного окисления у плотвы, сига и щуки (табл. 1, 2, 3). В тоже время уровень полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с 4-6 двойными связями в мышцах рыб выше, чем в других исследованных тканях (табл. 1, 2, 3). Таким образом, согласно полученным данным, в мышцах рыб перекисные процессы протекают менее активно, чем в печени и жабрах рыб.

Исходя из анализа изученных параметров, среди трех видов рыб наиболее устойчивой к техногенному влиянию является щука. Вероятнее всего, это объясняется особенностями ее экологии: щука, в отличие от плотвы и сига, относится к консументам более высокого порядка, и, возможно, в процессе эволюции у данного вида сформировались особые приспособительные механизмы, в том числе и на биохимическом уровне, позволяющее пластичнее адаптироваться к меняющимся условиям внешней среды.

Таким образом, в тканях рыб, обитающих в озере Костомукшское, перекисные процессы протекают активнее, а содержание основных субстратов перекисного окисления ниже, особенно жирных кислот с количеством двойных связей больше, либо равным четырем. Озеро Койвас дальше всего удалено от предприятия, поэтому в тканях рыб, обитающих в данном озере, степень перекисидации наименьшая, а количество ПНЖК выше. Активность перекисных процессов снижается в ряду: жабры-печень-мышцы. Также следует учесть, что степень перекисидации липидов может быть связана с типом питания рыб.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Обн РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» на 2012-2014 гг. № г.р. 01201262104, проекта РФФИ № 13-04-90714-мол-рф-нр и программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ-1410.2014.4*

#### Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов. – М., 1972. – С. 252.
2. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопросы медицинской химии. 1987. №1. С. 118-121.
3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида // Современные методы в биохимии под ред. Ореховича В.Н. 1997. С. 66-68.
4. Jamieson G.R. GLS-identification techniques for longchain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr.Sci. – 1975. – V. 13. – № 10. – P.491-497.
5. Zaman M.U., Sarker S.R., Hossain S. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish (*Puntius sophore*) tissue in comparison with those of freshwater fish. // Journal of Food Lipids. 2008. V. 15. № 2. P. 198-208.

**ОСОБЕННОСТИ СТРЕСС-ОТВЕТА БАЙКАЛЬСКОГО ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА АМФИПОД *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) В УСЛОВИЯХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ И АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**К.П. Верещагина<sup>1</sup>, С.О. Прокозов<sup>1</sup>, Е.С. Кондратьева<sup>1</sup>, Е.В. Мадьярова<sup>2</sup>, Д.В. Аксенов-Грибанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет»  
664003, г. Иркутск, К. Маркса 1, Россия, k.p.vereshagina@gmail.com  
<sup>2</sup>НИИ биологии ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет»  
664025, г. Иркутск, Ленина 3, Россия, Denis.axengri@gmail.com

Целью исследования являлось выявление особенностей стресс-ответа эндемичного байкальского вида амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) в условиях повышенной температуры среды обитания и сопряженной с ней антропогенной нагрузкой.

*Ключевые слова:* амфиподы, Байкал, стресс.

В последнее время приобретают актуальность исследования, направленные на изучение влияния климатических изменений, обусловленных, в том числе и нарастающими темпами антропогенной нагрузки на состояние водных экосистем [1]. Изменение температурного режима водоема приводит к смене ключевых параметров среды обитания, таких как газовый режим и растворимость веществ, в том числе и токсичных компонентов, поступающих в водоем с грунтовыми и сточными водами. Повышенная температура воды может усилить негативное влияние различных компонентов (например, ксенобиотиков) на организмы, населяющие водные экосистемы. Поэтому представляется актуальным изучение механизмов стресс-реакции водных организмов в условиях изменения температуры среды.

Недостаточная изученность механизмов стресс-реакции гидробионтов и возможных ее модификаций в зависимости от условий среды затрудняет оценку и прогнозирование последствий антропогенных воздействий на водные экосистемы. Особенно это актуально для уникальных древних экосистем, развитие фауны которых длительное эволюционное время проходило в стабильных условиях и, следовательно, могло привести к развитию специфических механизмов стресс-резистентности. Примером уникальных древних экосистем является озеро Байкал, фауна которого характеризуется чрезвычайным биоразнообразием с высокой степенью эндемизма.

Экологические и эволюционные характеристики видов, в частности показатели терморезистентности и термопреференции, могут играть решающую роль в их способности противостоять различным стрессовым факторам и антропогенным нагрузкам [2, 3, 4].

Одной из проблем, проявляющихся в условиях климатических изменений и повышенной антропогенной нагрузки, являются инвазии видов и вытеснение ими аборигенной фауны. Вероятные причины способности вселенцев к успешному освоению водоемов за пределами естественного ареала и внедрению в нехарактерные экосистемы могут быть связаны с физиолого-биохимическими особенностями видов, обеспечивающими высокий уровень их экологической пластичности и возможность адаптации к новым условиям обитания. Одним из наиболее вероятных объяснений этих характеристик может быть способность видов к эффективному энергообеспечению стресс-реакций. Можно предположить, что именно способности к эффективному поддержанию повышенных уровней реакции стресс-систем в широком диапазоне изменений характеристик среды, определяют конкурентные преимущества успешных видов-вселенцев, по сравнению с аборигенными видами.

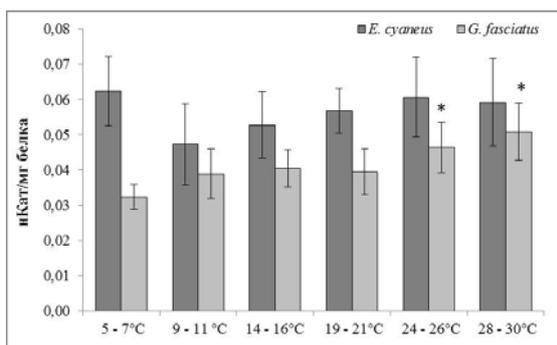
Байкальский вид амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) представляет собой уникальный объект для исследований адаптивных способностей гидробионтов в аспекте проблемы биологических инвазий и изменений климатических условий. По оценкам ряда исследователей возраст вида превышает возраст Байкала и составляет более 30 млн. лет. Таким образом, *G. fasciatus*-реликтовый вид, представляющий фауну добайкальского происхождения. В естественном ареале распространение вида ограничено литоралью Байкала. В байкальском регионе за пределами Байкала *G. fasciatus* встречается только в очень ограниченном числе водоемов (чаще всего с антропогенно-нарушенными условиями), в которых вид испытывает жесткую конкуренцию со стороны широко распространенного *Gammarus lacustris* Sars. В середине прошлого века *G. fasciatus* вместе с некоторыми другими байкальскими видами был интродуцирован в европейские водоемы. После первичной интродукции вид приспособился к обитанию в новых условиях и в дальнейшем широко распространился в водоемах европейской части России, став массовым видом-вселенцем.

Целью исследования являлось выявление особенностей стресс-ответа эндемичного байкальского вида амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) в условиях повышенной температуры среды обитания.

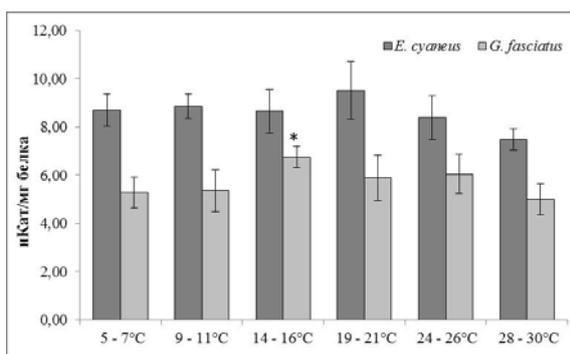
В качестве объекта исследования был выбран эндемичный вид амфипод озера Байкал *G. fasciatus* (Stebb., 1899). Для сравнительной оценки был использован другой байкальский вид, близкий по экологическим и терморезистентным характеристикам – *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb., 1874)[6]. В ходе исследования проведены эксперименты по экспонированию рачков в условиях постепенного повышения температуры с 5-7 °С (средняя температура среды обитания, температура акклимации) до температуры, при которой ранее отмечали гибель 100% особей (28-30°С). Скорость изменения температуры составила 1 °С·ч<sup>-1</sup>.

Для оценки влияния изменения температуры среды на активность механизмов терморезистентности в ходе исследования определяли изменение содержания лактата, изменение активности ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы, глутатион S – трансферазы) и фермента анаэробного гликолиза (лактатдегидрогеназы) по методикам, описанным в [6].

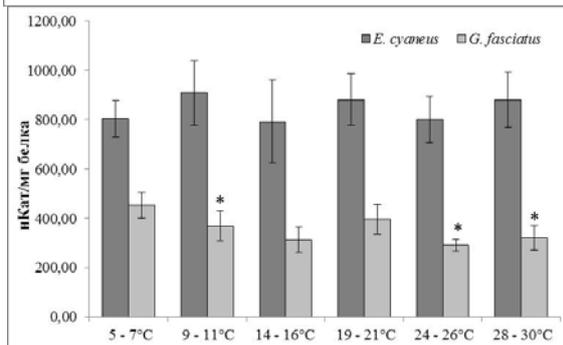
При экспозиции в условиях постепенной гипертермии у амфипод наблюдали изменение активности ферментов антиоксидантной системы и лактатдегидрогеназы, а также изменение содержания лактата. В условиях постепенного повышения температуры среды, на протяжении всего эксперимента не наблюдали изменения активности ферментов антиоксидантной системы у амфипод вида *E. cyaneus* (Рис.1, 2, 3), не смотря на то, что данный вид считается менее терморезистентным в сравнении с *G. fasciatus*. При экспозиции *G. Fasciatus* в данных условиях, при достижении температуры среды 24-30°С наблюдали увеличение активности пероксидазы (Рис. 1). Активность глутатион S-трансферазы кратковременно увеличивалась при достижении температуры среды 14-16 °С (Рис. 2). В то же время в изменении активности каталазы (Рис. 3) наблюдали кратковременное снижение при достижении температур 9-11 и 24-30°С.



**Рис. 1.** Изменение активности пероксидазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды



**Рис. 2.** Изменение активности глутатион S-трансферазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды

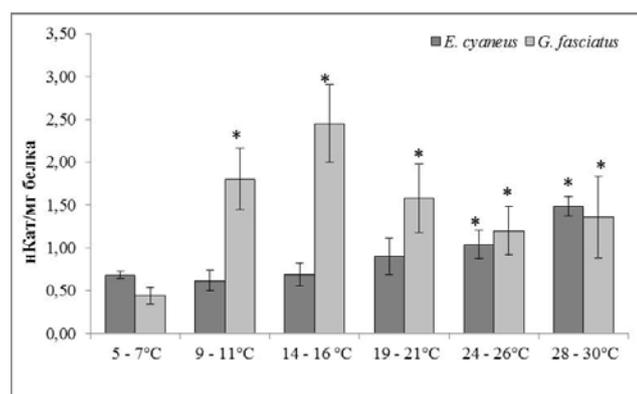


**Рис. 3.** Изменение активности каталазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды

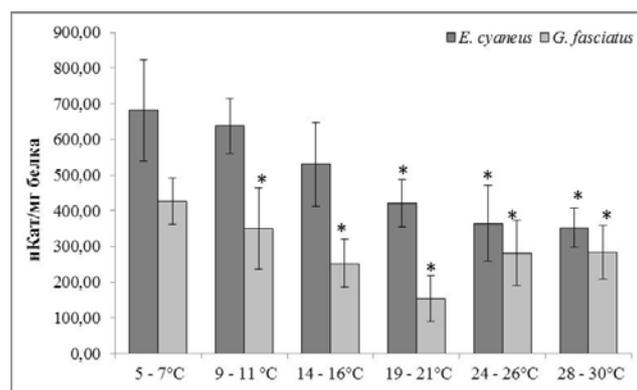
При экспозиции амфипод в условиях постепенного повышения температуры наблюдали увеличение содержания лактата у обоих видов (Рис. 4). У *G. fasciatus* увеличение содержания лактата происходило раньше и при меньших температурах, чем у *E. cyaneus*. Повышение содержания лактата у *G. fasciatus* отмечали при достижении температуры выше 9°C., тогда как у *E. cyaneus* изменение содержания лактата наблюдали только при достижении 24-26°C.

Изменение активности лактатдегидрогеназы также отмечали у обоих видов (Рис. 5). При том наблюдали снижение активности фермента, коррелирующее с повышением содержания лактата. Изменение активности лактатдегидрогеназы у *E. cyaneus* отмечали в диапазоне температур 19-21 °C, а у *G. fasciatus* при достижении температуры 9-11°C.

После сравнения результатов, представленных в данном исследовании с ранее проведенными материалами показано, что реликтовый эндемичный вид *G. fasciatus* имеет специфические механизмы стресс-ответа на воздействие повышенных температур среды. При повышении температуры среды накопление лактата в тканях *G. fasciatus* происходило при меньших температурах, чем у других изученных видов амфипод литорали озера Байкал. В то время как изменение содержания клеточных стресс-маркеров и их активности у *E. cyaneus* и других литоральных байкальских видов (*Ommatogammarus flavus*, *E. verrucosus*) наблюдали за пределами зоны термопреференции [7], изменение содержания (активности) клеточных стресс-маркеров у *G. fasciatus* связано с входом в зону термопреференции. Таким образом, в ходе проведенного исследования показана специфика стресс-ответа вида *G. fasciatus* в условиях антропогенно индуцированной температурной нагрузки. Установлено, что активация защитных систем у вида *G. fasciatus*, получившего широкое распространение в водоемах с различной антропогенной нагрузкой европейской части России, происходит раньше, чем у других байкальских и палеарктических видов.



**Рис. 4.** Изменение активности лактата (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды



**Рис. 5.** Изменение активности лактатдегидрогеназы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-00501\_а (приобретение расходных материалов), РФФ 14-14-00400 программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «ИГУ» и совместной программы академических обменов DAAD - Минобрнауки РФ М. Ломоносов 2014-2015.

#### Список литературы

1. Kerr R. A. Atlantic climate pacemaker for millennia past, decades hence? Science – 2005. - V. 309. - P. 41–42.

2. Имашева А. Г. Стрессовые условия среды и генетическая изменчивость в популяциях животных. Генетика. – 1999. – Т. 35. – №. 4. – С. 421-431.
3. Evgen'ev M.B. Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. Journal of biosciences. – 2007. – Vol. 32. – N. 3. – p. 489–499.
4. Hofmann A. A., Parsons P. Evolutionary genetics and environmental stress. – Oxford University Press, 1991.
5. Pörtner H.O. Ecology. Physiology and climate change. Science. – 2008. – Vol. 322. – p. 690–692.
6. Тимофеев М.А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р.биол. Наук: 030208 / М.А. Тимофеев; ТГУ; Томск. – 2010. – 384 с.
7. Axenov-Gribanov D.V. Determination of Lake Baikal endemic amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) thermal optima limits by changes in its metabolic markers. Journal of stress physiology and biochemistry. - 2012. - Vol. 8. - № 4. - P. 289-301.

УДК 574.24; 53.043

### ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РАЧКОВ *DAPHNIA MAGNA*, ПОДВЕРГНУВШИХСЯ ОБЛУЧЕНИЮ КРАСНЫМ НЕКОГЕРЕНТНЫМ СВЕТОМ

О.В. Воробьева<sup>1</sup>, О.Ф. Филенко<sup>1</sup>, Е.Ф. Исакова<sup>1</sup>, В.И. Юсупов<sup>2</sup>, В.Н. Баграташвили<sup>2</sup>, Н.Н. Воробьева.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова  
119889, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, кор. 12; Россия, olvorobieva@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт Проблем Лазерных и Информационных технологий РАН  
142190, Москва, г. Троицк, ул. Пионерская, д. 2, Россия

Представлены данные о комбинированном действии однократного светодиодного облучения и хронического действия потенциально токсичных веществ на рачков *Daphnia magna*.

*Ключевые слова:* *Daphnia magna*, низкоинтенсивное излучение, лазерное излучение, протекторные свойства, токсиканты, комбинированные воздействия

В последние десятилетия, в связи с большим распространением лазерных и светодиодных технологий в медицинской практике, исследования по влиянию излучений на организмы различного систематического положения становятся все более актуальными. Лазерное и светодиодное облучение способно стимулировать биологические процессы в организме, оказывать противовоспалительный, противоотечный эффекты, ускорять регенерацию повреждённых тканей, рост коллатеральной капиллярной сети, приводящий к усиленному кровоснабжению органов, нормализовать показатели иммунитета [7].

Помимо терапевтического эффекта, облучение лазерными и светодиодными источниками способно оказывать протекторное действие на организмы, защищая их от неблагоприятных факторов [2]. Так, однократное облучение гелий-неоновым лазером защищало икру рыб от воздействия патогенных организмов [7], увеличивало резистентность ряски к токсичным воздействиям [6], защищало дафний от действия ультрафиолетового облучения [5]. Особый интерес может представлять исследование последствий облучения на фоне воздействия химического фактора среды.

В связи с этим, целью работы было исследование эффектов совместного действия однократного светодиодного облучения красным светом и хронического действия потенциально токсичных веществ на рачков.

Объектом исследования служила лабораторная культура пресноводных рачков *Daphnia magna* - стандартного тест-объекта для токсикологических исследований. Эксперименты велись согласно стандартным методикам [4].

Односуточных особей однократно облучали при помощи прибора СДМ-01, генерирующего светодиодное излучение ( $\lambda=650$  нм, интенсивность облучения  $0.9$  мВт/см<sup>2</sup>, время экспозиции 60 и 300 с, доза облучения 54.6 и 273 мДж/см<sup>2</sup> соответственно), после чего рачков помещали в опытные стаканы с раствором бихромата калия (0.3 и 0.5 мг Сг/л) или этилового спирта (0.02, 0.2 и 2 мг/л). Смена растворов токсикантов производилась через день. В качестве контроля служили рачки из того же помета, что и опытная выборка, но не подвергавшиеся действию облучения и токсикантов. Эксперименты велись 21 день, регистрировались выживаемость и плодовитость рачков.

Однократное облучение без воздействия токсикантов во всех сериях экспериментов не оказывало влияния на выживаемость и наступление половой зрелости, однако приводило к статистически незначимому увеличению плодовитости.

Этиловый спирт в исследованных концентрациях оказывал влияние как на выживаемость, так и на плодовитость дафний (табл. 1). В наименьшей из исследованных концентраций 0.02 мг/л, спирт увеличивал суммарную плодовитость рачков почти в два раза по сравнению с контрольными значениями. При концентрации 0.2 мг/л наблюдалось снижение выживаемости и суммарной плодовитости дафний, а самая большая из исследованных концентраций, 2 мг/л, существенно снижала выживаемость рачков и вызывала полное угнетение репродуктивных функций дафний.

Предварительное облучение оказывало частичное протекторное действие, предотвращая изменение морфо-функциональных параметров дафний, вызываемых действием токсиканта. Плодовитость облученных дафний при концентрации спирта 0.02 мг/л также была выше контрольных значений, однако ниже плодовитости дафний в присутствии токсиканта, но без облучения. Поскольку известно, что негативный эффект от воздействия токсикантов может проявляться как в стимуляции, так и угнетении различных функций организма [1, 3], снижение плодовитости дафний после предварительного облучения, может расцениваться как компенсаторное действие красного света, проявляющееся при действии токсиканта.

**Таблица 1.** Влияние предварительного облучения на проявление токсического эффекта этилового спирта

Воздействие	Выживаемость		Плодовитость	
	% от Контроля	td	% от Контроля	td
Этиловый спирт 0.02 мг/л	100	-	192.2	<b>5.18*</b>
Облучение 273 мДж/см <sup>2</sup> + этиловый спирт 0.02 мг/л	100	-	171.4	<b>3.81*</b>
Этиловый спирт 0.2 мг/л	88.74	<b>2.47*</b>	79.64	<b>2.47*</b>
Облучение 273 мДж/см <sup>2</sup> + этиловый спирт 0.2 мг/л	86.19	2.13	55.42	<b>2.5*</b>
Этиловый спирт 2 мг/л	43.10	<b>8.54*</b>	0	<b>4.08*</b>
Облучение 54.6 мДж/см <sup>2</sup> + этиловый спирт 2 мг/л	87.86	<b>2.18*</b>	71.43	1

\* обозначены статистически достоверные отличия от контроля (t-критерий Стьюдента).

При действии спирта в концентрации 0.2 мг/л на предварительно облученных рачков, наблюдалось усиление деструктивного действия токсиканта, сказывающегося преимущественно на плодовитости дафний. При самой большой из исследованных концентраций предварительное облучение увеличивало среднюю продолжительность жизни и суммарную плодовитость дафний. Продолжительность жизни при этом оказывалась статистически значимо ниже контрольных значений, тогда как плодовитость, хотя и была ниже контрольных значений, статистически значимо от них не отличалась.

Бихромат калия использовали в концентрациях 0.3 и 0.5 мг Cr/л, доза облучения при этом составляла 273 мДж/см<sup>2</sup>. Бихромат в исследованных концентрациях снижал как среднюю продолжительность жизни, так и суммарную плодовитость дафний по отношению к контролю (табл. 2).

**Таблица 2.** Влияние предварительного облучения на проявление токсического эффекта бихромата калия

Воздействие	Выживаемость		Плодовитость	
	% от Контроля	td	% от Контроля	td
Бихромат калия 0.3 мг/л	50.70	<b>9.98*</b>	60.45	<b>2.61*</b>
Облучение 273 мДж/см <sup>2</sup> + бихромат калия 0.3 мг/л	46.19	<b>10.59*</b>	128.70	<b>2.56*</b>
Бихромат калия 0.5 мг/л	30.62	<b>17.09*</b>	46.10	0.55
Облучение 273 мДж/см <sup>2</sup> + бихромат калия 0.5 мг/л	39.04	<b>22.37*</b>	49.45	1.94

\* обозначены статистически достоверные отличия от контроля (t-критерий Стьюдента).

Одинокое действие бихромата калия в концентрации 0.3 мг Сг/л приводило к статистически значимому снижению средней продолжительности жизни, однако плодовитость, по сравнению с необлученными дафниями, находящимися в растворе бихромата калия той же концентрации, увеличивалась. Стимуляция репродуктивных функций при совместном действии токсиканта и облучения, несмотря на сниженную продолжительность жизни, была настолько сильной, что оказалась выше контрольных значений плодовитости и более чем в 2 раза превосходила плодовитость дафний, подвергшихся только действию токсиканта.

При концентрации 0.5 мг/л предварительное облучение вело к увеличению выживаемости и суммарной плодовитости по сравнению с однократным действием токсиканта. Под влиянием бихромата калия гибель дафний начиналась уже на 2 сутки эксперимента, тогда как предварительно облученные рачки начинали погибать на 7 сутки наблюдений. Рачки, как облученные, так и необлученные, при воздействии бихромата калия в концентрации 0.5 мг Сг/л, погибли к 11 суткам наблюдений. Наибольшая плодовитость наблюдалась в контрольной выборке в чистой воде, в опытных выборках и при воздействии бихромата калия плодовитость в различной степени была снижена. Согласно данным статистической обработки, при отдельном воздействии бихромата калия на рачков средняя суммарная плодовитость на одну самку была снижена недостоверно (46 % от значения в контроле). Снижение плодовитости у облученных рачков при воздействии бихромата калия (49 % от контроля) также было статистически недостоверным.

Таким образом, проведенные исследования показали, что предварительное облучение красным некогерентным светом ( $\lambda=650$  нм) способно оказывать, в целом, некоторое протекторное действие на организмы, находящиеся в условиях хронического токсического стресса. При этом эффект от действия предварительного облучения зависит, по всей вероятности, от концентрации токсиканта.

#### Список литературы

1. Dave G. Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna* // Biochemistry and physiology, 1984. Vol. 78, N 2. P. 439-443.
2. Duan R, Zhu L, Liu TC, Li Y, Liu J, Jiao J, Xu X, Yao L, Liu S. Light emitting diode irradiation protect against the amyloid beta 25-35 induced apoptosis of PC12 cell *in vitro* // Lasers in Surgery and Medicine, 2003. Vol. 33. P. 199-203.
3. Wang W. Chromate ions as a reference toxicant for aquatic phytotoxicity tests // Environmental Toxicology and Chemistry, 1987. Vol. 213. P. 361-397.
4. Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний ФР.1.39.2007.03.222, М.: АКВАРОС, 2007. – 52с.
5. Осипова Е.А., Крылов В.В., Юсупов В.И., Симонова Н.Б. Эффекты кратковременного действия низкоинтенсивного лазерного и ультрафиолетового излучений на эмбрионы *Daphnia magna* // Журнал Сибирского федерального университета. Сер. Биология, 2011. Т. 4, № 3. С. 301-309.
6. Фельдман М.Г., Крутик С.Ю. Аспекты совместного воздействия низкоинтенсивного лазера и токсикантов // В Сб. трудов молодых ученых МГУТУ. М.: МГУТУ, 2005. С. 24-29.
7. Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А., Дроздов А.Л., Юсупов В.И. Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии. Владивосток: Дальнаука, 2002. - 157 с.

УДК 57.044-582.28

### ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ БЕНЗИНОМ И ДИЗЕЛЬНЫМ ТОПЛИВОМ НА РАЗВИТИЕ САПРОЛЕГНИИ

Л.В. Воронин

Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского,  
150000 Ярославль, ул. Республиканская, 108, Россия, voroninfunji@mail.ru

Экспериментально показано, что низкая концентрация бензина в воде стимулирует рост и воспроизведение сапролегнии, более высокие концентрации ингибируют ее развитие. Дизельное топливо ингибирует развитие сапролегнии даже при низких концентрациях.

*Ключевые слова:* сапролегния, бензин, дизельное топливо, оогонии, зооспорангии

Сапролегниевые - широко распространенная и сравнительно хорошо изученная группа грибоподобных организмов. Они играют большую роль в биологических процессах, протекающих в

пресных водоемах. Основное их значение, как и водных грибов, состоит в очищении воды, в превращении растительных и животных остатков в корм, используемый беспозвоночными и микроорганизмами [1]. Количество сапролегниевых в водоеме зависит от количества органических веществ. Эта зависимость и широкое распространение сапролегний позволяют использовать их в качестве объекта биоиндикации для оценки трофического статуса водоемов.

Для наших экспериментов пробы воды в объеме 1-1.5 л отбирали в октябре 2013 г. в прибрежье р. Которосль в 1.0 км от устья реки. Обработку производили в течение 30 мин после отбора, чтобы предотвратить гибель зооспор сапролегнии. Использовали метод "приманок", в качестве которых применяли несколько раз прокипяченные семена льна. Всего было использовано 40 семян, размещенных по 5 шт в стерильных чашках Петри, в которые затем разливали по 20 мл воды, отобранной в р. Которосль. Чашки держали при комнатной температуре, через 5-7 сут учитывали количество колонизованных семян. При этом отмечали количество оогониев в каждой Gross-колонии сапролегнии по шкале: 0 - отсутствуют, 1-20 - мало, 21-40 - среднее количество, более 40 - много. Аналогично по такой же шкале оценивали количество зооспорангиев.

Были получены следующие данные: на 4 колониях (10%) оогониев не было, на 15 колониях (37.5%) - мало, на 13 колониях (32,5%) - среднее количество и на 8 колониях (20%) - много. Выявлен только один вид - *Saprolegnia ferax* (Gruith.)Thuret. Были определены диаметр оогония и ооспор, количество ооспор в оогониях: диаметр оогония - (50)-60-88-(132) мкм, количество ооспор в оогонии - (3)-4-21-(40), диаметр ооспор - (16.5)-19.8-24.5-(27.0) мкм. Морфометрические показатели свидетельствуют о том, что Gross-культуры получены из среды с наличием ингибирующих факторов. Для экспериментальной работы по исследованию влияния на рост и репродукцию сапролегнии бензина и дизельного топлива были получены дочерние колонии от колонии сапролегнии со средними показателями численности оогониев и ооспор.

Для проведения эксперимента по влиянию бензина использовали недельную Gross-культуру *Saprolegnia ferax*, выращенную в дистиллированной воде на семенах льна; применяли суспензию бензина А-92 и дистиллированной воды с концентрациями 3, 5, 10 капель бензина в 100 мл воды (85.2; 142.0 и 284.0 мг/ 100 мл соответственно). В чашки Петри в качестве приманок помещались прокипяченные семена льна (по 5 в каждую) и переносилось по одной зрелой колонии сапролегнии. Эти чашки заливались суспензиями с выбранными концентрациями, по три повторности в каждой. В контрольном варианте в чашки заливалась дистиллированная вода.

Анализ проводился через 9 сут. Для каждой концентрации суспензии рассчитывали процент заселенных семян и оценивали количество оогониев и (или) зооспорангиев в каждой колонии по указанной выше шкале (Табл. 1).

**Таблица 1.** Число колоний сапролегнии с определенным количеством зооспорангиев (оогониев) при действии различных концентраций бензина

Показатель	контроль	85.2 мг/100мл	142.0 мг/100мл	284.0 мг/100мл
Количество заселенных семян	15 = 100%	15 = 100%	10 = 66.7%	10 = 66.7%
Нет зооспорангиев (оогониев)	- (13 = 86.7%)	- (-)	5 = 33.3 % (-)	5 = 33.3% (-)
Мало зооспорангиев (оогониев)	2 = 13.3% (2 = 13.3%)	- (-)	2 = 13.3 % (-)	- (-)
Среднее количество зооспорангиев (оогониев)	4 = 26.4% (-)	2 = 13.3% (-)	4 = 26.7% (-)	7 = 46.7% (-)
Много зооспорангиев (оогониев)	9 = 60.0% (-)	13 = 86.7% (-)	4 = 26.7% (-)	3 = 20.0% (-)

Полученные данные позволяют оценить влияние бензина на развитие *S. ferax*. В контроле на всех приманках проросли колонии сапролегнии, на всех колониях образовались зооспорангии, и только на двух — оогонии. Под воздействием бензина в колониях формировались только зооспорангии, т. е. сапролегния размножается только бесполым путем. Хорошо видно, что при увеличении концентрации бензина уменьшается количество заселенных семян. Если при трех каплях на 100 мл заселились все «приманки» то при 5 и 10 — только 10 из 15 (66.7%). Кроме того, при увеличении концентрации бензина наблюдается уменьшение количества колоний, где зооспорангиев много (более 41), и

увеличение количества колоний со средним количеством зооспорангиев. При концентрации 85.2 мг/мл формирование зооспорангиев происходит обильнее, чем в контроле. Бензин — это смесь низкомолекулярных (C5 — C11) углеводородов, значит, он может использоваться для питания сапролегний, или быть катализатором ее роста.

**Таблица 2.** Число колоний сапролегнии с определенным количеством зооспорангиев (оогониев) при действии различных концентраций дизельного топлива

Показатель	Контроль	31.2 мг/ 100 мл	93.6 мг/ 100 мл	156.0 мг/ 100 мл	312.0 мг/ 100 мл
Количество заселенных семян	15 = 100%	4 = 26.7%	9 = 60.0%	1 = 6.7%	2 = 13.3%
Нет зооспорангиев (оогониев)	- (13 = 86.7%)	11 = 73.3% (11 = 73.3%)	6 = 40.0% (8 = 53.4%)	14 = 93.3% (14 = 93.3%)	13 = 86.7% (13 = 86.7%)
Мало зооспорангиев (оогониев)	2 = 13.3% (2 = 13.3%)	1 = 6.7% (3 = 20.0%)	- (2 = 13.3%)	- (1 = 6.7%)	2 = 13.3% (2 = 13.3%)
Среднее количество зооспорангиев (оогониев)	4 = 26.7% (-)	2 = 13.3% (-)	5 = 33.3% (5 = 33.3%)	1 = 6.7% (-)	- (-)
Много зооспорангиев (оогониев)	9 = 60.0% (-)	1 = 6.7% (1 = 6.7%)	4 = 26.7% (-)	- (-)	- (-)

По данным эксперимента наиболее благоприятной концентрацией бензина для развития *S.ferax* является 85.2 мг/л, а при более высоких концентрациях ее развитие ингибируется. Таким образом при относительно небольших загрязнениях водоема бензином роль сапролегнии в трофической структуре биоценоза не нарушается.

Для проведения эксперимента по влиянию дизельного топлива (газойля) готовили материал аналогичным образом; он включал 4 варианта концентрации суспензии газойля с дистиллированной водой: 1 капля (31.2 мг/100 мл), 3 капли (93.6 мг/100 мл), 5 капель (156.0 мг/ 100 мл) и 10 капель (312.) мг/ 100мл) в 100 мл суспензии. Каждый вариант также имел три повторности. Анализ проводился также через 9 сут: определяли количество заселенных семян, оценивали формирование оогониев и зооспорангиев по шкале, указанной выше (Табл. 2).

Результаты экспериментов согласуются с данными о распространении сапролегниевых грибоподобных организмов в водоемах в зависимости от степени загрязнения их органическими веществами [2, 3]. При загрязнении водоемов, пропорционально ему, возрастает встречаемость сапролегнии, но до определенного предела. При сверхсильном загрязнении, в том числе и наличии в воде токсических веществ, сапролегниевые угнетаются, снижается их численность, нарушаются процессы воспроизводства.

#### Список литературы

1. Дудка И.А. Грибы как компоненты пресноводных биоценозов // Микология и фитопатология, 1974. Т. 8. Вып. 5. С. 444 — 449.
2. Терехова В.А., Семенова Т.А. Изменчивость микобиоты в условиях интенсивной антропогенной нагрузки // Экологическое состояние бассейна р. Чапаевка в условиях антропогенного воздействия. Биологическая индикация. Тольятти: ИЭВБ, 1997. С. 156 — 161.
3. Воронин Л.В. Микологическая индикация состояния экосистем водоемов Воркуты и ее окрестностей // Биоиндикация состояния природной среды Воркутинской тундры (Тр. КНЦ УрО РАН. № 143). Сыктывкар, 1996. С. 83 — 91.

**ФАКТОР ИЗМЕНЕНИЯ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ И РЕАКЦИИ ЦЕРИОДАФНИЙ  
НА ХИМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В КУЛЬТУРЕ – СЕЗОННОСТЬ ИЛИ МЕТЕОУСЛОВИЯ?**

Д.М. Гершкович, О.Ф. Филенко, Е.Ф. Исакова

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова  
Биологический факультет, кафедра гидробиологии  
119991, г. Москва, Россия, papirus451@yandex.ru*

Продолжительность жизни, плодовитость и реакция цериодафний на химическое воздействие изменяются в течение года. Проанализирована зависимость физиологических показателей от факторов среды.

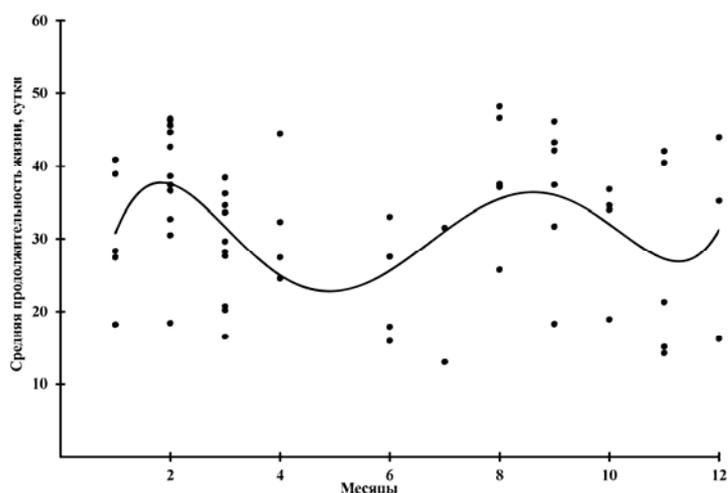
*Ключевые слова:* *Ceriodaphnia affinis*, продолжительность жизни, плодовитость, химическое воздействие, сезонность, факторы среды.

Стандартизация условий содержания лабораторных культур ракообразных в течение года не приводит к стабилизации основных физиологических показателей, таких как продолжительность жизни, плодовитость и реакция на химическое воздействие. Среди внешних факторов, влияющих на жизненные функции ракообразных, выделяют температурный режим [1], количество и качество корма [2], режим освещения. Однако, поддержание условий на оптимальном уровне, рекомендованном методиками, не гарантирует постоянство продолжительности жизни [3], плодовитости и стабильность реакций гидробионтов на химическое воздействие. Так, в условиях лаборатории в зимний период у ветвистоусых ракообразных наблюдается изменение токсикорезистентности и снижение уровня репродукции [4, 5]. Помимо контролируемых факторов, на ракообразных могут влиять метеорологические и фенологические факторы, такие как атмосферное давление, солнечная активность, изменение геомагнитного фона, продолжительность светового дня. Целью исследования служило выявление факторов, способных влиять на жизненные показатели и токсикорезистентность цериодафний в лабораторной культуре.

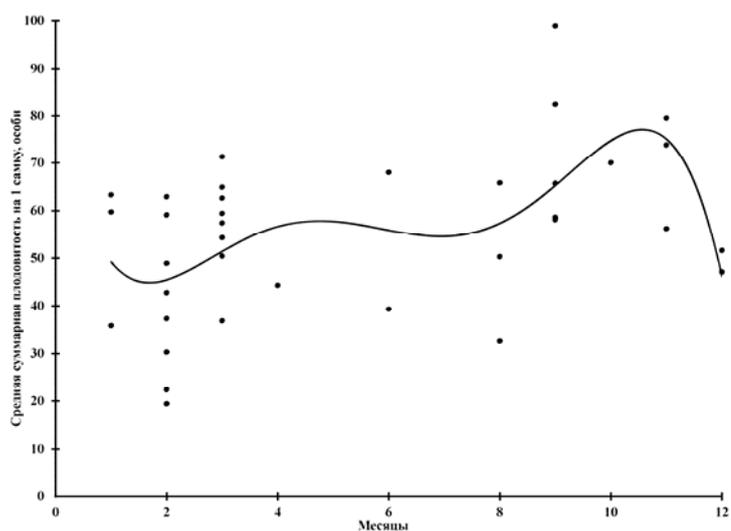
В 2007 - 2014 годах были проведены серии наблюдений, целью которых было исследование полной продолжительности жизни цериодафний в лабораторной культуре (60 серий) и плодовитости (36 серий) в различные сезоны года. Каждая серия насчитывала от 20 до 270 особей, рожденных в один день. Ракообразные содержались согласно рекомендациям стандартных методических указаний [6]. При наблюдении учитывалась полная продолжительность жизни цериодафний (от момента рождения до момента естественной гибели), а также количество рожденного за срок жизни потомства.

В разных сериях наблюдений средняя продолжительность жизни рачков *C. affinis* в лабораторной культуре варьировала от 13.0 до 48.2 суток, максимальная продолжительность жизни изменялась в пределах от 28 до 82 суток. Обобщенная по всем сериям средняя продолжительность жизни на протяжении года составила  $32.6 \pm 2.6$ , а максимальный срок жизни  $54.4 \pm 2.8$  суток. Плодовитость в пересчете на одну самку изменялась от 19.4 до 98.9 особей, средняя плодовитость самки составила  $54.5 \pm 5.7$  особей. В относительном выражении вариабельность срока максимальной продолжительности жизни была меньше (коэффициент вариации  $CV=19.6\%$ ), чем вариабельность средней продолжительности жизни ( $CV=30.7\%$ ). Это различие может быть обусловлено тем, что предельный срок жизни отражает генетически закрепленный потенциал жизнеспособности вида. В полной мере он может быть реализован у тех особей, которые обладают более высокой резистентностью к изменениям условий внешней среды, чем основная часть популяции или выборки организмов. Отмечена тенденция к увеличению средней продолжительности жизни цериодафний в лаборатории от года к году.

На рис. 1 и 2 показаны изменения средней продолжительности жизни и плодовитости цериодафний в течение года. Снижение средней продолжительности жизни (до 25 суток и менее) чаще было отмечено в июне и ноябре. Таким образом, периоды депрессии *C. affinis* совпадает с периодом снижения токсикорезистентности и уровня репродукции у *D. magna* в лабораторной культуре [5].



**Рис. 1.** Средняя продолжительность жизни *Ceriodaphnia affinis* в зависимости от месяца рождения.



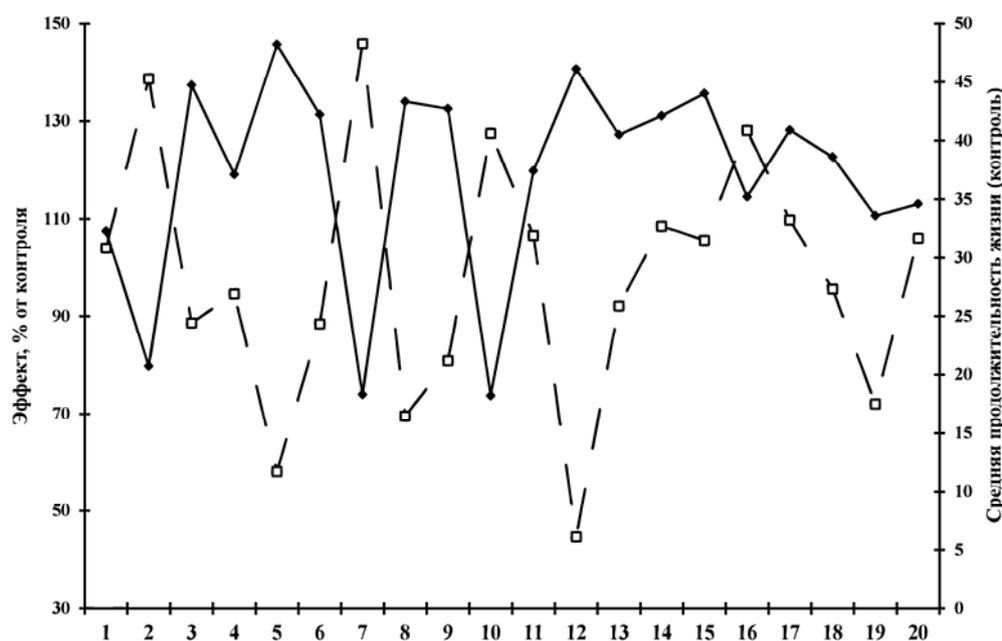
**Рис. 2.** Плодовитость *Ceriodaphnia affinis* (в пересчете на самку) в зависимости от месяца рождения.

При индивидуальном наблюдении за взрослыми самками выявлена прямая зависимость плодовитости цериодафний от средней продолжительности жизни ( $r = 0.92$ ). Ракообразные сохраняют репродуктивные способности до конца жизни, поэтому увеличение продолжительности жизни приводит к увеличению суммарного количества рожденной за весь срок жизни молоди.

На основании полученной по итогам наблюдений выборки данных были вычислены коэффициенты корреляции средней продолжительности жизни и плодовитости цериодафний со значениями контролируемых и неконтролируемых факторов среды. Данные о температуре в лаборатории фиксировались ежедневно; информация о длительности светового дня, показателях солнечной активности и изменениях геомагнитного фона была взята из общедоступной базы ([www.moveinfo.ru](http://www.moveinfo.ru)), информация об изменении атмосферного давления – из общедоступного архива агрометеорологической станции ВДНХ (Москва).

На постоянном уровне поддерживались интенсивность и режим искусственного освещения, стабильным оставался состав и режим смены культивационной воды, режим кормления. Температура в лаборатории в 2007-2012 гг. колебалась в рамках экологической валентности вида (20.6-23.9°C), начиная с 2012 г. поддерживалась на постоянном уровне (23.5 °C) в климатостате. Низкие величины коэффициентов корреляции показателей продолжительности жизни и плодовитости с температурой в течение наблюдений свидетельствуют об отсутствии зависимости физиологических показателей цериодафний от температуры (в пределах экологической валентности вида). Кроме того, после стабилизации температурного режима в 2012 г. показатели продолжительности жизни и плодовитости рачков продолжали колебаться. Корреляционный анализ физиологических показателей цериодафний с абсолютным значением и скоростью изменения атмосферного давления, природной продолжительности

светового дня, показателей солнечной активности и геомагнитного фона не выявил наличия прямых или обратных зависимостей. Возможно установление корреляций при увеличении объема данных со временем, однако вопрос зависимости жизненных функций гидробионтов от неконтролируемых внешних факторов остается открытым.



**Рис. 3.** Изменение влияния 0.02 мг/л этилового спирта на среднюю продолжительность жизни рачков *Ceriodaphnia affinis*. По оси абсцисс указана последовательность проведения экспериментов; ■ – средняя продолжительность жизни в контрольной группе рачков; ♦ – эффект 0.02 мг/л этилового спирта (в % от контроля)

Было отмечено изменение реакции цериодафний на химическое воздействие в течение года. На рис. 3 показано изменение средней продолжительности жизни в контрольных наблюдениях и изменение эффекта воздействия этилового спирта в концентрации 0.02 мг/л (в % от контроля). Показана обратная зависимость средней продолжительности жизни цериодафний в контрольных наблюдениях и эффекта воздействия потенциального токсиканта (коэффициент ранговой корреляции Спирмена = 0.67; крит. = 0.45). Наибольший стимулирующий эффект спирта проявляется одновременно со снижением средней продолжительности жизни у рачков в контрольной группе. Если сопоставить сезонные изменения продолжительности жизни рачков и сезонные изменения величины эффекта воздействия этилового спирта, можно заметить, что при естественно высоком уровне средней продолжительности жизни в контроле эффект воздействия токсиканта снижается по сравнению с эффектом в периоды депрессии, когда продолжительность жизни рачков в культуре снижена. Аналогичная зависимость наблюдается также при воздействии этилового спирта в концентрации 0.002 мг/л. Таким образом, можно предполагать наличие природного ограничения продолжительности жизни рачков. В периоды депрессий потенциальный токсикант может выполнять функции адаптогена, увеличивая сниженную внешними и внутренними факторами продолжительность жизни до нормального уровня.

Корреляционный анализ физиологических показателей цериодафний с изменениями неконтролируемых абиотических факторов не выявил наличия прямых или обратных зависимостей. Возможно установление корреляций при расширении спектра анализируемых параметров и увеличении объема данных со временем, однако вопрос зависимости жизненных функций гидробионтов от внешних факторов остается открытым.

Предполагается, что основополагающее значение имеют генетически predetermined способности особей в популяции реагировать на внешние воздействия, по-разному реализуемые в изменяющихся условиях.

Таким образом мы ставим вопрос, вынесенный в заголовок, так как получение ответа на него поможет лучшему пониманию влияния естественных факторов среды на эффект экстремального воздействия и регламентировать условия лабораторных испытаний на гидробионтах.

## Список литературы

1. Галковская Г.А., Морозов А.М. Формирование температурных адаптаций у дафний // Журнал Общей Биологии. 1981. Т. 42, № 1. С.113-117.
2. Крючкова Н.М., Рыбак В.Х. Продолжительность развития дафний при разных пищевых условиях // Вестник Белорусского Университета. 1980. Т. 2, № 1. С. 44-47.
3. Filenko O.F., Isakova E. F., Gershkovich D. M. The lifespan of the Cladoceran *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg in a laboratory culture // Inland water biology. 2011. V. 4 (3). P. 283-286.
4. Исакова Е.Ф. Сезонные изменения фактической плодовитости *Daphnia magna* Straus в лабораторной культуре // Гидробиологический журнал. 1980. Т.16, № 4. С. 86-89.
5. Исакова Е. Ф., Юклеевских М. Ю. Сезонные изменения резистентности лабораторной культуры *D. magna* Str. к бихромату калия // Биол. внутр. вод. 1998. № 3. С. 76-82.
6. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: АКВАРОС, 2007. – 56 с.

УДК: 597.554.3:577.151.01

### ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (Cu, Zn, Pb) НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ КИШЕЧНИКА СИНЦА И БЕЛОГЛАЗКИ

И.Л. Голованова\*, А.А.Филиппов\*, Б.А.Левин\*, А.А. Болотовский\*, Г.А.Урванцева\*\*

\*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок, Россия. golovanova5353@mail.ru

\*\*Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Россия

Установлены различия в чувствительности гликозидаз (мальтаза, амилолитическая активность) кишечника планктоядного синца *Ballerus ballerus* и бентоядной белоглазки *Ballerus sapa* к *in vitro* действию ионов Cu, Zn, Pb.

*Ключевые слова:* рыбы, Cyprinidae, пищеварительные гликозидазы, тяжелые металлы.

В настоящее время практически все водоемы загрязнены тяжелыми металлами, которые в отличие от органических загрязнителей не подвергаются биодеградации, и крайне медленно покидают биологический цикл. Они поступают в водную среду в результате антропогенного загрязнения либо из природных источников, и находятся в растворимой (или ионной), коллоидной (органической и неорганической) или взвешенной форме. Значительное количество тяжелых металлов накапливается в грунтах, которые могут быть вторичным источником загрязнения. Форма существования металлов может меняться в зависимости от pH среды и наличия растворенных органических веществ. Наибольшей биологической активностью, как правило, обладают ионные формы металлов либо их липофильные комплексы.

Медь, цинк, свинец, наряду с ртутью и кадмием, рассматривается в ряду самых распространенных и опасных в экотоксикологическом отношении элементов. При этом Cu и Zn – необходимые микроэлементы, в то время как биологические функции Pb, Cd и Hg пока не известны. ПДК меди, свинца и цинка для воды водоемов рыбохозяйственного назначения составляет 1, 6 и 10 мкг/л соответственно [1]. Попадая в организм с водой и/или пищей, они в значительных количествах накапливаются в разных органах рыб. Концентрации Cu и Zn в тканях пресноводных рыб могут достигать 19 и 59 мг/кг сырого веса соответственно, Pb – 2–15 мг/кг [2]. Высокие концентрации этих металлов отмечены в донных отложениях водоемов и в кормовых объектах рыб: у бентосных беспозвоночных – хирономид, олигохет, моллюсков – до 16–59 мг/кг, у зоопланктона несколько ниже – до 7–26 мг/кг сырой массы [2, 3]. Попадая в организм рыб вместе с водой и пищей, они могут оказывать прямое и опосредованное действие на активность ферментов пищеварительного тракта рыб. Углеводы являются важным энергетическим и пластическим компонентом пищи. Их содержание в кормовых объектах рыб планктофагов, бентофагов и особенно макрофитофагов значительно выше, чем у типичных ихтиофагов. Установлено, что большее содержание углеводов в естественной пище рыб сопровождается более высоким уровнем активности пищеварительных гликозидаз. Ранее в экспериментах *in vitro* установлены изменения активности кишечных гликозидаз в присутствии ионов Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> у ряда видов пресноводных рыб, различающихся по типу питания [4, 5].

Цель настоящей работы состояла в сравнительном изучении чувствительности пищеварительных гликозидаз кишечника к действию ионов меди  $\text{Cu}^{2+}$ , цинка  $\text{Zn}^{2+}$  и свинца  $\text{Pb}^{2+}$  у близкородственных видов рыб рода *Ballerus* (Cyprinidae), различающихся по типу питания.

Половозрелые особи синца *Ballerus ballerus* (L.) (масса  $222 \pm 26$  г, длина  $24.8 \pm 0.8$  см, 11 экз.) и белоглазки *Ballerus sapa* (Pallas) ( $200 \pm 11$  г,  $21.8 \pm 0.4$  см, 10 экз.) отловлены в первой декаде мая 2013 г в устье р. Ветлуги (Республика Марий-Эл). После поимки рыб сразу обездвигивали, извлекали кишечника, и хранили их при температуре  $-18^\circ\text{C}$  не более 2-х недель. В лабораторных условиях кишечника очищали от жира и прилегающих тканей, извлекали химус и снимали слизистую оболочку кишечника. При помощи стеклянного гомогенизатора готовили суммарные пробы (в состав которых входила слизистая или химус медиального отдела кишечника от 4–8 экз. рыб одного вида), добавляя охлажденный до  $2-4^\circ\text{C}$  раствор Рингера для холоднокровных животных (110 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 13 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4) в соотношении 1:9. Затем исходные гомогенаты дополнительно разводили раствором Рингера в 2–10 раз. В гомогенатах слизистой оболочки и химуса определяли активность гликозидаз: активность мальтазы НФ 3.2.1.20 глюкозооксидазным методом с помощью набора для клинической медицины “Фотоглюкоза” (ООО “Импакт”, Россия) и амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал –  $\alpha$ -амилазы НФ 3.2.1.1, глюкоамилазы НФ 3.2.1.3 и мальтазы – модифицированным методом Нельсона [6]. Для оценки влияния ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  на активность гликозидаз гомогенаты предварительно инкубировали в присутствии сернокислых солей меди, цинка ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) или азотнокислой соли свинца  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  в течение 1 ч при температуре  $20^\circ\text{C}$  и pH 7.4. Концентрации ионов, рассчитанные по общему содержанию металла в соли, составляли 0 (контроль), 0.1, 1, 5, 10 и 25 мг/л. Затем к гомогенату добавляли равное количество субстрата (растворимый 1.8%-ый крахмал, 50 ммоль мальтоза или сахароза, приготовленные на растворе Рингера) и вновь инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Выбор диапазона концентраций обусловлен значениями ПДК этих металлов и их содержанием в тканях рыб и кормовых объектов [2, 3]. Ферментативную активность определяли в пяти повторностях для каждой точки с учетом фона (количества конечных продуктов реакции в исходном гомогенате) и выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации в расчете на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/г·мин). Результаты обработаны статистически с помощью программы Statistica 10.0 и представлены в виде средних и их ошибок ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса при  $p \leq 0.05$ .

Активность исследованных гликозидаз в слизистой оболочке и химусе кишечника белоглазки превышает таковую у синца приблизительно в 2 раза (табл.). Амилолитическая активность в слизистой оболочке и химусе кишечника белоглазки в присутствии ионов Cu снижается в большей мере по сравнению с синцом. Так, у белоглазки ферментативная активность понижается на 34 и 73% в слизистой и на 38% и 73% в химусе при концентрации ионов Cu 10 и 25 мг/л соответственно. У синца тормозящий эффект составил 53% в слизистой и 58% в химусе лишь при наибольшей концентрации ионов Cu. В присутствии ионов Zn торможение амилолитической активности в слизистой оболочке кишечника синца составило 32% от контроля, у белоглазки – лишь 18%; в химусе отмечено снижение активности на 33–37% лишь у белоглазки при наибольших концентрациях металла. Ионы Pb не изменяют амилолитическую активность кишечника у обоих исследованных видов рыб. Активность мембранного фермента мальтазы в слизистой оболочке кишечника синца снижается на 23–25% в присутствии ионов Cu и Zn в концентрациях 10 и 25 мг/л. В то же время у белоглазки отмечен стимулирующий эффект этих металлов: активность мальтазы повышается на 19% от контроля в присутствии ионов Cu (25 мг/л) и на 43–45% в присутствии ионов Zn (10 и 25 мг/л). Ионы Pb в наибольших концентрациях повышают активность мальтазы на 23 и 73% от контроля лишь у синца.

Синец и белоглазка – сестринские виды рода *Ballerus*, существенно дивергировавшие по типу питания и комплексу морфологических признаков, адаптированных в соответствие с пищевой стратегией. Синец является типичным планктофагом, белоглазка питается преимущественно бентосом. Более высокая активность гликозидаз у белоглазки хорошо согласуется с большим содержанием углеводов в естественной пище рыб-бентофагов по сравнению с планктофагами и подтверждает представления о стимулирующем действии пищевых субстратов на активность пищеварительных ферментов. Однако различия в уровне активности гликозидаз могли быть вызваны не только разным спектром питания и биохимическим составом пищи, но и изначальными различиями в тиреоидном статусе этих видов рыб. Более высокий уровень трийодтиронина отмечен у белоглазки [7], активность гликозидаз у которой также выше. Возможно, дивергенция по уровню тиреоидных гормонов явилась определяющей в морфологической дивергенции и дальнейшей пищевой специализации данных видов.

**Таблица 1.** Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке и химусе кишечника рыб рода *Ballerus* (Cyprinidae)

Концентрация ионов, мг/л	Синец			Белоглазка		
	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
Амилолитическая активность в слизистой оболочке						
0 (контроль)	4.85 ± 0.23	4.85 ± 0.23	6.29 ± 0.25	14.0 ± 0.54	14.0 ± 0.54	17.0 ± 0.66
0.1	4.27 ± 0.17	5.49 ± 0.35	5.97 ± 0.11	12.0 ± 0.49	12.9 ± 0.39	15.4 ± 0.74
1	3.97 ± 0.14	4.69 ± 0.05	6.35 ± 0.10	11.5 ± 0.27	13.1 ± 0.36	18.1 ± 0.56
5	3.76 ± 0.14	4.16 ± 0.08	6.13 ± 0.24	10.8 ± 0.41	12.8 ± 0.53	18.6 ± 0.46
10	3.68 ± 0.14	4.00 ± 0.09	6.24 ± 0.23	9.28 ± 0.46 <sup>B</sup>	11.6 ± 0.39	21.0 ± 0.26
25	2.29 ± 0.15 <sup>B</sup>	3.28 ± 0.19 <sup>A</sup>	6.13 ± 0.24	3.36 ± 0.35 <sup>B</sup>	11.5 ± 0.32 <sup>A</sup>	20.9 ± 0.24
Амилолитическая активность в химусе						
0 (контроль)	7.98 ± 0.18	7.98 ± 0.18	7.98 ± 0.18	25.9 ± 0.40	25.9 ± 0.40	25.9 ± 0.40
0.1	8.05 ± 0.42	9.26 ± 0.07	9.76 ± 0.33	26.7 ± 0.34	23.5 ± 0.75	21.9 ± 0.38
1	7.44 ± 0.16	8.41 ± 0.27	9.44 ± 0.29	25.6 ± 0.89	20.8 ± 0.70	22.1 ± 0.80
5	6.83 ± 0.16	7.01 ± 0.17	7.95 ± 0.38	21.6 ± 0.62	19.2 ± 0.58	23.9 ± 0.72
10	5.97 ± 0.33	5.70 ± 0.25	8.21 ± 0.34	16.0 ± 0.32 <sup>б</sup>	17.5 ± 0.59 <sup>б</sup>	21.7 ± 0.82
25	3.32 ± 0.19 <sup>B</sup>	6.34 ± 0.25	12.7 ± 0.43	7.04 ± 0.26 <sup>B</sup>	16.2 ± 0.95 <sup>B</sup>	27.5 ± 0.62
Активность мальтазы в слизистой оболочке						
0 (контроль)	10.5 ± 0.23	10.5 ± 0.23	10.5 ± 0.23	28.2 ± 1.12	28.2 ± 1.12	23.3 ± 0.10
0.1	8.40 ± 0.10	8.24 ± 0.13	11.8 ± 0.14	30.0 ± 0.72	34.7 ± 0.52	23.3 ± 0.32
1	8.05 ± 0.08	8.40 ± 0.20	12.1 ± 0.22	30.3 ± 0.50	38.6 ± 1.08	24.3 ± 0.24
5	8.42 ± 0.11	8.50 ± 0.06	12.4 ± 0.30	32.4 ± 0.52	38.6 ± 0.70	24.6 ± 0.51
10	7.90 ± 0.05 <sup>B</sup>	7.90 ± 0.04 <sup>B</sup>	12.9 ± 0.15 <sup>A</sup>	32.8 ± 0.38	40.3 ± 0.70 <sup>б</sup>	24.5 ± 0.27
25	7.85 ± 0.06 <sup>B</sup>	8.12 ± 0.10 <sup>б</sup>	18.2 ± 0.50 <sup>B</sup>	33.6 ± 0.56 <sup>б</sup>	41.1 ± 0.42 <sup>B</sup>	24.6 ± 0.44

Примечание. Различия по сравнению с контролем статистически достоверны: <sup>A</sup> – при  $p < 0.05$ , <sup>б</sup> –  $p < 0.01$ , <sup>B</sup> –  $p < 0.001$ .

Изучение амилолитической активности подтвердило представление о большей токсичности Cu по сравнению с Zn для рыб планкто- и бентофагов [5], при этом ферменты слизистой оболочки кишечника и химуса белоглазки более чувствительны к действию указанных металлов по сравнению с синцом. Возможно, это связано с большим содержанием Cu и Zn в кормовых объектах рыб-бентофагов и избыточным накоплением металлов, превышающим детоксикационные возможности организма. Труднее объяснить разнонаправленные эффекты Cu, Zn и Pb на активность мальтазы у белоглазки и синца. Поскольку существует несколько изоформ этого фермента, возможно, разная направленность эффектов тяжелых металлов связана с разным изоферментным составом мальтазы у исследованных видов рыб.

Таким образом, изучение активности гликозидаз слизистой оболочки кишечника и химуса двух близкородственных видов рыб (синца и белоглазки), различающихся типом питания, выявило не только различия в уровне активности одноименных ферментов, но и различия в их чувствительности к *in vitro* действию ионов тяжелых металлов (меди, цинка и свинца). Для ферментов, гидролизующих крахмал, как в слизистой оболочке, так и в химусе выявлен тормозящий эффект в присутствии ионов Cu и Zn в концентрациях 10 и 25 мг/л, более выраженный у бентоядной белоглазки. Активность мембранного фермента мальтазы в присутствии ионов Cu и Zn, напротив, снижается лишь у планктоядного синца, в то время как у белоглазки отмечен стимулирующий эффект. Выявлена низкая чувствительность гликозидаз слизистой оболочки кишечника исследованных видов рыб к действию ионов Pb в концентрации 0.1–25 мг/л: достоверный стимулирующий эффект отмечен лишь у синца при самых высоких концентрациях металла.

#### Список литературы

1. Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т рыб. хоз-ва и океанографии, 1999. 304 с.
2. Первозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб.: Гос. науч.-

исслед. ин-т озер. и реч. хоз-ва, 1999. 228 с.

3. Соболев К.Д. Загрязнение тяжелыми металлами естественных и искусственных кормов и его влияние на рыб в условиях сбросных теплых вод: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2006. 24 с.

4. Golovanova I.L., V.V. Kuz'mina, T.E. Gobzhelian, D.F. Pavlov, G.M. Chuiko. In vitro effects of cadmium and DDVP (Dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleost // Comp. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 122 C. N 1. P. 21–25.

5. Филиппов А. А., Голованова И. Л. Раздельное и совместное влияние меди и цинка in vitro на активность карбогидраз кишечника пресноводных костистых рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 104–109.

6. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. 216 с.

7. Levin B.A., Levina M.A., Bolotovskiy A.A. 2013. Thyroidal divergence as a basis for evolutionary changes in fish skeleton: example from cyprinid genus *Ballerus* // Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology. Abstracts of Third Meeting 22-24 April 2013, Tavira, Portugal. P. 46.

УДК 597.583.1:574.64

**СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ РЕЧНОГО ОКУНЯ  
*PERCA FLUVIATILIS* (PERCIFORMES: PERCIDAЕ) РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА**

В.А. Гремячих, В.Т. Комов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН,  
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия*

На протяжении 1997-2012 гг. исследовали динамику накопления ртути в мышечной ткани одного из объектов промышленного и любительского рыболовства на Рыбинском водохранилище – окуне *Perca fluviatilis* L. Установлено, что средние концентрации ртути в мышцах окуня сопоставимы со значениями показателя для других крупных озёр и водохранилищ северо-запада европейской части России Вологодской, Костромской, Тверской областей. Индивидуальные значения показателя у отдельных особей достигали значений, потенциально опасных для здоровья человека (0.3-0.6 мг/кг сырой массы).

*Ключевые слова:* ртуть, речной окунь, Рыбинское водохранилище.

Загрязнение водных экосистем соединениями ртути происходит из локальных источников, а также вследствие атмосферного переноса на большие расстояния и выпадения непосредственно на водное зеркало и водосборный бассейн водоёма. Ежегодные объёмы природной и антропогенной эмиссии Hg в окружающую среду составляют несколько тысяч тонн [9], в связи с чем сохраняется актуальность исследования механизмов и динамики накопления металла гидробионтами. Для изучения накопления ртути в мышцах рыб из водоемов России и сопредельных стран используется речной окунь, широко распространенный на территории европейской части России вид, объект промышленного и спортивного рыболовства [2]. Известны биотические и абиотические факторы, способствующие повышению аккумуляции Hg в мышцах рыб (хищный способ питания животных, низкий темп роста, умеренная температура, низкая минерализация воды, малая площадь водоёмов, заболоченность водосборного бассейна). Ранее было показано, что потенциально опасные для здоровья человека концентрации Hg (0.3-0.6 мг/кг сырой массы) регистрируются не только в мышцах рыб из малых лесных озёр, но и из крупных водоёмов [1]. В самом крупном из каскада Верхне-Волжских водохранилищ Рыбинском выделяют 4 плёса (Волжский, Главный, Моложский и Шекснинский), различающихся по своим гидрологическим и гидрохимическим характеристикам, а также составу и численности представителей разных биологических сообществ, ихтиомассе и распределению рыб [7]. В последние десятилетия наблюдается повышение температуры воздуха и поверхностного слоя воды Рыбинского водохранилища, непосредственно влияющее на биоту и способное изменять интенсивность накопления ртути в рыбе [3].

Цель работы - анализ уровней накопления ртути в мышцах окуня из разных районов (плесов) Рыбинского водохранилища в последние годы (1997-2012 гг.).

Содержание ртути определяли в мышечной ткани 148 экземпляров речных *Perca fluviatilis* L. окуней (104 самки, 40 самцов и 5 ювенильных особей), отловленных в 1997-2012 гг. на станциях Волжского, Моложского, Центрального и Шекснинского плёсов Рыбинского водохранилища. В отдельных случаях анализ данных, проводили только для особей, масса которых не превышала 100 г. С целью уточнения распределения металла в организме рыб у 12 окуней, массой от 7 до 947 г. Кроме мышц было проведено

определение массы и содержания ртути в печени, почках, сердце, желудке, селезёнке, кишечнике, гонадах, мозге, жабрах, глазах, костях головы и позвоночника, чешуе, коже и плавниках.

Рыбу, отловленную разными способами (сетями, неводом, тралом, на удочку) после измерения длины, веса и определения пола помещали в полиэтиленовые пакеты и замораживали при температуре от - 4 до -14°C. В таких условиях хранили до определения содержания ртути. Размороженную рыбу помещали в эмалированные кюветы, вырезали необходимое для анализа количество мышц (100-200 мг) с левой стороны, начиная от спинного плавника до начала ребер вдоль тела. Содержание ртути в образцах определяли в 2-3 повторностях атомно-абсорбционным методом холодного пара на ртутном анализаторе РА-915+с приставкой ПИРО (Люмэкс), без предварительной подготовки проб. Точность аналитических методов измерения контролировали с использованием сертифицированного биологического материала DORM-2 и DOLM-2 (Институт химии окружающей среды, Оттава, Канада).

Результаты обрабатывали статистически, используя метод однофакторного и множественного дисперсионного анализа (ANOVA) и процедуру LSD-теста при уровне значимости  $p = 0.05$  [8]. Данные представляли в виде средних значений и их ошибок ( $x \pm SE$ ).

Концентрация Hg в мышцах рыб варьировала в пределах от 0.01 до 0.82 мг Hg/кг сырой массы (табл.1). Выборки окуня по годам статистически значимо различались по показателю содержания ртути в мышцах, так же, как и по морфометрическим показателям (масса, размер).

**Таблица 1.** Содержание ртути в мышцах окуня Рыбинского водохранилища (1997-2012 гг.)

Год	n	Масса, г	L <sub>2</sub> , см	Hg, мг/кг сырой массы
1997	8	<u>27.1±4.8</u> 16.2-58.0	<u>13.3±0.7</u> 11.6-18.2	<u>0.08±0.03</u> 0.01-0.25
1998	18	<u>77.6±14.1</u> 29.9-297.6	<u>17.3±0.7</u> 13.5-26.5	<u>0.20±0.04</u> 0.01-0.58
1999	6	<u>461.7±61.6</u> 308-672.0	<u>30.0±1.1</u> 27.0-34.0	<u>0.37±0.03</u> 0.3-0.46
2000	9	<u>35.5±7.8</u> 16.5-95.4	<u>12.8±1.2</u> 5.2-19.5	<u>0.04±0.003</u> 0.03-0.06
2001	4	<u>1006.3±78.9</u> 850.0-1200.0	<u>39.3±2.1</u> 35.0-45.0	<u>0.44±0.03</u> 0.38-0.51
2002	13	<u>569.5±68.8</u> 400.0-1240.0	<u>30.5±0.8</u> 27.5-37.0	<u>0.35±0.03</u> 0.25-0.57
2003	2	1226.0	<u>42.3</u> 42 и 42.5	<u>0.56</u> 0.4 и 0.72
2004	16	<u>493.5±56.5</u> 240.3-910.0	<u>30.2±1.0</u> 25.6-37.0	<u>0.28±0.05</u> 0.11-0.82
2005	4	<u>92.4±32.0</u> 43.3-178.8	<u>18.5±2.2</u> 15.0-24.2	<u>0.14±0.04</u> 0.08-0.25
2006	10	<u>81.3±12.6</u> 31.5-150.9	<u>17.6±0.9</u> 13.2-22.7	<u>0.21±0.02</u> 0.09-0.29
2008	14	<u>90.4±18.4</u> 3.0-209.7	<u>18.8±2.0</u> 3.5-33.3	<u>0.17±0.03</u> 0.03-0.39
2009	15	<u>278.5±53.6</u> 81.4-695.0	<u>23.4±1.7</u> 16.3-33.2	<u>0.25±0.04</u> 0.06-0.58
2010	13	<u>254.1±68.0</u> 26.8-969.0	<u>40.4±17.8</u> 13.5-244.6	<u>0.26±0.02</u> 0.13-0.41
2012	16	<u>351.1±91.5</u> 74.2-1543.0	<u>28.0±1.7</u> 17.5-42.5	<u>0.41±0.04</u> 0.18-0.68
За все годы	148	<u>284.0±25.4</u> 3.0-1543.0	<u>24.8±1.7</u> 3.5-244.6	<u>0.25±0.01</u> 0.01-0.82

Примечание: В таблицах 1-3 приведены средние значения показателей и их ошибки ( $x \pm SE$ ) – над чертой, минимальное и максимальное значения – под чертой.

Минимальные значения показателей содержания металла и массы рыб отмечены для выборок 1997 и 2000 гг.: 0.08±0.03, 0.04±0.003 мгHg/кг сырой массы и 27.1±4.8, 35.5±7.8 г. Максимальные – в

выборках 2001, 2003 гг.:  $0.44 \pm 0.03$ ,  $0.56$  мгHg/кг сырой массы и  $1006.3 \pm 78.9$ ,  $1226$  г. Содержание металла в мышцах положительно коррелировало с массой рыб ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ ). Темп роста окуня невысок, однако, до наступления половой зрелости (самцы на 2-3, самки на 3-4 год при длине тела 10-16 см) он растет интенсивнее [4,6], что может сказываться и на процессах аккумуляции ртути. Длина тела окуня Рыбинского водохранилища массой до 100 г составляла в среднем  $15.4 \pm 0.5$  см.

Особь, отловленные на разных плёсах Рыбинского водохранилища, по содержанию металла в мышцах достоверно не различались. Значения показателя по Волжскому, Главному, Моложскому и Шекснинскому плёсу составили  $0.28 \pm 0.02$ ;  $0.23 \pm 0.05$ ;  $0.21 \pm 0.02$  и  $0.30 \pm 0.06$  мг/кг сырой массы, соответственно. При этом выборки рыб Волжского, Главного и Шекснинского плёсов по средней массе тела не различались ( $328.9 \pm 33.8$ ,  $293.9 \pm 61.6$  и  $433.8 \pm 118.6$  г) а окунь с Моложского – имел минимальные значения показателя ( $157.7 \pm 39.4$  г), достоверно отличаясь от рыб Волжского и Шекснинского плёсов.

Для окуней Шекснинского плёса массой до 100 г отмечена достоверно более высокая концентрация Hg -  $0.26 \pm 0.1$ , по сравнению с  $0.13 \pm 0.02$ ,  $0.06 \pm 0.04$  и  $0.12 \pm 0.01$  мг/кг сырой массы для особей с Волжского, Главного и Моложского плёсов. Для особей массой до 100 г с разных плёсов Рыбинского водохранилища установлена достоверная положительная зависимость содержания Hg в мышцах от общей биомассы фитопланктона ( $r = 0.40$ ,  $p = 0.002$ ), и слабовыраженная – от общей биомассы зоопланктона ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.08$ ).

По данным множественного регрессионного анализа ( $R_{\text{squared}} = 35.6$  при  $p \leq 0.00001$ ) значение показателя концентрации Hg в мышцах положительно зависело не только от массы ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ ), но от среднелетней температуры поверхностного слоя воды водохранилища ( $r = 0.17$ ,  $p < 0.04$ ), которая последние годы имела тенденцию к повышению:

$$\lg[\text{Hg}] = -4.97 + 3.4 \cdot t_{\text{воды}} + 0.0007 \cdot \text{Масса}$$

У самцов эта зависимость была выражена сильнее, чем у самок ( $R_{\text{squared}}$  составлял 50.6 и 37.5 при  $p \leq 0.001$ , соответственно).

Для мышечной ткани речного окуня были характерны не только более высокие по сравнению с другими исследованными органами концентрации ртути ( $0.10$ - $0.68$  мг/кг сырой массы), но и максимальная доля в суммарной массе органов ( $37.1$ - $56.8$  %) и в общем количестве металла ( $67.8$ - $82.4$ %), аккумулированном ими (табл. 2).

**Таблица 2.** Концентрация и доля ртути в различных органах и тканях окуня

№ п/п	показатель орган	концентрация Hg, мг/кг сырой массы	$r/p^*$ [Hg] от массы рыб	% массы органа от суммарной массы органов	% Hg в органе от общего количества Hg в органах
1	мышцы	$0.26 \pm 0.06$ 0.10-0.68	0.91/0	$49.2 \pm 1.8$ 37.1-56.8	$76.0 \pm 1.3$ 67.8-82.4
2	печень	$0.12 \pm 0.05$ 0.03-0.60	0.42/0.18	$2.42 \pm 0.17$ 1.60-4.00	$1.49 \pm 0.18$ 0.66-3.03
3	кости головы	$0.09 \pm 0.05$ 0.02-0.59	0.84/0.001	$10.6 \pm 0.5$ 8.5-14.3	$4.91 \pm 1.27$ 0.24-14.15
4	скелет	$0.14 \pm 0.03$ 0.05-0.46	0.35/0.27	$7.81 \pm 0.29$ 6.43-9.62	$8.17 \pm 1.02$ 2.01-13.02
5	кожа	$0.06 \pm 0.01$ 0.0-0.18	0.72/0.01	$7.12 \pm 0.25$ 5.51-8.79	$3.51 \pm 0.62$ 0-6.80
6	чешуя	$0.03 \pm 0.01$ 0.0-0.10	0.59/0.04	$4.52 \pm 0.52$ 2.45-10.43	$1.13 \pm 0.36$ 0-3.98
7	жабры	$0.05 \pm 0.02$ 0.001-0.19	0.54/0.09	$3.45 \pm 0.21$ 2.32-4.57	$1.30 \pm 0.27$ 0.03-3.25
8	гонады	$0.05 \pm 0.003$ 0.0-0.35	0.10/0.30	$7.7 \pm 2.3$ 0.49-26.08	$1.80 \pm 1.00$ 0-12.19

В таблице 2 приведены также значения показателей для тех органов, доля которых в суммарной массе органов и в общем количестве накопленного металла превышала 1%. Доля таких органов, как глаза, желудок, кишечник, мозг, почки, селезёнка и сердце, и от суммарной массы и от общего количества Hg была меньше 1%. Распределение ртути по разным органам и тканям рыб видоспецифично. Так у кумжи,

проходной или озёрной рыбы из семейства лососёвых (Salmonidae) накопление ртути происходит преимущественно в печени, почках и скелете [5]. Но в случае, когда в качестве индикаторного вида при ртутной нагрузке на водную экосистему используется речной окунь, можно ограничиться определением концентраций металла в мышцах, так как именно они составляют основную долю от органов и тканей рыбы и аккумулируют около 80 % от всей поступившей в организм Hg.

Средние концентрации ртути в мышцах окуня Рыбинского водохранилища за 1997-2012 гг ( 0.08-0.56 в разные годы, по всей выборке – 0.25 мг/кг сырой массы) сопоставимы со значениями показателя для других крупных озёр и водохранилищ северо-запада европейской части России (табл.3) [2]. Значение показателя выше, чем для окуня из озёр Белое, Воже (Вологодская обл.) и Чухломское (Костромская обл.) и ниже, чем для о. Кубенское (Вологодская обл.), Иваньковского (Тверская обл.) и Увельского (Ивановская обл.) водохранилищ.

**Таблица 3.** Содержание ртути в мышцах окуня из водоёмов северо-запада европейской части России

Водоём		Год	n	Масса, г	Hg, мг/кг сырой массы
озеро	Белое	2002	7	154.7±49.4	0.10±0.03
	Воже	2002	11	170.8±89.2	0.21±0.03
	Кубенское	2002	26	216.7±110.7	0.48±0.02
	Чухломское	1992	5	22.2±1.68	0.06±0.01
водохранилище	Иваньковское	1998	7	72.0±6.0	0.38±0.01
	Увельское	1997	9	170.0±22.0	0.40±0.05
	Рыбинское	1997-2012	148	284.0±25.4	0.25±0.01

#### Список литературы

1. Комов В.Т., Степанова И.К. Ртутное загрязнение//Экологические проблемы Верхней Волги. Ярославль: Изд-во ЯГТУ. 2001. С. 239-243.
2. Комов В.Т., Степанова И.К., Гремячих В.А. Содержание ртути в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России: причины интенсивного накопления и оценка негативного эффекта на состояние здоровья людей // Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: ИБВВ РАН, 2004. С.99-123.
3. Литвинов А.С., Пырина И.Л., Законнова А.В., Кучай Л.А., Соколова Е.Н. Изменение термического режима и продуктивности фитопланктона Рыбинского водохранилища в условиях потепления климата. //Бассейн Волги в XXI-м веке: структура и функционирование экосистем водохранилища Материалы докладов Всероссийской конференции. ИБВВ им.И.Д. Папанина РАН, Россия, Борок, 22-26 октября 2012г. С.167-169
4. Моисеев П.А., Азизова Р.А., Куранова И.И. Ихтиология. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1981 С.296.
5. Моисеенко Т.И. Закисление вод: Факторы, механизмы и экологические последствия / М.: Наука. 2003. С.246-247.
6. Правдин И.Ф. руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность. С.192.
7. Современное состояние экосистемы Рыбинского водохранилища. СПб: Гидрометеоздат.1993.254 с.
8. Sokal R. R., Rohlf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. N.Y.:W.H. Freeman and Co.— 1995. — 887 p.
9. Wilson S.J., Steenhuisen F., Pacyna J.M., Pacyna E.G. Mapping the spatial distribution of global anthropogenic mercury atmospheric emission inventories // Atmospheric Environment. 2006. V. 40, №24. P. 4621-4632.

#### УДК 504.064.3

### РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОДРОСЛИ ХЛОРЕЛЛА И ХАРАКТЕР ВЛИЯНИЯ НА НИХ ИОНОВ МЕДИ

Н.С. Давыдова, Ю.С. Григорьев

*Сибирский федеральный университет  
660041 г. Красноярск, Россия, n.s-davidova@mail.ru*

Показано, что регистрация кривых роста культуры водоросли позволяет не только изучать ее продукционные характеристики, но и отслеживать состояния тест-организма в токсикологическом эксперименте. На этой основе можно оптимизировать сроки проведения водорослевых биотестов при определении токсичности вод.

*Ключевые слова:* водоросль *Chlorella vulgaris*, кривые роста, токсичность, ионы меди

В биотестировании токсичности вод широко распространенным тест-объектом являются одноклеточные зеленые водоросли. Они удобны тем, что имеют короткий жизненный цикл, быстро размножаются, и обладают малыми размерами. Биотестирование на водорослях выполняется в достаточно длительном токсикологическом эксперименте, занимающем до 3 суток [1]. На кафедре экологии и природопользования СФУ в последние годы разработана более оперативная методика биотестирования на водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, длительностью 22 часа [2]. Вместе с тем, неизвестно, на какой стадии роста культуры водоросли в наибольшей степени проявляется действие токсиканта. Для изучения ростовых процессов водорослевой культуры на кафедре создан прибор, который, благодаря непрерывному измерению оптической плотности, позволяет регистрировать динамику роста тест-культур водоросли в каждом из 24 флаконов-реакторов. С его помощью можно изучать ростовые характеристики культуры водоросли в любой промежуток времени. Такие данные представляют большой научный и практический интерес. В связи с этим, целью настоящего исследования был анализ ростовых характеристик культуры водоросли *Chlorella vulgaris* и характер влияния на них ионов меди как модельного токсиканта.

Для изучения кривых роста водоросль выращивалась в автоматизированном многокюветном культиваторе КВМ-06 при температуре 36 °С, световом облучении светодиодными источниками интенсивностью 60 Вт/м<sup>2</sup>, непрерывном перемешивании, обеспечивающем поступление углекислого газа из воздушной среды (0.03%). Последнее достигалось благодаря интенсивному вращению кассеты с флаконами, содержащими суспензию водоросли. В зависимости от задачи эксперимента засев культуры производился с исходной оптической плотностью 0.002, 0.006, 0.010 и 0.018, которая измерялась на приборе ИПС - 03 в 2 см кювете при длине волны 560 нм. В качестве питательной среды использовалась 2% и 50% среда Тамия. Одновременно определяли влияние на рост культуры водоросли дополнительного внесения микроэлементов в разбавленную до 2% среду до уровня содержания их в 100% среде Тамия. В экспериментах с ионами меди во флаконы-реакторы вносили раствор CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O, в количестве, обеспечивающем концентрацию ионов меди в опытных пробах 0.04 мг Cu<sup>+2</sup>/дм<sup>3</sup>. Культивирование проводилось в течение 1-3 суток.

Была изучена динамика роста культуры водоросли хлорелла в культиваторе КВМ-06 в течение суток при разной плотности засева. По результатам экспериментов построены кривые роста (рис. 1,2) и рассчитана скорость роста культуры водоросли.

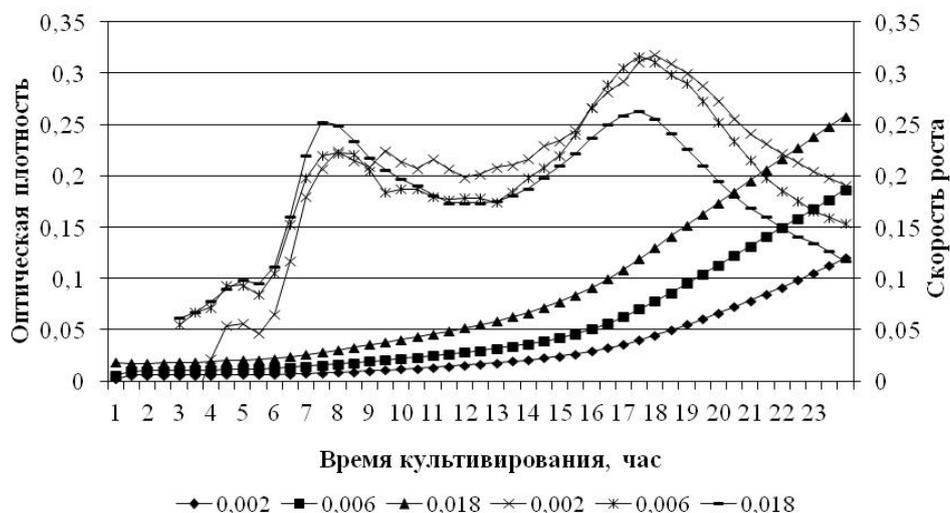
Для подсчета скорости роста культуры водоросли использовалась формула:

$$\mu = (\log_2 D_2 / D_1) / \Delta t,$$

где D<sub>2</sub> – оптическая плотность культуры водоросли на момент времени t<sub>2</sub>,

D<sub>1</sub> – оптическая плотность культуры водоросли на момент времени t<sub>1</sub>,

Δt – промежуток времени, за которое производится подсчет (в данном исследовании равный 1 часу).



**Рис. 1.** Кривые оптической плотности и скорости роста культуры водоросли хлорелла при разной плотности засева, культивируемой в 2% среде Тамия.



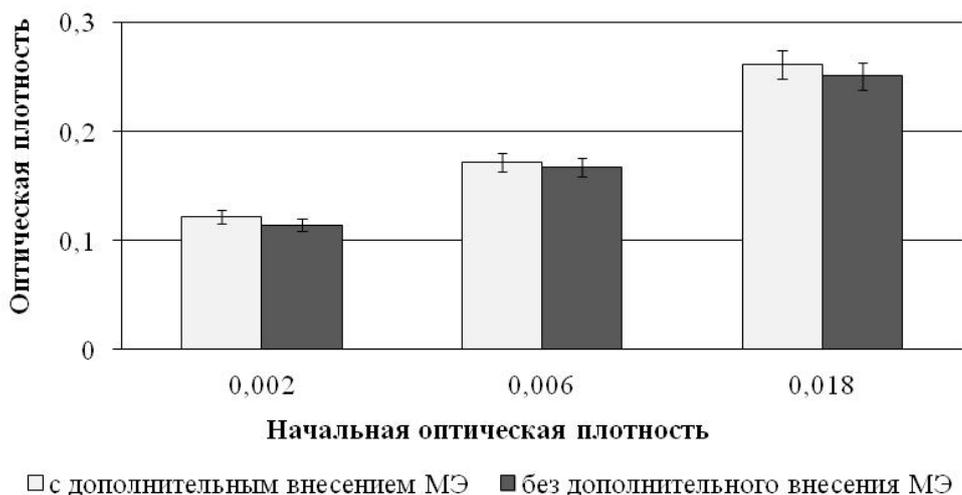
**Рис. 2.** Кривые оптической плотности и скорости роста культуры водоросли хлорелла при разной плотности засева, культивируемой в 50% среде Тамия.

Из рисунков 1 и 2 видно, что при выбранных условиях культивирования, независимо от засеваемого количества клеток, оптическая плотность культуры росла по кривой близкой к экспоненциальной. Графики скорости роста культуры при этом характеризовались двумя пиками. При всех плотностях засева в первые часы культивирования отмечалась низкая скорость роста культуры. Это может свидетельствовать о наличии лаг-периода в цикле развития водорослевой культуры.

Существование двух пиков скорости роста тест-культуры может быть вызвано тем, что с возникновением дефицита растворенного углекислого газа в среде при нарастании в ней численности клеток может происходить изменение скорости фотоассимиляции  $\text{CO}_2$  в результате запуска  $\text{CO}_2$ -концентрирующего механизма. При этом его включение по-разному проявлялось для культур водоросли при выращивании на среде Тамия высокой и низкой концентрации. Если на 2% среде кривые скорости роста водорослевой суспензии были близки при всех плотностях засева, то на 50% среде они достигали своих максимумов в разное время. Это время соответствовало состоянию культур водоросли, при котором их оптическая плотность в каждом варианте опыта достигала величины 0,050 (рис. 1,2).

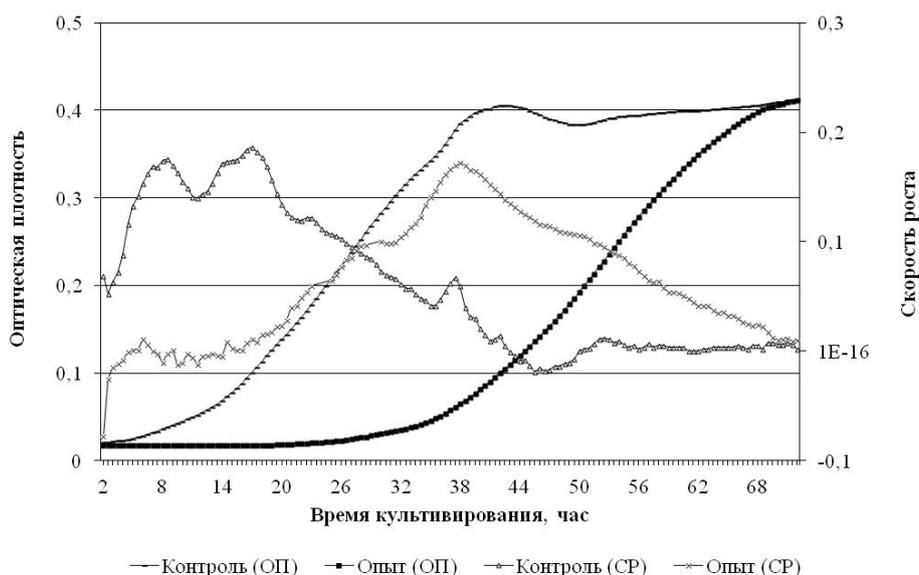
При более длительном времени культивирования культура водоросли к 72 часам приближалась к своему плато, а скорость роста снижалась практически до нуля (рис.4, 5). Выход на плато при достижении больших плотностей, вероятно, вызван лимитированием в этих условиях роста водоросли хлорелла из-за взаимного затенения клеток и возникновения дефицита углекислого газа. Кроме того, лимитирование роста при высоких плотностях может происходить из-за недостатка минеральных веществ в среде. Об этом свидетельствует то, что в 2% среде Тамия выход на плато плотности культуры водоросли наблюдался раньше, чем в 50% среде Тамия.

Также было установлено, что существенных отличий в оптической плотности суспензии после суточного культивирования на 2% среде Тамия не наблюдается в вариантах опытов с дополнительным внесением растворов микроэлементов (рис. 3). Отсутствие различий в приросте культуры можно объяснить тем, что концентрация микроэлементов после разбавления среды Тамия до 2% достаточна для полноценного роста культуры водоросли в течение 24 часов. При этом лимитирование роста хлореллы при суточной световой экспозиции со стороны макроэлементов в разбавленной среде не происходит. Об этом свидетельствуют одинаковый прирост культуры хлореллы при равном засева в 2 и 50% среде Тамия. Дополнительное внесение в разбавленную среду Тамия микроэлементов не оказывает влияния на чувствительность культуры водоросли к токсикантам. В связи с этим при выращивании культуры на 2% среде Тамия нет необходимости проводить корректировку по содержанию в ней микроэлементов.



**Рис. 3.** Оптическая плотность культуры водоросли *Chlorella vulgaris* после 24 часов культивирования в 2% среде Тамия при разной начальной плотности засева в пробах с дополнительным внесением микроэлементов (МЭ) и без него.

Однако выращивание хлореллы на 2 и 50% среде Тамия сказывалось на чувствительности водоросли к тяжелым металлам. Из рисунка 4 видно, что на 2% среде Тамия рост хлореллы в первые сутки культивирования полностью подавлялся при концентрации ионов меди  $0.04 \text{ мг/дм}^3$ . Из графика скорости роста культуры водоросли также следует, что внесение токсиканта подавляло рост хлореллы только в начале культивирования. В последующем рост тест-культуры постепенно увеличивался, по-видимому, в результате адаптации водоросли к токсиканту. Вместе с тем, внесение такой же концентрации ионов меди в суспензию водоросли на 50% среде Тамия не оказывало токсического действия на ее рост (рис. 5). Отсутствие воздействия токсиканта в 50% среде Тамия, вероятно, обусловлено его взаимодействием с компонентами этой высококонцентрированной среды. Для снижения возможного связывания токсикантов питательными элементами среды с образованием труднодоступных для тест-организма комплексов при биотестировании следует использовать 2% среду Тамия.



**Рис. 4.** Графики изменения оптической плотности (ОП) и скорости роста (СР) суспензии водоросли хлорелла в процессе культивирования в 2% среде Тамия в контроле и после добавления ионов меди ( $0.04 \text{ мг/дм}^3$ ). Начальная оптическая плотность засеваемой культуры 0.010.



**Рис. 5.** Графики изменения оптической плотности (ОП) и скорости роста (СР) суспензии водоросли хлорелла в процессе культивирования в 50% среде Тамия в контроле и добавлении ионов меди (0.04 мг/л). Начальная оптическая плотность засеваемой культуры 0.010.

Таким образом, регистрация кривых роста культуры водоросли позволяет не только изучать продукционные характеристики водорослевой суспензии, но и получать новые данные о состоянии тест-организма в токсикологическом эксперименте. На этой основе можно устанавливать оптимальные сроки проведения водорослевых биотестов при определении токсичности вод.

#### Список литературы

1. Жмур Н.С., Орлова Т.Л., Методика определения токсичности вод,.... по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей, ФР. 1.39.2007.03223 М. 2007, 48.
2. Григорьев Ю.С. Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). Москва, 2004 (издание 2012 г.), 37 с., ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 16.1:2.3:3.7-04, ФР.1.31.2009.06643.

УДК 574.58+579.262

### БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У СЕРРИПЕСА ГРЕНЛАНДСКОГО *SERRIPES GROENLANDICUS* ИЗ РАЙОНОВ ГИДРОТЕХНИЧЕСКОГО СТРОИТЕЛЬСТВА В ЗАЛИВЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

С.А. Даниленко<sup>1</sup>, О.Н. Лукьянова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр)  
690950, Владивосток, пер. Шевченко, 4, Россия, ir\_lana@live.ru

<sup>2</sup>Дальневосточный Федеральный Университет, Школа естественных наук  
690091, Владивосток, ул. Октябрьская, 27, Россия, olgaluk@gmail.com

Проведено сравнение функционального состояния глубоководного зарывающегося двусторчатого моллюска серрипеса гренландского из районов, отличающихся по уровню антропогенной нагрузки.

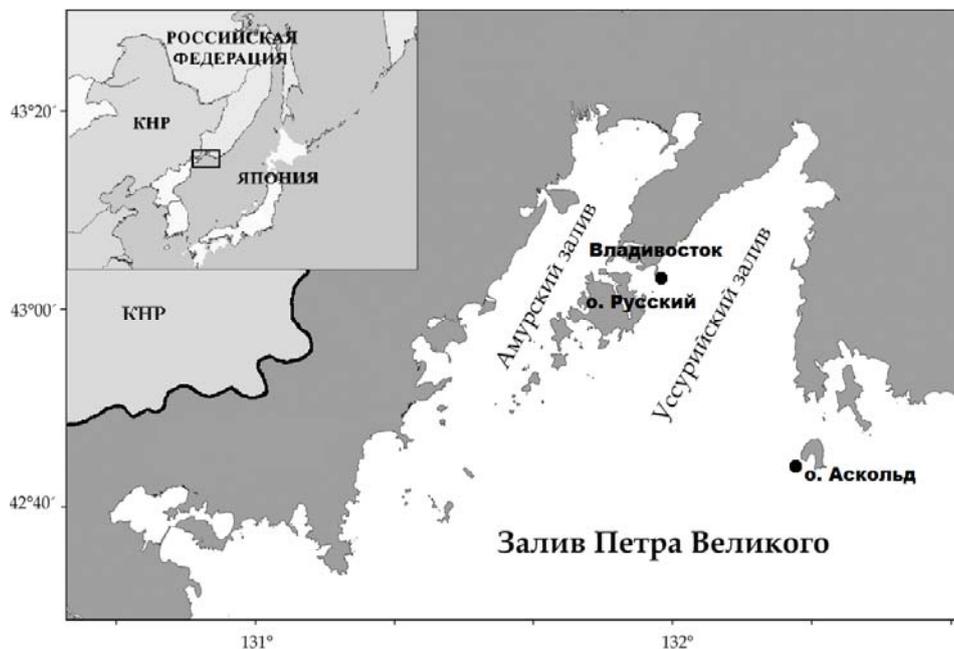
**Ключевые слова:** залив Петра Великого, антропогенное загрязнение, молекулярные биомаркеры, окислительный стресс, *Serripes groenlandicus*

Проведение гидротехнического строительства в прибрежной зоне связано, прежде всего, с перемещением больших объемов грунта. Взмучивание и образование взвеси оказывает негативный эффект на морские организмы, особенно бентосные. Благодаря постоянному контакту с водной средой и донными отложениями – главным резервуаром загрязняющих веществ, двустворчатые моллюски являются самыми популярными индикаторными видами среди гидробионтов. Причина лежит в их широком географическом распространении, обилии видов, легкости идентификации, малоподвижном образе жизни и фильтрующем типе питания. Они часто являются устойчивыми к химическому загрязнению и могут аккумулировать и биоконцентрировать поллютанты в своих тканях.

Одно из важнейших мест в реакции организмов на воздействие токсичных соединений занимают свободнорадикальные процессы, включающие образование активных форм кислорода (АФК) и/или оксирадикалов, ответственных за многочисленные повреждающие эффекты, включая цитотоксический и мутагенный. Биохимические показатели, характеризующие процессы биотрансформации (активность GST), состояние АОС (активность каталазы) и окислительный стресс (уровень ПОЛ) могут служить чувствительными биомаркерами состояния организмов при антропогенном загрязнении [1].

Целью данной работы являлась сравнительная оценка функционального состояния серрипеса из районов, отличающихся по уровню антропогенной нагрузки, с помощью молекулярных биомаркеров.

**Серрепес гренландский** *Serripes groenlandicus* (Bruguiere, 1789) – широко распространенный бореально-арктический, сублиторально-элиторальный вид. Образует скопления на глубинах 30-80 м. Максимально установленные: возраст – 33 года, высота раковины – 122 мм, масса особи – 226 г. Промысловый размер – 70 мм по длине раковины. В зал. Петра Великого встречается на глубине 15-60 м, преимущественно в илесто-песчаных грунтах [2].



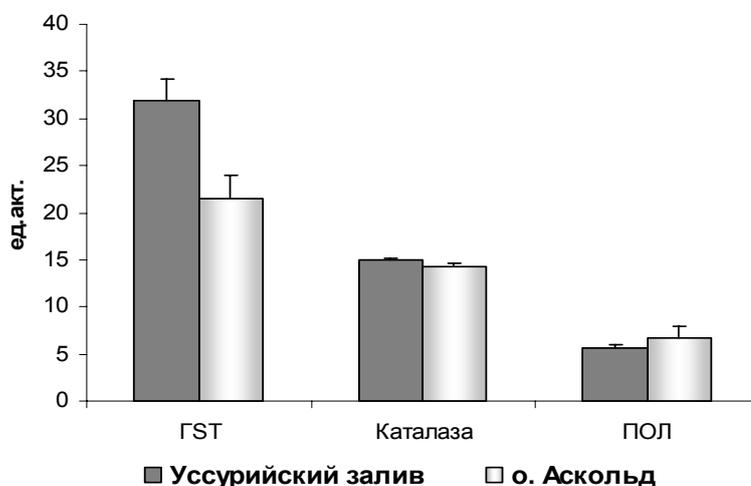
**Рис. 1.** Карта-схема отбора проб.

Экземпляры серрипеса размером 8-10 см. были собраны в августе 2011 г. в заливе Петра Великого: у о. Аскольд – условно фоновый район, и в Уссурийском заливе вблизи о. Русский, где велось активное гидротехническое строительство моста с материка на о. Русский в рамках подготовки к саммиту АТЭС в 2012 г. (рис. 1). Моллюсков отбирали драгой, доставляли в лабораторию в охлажденном виде и препарировали с использованием ледяной бани. Для анализа использовали по шесть экземпляров из каждого района. В гепатопанкреасе и жабрах каждой особи были определены содержание GSH, уровень МДА, активность GST и каталазы по методикам, описанным нами ранее [3].

Определяли средние значения и стандартные ошибки средних значений ( $M \pm m$ ). Для определения достоверности различий между выборками использовали U-критерий Манна-Уитни.

Глутатион-S-трансфераза как специфический маркер II фазы биотрансформации органических поллютантов весьма показательна в отношении степени влияния неблагоприятных факторов и глубины адаптивных перестроек метаболизма. Активность этого фермента в гепатопанкреасе моллюсков из Уссурийского залива составляла  $31.8 \pm 2.3$  нмоль/мин/мг белка, что превышало величины этого показателя у животных из фонового района на 33 % ( $p \leq 0.05$ ).

Активность каталазы составляла в среднем 15 ед. акт./мг белка у моллюсков с обеих станций. Статистически значимых различий уровня ПОЛ у серрипеса с разных станций также выявлено не было, этот показатель варьировал в пределах 5-6 нмоль МДА/мг белка. Содержание GSH в органах моллюсков было очень низким, на уровне чувствительности метода, поэтому достоверные данные не получены.



**Рис. 2.** Активность молекулярных биомаркеров в гепатопанкреасе серрипеса гренландского. Единицы измерения: ПОЛ – нмоль МДА/мг белка; каталаза – ед. акт./мг белка; GST – нмоль/мин/мг белка

При гидротехнических работах депонированные в грунтах поллютанты контактируют с водной средой и переходят в растворенное или взвешенное состояние в зависимости от своих химических свойств. Возникающее вторичное загрязнение оказывает воздействие на различные метаболические процессы гидробионтов. Как было отмечено выше, функции глутатион-S-трансферазы направлены на детоксикацию поступающих в организм поллютантов и промежуточных продуктов их метаболизма [4]. Повышенная активность GST у моллюсков из Уссурийского залива (импактный район), вероятно, указывает на влияние вторичного загрязнения органическими поллютантами, мобилизованными из донных отложений при перемещении грунта. Во многих исследованиях отмечается достоверное увеличение активности этого фермента у животных из морских и пресноводных акваторий с повышенным содержанием различных загрязняющих веществ. Так, активность GST была значительно повышена в жабрах и пищеварительной железе мидий *Mytilus edulis*, обитающих в эстуарии, загрязненной промышленными стоками, а также у перенесенных туда из фонового района. Корреляции содержания восстановленного глутатиона с уровнем загрязнения не наблюдалось [5]. Бентосные малоподвижные виды периодически сталкиваются с дефицитом кислорода ввиду ограниченного водообмена. Есть сведения, что глутатион-S-трансфераза также участвует в защитных реакциях организма в условиях гипоксии. Например, активность этого фермента была повышена на 52 % в печени мидий *Perna perna*, пребывавших вне воды в течение 18 часов [6]. Достоверных изменений активности антиоксидантных ферментов обнаружено не было, тогда как активность GST оставалась повышенной даже после 1 часа реоксигенации.

Различные стрессовые факторы приводят к увеличению образования свободных радикалов, продуктов перекисного окисления липидов, и – для компенсации этих процессов – повышению активности антиоксидантных ферментов и концентрации низкомолекулярных антиоксидантов. При хроническом воздействии происходит истощение ресурсов АОС и снижение ее активности, что сопровождается резким повышением интенсивности ПОЛ [7]. Таким образом, как увеличение количества продуктов ПОЛ, так и снижение активности антиоксидантных компонентов может указывать на воздействие неблагоприятных факторов. Отсутствие достоверных различий в уровне ПОЛ у животных из фонового и импактного районов свидетельствует об отсутствии патологий в структуре мембран, а сходная активность каталазы подтверждает эффективность работы антиоксидантной системы.

Имеющиеся к настоящему времени экспериментальные данные подтверждают, что состояние адаптированности организма к его химическому окружению зависит от оптимального функционирования систем ферментативной биотрансформации и детоксикации поллютантов совместно с системой антиоксидантной защиты. Их действие при антропогенном стрессе у морских организмов носит защитный характер и направлено на повышение резистентности организма, на возвращение его в состояние гомеостаза. Наиболее чувствительными к загрязнению оказываются те животные, АОС

которых недостаточно развита в силу каких-либо индивидуальных особенностей организма, либо ее реакция запаздывает. Серрипес гренландский – глубоководный зарывающийся моллюск, находящийся в непосредственном контакте с донными отложениями. Показатели окислительного стресса у этого моллюска ранее не были исследованы. Несомненно, системы биотрансформации и антиоксидантной защиты у этого вида имеют свои особенности, в отличие, например, от широко используемых при мониторинге мидий, чувствительных к различным типам загрязнения.

При изучении организмов из природных популяций часто бывает сложно интерпретировать результаты по молекулярным биомаркерам, так как их активность зависит от ряда факторов: физиологического состояния, питания, возраста, сезона и связанных с ним колебаний абиотических факторов среды. Тем не менее, эти данные несут важную информацию о реальном состоянии организмов в конкретных условиях естественной среды обитания, и создают основу для дальнейшего изучения загрязнения водоемов.

#### Список литературы

1. Алешко С.А. Действие нефтяных углеводородов на морские организмы на молекулярном уровне // Изв. Тихоокеан. научно-исслед. рыбохоз. центра. 2007. Т. 148. С. 247–261.
2. Атлас двустворчатых моллюсков дальневосточных морей России. /Сост. Явнов С.В. // Атласы промысловых и перспективных для промысла гидробионтов дальневосточных морей России. Владивосток: Дюма, 2000. 168 с.
3. Ирейкина С.А., Лукьянова О.Н. Активность антиоксидантной системы и биотрансформации поллютантов у полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского и Уссурийского заливов (Японское море) // Вопросы рыболовства. 2012. Т. 13. № 1-49. С. 145-154.
4. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. С. 179–194.
5. Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D., Walsh A.R. Assessment of glutathione-S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers // Biomarkers. 1997. Vol. 2. P. 51-56.
6. Almeida E.A., Bairy A.C.D., Dafre A.L. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed // J. Experiment. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 318. P. 21-30.
7. Doyotte A., Cossu C., Jacquin M. et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* // Aquat. Toxicol. 1997. Vol. 39. Is. 2. P. 93–110.

УДК 597.555.5:577,1(262,5 + 268,46)

### ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА В ТКАНЯХ ТРЕСКОВЫХ РЫБ КАК МАРКЕР ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ

И.И. Дорохова<sup>1</sup>, Н.С. Кузьмина<sup>1</sup>, Д.О. Шпинь<sup>2</sup>

*\*Институт биологии южных морей*

*299011 г. Севастополь, Республика Крым, Россия, mireni@bk.ru*

*\*\*Малая Академия Наук Учащейся Молодежи*

*299055 г. Севастополь, Россия*

Исследована активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в печени и гонадах некоторых видов тресковых рыб. Достоверные половые и видовые отличия в активности фермента установлены только для гонад, что обусловлено нерестом исследуемых рыб.

*Ключевые слова:* тресковые, печень, гонады, щелочная фосфатаза.

Фосфатазы - ферменты, которые отщепляют фосфатные группы от молекул путем гидролиза сложноэфирной связи фосфорной кислоты с образованием фосфат-иона и молекулы со свободной гидроксильной группой. Добавление фосфатной группы может активировать или дезактивировать фермент, поэтому фосфатазы являются неотъемлемой частью многих систем передачи сигнала, в особенности в мембранах. Наиболее распространенной фосфатазой во многих организмах является щелочная фосфатаза (ЩФ, ALP), хотя, встречается и кислая фосфатаза. Щелочные фосфатазы представляют собой группу ферментов, находящихся в основном в печени (изофермент ALP-1) и костях (изофермент ALP-2) животных. Также небольшое количество вырабатывается клетками, выстилающими кишечник (изофермент ALP-3), гонадами и почками (в проксимальных канальцах). В настоящее время

исследования активности ЩФ тканях широко используются при оценке состояния гидробионтов: как для диагностирования болезней печени и костей, нарушений роста, так и в экотоксикологических работах. Тем не менее, работ, посвященных состоянию репродуктивных органов или репродуктивной активности не много. Одновременное исследование состояния ферментов в печени и гонадах позволяет увидеть связь в работе или нарушения в функционировании данных органов.

Известно, что ЩФ является одним из широко используемых маркеров состояния рыб в различных условиях обитания. Так, у трех видов рыб (тиляпии (*Tilapia zillii*), морского языка (*Solea vulgaris*), кефали (*Mugil capito*)) было отмечено снижение активности ЩФ в более загрязненных акваториях и печени, и в мышцах [1]. Исследование влияния сточных вод металлургического завода на печень, жабры и гонады карпа (*Cyprinus carpio*) показало как органоспецифичность, так широкую вариабельность значения активности фермента в зависимости от дозы и времени воздействия [2].

Одним из важных объектов промысла являются трескообразные. Трескообразные — преимущественно морские, холодноводные и придонные рыбы, распространенные в акваториях умеренных областей, имеющее большое практическое значение, так как дают 10—15% мирового улова, занимая второе место после сельдеобразных [3]. Немаловажное значение они играют и в поддержании биоразнообразия и устойчивости экосистем водоемов.

Таким образом, целью данной работы является исследование активности щелочной фосфатазы в печени и гонадах тресковых рыб как биомаркера влияния условий обитания.

Объектами исследования служили морской налим *Gaidropsarus mediterraneus* (Linnaeus, 1758), мерланг *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann, 1840), навага *Eleginus nawaga* (Koelreuter, 1770) и треска *Gadus morhua marisalbi* (Derjugin, 1920).

Треска и навага были отловлены удочкой в сентябре 2012 г. в Кандалакшском заливе Белого моря, в районе биологической станции МГУ им. М.В. Ломоносова (Карелия). Мерланг и трехусый морской налим были получены преимущественно с использованием донных ловушек в зимний период 2012 – 2013 гг. в бухтах Карантинная и Александровская г. Севастополя (Черное море).

Проводили полный биологический анализ рыб, извлекали печень и гонады и замораживали материал при температуре -20<sup>0</sup> С. Возраст рыб определяли по отолитам. Для анализа использовали 2-х годовалых мерланга и налима и 2-3-летних навагу и треску. Все отобранные экземпляры наваги, мерланга и морского налима находились в состоянии нереста. Яичники трески были на II и III стадиях зрелости, а семенники – на III, IV, IV-V стадиях зрелости.

Определение активности щелочной фосфатазы проводили в экстракте тканей печени и гонад, который получали путем гомогенизации в физиологическом растворе на холоду и центрифугировании при 5000 g 15 минут. Активность ферментов анализировали с использованием стандартного набора реактивов «Філісіт» - «Щелочная фосфатаза» (Украина). ЩФ расщепляет фенилфосфат, с образованием фенола, окисленная форма которого регистрируется при 490-550 нм. Полученные значения экстинкции пересчитывались с учетом содержания белка в гомогенатах тканей. Белок определяли по методу Лоури с использованием стандартного набора «Філісіт» - «Общий белок» (Украина). Результаты обрабатывали статистически, вычисляли среднее значение и ошибку средней.

**Таблица 1.** Уровень активности ЩФ (нмоль/с\*мг) в печени тресковых рыб

район	вид	пол	M±m	Lim	n
Белое море	треска	самки	211.66±103.96	21.65ч1003.19	9
		самцы	131.81±21.11	25.26ч280.89	15
	навага	самки	237.02±136.65	21.5ч1031.86	8
		самцы	138.68±51.8	1.73ч421.25	7
Черное море	мерланг	самки	261.69±87.87	52.31ч1390.91	15
		самцы	738.24±604.71	72.76ч3154.07	5
	трехусый морской налим	самки	847.16±384.12	49.95ч2331.45	7
		самцы	454.99±104.29	240.58ч1010.78	7

В печени тресковых рыб не установлено ни видовых, ни половых отличий в активности исследуемого фермента. Однако следует отметить, что самки наваги, трески и налима имели более высокие значения активности ЩФ, а для черноморских видов характерна большая активность фермента, чем для беломорских. Установлена существенная вариация значений. Следует отметить, что у тресковых, полученных в чистом районе Белого моря активность ферментов в целом ниже, нежели у видов из Черного моря, акватории которого, особенно прибрежные, подвержены большему

антропогенному влиянию. Однако данные отличия могут быть, исключительно видовой особенностью, сложившейся эволюционно под воздействием множества факторов окружающей среды.

**Таблица 2.** Уровень активности ЩФ (нмоль/с • мг) в гонадах тресковых рыб

район	вид	пол	M±m	Lim	n
Черное море	мерланг	самки	2009.77±254.62*	926.20ч3491.76	9
		самцы	828.24±5.58	822.65ч833.82	3
	трехусый морской налим	самки	746.48±67.04**	501.72ч1226.03	10
		самцы	4335.18±866.62 <sup>□</sup>	2812.53ч6289.03	4

Примечание: \* - достоверно выше по отношению к самцам, \*\* достоверно ниже по отношению к самцам, <sup>□</sup> - достоверно по отношению к самцам мерланга

В отличие от печени рыб, в гонадах установлены как половые, так и видовые отличия в активности ЩФ. Для самок мерланга характерна высокая (более чем в 2 раза) активность фермента, в то время как для налима напротив – активность ЩФ в яичниках почти в 6 раз ниже, нежели в семенниках. Выявлены и видовые отличия, достоверные для самцов двух видов и недостоверные, но ярко выраженные для самок. Следует отметить и тот факт, что активность фермента в целом выше в гонадах и меньше варьирует, нежели в печени. Однако, это является следствием того, что все особи отбирались в период нереста или подготовки к нему, а как известно, в этот период гонады являются одним из основных мест синтеза фермента.

Печень является главным органом детоксикации ксенобиотиков, местом синтеза многих веществ, в том числе ЩФ. Активность ЩФ в данном органе зависит от многих факторов: температуры, стадии зрелости гонад, ростовых процессов и пр. Немаловажным является и питание. Кандюк (1966) [3], показано, что активность ЩФ в кишечном тракте рыб зависит от их рациона. В пищеварительном тракте черноморского шпрота активность ЩФ была высокой, что объясняется высокой жирностью пищевых объектов, богатых фосфолипидами. Известно, что у ставриды активность этого фермента была значительно ниже, что автор связывал с разнообразным рационом и менее жирной пищей. Пищевые объекты наваги и трески тоже весьма разнообразны (ракообразные, черви и моллюски, мелкая рыба), что выразилось в невысоких значениях ЩФ в печени. В то время как у черноморских трескообразных количество и качество пищевых объектов другое. В частности, у мерланга в современный период отмечается сужение рациона, и переход в основном на питание рыбами (хамса, султанка, шпрот и сам мерланг), по сравнению с более ранним периодом (наши данные).

ЩФ играет важную роль в функционировании гонад. Проведенные ранее исследования активности ЩФ в яичниках 6 видов сельдевых показали, что видовые отличия обнаруживаются как в зрелых, так и в незрелых гонадах, при этом наибольшие значения активности фермента отмечали в зреющих гонадах, при этом у рыб разных видов по-разному возрастала активность фермента в период созревания. Авторы также установили, что виды с более крупными икринками обычно обладают более низкой активностью ЩФ [5]. Для яичниковой жидкости 4-х видов лососевых характерны существенные видовые отличия в активности исследуемого фермента. ЩФ принимает активное участие в метаболизме фосфолипидов, в частности образовании свободного холина из фосфатидилхолина, который в свою очередь является одним из основных фосфолипидов мембран клеток. Таким образом, ЩФ наряду с протеолитическими ферментами играет важную роль в лизисе фолликулярного эпителия в процессе высвобождения зрелых ооцитов [6]. Все исследованные особи нерестились или находились в состоянии подготовки к нересту, известно, что в это время в организме рыб происходят важные морфологические, гистологические и гистохимические изменения. В это время связь между печенью и гонадами особенно значительна. Печень является основным поставщиком веществ и энергии идущих на постройку ооцитов [7].

Таким образом, активность щелочной фосфатазы в печени и гонадах тресковых рыб является видоспецифичной, обусловленной условиями обитания, питанием, стадией репродуктивного цикла, и другими видовыми особенностями, при этом в период нереста в гонадах, и в некоторой степени в печени, могут проявляться выраженные половые отличия.

#### Список литературы

1. Mohamed F.A.S., Gad N.S. Environmental Pollution-Induced Biochemical Changes in Tissues of *Tilapia zillii*, *Solea vulgaris* and *Mugil capito* from Lake Qarun, Egypt // Global Veterinaria, 2008. – 2 (6) – p. 327-336.
2. Bakde C., Poddar A.N. Effect of steel plant effluent on acid and alkaline phosphatases of gills, liver and gonads of *Cyprinus carpio* Linn. (1758) // International J. of environ. Sci., 2011. – Vol. 1. - No 6. – p.1305 – 1316.

3. Жизнь животных: в 6-ти томах. — М.: Просвещение. Под редакцией профессоров Н.А.Гладкова, А.В.Михеева. 1970.
4. Кандюк Р. П. Сравнительная оценка активности и термостабильности пищеварительных ферментов некоторых планктоноядных и бентосооядных рыб северо-западной части Черного моря / автореферат на соиск. уч. степени канд. биол. наук, 1966. – 23 с.
5. Appa Rao, T. Alkaline phosphatase activity in ovaries of some clupeoides // Indian J. Fish., 1979. - 26 (1 & 2). – p. 253 - 255.
6. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho* // Reprod Nutr Dev., 1995. - 35(5). – p. 465-74.
7. Rosety M., Blanco M., González de Canales M.L., Grau A., Sarasquete M.C. Biochemical parameters during reproduction of the toad fish, *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) // Sci. Mar., 1992. - 56(1). - p. 87-94.

УДК 502.175:632.954:57.084

## ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ ГЛИФОСАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТОВЫХ ОБЪЕКТОВ БИОМОНИТОРИНГА

А.А. Жиденко, Т.В. Мищенко, В.В. Кривопиша

*Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко  
14013 г. Чернигов 13, ул. Гетмана Полуботко, 53, Украина, chnpu@chnpu.edu.ua, zaa2006@ukr.net*

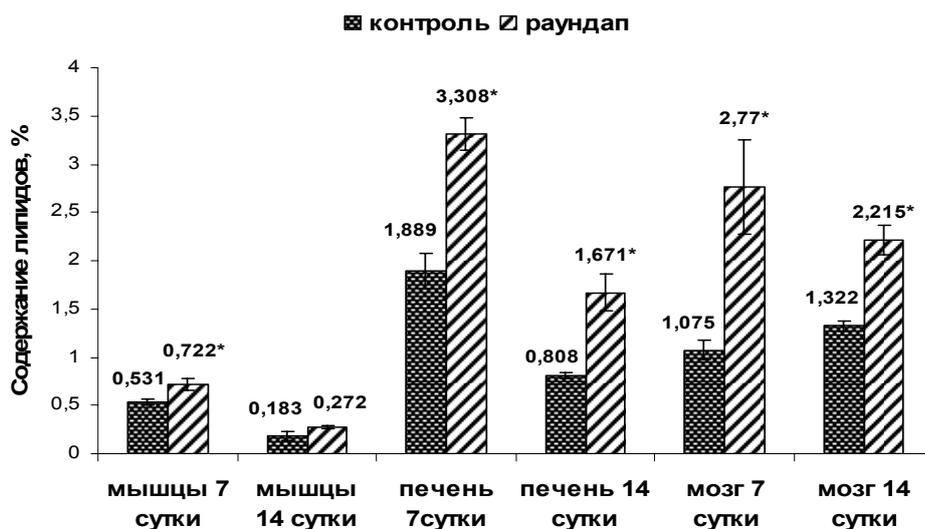
В работе дается экологическая оценка использования глифосата в Черниговской области, приводится сравнительный анализ влияния гербицидов на основе глифосата на различных представителей гидробионтов, а также обосновывается возможность использования карпа в качестве тестового объекта биомониторинга.

В Черниговской области ежегодно увеличиваются площади посевов сои и кукурузы, что приводит к возрастанию динамики применения пестицидов. Так, в Талалаевском районе в 2010 году, по сравнению с 2009 г., посевы сои выросли в 4 раза, кукурузы – на 14%. При этом применение пестицидов в 2009 г. составляло 0.5 т/тыс. гектар, а в 2010 – 0.7 т/тыс. гектар. Рост использования глифосата связан с созданием с помощью генной инженерии растений, толерантных к гербициду. Введение в геномы сои культурной (*Glicine maxima*) гена стойкости к глифосату с *Agrobacterium tumefaciens* позволяет получить глифосаттолерантную сою, устойчивую к этому гербициду. Генетически модифицированная соя (ГМС) имеет высокую урожайность и разрешена к использованию во многих странах [1]. Именно такая соя может содержаться в большом количестве пищевых продуктов.

Действующее вещество глифосат, которым обрабатываются посевы сои и кукурузы, входит в состав многих гербицидов: факел, глифос, сангли, корфосат, вулкан, раундап и др. Из этих гербицидов сплошного действия наиболее широко используется на Украине и в Черниговской области именно раундап. Так, в Черниговской области ежегодно обрабатывается им около 25 тыс. гектаров полей, в том числе 2600 гектаров в Корюковском р-не, 1300 гектаров в Менском и 2800 гектаров в Ичнянском р-нах. Указанные районы богаты водоемами, к которым сходят стоки с полей, поэтому наличие в них раундапа является предсказуемым.

Различные представители биоты имеют разную чувствительность к действию данного токсического вещества. Как показано [2], водоросли являются наиболее чувствительными к действию глифосата по сравнению с высшими водными растениями, водными беспозвоночными и рыбами. Так, средняя эффективная концентрация (ЭК50) зеленой водоросли (*Scenedesmus quadricauda*) при острой 72-часовой интоксикации составляет 4.4 мг/дм<sup>3</sup>, хроническая 96-часовая NOEC (no observed effect concentration, максимально недействующая концентрация вещества, которая не вызывает видимый эффект) для водорослей составляет 2.0 мг/дм<sup>3</sup>, при этом для ряски горбатой средняя эффективная концентрация (ЭК50) при острой 7-суточной интоксикации составляет 12.0 мг/дм<sup>3</sup>, что указывает на её большую стойкость по сравнению с водорослями. Меньшей чувствительностью обладают рыбы и водные беспозвоночные. Так, СК50 радужной форели при острой 96-часовой интоксикации составляет 38.0 мг/дм<sup>3</sup>, тогда как СК50 водных ракообразных (креветка-мизиды) при тех же условиях составляет 40.0 мг/дм<sup>3</sup> [2]. При этом такая же концентрация для других водных беспозвоночных (дафния, блоха большая) не является летальной и составляет среднюю эффективную концентрацию при острой 48-часовой интоксикации. Хроническая токсичность рыб и беспозвоночных также не имеет существенных отличий в данном случае. Для радужной форели максимально недействующая концентрация вещества

(NOEC) при хронической 21-суточной интоксикации составляет 25.0 мг/дм<sup>3</sup>, для водных беспозвоночных (дафния, блоха водяная большая) NOEC при тех же условиях составляет 30.0 мг/дм<sup>3</sup>, что даже несколько выше, чем для рыб. Следует отметить, что гидробионты имеют большую чувствительность к глифосату по сравнению с млекопитающими и птицами, поэтому значительное число экспериментов проведено по отношению к ним. Так, исследования токсичности шести гербицидов (факел, глифос, сангли, корфосат, вулкан, раундап), действующее вещество которых – изопропиламинная соль глифосата (48%), осуществлено на ветвистоусых ракообразных [3]. Гербициды оказали определенное физиолого-биохимическое влияние на рачков, изменяя звенья обмена веществ, о чем свидетельствовали нарушения линьки, задержка роста, значительные накопления жировых капель в жировом теле, причем накопление большого количества жировых капель наблюдалось как при острых и хронически летальных, так и при сублетальных и витальных концентрациях [3]. Эти результаты согласуются с установленным нами процессом жиронакопления в тканях сеголеток карпов под действием раундапа, концентрация которого – 0.04 мг/дм<sup>3</sup> (2 ПДК) поддерживалась в течение 14 дней в воде аквариумов (Рис.). Так, содержание липидов уже на 7 сутки эксперимента достоверно увеличивалось в белых мышцах, печени и мозге (в 1.4; в 1.8 и в 2.6 раза соответственно). На 14 сутки действия глифосата тенденция сохранилась: в печени – рост в 2 раза по сравнению с контролем, в мозге – в 1.7 раза и только в белых мышцах увеличение не явилось существенным и может свидетельствовать о замедлении жиронакопления и стабилизации содержания липидов на определенном стационарном уровне (рис.). Поскольку карпы находились на эндогенном питании, такие изменения свидетельствовали об отсутствии усиленного использования липидов как энергетического субстрата и интенсивном их анаболизме, накоплении в тканях. Мозг, в отличие от других исследуемых тканей, не является жировым депо рыб, поэтому полученные данные можно объяснить возрастанием уровня полиненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов мозга, что является характерным признаком влияния патогенных факторов на организм.



**Рисунок.** Содержание общих липидов в тканях сеголеток карпа под действием раундапа (M±m, n=12, \* – результаты достоверно отличаются от контроля, P<0.05).

Каждый из гербицидов в той или иной степени негативно влиял на линьку и рост молоди рачков [3]. При высоких концентрациях гербицида рачки или вовсе не линяли, или линяла лишь часть особей (если линька происходила), размеры их не изменялись, наблюдалась задержка роста. Только при концентрациях 5-2.5 мг/дм<sup>3</sup> глифосата через 24 часа была отмечена линька единичных особей, а через 48 – 100% линька. При 50-100 мг/дм<sup>3</sup> раундапа через 48 часов наблюдалась 100% гибель дафний, а перелиняли до этого времени лишь 50-70% молоди. При 5-25 мг/дм<sup>3</sup> раундапа 100% линька рачков происходила через 48 часов, но при концентрации 25 мг/дм<sup>3</sup> они погибали, при 10 мг/дм<sup>3</sup>, их смертность через 48 часов составляла 65%, а через 72-140 часов – 90%. Реакция молоди *C. affinis* на влияние исследуемых гербицидов отличалась от реакции *D. magna*. У молоди цериодафний все фазы отравления выражены в меньшей степени, но они являются более чувствительными к действию глифосата. Так, LC50 (120 часов) для цериодафний при влиянии раундапа составила 5 мг/дм<sup>3</sup>, для дафний – 6.75 мг/дм<sup>3</sup>, LC100 (24-48 часов) для цериодафний – 25-10 мг/дм<sup>3</sup>, а для дафний 200-25 мг/дм<sup>3</sup>, что указывает на значительно меньшую их чувствительность [3]. Фазы интоксикации рачков свидетельствовали о

наличии у гербицидов свойств нервнопаралитических ядов. Установлено, что у молоди дафний наблюдались все фазы патологического процесса: гипертоническое возбуждение, нарушение координации движений, потеря равновесия, глубокое подавление функции дыхания и сердечного ритма, паралич и смерть. В острых опытах установлено, что LC50 (120 часов) гербицидов, за исключением вулкана, для *D. magna* находилось в пределах 1.75-6.75 мг/дм<sup>3</sup>, а для *C. affinis* – 2.13-5.25 мг/дм<sup>3</sup>. LC50 (120 часов) вулкана для *D. magna* и *C. affinis* составляло соответственно 82.50 и 49.91 мг/дм<sup>3</sup>. Следовательно, несмотря на то, что действующее вещество у всех исследуемых гербицидов одинаково, чувствительность гидробионтов к ним значительно отличается.

Таким образом, наибольшее количество исследований влияния глифосата на гидробионтов осуществлено на ветвистоусых рачках, а именно *Daphnia magna*. Чувствительность изученных гидробионтов к глифосату, как показано выше, существенно не отличается от чувствительности рыб (радужная форель, плотва). Концентрации глифосата, использованные в наших исследованиях (0,04 мг/дм<sup>3</sup>) и обнаруженные в водоеме при верификации результатов эксперимента (табл.) являются витальными для всех исследуемых гидробионтов и вызывают лишь метаболические и функциональные изменения. Для установления взаимосвязи между исследованными показателями ПОЛ сеголеток карпа и концентрацией гербицида раундап, а также для прогнозирования дальнейших взаимозависимых изменений этих величин были осуществлены корреляционный, дисперсионный и регрессионный анализы ( $p < 0.05$ ). Регрессионный анализ позволяет спрогнозировать концентрацию раундапа в водоеме в зависимости от изменений показателей в тканях карпа.

**Таблица.** Показатели ПОЛ сеголеток карпа и концентрации раундапа в воде соответственно математическим моделям

Активность ферментов / содержание субстратов в тканях		Концентрация раундапа в воде (теоретическая) мг/дм <sup>3</sup>
Активность каталазы в почках, ммоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /см <sup>3</sup> • с	0.15 ± 0.01	0.035
Содержание гидроперекисей липидов в почках, у.е./см <sup>3</sup>	6.70 ± 0.20	0.027
Содержание малонового диальдегида в почках, мкмоль/дм <sup>3</sup>	3.40 ± 0.05	0.026

Уравнения регрессионной зависимости имеют следующий вид:

$$K_p = -0.04 + 0.01 \cdot T_n, \quad (1)$$

где  $K_p$  – концентрация раундапа (мг/дм<sup>3</sup>) в водной среде;  $T_n$  – содержание гидроперекисей липидов в почках карпов (у.е./см<sup>3</sup>).

$$K_p = 0.06 - 0.01 \cdot T_n, \quad (2)$$

где  $K_p$  – концентрация раундапа (мг/дм<sup>3</sup>) в водной среде;  $T_n$  – содержание малонового диальдегида в почках карпов (мкмоль/дм<sup>3</sup>).

$$K_p = 0.07 - 0.23 \cdot T_n, \quad (3)$$

где  $K_p$  – концентрация раундапа (мг/дм<sup>3</sup>) в водной среде;  $T_n$  – активность каталазы в почках карпов (ммоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/см<sup>3</sup> • с).

Математические модели определения концентрации раундапа в воде были верифицированы в природных условиях. Из водоёма Менского района Черниговской области были взяты образцы воды и выловлено необходимое количество сеголеток карпа. В воде была установлена концентрация раундапа [4,5], в тканях рыбы определена активность необходимых ферментов и содержание субстратов соответственно приведенным математическим уравнениям, с помощью которых было получено теоретическое значение содержания раундапа в воде в каждом случае (табл. 2). Концентрация раундапа в воде в результате экспериментального определения составляет 0.034±0.002 мг/дм<sup>3</sup>, что соответствует результатам теоретических расчетов.

Таким образом, использование рыб как тестовых объектов биомониторинга гербицидного загрязнения водоёмов является целесообразным, поскольку они – интегрирующие системы, имеющие

высокую чувствительность к изменениям среды и достаточную резистентность к сублетальным концентрациям токсичных факторов. Это дает возможность их применения как при высоких концентрациях ксенобиотиков, когда можно наблюдать изменения на организменном уровне, так и при низких, когда, невзирая на отсутствие внешних проявлений токсичного эффекта, происходят существенные изменения на биохимическом уровне, который имеет высокую чувствительность. Для регистрации этих изменений рыба является наиболее удобным объектом среди гидробионтов.

#### Список литературы

1. Трансгенная соя. Удобрения и средства защиты [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://zerno-ua.com/?p=2286>
2. Глифосат: экотоксичность [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.rupest.ru/ppdb/glyphosate.html>. – 2011.
3. Мельничук С.Д. Оценка токсичности гербицидов на основе глифосата методом биотестирования на ветвистоусых рачках / С.Д. Мельничук, Э.П. Щербань, В.И. Лоханская // Гидробиологический журнал. – 2007. – Т.43. – №1. – С. 84-96.
4. Методичні вказівки з визначення мікрокілЬкостей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі. – Київ: Націон. аграрн. ун-т України, лабор. ”Якості та безпеки сільськогосподарської продукції,” 2004. – №39. – 252 с.
5. Способ определения раундапа в биологических объектах: Патент Российской Федерации [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://ru-patent.info/21/05-09/2105973.html>.

УДК597.554.3-11+574.64:597.554.43

### ОЦЕНКА ЗДОРОВЬЯ ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA L.* ИЗ РАЗНЫХ ПО УРОВНЮ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПЛЕСОВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА ПО ЦИТО- И ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ СЕЛЕЗЕНКИ

Е.А.Заботкина

*ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия, zabel@ibiw.yaroslavl.ru*

В работе рассмотрены различия селезенки лещей, выловленных в Моложском и Шекснинском плесах Рыбинского водохранилища, по гистологическим (зародышевые и мелано-макрофагальные центры) и цитологическим (макрофаги и гранулоциты) показателям. Отмечены достоверные отличия по этим показателям и их связь с уровнем загрязнения грунтов.

*Ключевые слова:* лещ, селезенка, зародышевые центры, мелано-макрофагальные центры, макрофаг, гранулоцит.

Рыбинское водохранилище – одно из самых крупных искусственных водоёмов Европейской части России, расположенное на р. Волге и её притоках – р. Шексне и Мологе. Оно находится на Северо-западе Ярославской области, частично в Тверской и Вологодской областях. Водоём является судоходным и рыбопромысловым, самым массовым добываемым видом является лещ *Abramis brama L.*, по берегам хорошо развито сельское хозяйство.

В месте впадения р. Шексны в Рыбинское водохранилище расположен г. Череповец. В основу экономического потенциала города Череповец входят предприятия химического комплекса и черной металлургии. Среди ведущих предприятий города можно выделить ОАО «Аммофос», ОАО «Череповецкий», ОАО «Азот», ОАО «Северсталь» и ОАО «Северсталь-метиз». Воды Шекснинского плеса находятся под техногенной нагрузкой промышленного комплекса. Грунты этой части Рыбинского водохранилища содержат загрязняющие вещества в концентрациях, превышающих допустимые уровни содержания, оказывают токсическое действие на гидробионтов, в том числе рыб (Лапирова, Заботкина, 2010; Микряков и др., 1990; Чуйко и др., 2010; Экологические проблемы Верхней Волги, 2001).

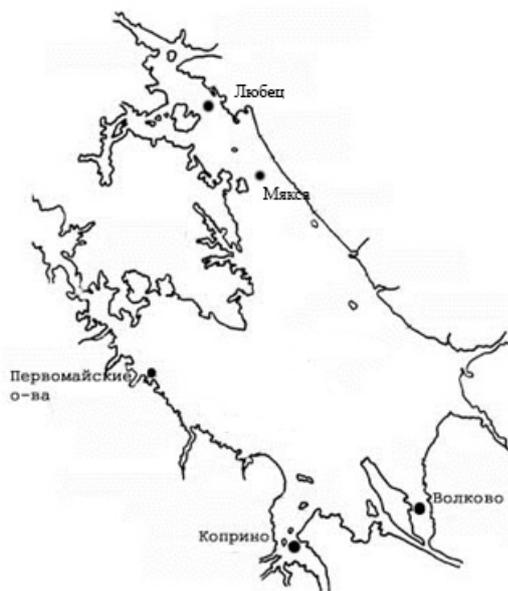
Известно, что рыбы, обитающие в зоне поступления промышленных и коммунальных сточных вод, реагируют изменением различных функций, в том числе иммунологических (Микряков, 1990). После аварийного поступления отходов промышленных предприятий г. Череповца в 1986 г. в водохранилище в иммунной системе рыб были зафиксированы существенные изменения, которые уменьшались с удаленностью от мест сброса. Вместе с тем, через 15 лет после аварии, в условиях хронического поступления загрязненных вод, отмечено постепенное улучшение состояния иммунной

системы рыб. Но в Шекснинском плесе водохранилища по-прежнему остается высокой доля иммунодефицитных рыб, а также с высоким уровнем токсикант реагирующих антител, и антителами к полиароматическим углеводородам (Экологические проблемы Верхней Волги, 2001).

Одним из центральных органов иммунной системы рыб, ответственным за реакции неспецифической клеточной защиты и кроветворение, является селезенка. Как и другие органы, она чувствительна к изменению биотических, абиотических, антропогенных факторов окружающей среды. В связи с этим особенно актуально исследовать последствия хронического загрязнения донных отложений Рыбинского водохранилища в Шекснинском и Центральном плесах водоема для клеточной и тканевой структуры селезенки леща.

Целью работы было изучить структурно-функциональные изменения клеток и тканей селезенки леща, как основного органа кроветворения из различных по загрязненности плесов Рыбинского водохранилища.

Объект исследования, лещ (*Abramis brama* L.), по 10 экз. с каждой точки, был отловлен траловым способом с экспедиционного судна «Академик Топчиев» в Моложском (ст. Первомайка), Шекснинском (ст. Любец и Мякса), Волжском (ст. Коприно) и Центральном (Главном) (ст. Волково) плесах Рыбинского водохранилища в сентябре 2008 г. (Рис. 1).



**Рис.2.** Схема Рыбинского водохранилища. Ст. Волково, Коприно, Любец, Мякса, Первомайка – места отлова рыб.

Для исследования у половозрелых особи длиной  $31,3 \pm 0,5$  см и массой  $695,7 \pm 28,1$  г иссекали кусочки селезенки, которые фиксировали в 2,5% глютаральдегиде на 0,1 М фосфатном буфере с pH 7.2 и постфиксировали 1% четырехокисью осмия ( $OsO_4$ ) на том же буфере. Затем образцы обезвоживали в спиртах возрастающих концентраций, и заливали в смесь эпоксидных смол Аралдит-Эпон по стандартной методике. Из заливок приготавливали полутонкие и ультратонкие срезы. Полутонкие срезы окрашивали 1% метиленовым синим, ультратонкие контрастировали водными растворами уранилацетатат и цитрата свинца.

Измерение размеров структурных элементов селезенки проводили на полутонких срезах на цифровом микроскопе KEYENCEVHX-1000E при использовании объектива Z500 и программ микроскопа. Измеряли размеры, количество и площадь объектов, высчитывали соотношения площадей зародышевых центров и ММЦ к площади среза. Размеры клеток и органелл проводили на электронно-микроскопических снимках в программе ImageTool 3.0.

Результаты подсчетов подвергали статистической обработке в программе Excel, выражали в виде  $m \pm \sigma$ , оценивали при степени достоверности  $\leq 0.05$ .

Результаты светомикроскопических исследований показали, что ткани селезенки лещей из разных плесов имеют сходную структуру и включают зародышевые и мелано-макрофагальные центры (Табл. 1, 2).

Эти структурные элементы имели достоверные различия как по количеству на  $mm^2$ , площади на  $mkm^2$ , так и по отношению площадей в разных точках отбора.

**Таблица 1.** Характеристика зародышевых центров в селезенке лещей на разных станциях Рыбинского водохранилища

Станции	Кол-во на мм <sup>2</sup>	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Отношение площадей, %
Волково	440,73±30,83	121,04±8,57 <sup>абв</sup>	0,58±0 <sup>абв</sup>
Коприно	359,14±37,18	148,51±14,17 <sup>где</sup>	0,75±0,1 <sup>где</sup>
Любец	370,88±4,76 <sup>а</sup>	58,09±3,41 <sup>ар</sup>	0,30±0 <sup>ар</sup>
Мякса	220,68±27,01 <sup>аб</sup>	62,06±7,10 <sup>бд</sup>	0,32±0 <sup>бд</sup>
Первомайка	351,87± 45,06 <sup>б</sup>	77,22±5,69 <sup>ве</sup>	0,39±0,1 <sup>ве</sup>

Примечание: в табл. 1-3 одинаковыми буквенными индексами обозначены достоверно отличающиеся результаты.

**Таблица 2.** Характеристика мелано-макрофагальных центров в селезенке лещей на разных станциях Рыбинского водохранилища

Станции	Кол-во на мм <sup>2</sup>	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Отношение площадей, %
Волково	189,64± 46,28 <sup>а</sup>	247,25±49,50 <sup>а</sup>	1,28±0,3
Коприно	29,03±13,80 <sup>аб</sup>	45,59±20,39 <sup>аб</sup>	0,23±0,1
Любец	187,93± 52,49 <sup>б</sup>	148,09±43,34	0,75±0,2
Мякса	499,67±56,97	365,81±43,46 <sup>б</sup>	1,86±0,2
Первомайка	287,09±62,86	174,85±49,94	0,89±0,3

Результаты исследования показали, что характеристики структурных элементов селезенки отличаются в разных плесах водохранилища.

Количество зародышевых центров было наименьшим в Шекснинском плесе, на ст. Мякса и Любец, и наибольшим в Волжском плесе. По мелано-макрофагальным центрам наблюдалась обратная тенденция. Наиболее ярко она проявлялась при сравнении отношения их площадей. Отдельно следует выделить результаты по ст. Волково и Первомайка, где при выраженном отсутствии сильного загрязнения (Чуйко и др., 2010), полученные данные свидетельствуют о действии каких-либо неблагоприятных факторов.

Анализ данных по структуре клеток и субклеточных органелл показал, что лимфоциты, бластные и плазматические клетки достоверно не отличались в точках отбора как по количественным, так и качественным характеристикам, но были обнаружены достоверные различия по ряду характеристик между макрофагами и гранулоцитами (Табл. 3).

Размеры эозинофилов недостоверно колебались у рыб из разных плесов, но достоверно отличались количество и размеры специфичных гранул. Максимальное их число наблюдалось в Волково, минимальное - в Коприно. Самые большие специфичные гранулы, напротив, были у рыб в Коприно, а самые маленькие – в Волково. Индекс формы гранул был наибольшим на ст. Коприно.

Размеры нейтрофилов достоверно отличались у рыб из разных плесов. Самые мелкие клетки были на ст. Волково, а самые крупные – в Любце. Так же, как и эозинофилы, нейтрофилы отличались по количеству гранул в клетке, размерам гранул и индексу формы. Количество гранул было наименьшим в Моложском плесе и наибольшим – в Любце и Мяксе. Размеры гранул были достоверно больше только на ст. Первомайка, на этой станции гранулы отличались и наибольшим индексом формы.

На станциях Шекснинского плеса обнаружено большее количество специфичных гранул с измененной структурой, как у нейтрофилов, так и эозинофилов. Изменение структуры специфичных гранул и их размеров свидетельствует об изменении содержания ферментов в этих органеллах.

Анализ структуры макрофагов показал, что достоверных отличий по размерам клетки и ядра макрофагов не наблюдается, нет четкой зависимости по количеству и размерам фагосом. Но сравнение отношения площадей фагосом к площади клетки показал достоверное увеличение данного показателя в макрофагах Шекснинского плеса.

Лещ является типичным бентофагом, поэтому на его состояние в значительной степени оказывают не только качество пищи, но и состояние грунтов в местах обитания. Последние исследования показали, что и в грунтах, и мышцах леща Рыбинского водохранилища обнаружены стойкие органические загрязнители (полихлорированные бифенилы, ДДТ, ГХЦГ и ГХБ). Наибольшие их количества обнаружены в Шекснинском плесе, наименьшие – в Моложском плесе. Различия в их содержании между станциями обусловлены источниками и путями поступления в водоем, а также особенностями миграции (Герман и др., 2010; Чуйко и др., 2010). По данным авторов, поступление стойких

органических загрязнителей в водоем продолжается, и наибольшую опасность для экосистемы водохранилища на современном этапе представляют полихлорированные бифенилы.

**Таблица 3.** Морфологические показатели гранулоцитов и макрофагов селезенки лещей на разных станциях Рыбинского водохранилища

Показатель	Волково	Коприно	Любец	Мякса	Первомайка	
Эозинофил	$l_k$	8,15±0,27	6,42±0,31	8,11±0,41	7,02±0,90	8,91±0,78
	$b_k$	5,90±0,13	5,08±0,19	5,99±0,40	6,49±0,24	6,78±0,22
	$l_n$	3,44±0,60	3,13±0,23	4,45±0,29	4,60±0,21	4,07±0,34
	$b_n$	1,65±0,18	2,37±0,17	2,49±0,22	2,05±0,22	2,32±0,30
	$n_z$	58,4±10,89	21,0±2,99	30,08±3,81	37,0±3,79	38,83±6,90
	$l_z$	0,61±0,02	1,13±0,47	0,72±0,02	0,73±0,02	0,78±0,02
	$b_z$	0,37±0,01	0,63±0,18	0,39±0,01	0,41±0,01	0,47±0,01
	$I_{\phi}$	0,63±0,01	0,71±0,03	0,58±0,01	0,60±0,02	0,64±0,02
Нейтрофил	$l_k$	5,91±0,40	6,31±0,47	7,42±0,23	6,97±0,37	6,44±0,61
	$b_k$	4,28±0,40	4,29±0,26	5,36±0,32	5,44±0,25	4,38±0,31
	$l_n$	3,36±0,29	3,02±0,32	3,88±0,16	3,79±0,28	3,60±0,32
	$b_n$	2,12±0,07	2,26±0,21	2,43±0,28	2,64±0,19	2,44±0,32
	$n_z$	34,00±10,89	39,60±5,00	45,15±7,36	42,18±9,36	14,83±3,38
	$l_z$	0,35±0,01	0,32±0	0,34±0,01	0,37±0,01	0,43±0,02
	$b_z$	0,13±0	0,13±0	0,13±0	0,16±0	0,23±0,01
	$I_{\phi}$	0,39±0,01	0,42±0,01	0,42±0,01	0,43±0,01	0,54±0,03
Макрофаг	$l_k$	12,46±2,35	14,85±1,20	16,24±1,96	10,43±2,44	16,50±2,53
	$b_k$	5,64±1,56	9,90±0,47	10,93±1,76	8,21±1,99	8,79±0,84
	$l_n$	3,40±0,33	4,12±0,39	5,36±0,36	5,33±1,12	4,39±0,43
	$b_n$	2,19±0,53	3,51±0,35	3,23±0,60	2,30±0,49	3,07±0,25
	$n_{\phi}$	14,75±4,96	31,29±7,53	22,33±3,67	12,75±0,85	7,90±1,16
	$I_s$	0,28±0,12	0,15±0,03	0,29±0,05*	0,38±0,03*	0,14±0,05

Примечание:  $l_k$  – длина клетки,  $b_k$  – ширина клетки,  $l_n$  – длина ядра,  $b_n$  – ширина ядра,  $n_z$  – количество гранул,  $l_z$  – длина гранул,  $b_z$  – ширина гранул,  $I_{\phi}$  – индекс формы,  $n_{\phi}$  – количество фагосом,  $I_s$  – индекс площадей.

Согласно литературным данным, наибольшим токсическим эффектом обладают донные отложения Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища, который подвергается интенсивному загрязнению Череповецким промышленным узлом. Грунты Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища содержат загрязняющие вещества в концентрациях, превышающих допустимые уровни содержания, и оказывают токсическое действие на гидробионтов (Герман и др., 2010; Чуйко и др., 2010).

Таким образом, современный уровень качества воды и грунтов оказывает негативное влияние на структуру органа у рыб, выловленных в Шекснинском плесе, вместе с тем, отличия показателей у рыб на ст. Волково может быть вызваны особенностями переноса загрязнений с грунтами, или перемещением их, вызванным близостью водозабора Рыбинской электростанции. Характерное изменение – увеличение площадей ММЦ, изменение количества, формы и структуры специфичных гранул гранулоцитов у рыб из Шекснинского плеса свидетельствует о негативном влиянии среды на состояние здоровья рыб. Выявленные изменения косвенно свидетельствуют о снижении защитных функций иммунной системы у лещей Шекснинского плеса, и, соответственно, о большей подверженности их болезням.

Выводы:

1. Обнаружены достоверные различия по размерам, количеству и отношению площадей зародышевых центров и мелано-макрофагальных центров в зависимости от степени загрязнения воды и грунтов на рассматриваемых станциях. Количество и размеры зародышевых центров уменьшается, а мелано-макрофагальных центров – увеличивается при усилении загрязнения.

2. Отмечены изменения в соотношении и структуре макрофагов и гранулоцитов лещей в разных плесах Рыбинского водохранилища. Обнаруженные изменения могут быть связаны с изменением содержания и структуры ферментов в специфичных гранулах гранулоцитов.

Список литературы:

1. Герман А.В., Законнов В.В., Мамонтов А.А. Хлорорганические соединения в донных отложениях, бентосе и рыбе Волжского плеса Рыбинского водохранилища // Водные ресурсы. – 2010. – том 37.- №1. С. 84-89.
2. Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А. Сравнительный анализ показателей иммунофизиологического состояния леща *Abramis brama L.* из различных по степени загрязнения участков Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод. 2010. № 2. С. 86 – 92.
3. Микряков В.Р., Андреева А.М., Лапирова Т.Б., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб Шекснинского плеса после аварии на промышленных предприятиях г. Череповца // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Академия наук СССР. Рыбинск. – 1990 г. 156 с.
4. Чуйко Г.М., Законнов В.В., Морозов А.А., и др. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) и хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и леще (*Abramis brama L.*) Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод. №2 2010. С. 98 - 108.
5. Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография / Под ред. Копылова А.И. Ярославль: ЯГТУ, 2001. 427 с.

УДК 579.81+574.23

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ С ТОКСИЧНЫМИ МЕТАЛЛОИДАМИ**

А.В. Комова<sup>1</sup>, Е.И. Компанцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»  
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1, Россия, KomovaAV@gmail.com*

<sup>2</sup>*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки РАН Институт микробиологии РАН  
117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, Россия, elenataxi@mail.ru*

В работе исследуется взаимодействие несерных пурпурных бактерий с токсичными оксианионами металлоидов – теллура, селена, мышьяка. Определены минимальные ингибирующие концентрации для четырех штаммов галоалкалофильных и галофильных пурпурных бактерий.

**Ключевые слова:** пурпурные бактерии, пределы толерантности, детоксикация, теллур, селен, мышьяк.

Теллур, селен и мышьяк по своим химическим свойствам относятся к металлоидам. Они присутствуют в водных и наземных экосистемах, и их биогеохимические свойства сходны. Селен, в отличие от теллура и мышьяка, является микроэлементом, необходимым для функционирования биохимических систем живых организмов. В воде эти элементы обычно присутствуют в растворимой форме оксианионов, весьма токсичных, как для прокариот, так и для эукариот. Антропогенная деятельность (горная и нефтяная промышленность, нерациональное использование водных ресурсов) приводит к увеличению биодоступности металлоидов [1], что в свою очередь может вызвать тяжелые последствия для экосистем и населения.

Микроорганизмы играют важную роль в круговороте Te, Se и As в природе, обладая способностью изменять валентное состояние элементов в результате реакций окисления-восстановления и метилирования-деметилирования. Эти процессы используются для дыхания, детоксикации, поддержания окислительно-восстановительного потенциала. В некоторых случаях соединения металлоидов способны выступать в качестве доноров электронов при фотосинтезе. Микроорганизмами осуществляется полный редокс-цикл селена, аналогичный циклу серы [2], и цикл мышьяка [3]. Для теллура полного цикла показано не было.

Токсичность Te, Se и As обусловлена главным образом окислительным стрессом в результате подавления тиоловой антиоксидантной защитной системы бактерий [4]. Селен также способен замещать серу, а мышьяк фосфор в некоторых соединениях, нарушая функции клеток.

Устойчивость хемотрофных бактерий к Te, Se и As изучена достаточно хорошо [5, 4]. Сведения об устойчивости фототрофных пурпурных бактерий к Te, Se и As немногочисленны. При этом исследованы нейтрофильные представители, в то время как по галофильным и алкалофильным представителям информация отсутствует. Целью данной работы было установить пределы токсичности Te, Se и As для нескольких штаммов галоалкалофильных и галофильных несерных пурпурных бактерий (НПБ).

Для исследования были взяты четыре штамма НПБ рода *Rhodovulum*. Два из них (*Rhodovulum steppense* A-20s, *Rhodovulum tesquicola* A-36s) являлись умеренными галоалкалофилами (оптимумы pH

8.5 – 9.0, солености 1 – 3 % NaCl), два штамма являлись галофильными (*Rhodovulum sp.* S-21-65 – оптимум 5 % NaCl, *Rhodovulum sp.* S-17-65 – оптимум 12 % NaCl).

Исследуемые штаммы бактерий культивировали на жидкой модифицированной среде Пфеннига (г/л: 0.33 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.33 KCl, 0.33 NH<sub>4</sub>Cl, 0.33 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.33 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) с добавлением оптимального для каждой культуры количества NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, а также 1 мл/л раствора микроэлементов, 20 мкг/л витамина B12, 0.05 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л ацетата натрия, при pH среды 8.5 для алкалофильных штаммов, 7.0 для галофильных. Для ростового контроля использовалась среда с 0.3 г/л Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O. В экспериментальных вариантах использовалась среда, лишенная других восстановителей, с добавлением различных концентраций K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, Na<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub> (от 0 до 10 мМ, согласно литературным данным о минимальных ингибирующих концентрациях для НПБ).

Культивирование бактерий происходило во флаконах на 25 мл, из которых 20 мл были заполнены средой. Среда была освобождена от кислорода вакуумированием, в качестве газовой фазы использовался аргон. Бактерии культивировались в люминостате, освещенность около 2000 люкс, температура 25°C, в течение 6 недель.

Пределы токсичности восстановленных соединений Te, Se и As для исследуемых бактерий определяли по изменению количества клеток.

Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Устойчивость бактерий к оксианионам металлоидов при анаэробном фототрофном росте.

Микроорганизм	Минимальная ингибирующая концентрация, мМ		
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>	Na <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub>
<i>Rhodovulum stepposum</i> A-20s <sup>†</sup>	0.05	0.05	0.05
<i>Rhodovulum tesquicola</i> A-36s <sup>†</sup>	0.05	4	4
<i>Rhodovulum sp.</i> S-21-65	0.05	0.05	0.01
<i>Rhodovulum sp.</i> S-17-65	0.05	0.05	0.01

Культуры умеренно галоалкалофильных НПБ *Rhodovulum steppense* A-20s и *Rhodovulum tesquicola* A-36s ингибировались селенитом даже в низкой концентрации. Штамм A-36s оказался толерантен к теллуриду и арсениту. Рост культур сопровождался образованием элементарного селена и теллура, что является результатом восстановления оксианионов металлоидов для их детоксикации. Среда окрашивалась в красно-оранжевый цвет в случае образования элементарного селена и в черный в случае образования элементарного теллура. При микроскопировании наблюдались внеклеточные отложения аморфных частиц селена и кристаллов теллура.

Арсенит оказался весьма токсичным для бактерий штамма A-20s. Толерантность штамма A-36s к мышьяку (до 4 мМ) может быть объяснена работой фермента арсенит-оксидазы, который переводит арсенит в менее токсичный арсенат. Гены этого фермента уже были обнаружены у многих фототрофных бактерий, в частности, у пурпурной несерной бактерии *Rhodospirillum rubrum*, относящейся к Я-Proteobacteria [5].

Галофильные штаммы НПБ S-21-65 и S-17-65 оказались нетолерантны к оксианионам металлоидов. Существующие данные по нефототрофным галофильным штаммам рода *Bacillus* показывают, что более галофильные штаммы проявляют большую толерантность к оксианионам [6]. Однако для фототрофных аэробных [7] бактерий была показана обратная зависимость толерантности к металлоидам от галофилии. Вероятно, для НПБ это также справедливо.

Из полученных в настоящем исследовании данных можно сделать вывод о том, что галоалкалофильные НПБ более резистентны к оксианионам металлоидов. Показавший высокую толерантность к теллуру и мышьяку штамм A-36s является потенциально перспективным объектом для биоремедиации загрязненных теллуrom и мышьяком вод. Требуется дальнейшее изучение характеристик роста и механизмов толерантности галоалкалофильных и галофильных НПБ к оксианионам металлоидов.

#### Список литературы

1. Lemly A.D. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue // *Ecotoxicology and environmental safety*. 2004. № 59(1). P. 44-56.
2. Dowdle P.R., Oremland R.S. Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures // *Environmental science & technology*. 1998. № 32(23). P. 3749-3755.
3. Oremland R.S., Kulp T.R., Blum J.S., Hoefl S.E., Baesman S., Miller L.G., Stolz J.F. A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment // *Science*. 2005. № 308(5726). P. 1305-1308.

4. Zannoni D., Borsetti F., Harrison J.J., Turner R.J. The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te // *Advances in microbial physiology*. 2007. № 53. P. 1-312.
5. Stolz J.F., Basu P., Santini J.M., Oremland, R. S. 2006. Arsenic and Selenium in Microbial Metabolism // *Annual Review on Microbiology*. 2006. № 60. P. 107-130.
6. Amoozegar M.A., Hamed J., Dadashpour M., Shariatpanahi S. Effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyanions in native moderately halophilic spore-forming bacilli // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005. № 21(6-7). P. 1237-1243.
7. Yurkov V., Jappe J., Vermeglio A. Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria // *Applied and environmental microbiology*. 1996. № 62(11). P. 4195-4198.

УДК 507.057+574+57.047+57.084+502.084

***In situ* ИЗМЕРЕНИЯ КАРДИОАКТИВНОСТИ МЕСТНЫХ ВИДОВ  
МАКРОБЕНТОСНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ В ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ  
ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ГИДРОБИОНТОВ**

Т.В. Кузнецова, С.В. Холодкевич, А.С. Куракин

*Санкт-Петербургский научно-исследовательский Центр экологической безопасности РАН  
Лаборатория биоэлектронных методов геоэкологического мониторинга  
Корпусная, 18, Санкт-Петербург, 197110, Россия, kuznetsova\_tv@bk.ru*

В работе представлены и обсуждаются результаты экспериментальных исследований кардиоактивности ракообразных и моллюсков и развития методологических подходов к оценке их функционального состояния с помощью неинвазивной регистрации ритма сердца в условиях полевых экспериментов. Показано действие искусственного заменителя сахара - сукралозы, на кардиоактивность черноморских крабов. Обсуждается значение подобных исследований и методических подходов для целей индикации качества воды как среды обитания гидробионтов, а также перспективы использования биоэлектронных систем в экотоксикологических экспериментах.

Оценки биологических эффектов загрязняющих веществ на природные воды проводятся различными методами и средствами биоиндикации и биомониторинга состояния поверхностных вод пресноводных и морских акваторий. Традиционный мониторинг включает отбор воды и седиментов в изучаемых акваториях и их последующий физико-химический анализ в лабораторных условиях. Биоиндикация состояния водной среды обычно осуществляется посредством тестирования с применением различных тестов, проводимых на разных по чувствительности и толерантности тест-организмах на основе оценок выживаемости последних, их плодовитости в условиях краткосрочных, либо длительных экспозиций в анализируемых средах, а также на основе использования различных методов оценок биоразнообразия и некоторых других (см. обзоры: [1, 2]).

Однако такой подход не может являться удовлетворительным при оценке здоровья изучаемой экосистемы, поскольку он не согласуется с состоянием местной биоты в конкретном биотопе в конкретный период времени. Так, например, данные о наличии тяжелых металлов в седиментах содержат немного информации для понимания биологических эффектов такого вида загрязнения на живые организмы в случае отсутствия данных об их биодоступности и биоаккумуляции в отношении тестируемых ключевых видов организмов изучаемой экосистемы.

Использование беспозвоночных животных (БП) для оценки *in situ* вредного влияния загрязняющих веществ рассматривалось в целом ряде работ [3, 4, 5].

Преимущества использования БП в экотоксикологических исследованиях представляются в простоте поиска связей между эффектами, имеющими место на индивидуальном уровне и их интерпретацией на более высокие уровни биологической организации, например, популяции и сообщества [2, 6, 7].

Поведенческие реакции животных являются надежными показателями функциональной активности изучаемых организмов и часто используются в системах раннего биологического оповещения о резком изменении компонентов окружающей среды. Для пресноводных акваторий созданы и уже длительно функционируют такие системы как MosselMonitor, Mermayde; Kramer, Foekema; 2006 [8], оценивающие реакции пресноводных двустворчатых моллюсков (преимущественно, Unionidae), а для морских вод – системы, использующие морских моллюсков (преимущественно, *Mytilus edulis*). Аларм-сигнал в таких биосенсорных системах определяется на основе одновременной реакции

тест-организмов, выражающейся, например, в закрытии створок двустворчатых моллюсков или резкого изменения показателей их сердечной активности [9, 10].

Роль такого рода работ в скрининговых исследованиях по выявлению влияния ряда новых, возможно опасных для живых организмов веществ (emerging substances), представляется весьма актуальной.

В настоящее время сукралоза (4,1',6'-trichloro-4,1',6'-trideoxygalactosucralose) одобрена как пищевая добавка в качестве заменителя сахара (в 600 раз слаще) в более чем 80 странах, включая Россию. В Евросоюзе она также известна под кодом E955. Сукралоза была впервые синтезирована и открыта британской компанией «Gat&Lyle» как сахарозаменитель (подсластитель) в 1976 году. Ее применение было одобрено в Канаде в 1991 году, а затем в 1998г в США. До этого сукралоза за 13 лет прошла более сотни тестов на токсичность для человека и животных. Не было выявлено никаких канцерогенных свойств или побочного воздействия на репродуктивную функцию, нервную систему или генетику [11]. Было показано, что оптимальный прием сукралозы в день без отрицательных побочных эффектов составляет 16 мг/кг веса тела, а максимально допустимый – 1500 мг. В немалой степени отсутствие тератогенных эффектов сукралозы при высоких ее концентрациях (например, у кроликов до 2 г/вес тела) может объясняться неспособностью организмов ее усваивать, аккумулировать, в то время как скорость ее выведения из организма достаточно высока. Время полураспада сукралозы в воде более 3-х лет при температуре +25° С и более 5-6 лет в холодных водах. По данным исследований, проведенных в Швеции Институтом исследований окружающей среды, содержание ее в сточных водах крупных городов колеблется от 1,8 до 10 мкг/л [11]. В настоящее время неизвестно отрицательного токсикологического воздействия таких концентраций сукралозы на живые организмы. Однако существует мнение, что уровень сукралозы, с учетом ее очень медленной деградации в природе, в дальнейшем будет только возрастать. Поскольку в ее составе есть две  $\text{CH}_2\text{Cl}$ -группы, то сукралозу относят к хлорорганическим поллютантам и существуют опасения о ее возможном канцерогенном действии. В связи с этим исследования, направленные на выяснение потенциальных опасностей воздействия сукралозы как на беспозвоночных и млекопитающих, так и на водные экосистемы, являются весьма актуальными [11, 12].

В данном исследовании мы представляем предварительные результаты работы по оценке эффектов воздействия искусственного заменителя сахара – сукралозы, на каменных крабов (*Eriphia verrucosa* Forskal) Черного моря по показателям их кардиоактивности с помощью неинвазивной волоконно-оптической лазерной биоэлектронной системы мониторинга их сердцебиения. Подобные скрининговые работы могут быть полезны для определения пороговых концентраций воздействия заменителей сахара на гидробионтов и сравнения их с результатами, полученными при применении других методических подходов.

Для регистрации ЧСС одновременно 6-и животных в работе использовался разработанный в НИЦЭБ РАН многоканальный лазерный волоконно-оптический фотоплетизмограф [9]. Полученные фотоплетизмограммы анализировались в реальном времени с помощью оригинальной программы VarPulse [9]. На протяжении всего эксперимента активность сердца животных непрерывно регистрировалась и сохранялась в виде бинарных файлов и файлов текстового формата для дальнейшего анализа и архивирования.

В экспериментах в качестве тест-организмов использовались крабы *Eriphia verrucosa* Forskal, отловленные за сутки до проведения экспериментов с глубины 2-3 метра вручную в бухте Казачья г. Севастополя, рассматриваемой в качестве референтной чистой акватории. Из 11 отловленных крабов были отобраны 6 половозрелых самцов. Животные были немедленно перемещены на борт судна, где содержались в каюте, каждый в отдельной 6-литровой емкости с 3-я литрами свежей морской водой при постоянной принудительной ее аэрации. Температура воды составляла 19,7-20,5° С. Через 3 часа на карапакс краба в медиально-каудальной его области (*в месте проекции сердца*) приклеивался небольшой держатель для фиксации волоконно-оптического датчика для регистрации ЧСС. Эффективное расположение датчика кардиоактивности определялось по регистрации стабильных сокращений сердца.

Приготовление маточного раствора сукралозы. Сукралозу (Sigma-Aldrich, 69293,  $\geq 98.0\%$  (HPLC), China), растворяли в отфильтрованной через механический фильтр заборной морской воде (температура 19,4° С). Далее 50 мл маточного раствора подавали через трубку аэратора так, чтобы концентрация сукралозы в емкости с крабами составляла 1 г/л. Затем добавляли еще 100 мл маточного раствора, при этом концентрация сукралозы повышалась втрое. Выбор действующей концентрации был обоснован литературными данными, что острая токсичность сукралозы для *Daphnia magna* EC50 – 1800 мг/л [11].

### Фоновая активность сердца краба

Через 6 часов после отлова крабов, в каюте корабля, на котором проводили эксперименты, выключали свет (16:37) и начинали регистрацию активности сердца. У всех тестируемых крабов в стрессе после хэндлинга и наклеивания датчика наблюдали очень высокие показатели ЧСС от 103 до 152 уд/мин и высокие показатели стресс индекса – СИ (от нескольких тысяч (1200) до 26 тыс. усл.ед). Отмечали высокие значения variability ритма сокращения сердца крабов в возбужденном состоянии (на 100% и более). Так, для краба № 3 в течение 10 минутной записи мгновенные показатели ЧСС варьировали от 57-78 до 103 уд/мин. Наутро только 3 из 6 тестируемых крабов демонстрировали ЧСС оперативного покоя, т.е. значения ЧСС, характерные для ракообразных в спокойном состоянии в дневное время суток (Кузнецова и др., 2010), т.е. от 25 уд/мин до 40 уд/мин), в то время, как у остальных эти значения превышали 75 уд/мин -104 уд/мин.

### Активность сердца при воздействии сукралозы

Эксперименты по воздействию сукралозы начинали на следующий день с тем, чтобы достичь фоновых ЧСС покоя, обозначенных выше. При добавлении раствора сукралозы в 3-х литровую емкость с морской водой и экспериментальным животным наблюдали повышение ЧСС краба с фоновых значений от 24 до 39 уд/мин до максимальных значений 29-44 уд/мин в течение первых 3-5 мин после поступления раствора сукралозы. Таким образом, продолжительность реакции, регистрируемая нами по повышению ЧСС, составляла всего 5 мин. Затем происходило быстрое снижение ЧСС вплоть до фоновых или несколько более низких значений, чем фоновые ЧСС, в течение последующих 10-15 мин (рис. 1). Такая динамика кардиоактивности крабов, вероятно, связана с первичным сенсорным восприятием, а затем с действием компенсаторных механизмов кардиосистемы животного в случае неопасного для его организма воздействия.

Добавление еще 100 мл маточного раствора сукралозы (вторая стрелка на рисунке), вызывало однотипную реакцию сердечной системы, иногда с более высокой амплитудой повышенных значений пульса до 37-43 уд/мин, однако и она через 25 мин ЧСС также снижалось до фоновых значений.



**Рис. 1.** Эффект воздействия сукралозы на ЧСС черноморского каменного краба.

Стрелками показано начало подачи сукралозы в аквариум (пояснения в тексте). По осям: ординат – ЧСС в уд/мин, абсцисс – реальное время проведения экспериментов.

В процессе экспозиции (1 сутки) ни у одного из животных не наблюдалось второй волны повышения ЧСС, которую мы обычно наблюдали у раков при действии высоких концентраций токсикантов (гидрохинона, нефти, подробно см. в статье Кузнецовой и др., 2010) [13], и не отмечали в случае нетоксического воздействия [14]. Вероятно, это свидетельствует о нетоксическом характере воздействия на крабов этого заменителя сахара в выбранных нами концентрациях - 1 и 3 г/л. При этом тот факт, что сукралоза проникла в ткани крабов, было установлено органолептически: мясо крабов приобрело приторно-сладкий вкус.

Необходимо отметить, что мы наблюдали некоторое снижение ЧСС (до 20% от ЧСС покоя) при суточном воздействии сукралозы. Сходные данные получены нами в лабораторных исследованиях на речных узкопалых раках *Astacus leptodactylus* Esch. (неопубликованные данные) при длительном воздействии сукралозы (недельная экспозиция). Интерпретация полученных данных представляется нам

пока затруднительной и, вероятно, требует дополнительных исследований, включающих и определение биохимических показателей стресса.

Полученные в настоящей предварительной работе данные позволяют сделать выводы, что использование биоэлектронной системы неинвазивной регистрации кардиоактивности бентосных беспозвоночных может быть весьма перспективным для скрининговых исследований по оценке биологических эффектов загрязнителей окружающей среды и определения состояния гидробионтов, а также при биоиндикации водной среды. Резкое изменение кардиоактивности (ЧСС и вариабельности ритма), как интегральной характеристики функционального состояния животного, свидетельствует об изменении состояния окружающей среды. Показано, что черноморские каменные крабы *Eriphia verrucosa* Forskal реагируют на появление в воде искусственного заменителя сахара - сукралозы, кратковременным изменением ритма активности сердца, а также, что даже столь высокая концентрация сукралозы (1 и 3 г/л) в течение непродолжительной по времени экспозиции не является для них токсичной.

#### Список литературы:

1. Основы экогеологии, биоиндикации и биотестирования водных систем // Под ред. В.В.Куриленко. Учебное пособие. СПб, Изд-во СПб. Ун-та. 2004. 448 с.
2. Bae M.J., Park Y.S. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review // Sci. Total Environ. 2014. V. 466–467. P. 635–649.
3. Depledge M.H., Andersen B.B. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. 1990. V. 96A (4). P. 473–477.
4. Depledge M.H., Galloway T.S. Healthy animals, healthy ecosystems // Front Ecol Environ. 2005. V. 3(5). P. 251–258.
5. Lagadic L., Caquet T. Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives? // Environmental Health Perspectives Supplements, V. 106, N. S2, April 1998.
6. Moore M.N., Depledge M.H.L., Readman J.W., Paul Leonard DR. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management // Mutat Res. 2004, Aug 18. 552(1-2). P. 247-268.
7. Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A., Dissanayake A., Jones M.B., Depledge M.H. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers // Aquat. Toxicol. 2004. V. 66. P. 267-278.
8. Kramer K.J.M., Jenner H.A., de Zwart D. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring // Hydrobiologia. 1989. V. 189. P. 433–443.
9. Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Komienko E.L., Fedotov V.P. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations. Journal of Environmental Bioindicators. 2008, V. 3, № 1. P. 23-34.
10. Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Trusevich V.V., Kurakin A.S. Peculiarities of valve movements and cardiac activity in bivalve mollusks under different stressors actions // J. Evol. Biochem. Physiol. 2009. V. 45, № 4. P. 432-434.
11. Tollefsen K.E., Nizzetto L., Huggett D.B. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment // Science of the Total Environment. 2012. 438. P. 510–516.
12. Hjørth M., Hansen J. H., Camus L. Effects of sucralose on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* in Disko Bay, Greenland // Chemistry and Ecology. October 2010. V. 26, N 5. P. 385–393.
13. Кузнецова Т.В., Сладкова С.В., Холодкевич С.В. Оценка функционального состояния раков в нормальной и токсической среде по их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 46, № 3 С. 203-210.
14. Kuznetsova T.V. Change of salinity of medium as a functional loading in estimating physiological state of the crayfish *Astacus leptodactylus* // J. Evol. Biochem and Physiol. September 2013. V. 49(5). P. 498-502.

**ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ  
НА АКТИВНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ  
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ И ХИМУСА У РЫБ РАЗНЫХ ВИДОВ**

В.В. Кузьмина<sup>1</sup>, Е.Л. Грачева<sup>2</sup>, А.Ф. Тарлева<sup>1</sup>, У.Ж. Тажимуратова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
152742 Борок Ярославская обл., Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова

Фенол и его производные (хлорфенол, нитрофенол, динитрофенол), 2 ммоль/л, вызывают значительное снижение активности гемоглобинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов.

*Ключевые слова:* рыбы, фенол, хлорфенол, нитрофенол, динитрофенол, пищеварение, протеазы.

В естественных условиях фенолы образуются в процессе метаболизма водных организмов, при биохимическом распаде и трансформации органических веществ, протекающих как в воде, так и в донных отложениях, не представляя опасности для экосистем [1, 7]. Однако фенолы и его производные используются в химической промышленности в качестве компонентов или предшественников синтетических смол, пластификаторов, поверхностно-активных и дубильных веществ, ядохимикатов, стабилизаторов, антисептиков и др. В наибольших концентрациях фенолы поступают в воду со стоками предприятий нефтеперерабатывающей, сланцеперерабатывающей, коксохимической, лесохимической и анилиноокрасочной промышленности, достигая 3800 мг/л. [2, 4, 7]. Сброс фенольных вод в водоемы и водотоки резко ухудшает их санитарное состояние, вызывает значительное изменение режима биогенных элементов, содержание кислорода и углекислого газа, а также оказывает негативное влияние на гидробионтов. При концентрации 75 мг/л фенол тормозит процесс биологической очистки в водоеме [1].

Фенолы относятся к числу наиболее опасных для гидробионтов ядов нервно-паралитического действия, вызывающих резкие нарушения функций центральной нервной системы и изменения в других системах организма. Рыбы – наиболее чувствительны к воздействию фенола. Летальные концентрации фенола и его производных для рыб одного вида или систематической группы различны: для рыб сем. карповых летальные концентрации фенола колеблются в пределах 10–25 мг/л, моонитрофенола – 10–22 мг/л, динитрофенола – 8–30, тринитрофенола – 170–200 мг/л [2, 4].

Субтоксическая концентрация фенола (3.12 мг/л) оказывает негативное влияние на условнорефлекторную деятельность гуппии *Lebistes reticulatus*. При перемещении рыб из раствора фенола в чистую воду процент проявления условных реакций и сила рефлексов у них увеличивается, однако латентные периоды остаются высокими. При концентрациях фенола 6.25 мг/л и 12.5 мг/л наблюдается резкое угнетение и торможение условнорефлекторной деятельности рыб. При перенесении особей из этих растворов в чистую воду условные рефлексы не восстанавливаются [3]. При исследовании токсического действия сублетальных концентраций фенола (3 мкг/л) на мезонефрос серебряного карася *Carassius auratus* установлено, что на тканевом уровне наиболее чувствительны к токсиканту интерстициальная ткань и сосуды органа, на клеточном уровне – эпителиоциты проксимальных сегментов и гранулоциты, на субклеточном уровне – митохондрии и фагосомы [5]. Сведения о влиянии фенола и его производных на активность пищеварительных ферментов у рыб в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы – изучение влияния фенола и его производных на активность гемоглобинлитических (преимущественно химотрипсиноподобных) протеиназ пищеварительного тракта у разных видов рыб.

Объекты исследования: лещ *Abramis brama* (L.) массой 300–325 г, густера *Blicca bjoerkna* (L.) массой 280–320 г, плотва *Rutilus rutilus* (L.) массой 160–210 г и речной окунь *Perca fluviatilis* L. массой 50–70 г из Рыбинского водохранилища, а также прудовый карась *Carassius carassius* (L.) массой 10 – 15г. Рыб после поимки в течение 1 ч доставляли в лабораторию. Сразу проводили биоанализ, изымали пищеварительный тракт и замораживали. Для получения ферментативно активных препаратов кишечник рыб помещали на ледяную баню, очищали от жира, разрезали вдоль, изымали содержимое и специальным скребком снимали слизистую оболочку переднего отдела кишечника. Слизистую и содержимое (химус) тщательно перемешивали. Затем отбирали требуемое количество материала для приготовления исходного гомогената. Пробы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 0.45 mM CaCl<sub>2</sub>) при температуре

0–4°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом. Затем полученный гомогенат дополнительно разводили раствором Рингера до конечного разведения – 1:99. Протеолитическую активность (преимущественно активность химотрипсина КФ 3.4.21.1) оценивали по увеличению концентрации тирозина методом Ансона [6] в некоторой модификации. В качестве субстратов использовали 1% раствор гемоглобина (рН 7.4). Для оценки влияния фенола и его производных на активность протеаз предварительно 0.25 мл раствора исследуемых веществ (2, 1, 0.5, 0.25 и 0.125 ммоль/л) и 0.25 мл гомогената инкубировали в течение 1 ч. Затем в каждую пробирку приливали 0.5 мл субстрата. Инкубацию гомогената и субстрата осуществляли при температуре 20°C в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Активность ферментов определяли в 4–5-ти повторностях с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате). Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учётом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчёте на 1 г сырой массы ткани (мкмоль/г·мин). Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре,  $\lambda=670$  нм. Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office 95, приложение Excel). Степень различия между средними арифметическими оценивали с помощью критерия Стьюдента при  $p \leq 0.05$ .

Полученные данные свидетельствуют о значительном различии уровня активности гемоглоблилитических протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у контрольных рыб (0) разных видов, относящихся по типу питания к группам типичных бентофагов – лещ, густера, плотва и карась, а также ихтиофагов-факультативных бентофагов – окунь (таблица). Уровень активности протеаз слизистой и химуса максимален у леща, минимален – у густеры. Активность протеаз у окуня, плотвы и карася достаточно близка. Под действием фенола минимальное уменьшение ферментативной активности наблюдается у леща, максимальное и достоверное – у густеры. Хлорфенол значительно уменьшает активность протеаз слизистой у всех видов рыб. Эффекты нитрофенола и динитрофенола у густеры близки таковым хлорфенола. У плотвы и окуня близки лишь эффекты динитрофенола и хлорфенола, в то время как действие динитрофенола слабее. У карася эффект динитрофенола существенно выше такового нитрофенола, причем величина показателя достоверно отличается от контроля.

**Таблица.** Влияние фенола и его производных на активность гемоглоблилитических протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб Рыбинского водохранилища, мкмоль/(г·мин)

Фенол и его производные	Ферментативная активность				
	Лещ	Густера	Плотва	Карась*	Окунь
Слизистая оболочка					
0	1.72±0.11 (100)	0.74±0.13 (100)	1.33±0.07 (100)	1.49±0.01 (100)	1.29±0.10 (100)
Фенол	1.69±0.08 (1.8)	0.39±0.06 (47.3)*	1.18±0.18 (11.3)	1.37±0.16 (8.1)	1.10±0.18 (15.4)
Хлорфенол	1.49±0.16 (13.4)	0.35±0.04 (52.7)*	0.78±0.07 (41.4)*	1.21±0.16 (18.8)	0.86±0.10 (33.9)*
Нитрофенол	1.41±0.11 (18.0)*	0.31±0.08 (58.1)*	0.71±0.08 (46.6)*	0.98±0.13 (34.2)*	0.86±0.10 (33.9)*
Динитрофенол	1.41±0.14 (18.0)*	0.35±0.07 (52.8)*	0.90±0.10 (32.3)*	0.63±0.16 (57.7)*	0.98±0.14 (24.6)*
Химус					
0	1.80±0.12 (100)	0.55±0.11 (100)	1.64±0.10 (100)	-	1.76±0.09 (100)
Фенол	1.61±0.10 (10.6)	0.43±0.11 (21.8)	1.14±0.13 (30.5)*	-	1.69±0.10 (4.6)
Хлорфенол	1.41±0.13 (21.7)	0.31±0.08 (43.6)*	0.71±0.10 (56.7)*	-	1.45±0.10 (17.7)
Нитрофенол	1.61±0.11 (10.6)	0.24±0.04 (56.4)*	0.51±0.08 (68.8)*	-	1.33±0.07 (24.5)*
Динитрофенол	1.21±0.10 (32.8)*	0.24±0.04 (56.4)*	0.51±0.08 (68.8)*	-	1.45±0.10 (17.7)

Примечание. Цифры в скобках – относительная активность протеиназ, % торможения по отношению к контролю, принятому за 100. \* – достоверное отличие от контроля. У карася использована вся кишка.

Результаты опытов по влиянию фенола и его производных на активность гемоглоблинитических протеаз химуса у исследуемых видов также свидетельствуют о разной степени их воздействия на ферменты рыб. При этом в кишечнике карася химус не обнаружен, а у густеры обнаружен только в дистальном отделе кишечника. В контроле (0) ферментативная активность у леща, окуня и плотвы близка, причем выше, чем у густеры примерно в 3 раза. Под действием фенола активность протеаз химуса у окуня практически не меняется, у леща уменьшается незначительно. У рыб двух других видов эффекты выражены сильнее. Под действием хлорфенола ферментативная активность значительно уменьшается у всех видов рыб, причем достоверно у плотвы и густеры. Эффекты нитрофенола и динитрофенола у густеры и плотвы одинаковы, причем достоверно отличаются от контроля, в то время как у леща достоверное уменьшение активности по сравнению с контролем наблюдается лишь при действии динитрофенола. Эффекты нитрофенола и динитрофенола у плотвы и густеры равны и близки таковым хлорфенола. У окуня близки эффекты динитрофенола и хлорфенола, в то время как действие нитрофенола выражено сильнее. Более низкие концентрации (1.0, 0.5, 0.25 и 0.125 ммоль/л) фенола и его производных, как правило, вызывают или слабое снижение, или незначительное увеличение уровня ферментативной активности. Лишь при исследовании влияния фенола (0.5 и 0.25 ммоль/л) на активность протеаз химуса у плотвы был зарегистрирован значительный ингибирующий эффект (-52 и -38%). Аналогичная тенденция отмечена при исследовании хлорфенола. Хлорфенол в концентрации (1.0, 0.5 и 0.25 ммоль/л) вызывал последовательное снижение эффекта торможения на 45, 24 и 19% соответственно.

При обсуждении полученных результатов, прежде всего, следует отметить отсутствие зависимости активности гемоглоблинитических протеаз кишечника от характера питания рыб. Так, у леща уровень суммарной ферментативной активности слизистой и химуса соответствует 3.52, у окуня и плотвы несколько ниже – 3.05 и 2.97 мкмоль/(г·мин), у карася и густеры существенно ниже, чем у леща – 1.49 и 1.29 мкмоль/(г·мин) соответственно. Также важно подчеркнуть, что концентрация (2 мМ или 188.2 мг/л) соответствует или ниже концентраций фенола, наблюдающихся при антропогенном загрязнении водоемов [2, 4, 7]. Кроме того, необходимо обратить внимание на разную чувствительность отдельных видов рыб к фенолу. Действительно, несмотря на то, что лещ, густера, плотва и карась относятся к одному семейству, процент торможения активности гемоглоблинитических протеаз, функционирующих в слизистой, значительно варьирует (от 1.8 до 47.3%). При этом наиболее близкие в систематическом отношении лещ и густера характеризуются наибольшими различиями в реакции гемоглоблинитических протеаз на фенол. Вместе с тем у карася, плотвы и окуня, в большей степени различающихся по таксономии, процент торможения достаточно близок (8.1–15.4%).

Производные фенола в эквимолярных концентрациях оказывают более выраженный ингибирующий эффект. Чувствительность к хлорфенолу гемоглоблинитических протеаз слизистой выше по сравнению с таковой фенола максимум в 7.4 (лещ), химуса – в 3.8 (окунь). Чувствительность к нитро- и динитрофенолу гемоглоблинитических протеаз слизистой кишечника выше, по сравнению с таковой фенола максимум в 10.0 раз (лещ), химуса лишь в 1.8 раз (лещ). Эти результаты на первый взгляд свидетельствуют о том, что производные фенола более токсичны, чем фенол. Однако в данной работе сопоставлялись эффекты эквимолярных концентраций фенола и его производных. Поскольку молекулярные массы исследованных веществ были различными, то большее влияние производных фенола на активность гемоглоблинитических протеаз, скорее всего, связано с их большей молекулярной массой. При этом полученные данные отражают снижение активности протеаз под влиянием фенола и его производных, поступающих в пищеварительный тракт при залповых сбросах промышленных предприятий с водой, а не в составе пищи.

Различная степень влияния фенола и его производных на гемоглоблинитические протеазы рыб одного и того же вида, по всей вероятности, связана с различиями в аминокислотном составе и структуре белковых глобул ферментов у рыб разных видов. По всей вероятности, это связано с тем, что указанные вещества, влияя на регуляторные центры протеиназ, изменяют конформацию активных центров ферментов, в результате чего снижается эффективность взаимодействия ферментов и субстратов. Степень влияния фенола на активность гемоглоблинитических протеаз химуса значительно отличается от таковой слизистой оболочки кишечника. Этот факт заслуживает особого внимания, поскольку действия фенола на ферменты опосредовано рядом факторов.

Важно отметить, что в слизистой оболочке кишечника рыб функционирует как протеиназы, адсорбированные из полости, так и собственно кишечные пептидазы, в то время как в полости кишечника доминируют панкреатические по происхождению протеиназы, преимущественно трипсин и химотрипсин. Не меньшее значение имеют различия в составе сред, в которых фенол влияет на скорость ферментативной реакции. Учитывая то обстоятельство, что химус может содержать продукты деградации до сотни различных объектов питания, можно предположить, что некоторые из компонентов химуса могут усиливать или ослаблять влияние фенола. В пользу этого предположения свидетельствует

меньший разброс величин торможения активности гемоглобинлитических протеаз химуса по сравнению с таковыми слизистой оболочки кишечника у рыб сем. карповых (10.6–30.5%), спектр питания которых достаточно близок, а также значительное отличие этого показателя у окуня (4.6%). Последнее может быть связано с тем, что окунь по типу питания является бентофагом-факультативным ихтиофагом, в пище которого могли присутствовать не только беспозвоночные, но и рыбы.

Наконец, нельзя не отметить, что меньшие концентрации фенола и его производных (1.0, 0.5 и 0.25 ммоль/л или 47.1, 23.6 и 11.8 мг/л для фенола соответственно) не оказывают прямого негативного эффекта на активность гемоглобинлитических протеаз у большинства исследованных видов рыб. Особого внимания заслуживает тот факт, что наименьшая из использованных концентраций фенола близка таковой в хронических экспериментах на гуппи *Lebistes reticulatus* (12.5 мг/л). Однако при этом наблюдается резкое угнетение и торможение условнорефлекторной деятельности рыб [3]. Не исключено, что в условиях *in vivo* фенола и его производных оказывают опосредованное действие на активность протеаз. При этом токсичными становятся значительно меньшие концентрации. Последнее связано как с тем, что синтез и транслокация пищеварительных гидролаз находится под нейро-гормональным контролем, так и с тем, что фенол и его производные оказывают воздействие на метаболизм и другие системы организма рыб. Косвенно это предположение подтверждают результаты исследования токсического действия сублетальных концентраций фенола (3 мкг/л) на мезонефрос серебряного карася *Carassius auratus*. В этих опытах фенол вызывал нарушение целостности проксимальных сегментов в нефрогенной ткани, обширные очаги некроза и кровоизлияния в интерстициальной ткани. Помимо этого выявлены патологические изменения ультраструктуры плазматических клеток, повреждение внутренней мембраны митохондрий и целый ряд других изменений [5].

Таким образом, в условиях *in vitro* фенол и его производные в концентрации 2 ммоль/л значительно снижают активность гемоглобинлитических протеаз кишечника у рыб разных видов. Степень их воздействия зависит от вида рыб, а также локализации фермента (слизистая оболочка или химус). Более низкие концентрации (1.0, 0.5, 0.25 и 0.125 ммоль/л) фенола и его производных, как правило, вызывают или слабое снижение, или незначительное увеличение уровня ферментативной активности. Предполагается, что в условиях *in vivo* фенол и его производные могут оказывать опосредованное действие на активность протеаз. При этом токсичными становятся значительно меньшие концентрации. Наличие фенола и его производных в воде и пище рыб в концентрациях, встречающихся при залповых сбросах, снижает активность гемоглобинлитических протеаз кишечника, и, как следствие эффективность начальных этапов ассимиляции белковых компонентов пищи рыб.

#### Список литературы

1. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М., Изд. Высшая школа, 1974. 214 с.
2. Лукьяненко В. И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность 1983. 320с.
3. Матей В.Е. Влияние субтоксических концентраций фенола на условнорефлекторную деятельность гуппи. – Гидробиол. журн., 1970, Т.6, №3, С. 100-103.
4. Флеров Б. А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных // СПб. Наука. 1989. 144 с.
5. Флерова Е.А., Заботкина Е.А. Токсическое действие сублетальных концентраций фенола и нафталина на мезонефрос серебряного карася // Токсикол. вестник. 2012. №4. С. 49-52.
6. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. 1938. Vol. 22. P. 79-83.
7. Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity // Polish J. Environ. Stud. 2007. V. 16, N. 3. P. 347-362.

УДК 574.24

### ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ НА МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ

С.П. Кукла<sup>1</sup>, В.В. Слободскова<sup>2</sup>, Е.В. Журавель<sup>1</sup>, В.П. Челомин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет  
690600 Владивосток, Россия, [cthulhu-fhtan@mail.ru](mailto:cthulhu-fhtan@mail.ru)

<sup>2</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН  
690041 Владивосток, Россия

В работе исследуется генотоксический эффект наночастиц оксида меди и ионов меди на *Mytilus trossulus*, при помощи метода ДНК-комет. Проведена оценка уровней аккумуляции наночастиц оксида меди и ионов меди в тканях *M. trossulus*.

*Ключевые слова:* метод ДНК-комет, генотоксичность, наночастицы, аккумуляция.

Наночастицы – это частицы вещества с диаметром менее 100 нм, которые благодаря своим малым размерам и уникальным оптическим, каталитическим, электрическим и физиологическим свойствам обладают огромным потенциалом для применения в различных отраслях производств. Они могут быть углеродными, металлическими, сделанными из оксида металла, полупроводниковыми, органическими полимерами и т.д. В одну группу наночастицы объединены потому, что малый размер сам по себе приводит к проявлению необычных физико-химических свойств. На сегодняшний день основные отрасли, в которых используются наночастицы - это здравоохранение, электроника, химия, текстильная промышленность, производство товаров для дома. Наночастицы оксида меди входят в состав многих приспособлений, таких как газовые датчики, катализаторы, батареи, высокотемпературные сверхпроводники, преобразователи солнечной энергии, компьютерные процессоры, чернила принтеров, антивозрастные крема для кожи и минеральные добавки [1,2], используются в качестве антибактериальной добавки.

Однако интенсивное производство и использование наночастиц может привести в конечном итоге к попаданию в морские прибрежные воды [3]. Для наночастиц характерна высокая проникающая способность, большая площадь поверхности и химическая активность. Исследования показывают, что наночастицы могут проникать в организм животных и человека через покровы тела, при случайном вдыхании, а также с водой и пищей. По мнению специалистов, негативному воздействию наночастиц в наибольшей степени подвержены водные организмы. Наночастицы попадают в жабры и пищеварительный тракт водных обитателей, и, возможно, могут перемещаться по пищевым цепям. Присутствие наночастиц в воде снижает плодовитость гидробионтов, вызывает у них различные физиологические изменения, нарушения поведения и повышенную смертность. На токсичность влияет размер частиц, их химическая природа, растворимость в воде. Известно, что наночастицы оксида цинка, меди и серебра более токсичны, чем наночастицы других металлов и оксидов металлов. Однако, данные о токсичности наноматериалов весьма противоречивы и неоднозначны, в том числе практически не изучены эффекты хронического влияния наночастиц.

Таким образом, очень важно оценить возможное воздействие наночастиц на водные экосистемы. И хотя существуют работы, показывающие их токсическое влияние на рыб, земноводных, человека [4], работ, посвящённых воздействию наночастиц на морских беспозвоночных, довольно мало.

Двустворчатые моллюски, благодаря своей способности отфильтровывать большие объёмы воды и аккумулировать в своих органах различные поллютанты, широко используются в токсикологических исследованиях [3]. Проблему воздействия наночастиц, и в частности оксида меди, на морских двустворчатых моллюсков, уже несколько лет изучает Т. Гомес с коллегами [5,6] на примере *Mytilus galloprovincialis*. Подобных работ с моллюсками, населяющими зал. Петра Великого, еще не проводилось.

В связи с чем, целью нашего исследования было изучение генотоксического воздействия наночастиц оксида меди и ионов меди, используя метод ДНК-комет, а так же сравнить уровни аккумуляции и распределение наночастиц и ионов меди в тканях *Mytilus trossulus*.

Моллюсков собирали в бухте Средняя залива Восток. Особи размером от 4,5 до 5 см в течение 7 дней содержались в аэрируемых аквариумах с добавленными в воду нано формой оксида меди (SIGMA – ALDRICH, размер частиц менее 50 нм) и ионной формой ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ) меди в концентрации 20 мкг/л. Контрольные животные содержались в аквариуме с чистой морской водой из системы аквариальной МБС «Восток» ИБМ ДВО РАН. Вода в аквариумах менялась 2 раза в день.

По прошествии 7 дней экспозиции мидии (по 8 организмов из каждой группы) были отпрепарированы, из них были извлечены жабры и пищеварительная железа.

В работе использовали щелочной вариант кометного анализа, адаптированного к морским организмам.

Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc.

Для оценки степени повреждения ДНК был использован метод визуальной классификации, предложенной А. Коллинзом с коллегами. Данный подход предполагает деление комет на 5 классов C0, C1, C2, C3, C4 по степени поврежденности. Исходя из количества комет, принадлежащих к каждому классу, высчитывали индекс генетического повреждения:

$$\text{ИГП} = (C1+2\cdot C2+3\cdot C3+4\cdot C4) / (C0+C1+C2+C3+C4).$$

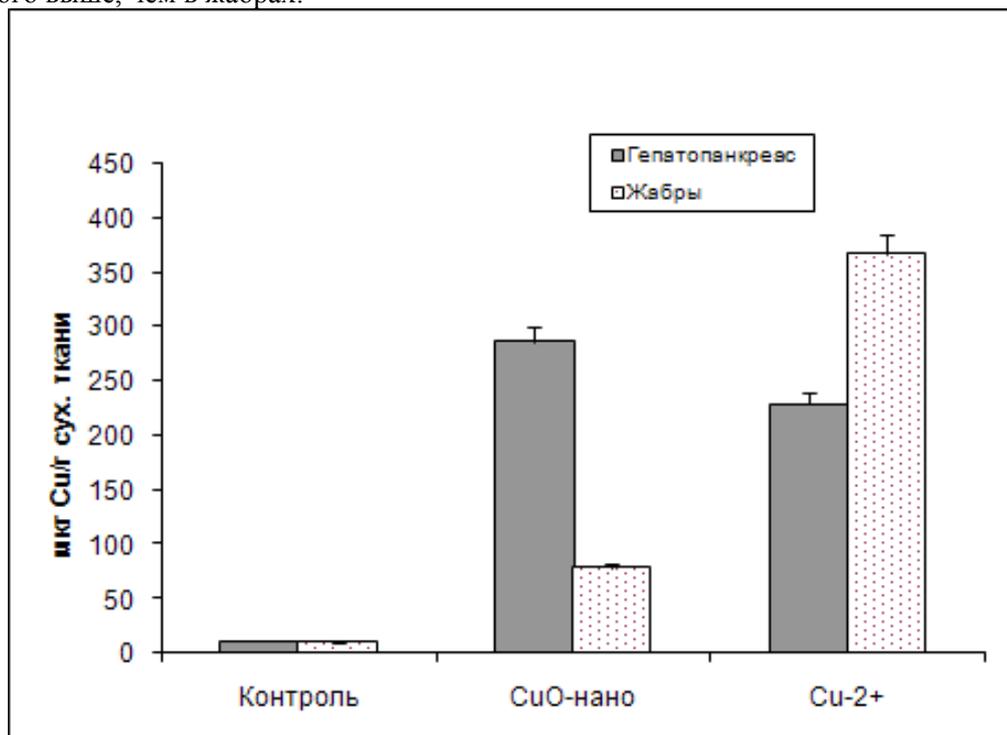
В каждой экспериментальной группе моллюсков анализировали по 8 слайдов (1 слайд = 1 особь), содержащих не менее 50 комет в каждом.

После 7 дневной экспозиции в обеих исследуемых группах количество меди в десятки раз превысило концентрацию меди в клетках контрольной группы.

Концентрация металла в жабрах моллюсков, подвергшихся воздействию ионной формы меди, составила 365,8 мкг/г сухого веса, в то время как её концентрация в жабрах мидий, подвергшихся воздействию наночастиц оксида меди, составила 78,9 мкг/г сухого веса (рис. 1).

Это говорит о том, что усвоение ионов меди поверхностью жабр, несмотря на регуляторную систему клеток, идёт высокими темпами, в то время как наночастицы усваиваются жабрами сравнительно плохо. Концентрация меди в пищеварительной железе мидий, подвергшихся экспозиции оксида меди, почти в 4 раза меньше по сравнению с таковой в эксперименте с ионами меди.

Известно, что агрегированные наночастицы преимущественно поглощаются пищеварительной системой мидий, в то время как жабры более чувствительны к содержанию растворенных ионов металлов [6]. В жабрах происходит сортировка частиц: более крупные агрегаты направляются в систему пищеварения, по мере продвижения измельчаясь, накапливаясь в гемолимфе и гемоцитах. Соответственно, и в нашем эксперименте с наночастицами их содержание в пищеварительной железе оказалось намного выше, чем в жабрах.



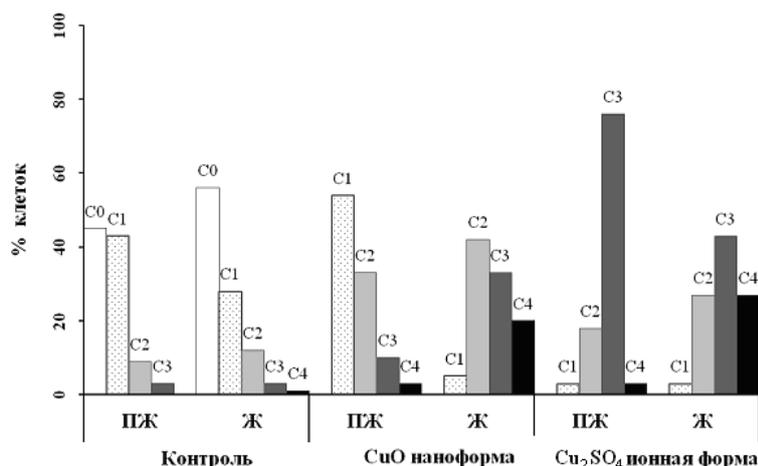
**Рис. 1.** Содержание меди в органах *M. trossulus* после 1 недели экспозиции (аккумуляция)

Возможно, слабая аккумуляция меди в клетках жабр связана с покрывающим их мощным слоем слизи. Большая часть частиц, несмотря на свои нано-размеры, вероятно, вязнет в ней, не добравшись до органа непосредственно. Напротив, для ионов меди выделения клеток не являются столь существенным барьером. В случае с пищеварительной железой подобного барьера между органом и наночастицами не существует, вследствие чего масштабы их усвоения даже несколько превышают ионную медь. Кроме того главным способом поступления наночастиц в клетку является эндоцитоз, имеющий наибольшую эффективность в клетках именно пищеварительной железы [3]. В опытах Гомес [5] была отмечена та же закономерность.

После 7-дневной экспозиции мидий в тестируемых растворах с концентрацией 20 мкг/л индекс генетического повреждения (ИГП) у моллюсков контрольной группы составлял 0,7 для пищеварительной железы и 0,63 для жабр.

В клетках контрольной группы моллюсков большинство комет относилось к типам C0 и C1, что свидетельствует о низком уровне повреждения (рис. 2).

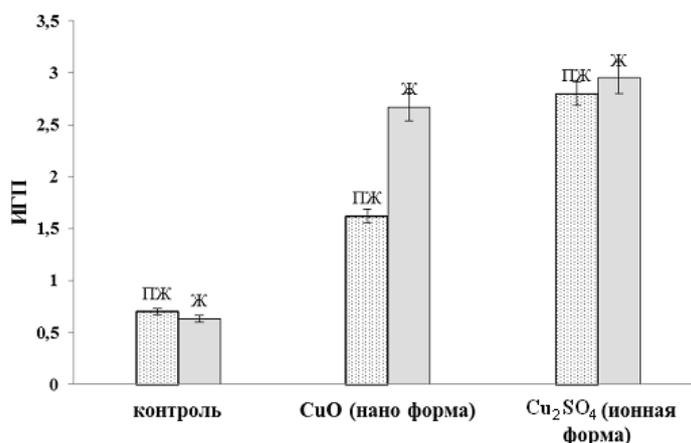
В клетках экспериментальных же животных кометы типа C0 практически отсутствовали. После экспозиции в растворе ионов меди и в клетках жабр, и пищеварительной железы преобладали кометы типа C3, тогда как в опыте с наночастичкой CuO в клетках жабр в большей степени присутствовали кометы типов C2 и C3, а в пищеварительной железе – C1 и C2.



**Рис. 2.** Распределение комет по классам в клетках *M. trossulus*.

ИГП клеток пищеварительной железы организмов, подвергшихся воздействию наночастиц CuO, превысил показатели контроля более чем в два раза и составил 1,62, для клеток жабр ИГП превышал контрольные значения более чем в 4 раза, и составил 2,67 (рис. 3).

У организмов, подвергшихся воздействию ионной формы меди, ИГП ДНК клеток обоих исследуемых органов также намного превышал показатели контроля (2,8 для пищеварительной железы и 2,95 для жабр).



**Рис. 3.** Индекс генетического повреждения (ИГП) после недельной экспозиции. Ж – жабры, ПЖ – пищеварительная железа.

Высокий ИГП свидетельствует о нарушении равновесного состояния ДНК и накопления в ней повреждений, которые в дальнейшем могут привести к гибели организма или нарушению генофонда популяции. Из результатов эксперимента видно, что после хронического воздействия любой из форм меди сильнее всего повреждается ДНК жабр. Это связано с тем, что жабры являются главным контактным органом моллюска.

В заключении можно отметить, что аккумуляция меди в ионной и наночастиц форме вызывает деструктивные изменения молекулы ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы двусторчатого моллюска *Mytilus trossulus*. При воздействии наночастиц меди на *M. trossulus*, накопление ее, главным образом, происходит в клетках пищеварительной железы моллюсков.

*Работа поддержана грантом Правительства Российской Федерации, договор № 11.G34.31.0010 и программой «Научный фонд ДВФУ».*

#### Список литературы

1. Karlsson H. L., Cronholm P., Gustafsson J., Moller L. Copper Oxide Are Highly Toxic between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes // Chem. Res. Toxicol. 2008. Vol. 21. Pp. 1726-1732.

2. Shaw B. J., Handy R. D. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions // *Environment International*. 2011. Vol. 37. Pp. 1083–1097.
3. Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gallo G. Bivalve mollusks as a unique target group for nanotoxicity // *Marine Environment Research*. 2012. Vol. 76. Pp. 16 - 21.
4. Wang Z., Li N., Zhao J., White C. J., Qu P., Xing B. CuO Nanoparticle Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export and Genotoxicology // *Chemical Research in Toxicology*. 2012. Vol 25. Pp 1512 – 1521.
5. Gomes T., Pereira C.G., Cardos C., Pinheiro J.P. Cancio I. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytillus galloprovincialis* // *Aquatic Toxicology*. 2012. Vol. 118-119. Pp. 72-79.
6. Gomes T., Araujo O., Pereira R., Almeida A. C., Cravo A., Bebianno M. J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Marine Environmental Research*. 2013. Vol. 84. Pp. 51-59.

УДК 594.1:574.64+591.05

## ДИНАМИКА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЛОВИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ КАДМИЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Т.Б. Лапирова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Борок, Некоузский р-он, Ярославская обл., Россия, ltb@ibiw.yaroslavl.ru*

Представлены результаты исследования действия ионов кадмия на ряд физиолого-биохимических параметров пресноводного двустворчатого моллюска *Unio pictorum* L. Показано сходство реакции показателей гемолимфы и отличие механизмов углеводного обмена в тканях у моллюсков и позвоночных животных в условиях токсического воздействия.

*Ключевые слова:* перловица, кадмий, гемолимфа, ткани, белок, лизоцим, гликоген, глюкоза

Двустворчатые моллюски – типичные представители малакофауны водных экосистем Европейской части России. Благодаря их широкому распространению, достаточно жесткой привязанности к определенному месту обитания, относительно несложному отлову логично встает вопрос об использовании этой группы животных как индикаторного объекта в комплексных исследованиях по оценке качества природных вод. Однозначно этот вопрос до сих пор не решен, необходимо накопление фактических данных по основным параметрам физиологического статуса этих животных в естественных условиях обитания, а также реакции их на воздействие различных факторов. Эта информация также чрезвычайно актуальна не только при исследовании качества воды и донных отложений водоемов, но и в сравнительно-эволюционном плане. На настоящий момент таких данных недостаточно, они неоднозначны, практически не изучены биохимические показатели гемолимфы пресноводных моллюсков, крайне мало сведений о реакции их на действие различных факторов, в том числе токсических.

В связи с вышеизложенным, целью работы явилось изучение динамики основных иммунофизиологических показателей гемолимфы и тканей перловицы в присутствии ионов кадмия и после переноса моллюсков в чистую воду.

В качестве объекта исследования использовали перловицу обыкновенную (*Bivalvia*, *Eulamellibranchia*, *Unio pictorum* L.). Средний размер моллюсков составил 77±6 мм. Отбирали материал в августе месяце в Борке недалеко от выхода судоходного канала в Рыбинское водохранилище с глубины около 150 см. Температура воды в водоеме и далее во время эксперимента колебалась в пределах 20-22°C. Моллюски были рассажены в аэрируемые пластиковые лотки с водопроводной водой и после недельной акклимации подопытную группу поместили в раствор токсиканта. В качестве токсического агента использовали соль CdCl<sub>2</sub> в концентрации 0.5 мг/л по металлу, меняли его 2 раза в неделю, кормили моллюсков через день сухим кормом для рыб. Пробы отбирали за сутки до начала опыта (нулевая точка) и далее через 1; 3; 7; 14; 21 и 28 суток. Затем подопытных перловиц перенесли в чистую воду на 28 суток (восстановительный период), после чего вновь взяли материал для исследования.

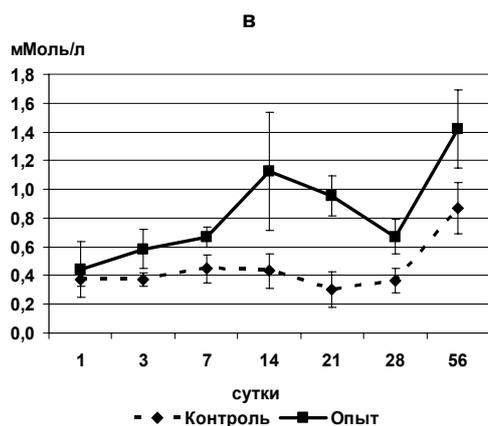
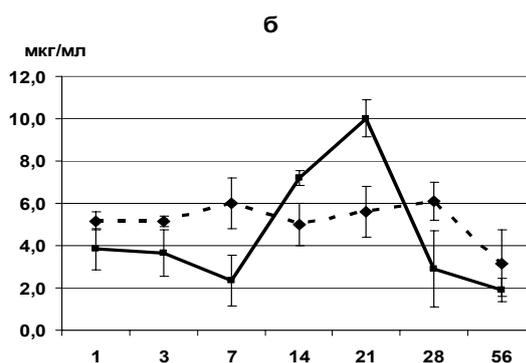
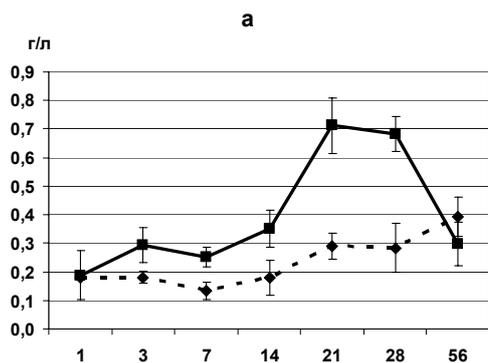
Активность лизоцима в экстрактах тканей определяли турбидиметрическим методом [1], концентрацию глюкозы – глюкозооксидазным, общего белка – биуретовым методом. Гликоген в тканях определяли по методике, применяемой при работе на мидиях [2].

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Excel. Данные представлены в виде  $M \pm m$  – средняя  $\pm$  ошибка средней, достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при  $P \leq 0.05$ .

Уже на 1-3 сутки у подопытных животных отмечено небольшое ослизиение, ослабление сердцебиения. После 14 сут. более, чем у половины особей, раковина находилась в приоткрытом состоянии, что свидетельствует о снижении мышечного тонуса. В эти же сроки стала происходить гибель моллюсков, в целом за период наблюдений смертность составила около 10%.

### Гемолимфа.

**Общий белок.** В течение первых 14 суток экспозиции в токсиканте происходит незначительный рост уровня общего белка гемолимфы относительно контроля. На 21-28 сутки отмечен резкий пик показателя, значительное его превышение сохраняется до конца эксперимента (Рис. 1а).



**Рис. 1.** Динамика изменений иммунофизиологических показателей гемолимфы перловицы.  
а – концентрация общего белка;  
б – лизоцима;  
в – глюкозы.

Исследования, проведенные на моллюсках, показали, что они, как и животные более высоких систематических групп, способны к образованию металлотионеинов. Есть сведения, что под влиянием кадмия происходит их активизация [3]. Эти факты позволяют предположить возможность синтеза в гемолимфе моллюсков и других защитных агентов белковой природы, о чем свидетельствует выявленный нами рост общего белка гемолимфы у подопытных животных.

**Лизоцим.** Анализ уровня содержания лизоцима подтверждает это предположение. Как видно на рис. 1б, Действие кадмия вызвало значительные колебания показателя в течение эксперимента. На начальном этапе воздействия уровень фермента в гемолимфе подопытных животных был ниже, чем у контрольных. На 14-21 сутки значения показателя резко возросли и достоверно превысили контрольный уровень. Таким образом, пик содержания лизоцима у подопытных особей по срокам близок с подъемом концентрации общего белка гемолимфы, однако, был менее продолжительным. Падение концентрации фермента к концу опыта свидетельствует об истощении ресурсов гуморальной защиты моллюсков в условиях продолжающегося токсического стресса. Такие фазовые колебания активности фермента могут свидетельствовать о развитии универсальной неспецифической реакции, присущей как теплокровным, так и низшим позвоночным, в том числе рыбам.

**Глюкоза.** Как следует из литературных данных, уровень гликемии у низших позвоночных намного менее стабилен, чем у млекопитающих. Наши исследования показывают, что в норме размах показателя у моллюсков несколько ниже, чем у рыб, однако в стрессовых условиях эта величина резко возрастает.

Превышение уровня глюкозы, достоверно значимое с 3-их суток воздействия (Рис. 1в), может свидетельствовать о том, что у моллюсков, стрессовые воздействия также вызывают рост уровня гликемии.

Дальнейший рост показателя может объясняться и тем, что организм увеличивает в гемолимфе уровень глюкозы – основного энергетического ресурса – для адаптации в экстремальных условиях. На графике видно, что в момент пика реакции показателя (14-е сутки) индивидуальная изменчивость показателя также достигает максимума. Значительное превышение показателя у подопытной группы по сравнению с контрольной после восстановительного периода, свидетельствует о том, что полной нормализации углеводного обмена у животных не произошло.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что у моллюсков, как и у животных более высоких систематических групп, в ответ на токсический стресс, вызванный действием кадмия, развивается неспецифическая стрессовая реакция, сопровождающаяся фазовыми колебаниями основных физиологических показателей. Происходит рост общего белка гемолимфы, концентрации защитных агентов, а также уровня гликемии. Наиболее выраженная реакция отмечена в основном на 14-21 сутки с начала воздействия.

Помимо исследования динамики биохимических параметров гемолимфы, мы проанализировали реакцию на воздействие кадмия ряда показателей, а именно глюкозы, белка и гликогена в тканях различных органов перловицы – мантии, ноги и печени.

### Содержание белка и глюкозы в тканях

**Мантия.** Уровень растворимого белка в мантии у подопытных моллюсков резко упал сразу после начала воздействия токсиканта. Но, начиная с 7-ых суток, показатели обеих групп рыб практически не отличались.

Концентрация глюкозы также была ниже у перловицы, экспонированной в соли кадмия, но, в отличие от белка, эта разница сохранилась до конца эксперимента.

**Нога.** Ход кривых изменений концентрации белка и глюкозы в контрольной и опытной группах моллюсков был очень сходен с таковым в мантии.

**Печень.** Наиболее выраженные сдвиги показателей выявлены в печени. Уровень содержания белка в этом органе в течение всего эксперимента у подопытных рыб был ниже, чем у контрольных (Рис. 2). Важно отметить, что это различие сохранилось и после восстановительного периода и стало статистически значимым.

Так же, как и в тканях мантии и ноги, в печени под действием кадмия выявлено снижение концентрации глюкозы. При этом, как и по белку, в отличие от других органов, в печени эта разница сохранилась после переноса животных в чистую воду и была статистически достоверной. Полученные результаты позволяют заключить, что наибольшее повреждающее влияние токсикант оказал на печень, что, скорее всего, обусловлено ее приоритетной ролью в процессах детоксикации.

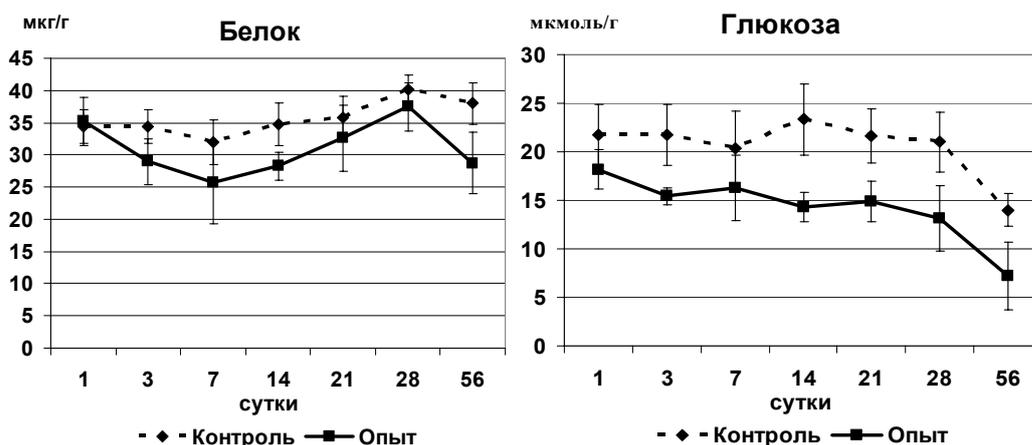


Рис. 2. Концентрация белка и глюкозы в печени

### Гликоген тканей.

Известно, что у высших позвоночных действие неблагоприятных факторов, как правило, вызывает снижение содержания гликогена в тканях [4]. В нашем эксперименте в течение всего срока наблюдений не было выявлено заметного сдвига уровня показателя ни в одной из исследованных тканей подопытных животных. Это подтверждает высказанное рядом авторов предположение о том, что механизм углеводного обмена у моллюсков отличается от такового теплокровных животных.

Анализ литературных данных свидетельствует, что в эволюционном плане эти отличия проявляются уже у рыб. К ним относится, в первую очередь, более низкая интенсивность углеводного обмена, обусловленная малой активностью ряда ферментов по сравнению с млекопитающими и птицами [5]. У моллюсков выявлены также отличия в системе регуляции данного процесса. Как показали исследования на устрицах [6], при экспозиции в кадмии как анаэробный, так и аэробный пути метаболизма активизируются, возрастает активность ряда ферментов, участвующих в реакциях углеводного обмена, в том числе гексокиназы. Это позволяет предположить, что уровень гликогена может поддерживаться на достаточно стабильном уровне за счет резервов глюкозы органа, о чем может свидетельствовать и выявленное нами значительно более низкое по сравнению с контролем содержание глюкозы во всех исследованных тканях подопытных особей. Также стоит иметь в виду способность моллюсков к глюконеогенезу, т.е. образованию гликогена не только из углеводного материала, но и других соединений.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы.

1. Динамика основных иммунофизиологических показателей гемолимфы перловицы при действии кадмия однозначно свидетельствует о развитии неспецифической стрессовой реакции, сходной с таковой у животных более высоких систематических групп. Эта реакция сопровождается фазовыми колебаниями основных физиологических показателей, усилением выработки защитных агентов.

2. Наибольшее повреждающее влияние кадмия среди всех исследованных органов выявлено в печени.

3. Анализ показателей гемолимфы и тканей перловицы после восстановительного периода свидетельствует о значительных нарушениях обмена веществ, вызванных кадмиевой интоксикацией, что может быть причиной снижения общей резистентности и адаптивных возможностей организма.

4. Полученные результаты подтверждают предположение о возможном наличии у моллюсков отличий в метаболизме углеводов по сравнению с высшими позвоночными.

#### Список литературы

1. Практикум по иммунологии: Учеб. пособие/ Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. / М.: Изд-во МГУ, 2001. 224 с.
2. Minhorst A., Liebezeit G. Determination of Glycogen in Tissues of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L./ *Senckenbergiana maritima*. 2003. V. 32. № 1-2. P. 191-193.
3. Павловская В. В. Экологические аспекты реакции моллюсков *Dreissena Polymorpha* (Pallas, 1771) на действие ионов тяжелых металлов/ Автореф. дисс... к.б.н. Калининград, 2007.
4. Северин С.Е. Биологическая химия./ М: издательская группа «ГЭОТАР - Медиа», 2011. 624 с.
5. Плисецкая Э.М. Гормональная регуляция углеводного обмена у низших позвоночных./ Л.: Наука, 1975. 216 с.
6. Иванина А. В. Физиологические эффекты кадмия на модели виргинских устриц//Автореф. дисс... к.б.н. Казань, 2012.

УДК 574.2, 574.5

### ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ СТРЕСС-АДАПТАЦИИ И ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ГАСТРОПОД ВИДА *LUMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ И НОРМОКСИИ

Ю.А. Лубяга<sup>1</sup>, Е.В. Мадьярова<sup>2</sup>, А.Н. Гурков<sup>1</sup>, Е.П. Шапова<sup>1</sup>,  
М.Д. Димова<sup>1</sup>, А.С. Хомич<sup>3</sup>, Д.В.Аксенов-Грибанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет»

664003, г. Иркутск, К. Маркса 1, Россия, [yuliya.a.lubyaga@gmail.com](mailto:yuliya.a.lubyaga@gmail.com)

<sup>2</sup>НИИ биологии ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет»

664025, г. Иркутск, Ленина 3, Россия, [denis.axengri@gmail.com](mailto:denis.axengri@gmail.com)

<sup>3</sup>Международный Государственный Экологический Университет им. А. Д. Сахарова  
220070, ул. Долгобродская, 23, г. Минск, Республика Беларусь

В исследовании изучена динамика изменения содержания общего белка, гемоцианина, лактата, ионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) в норме, в условиях индуцированной гипоксии и последующей нормоксии в гемолимфе *L. stagnalis*.

*Ключевые слова:* гастроподы, стресс, ионная регуляция

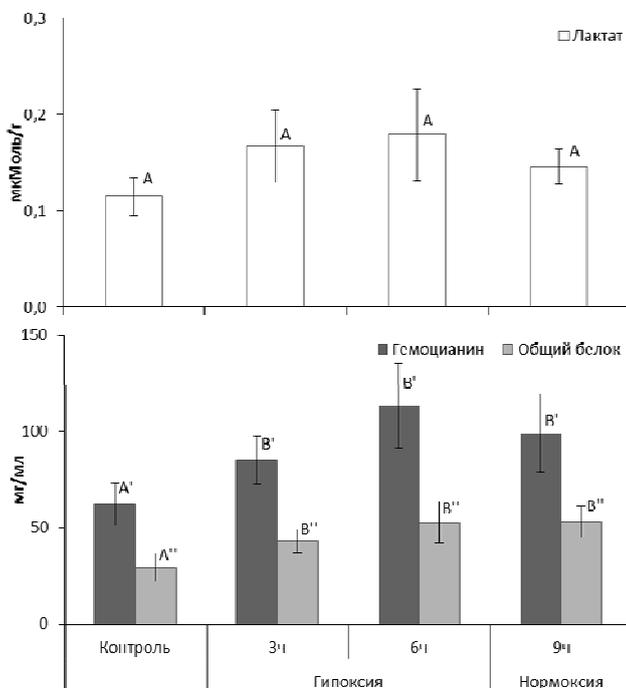
Известно, что экологические характеристики видов в значительной степени определяются биохимическими процессами, происходящими на уровне клеточного метаболизма. Одними из ключевых биохимических показателей, отражающих состояние организма и происходящие в нём процессы, являются механизмы ионной регуляции и физиологические показатели стресс-адаптации [1].

Пресноводные мелководные водоемы и их обитатели в наибольшей степени подвержены различным антропогенным нагрузкам [2]. В частности, вследствие повышения температуры и загрязнения среды обитания развитие жизни в мелководных водоемах идет в условиях повышенного содержания органических и неорганических соединений, повышенного уровня углекислого газа и сероводорода и пониженного содержания кислорода.

В связи с этим, целью настоящего исследования была оценка влияния гипоксии на содержание дыхательного пигмента гемоцианина, общего белка, лактата и некоторых ионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) в гемолимфе палеарктического вида гастропод *L. stagnalis*. Данный вид представляет большой интерес для изучения влияния условий среды на физиологические и биохимические показатели. Сбор гастропод проводили с водной растительности поверхности озера, расположенного в черте г. Иркутска на о. Юность. Оценку влияния гипоксии на гастропод проводили посредством экспонирования *L. stagnalis* в условиях индуцированной гипоксии (содержания кислорода 3 мг/л) и последующей нормоксии (8-9 мг/л).

Оценку содержания ионов проводили с применением метода безреагентной ионной хроматографии на приборе ICS – 2000 (Германия). Содержание общего белка, гемоцианина и лактата проводили с помощью методов спектрофотометрии на приборе Cary Varian – 50 (США). Измерение концентрации лактата проведено по стандартным протоколам «Лактат-витал» (Витал диагностика, СПб) [3]. Оценку содержания общего белка и гемоцианина проводили при длине волны 280 нм и 335 нм соответственно, предварительно разбавив пробы в 100 раз и осадив форменные элементы центрифугированием в течение 5' при 16100rpm, 5 °С.

Показано, что в условиях гипоксии происходит повышение содержания гемоцианина и общего белка (рис.1), что свидетельствует об активации физиологических реакций стресс-адаптации и об интенсификации транспорта кислорода в стрессовых условиях. При этом нормоксия в течение 3 часов после 6 часовой гипоксии не приводила к восстановлению уровня общего белка и гемоцианина до контрольных значений. Принимая во внимание, что в ходе работы не отмечали изменения содержания лактата, это указывает на то, что данный тип стрессового воздействия не приводит к увеличению доли анаэробных процессов в клетке и существенных перестроек в организме гастропод не происходит.

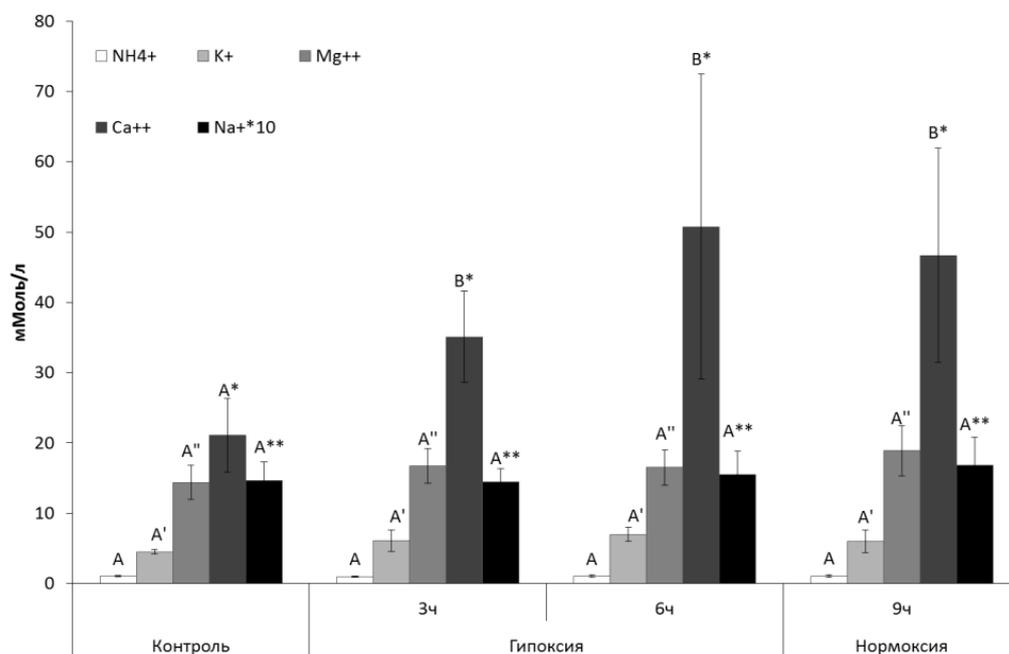


**Рис. 1.** Изменение содержания лактата, общего белка и гемоцианина у гастропод *L. stagnalis*, экспонированных в условиях гипоксии и нормоксии

В ходе исследования показано, что концентрации ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{NH}_4^+$  оставались неизменными в течение всего эксперимента, в то время как концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  повысилась уже к 3 часам экспозиции в условиях гипоксии и сохранялась на повышенном уровне после 3-х часовой нормоксии от суммарной 6 часовой гипоксии (рис.2).

По-видимому, индуцированное гипоксией среды обитания повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в гемолимфе связано с выходом ионов в межклеточную среду из-за недостатка энергии, снижения интенсивности активного транспорта ионов и вымывания  $\text{Ca}^{2+}$  из раковины.

Ранее проведенными исследованиями Мартемьянова В.И. (2011) на примере *D. polymorpha* показано, что повышенная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в гемолимфе пресноводных двусторчатых моллюсков проявляется в ответ на разные по качеству экстремальные воздействия (температура, токсиканты) [4]. Таким образом, в настоящей работе показано, что даже кратковременная индуцированная гипоксия приводит к активации физиологических механизмов стресс-адаптации у широко распространенного эврибионтного палеарктического вида гастропод.



**Рис. 2.** Изменение содержания катионов у гастропод *L. stagnalis*, экспонированных в условиях гипоксии и нормоксии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-00501\_a, РФФИ 14-14-00400 программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «ИГУ» и совместной программы академических обменов DAAD - Минобрнауки РФ М. Ломоносов 2014-2015.

#### Список литературы

- Grieshaber M.K. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates / M.K. Grieshaber, I. Hardewig, U. Kreutzer, H.O. Pörtner // Rev. physiol. Biochem. Pharmacol. –1994. –Vol.125. –p. 44 – 147.
- Тимофеев М.А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р.биол. Наук: 030208 / М.А. Тимофеев; ТГУ; Томск. – 2010. – 384 с.
- Аксенов-Грибанов Д.В. Сравнительная оценка влияния изменения температуры среды на байкальские и палеарктические организмы по показателям энергетического метаболизма и неспецифического стресс-ответа: Дис. ... Канд. биол. Наук: 030208 / Д.В. Аксенов-Грибанов; ИГУ; Иркутск. – 2014. – 169 с.
- Мартемьянов В. И. Влияние минерального состава внешней среды на показатели водно-солевого обмена вселившейся в Рыбинское водохранилище дрейссены *Dreissena polymorpha Pallas* //Росс.журн. биол. инвазий. – 2011. – №. 2. – С. 120-134.

**ИНТЕГРАЛЬНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ИНДЕКС СОСТОЯНИЯ  
МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

О.Н. Лукьянова

*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр)  
Дальневосточный федеральный университет  
690091 г. Владивосток, Россия, olga.lukyanova@tinro-center.ru*

Приведена методика расчета интегрального биохимического индекса для оценки функционального состояния морских организмов в условиях хронического загрязнения. Показано, что величина индекса соответствует уровню загрязнения морской среды.

*Ключевые слова:* молекулярные биомаркеры, интегральный биохимический индекс, загрязнение моря

Залив Петра Великого Японского моря является важным промысловым районом, в то же время прибрежные районы залива испытывают хроническое антропогенное загрязнение. Химический мониторинг выявляет небольшой круг веществ и не дает информацию об их воздействии на организмы, популяции и сообщества. Для выявления самых ранних, «сигнальных» изменений в метаболизме морских организмов используется широкий круг молекулярных биомаркеров [1]. Это биохимические показатели, которые свидетельствуют о наличии загрязняющего вещества и его воздействии на организмы. Однако присутствие комплекса поллютантов, а также взаимодействие абиотических и биотических факторов могут усложнять интерпретацию ответной реакции биомаркеров. Для комплексной оценки физиологического состояния гидробионтов в прибрежной зоне морей используются различные наборы (батареи) биомаркеров, которые характеризуют отдельные стороны метаболизма загрязняющих веществ. На основании измерения набора молекулярных биомаркеров в современных программах мониторинга с помощью статистических методов рассчитываются интегральные биохимические индексы (ИБХИ) состояния морских организмов в условиях загрязнения [2].

Цель работы состояла в выборе и расчете интегральных биохимических индексов состояния морских и эстуарных организмов, обитающих в загрязненной прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря.

В большинстве программ мониторинга загрязнения преимущество отдается измерению конкретного уровня токсиканта, и биомаркеры рассматриваются только как дополнительный инструмент. Это положение существует уже в течение 40 лет. Однако сейчас установлены несомненные преимущества биомаркеров:

- Биомаркеры указывают на присутствие биологически доступного токсиканта;
- Биомаркеры могут свидетельствовать о наличии токсиканта, присутствие которого не ожидается в конкретном месте;
- Биомаркеры можно определять длительное время после воздействия токсиканта, когда его уже нельзя выявить химическими методами;
- Анализ биомаркеров легче и дешевле, чем химический анализ токсикантов.

Применение биомаркеров предполагает, что взаимосвязь их активности и уровня загрязнения известна или, по крайней мере, коррелирует. В условиях флуктуирующей окружающей среды трудно установить эту связь однозначно. Для успешного развития применения биомаркеров необходима простая и воспроизводимая интегрирующая система, способная минимизировать наблюдаемые затруднения при прогнозе экологической ситуации и биологических последствий загрязнения.

Ни один биомаркер не может отдельно измерить деградацию окружающей среды. Только набор биомаркеров может быть чувствительным индикатором здоровья экосистем, чтобы снизить влияние вариаций абиотических и биотических факторов и различить чистые и загрязненные акватории.

Задачи вычисления индекса:

- Связать изменения в данных по биомаркерам с качеством среды;
- Классифицировать районы (акватории) в соответствии с изменениями здоровья организмов, вызванными воздействием загрязнения.

Индексы суммируют информацию о здоровье морских организмов. В то время как информация о состоянии здоровья выражена различными значениями биомаркеров, индекс представляет наиболее удобную информацию ряда стандартизированных оценок. Вместо комплекса интерпретаций индивидуальных различий, биологическая информация, таким образом, трансформируется в одну глобальную оценку, дающую приемлемое представление экологического риска. Такой индекс должен

снизить сложность и неопределенность многомерных данных для оценки, восстановления и представления результатов для общества и управленцев.

Индексы должны удовлетворять некоторым критериям:

- Предоставлять суммарные свойства объекта: индекс должен быть интегральным и чувствительным к воздействию, отражать реальные биологические ситуации

- Быть легко измеряемым: индекс должен быть легко рассчитан из доступных данных и легко интерпретироваться

- Объективность: индекс не должен зависеть от персональных представлений исследователя о том, как поступать с имеющимися данными.

В большинстве случаев индексы представляют собой взвешенную сумму измеренных результатов. Задача индексов – подчеркнуть важные аспекты данных.

В литературе приводятся различные подходы для вычисления интегральных биохимических индексов [2, 3, 4]. Наиболее цитируемой оказалась работа IBR – Integrated Biochemical Response [5]. Этот индекс не требует измерения большого количества показателей, однако значимость индекса увеличивается с каждым дополнительным параметром.

Алгоритм расчета ИБХИ:

1. На основании проведенных измерений получены значения **X** как среднее значение для индивидуальных особей (4-6) для биомаркеров (или по отдельным станциям для загрязнения).

2. Для каждого биомаркера по **N** станциям было рассчитано среднее значение (**m**) и стандартное отклонение (**s**).

3. Далее значение **X** было стандартизировано, чтобы получить **Y**, где

$$Y = (X - m)/s.$$

4. Далее рассчитано **Z**, как

$$Z = -Y \text{ или } Z = Y,$$

если биологический эффект соответственно активировался или ингибировался.

5. Для каждого биомаркера для всех станций было установлено минимальное значение (**Min**) и добавлено к **Z**.

6. Значение (**S**) было рассчитано, как

$$S = Z + | \text{Min} |,$$

где  $S \geq 0$ , а  $| \text{Min} |$  – абсолютное значение.

Величина (**S**) была принята как параметр для построения лепестковых диаграмм. Величина ИБХИ рассчитывается как площадь образовавшейся фигуры, т.е. как сумма площадей четырех или трех прямоугольных треугольников.

Для расчета ИБХИ были использованы данные по определению молекулярных биомаркеров (глутатион-S-трансфераза, каталаза, редуктаза, перекисное окисление липидов, глутатион) в органах животных из районов залива Петра Великого с различной степенью загрязнения. Определение проводили общепринятыми методами.

В качестве примера рассмотрим мидию Грея *Crenomytilus grayanus* (табл.1). Животные были собраны в Амурском заливе на станциях б. Перевозная и м. Песчаный, в Уссурийском заливе – у м.Ахлестышева, в б. Лазурная и б. Суходол. Контрольная станция в обоих случаях была у о. Рейнеке. В обоих заливах градиент загрязнения связан с влиянием рек, впадающих в кутовую часть – река Раздольная и река Артемовка, что определяет большую степень загрязнения во внутренних частях залива. О. Рейнеке расположен в открытых водах и является контрольной станцией в течение ряда лет.

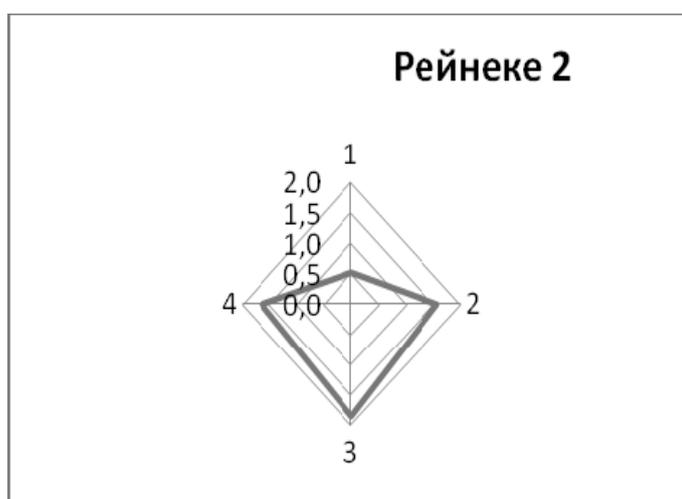
Для каждой станции проведена статистическая обработка результатов, для примера приведена таблица для мидий с о. Рейнеке (табл.2). **Min** значение найдено для всей совокупности станций. Т.к. при загрязнении величина молекулярных биомаркеров возрастала, при расчете **Z** применено положительное значение **Y**. **S** для каждого биомаркера вычислено по формуле  $Z + \text{Min}$ , где использовано абсолютная величина **Min**. На основании полученных значений **S** построены диаграммы (рис.1). Площадь полученных фигур является показателем интегрального биохимического индекса и рассчитывается как сумма четырех прямоугольных треугольников:  $\text{ИБХИ} = (S_1 \times S_2/2) + (S_2 \times S_3/2) + (S_3 \times S_4/2) + (S_4 \times S_1/2)$ .

**Таблица 1.** Средние значения (n=4-6) молекулярных биомаркеров в гепатопанкреасе мидий *C. grayanus* из различных районов залива Петра Великого

Станция	GST	ПОЛ	Каталаза	GSH
Рейнеке 1	10.9	2.04	21	1.33
Перевозная	13.6	1.53	18.1	6.63
Песчаный	25.1	1.44	17.9	2.8
Рейнеке 2	18.97	3.96	24.86	4.67
м. Ахлестышева	40.42	3.18	27.05	3.17
б. Лазурная	57.88	4.82	27.06	3.04
б. Суходол	41.47	6.42	26.8	1.23
Рейнеке 06 сентябрь	32.32	1.97	20.03	7.29
Рейнеке 06 июнь	33.5	3.85	23.68	5.67
Рейнеке 07	51.57	2.6	19.47	4.73
m	32.57	3.19	22.71	4.06
s	15.68	1.61	3.78	2.09

**Таблица 2.** Средние значения молекулярных биомаркеров и Интегральный биохимический индекс (ИБХИ) для мидий со станции Рейнеке 2

Рейнеке 2	GST	ПОЛ	Каталаза	GSH
X	18.97	3.96	24.86	4.67
m	32.57	3.19	22.71	4.06
s	15.68	1.61	3.78	2.09
Y	-0.87	0.48	0.57	0.29
Z	-0.87	0.48	0.57	0.29
Min	-1.38	-1.09	-1.27	-1.35
S	0.51	1.57	1.84	1.65
<b>ИБХИ</b>	<b>3.784</b>			



**Рис. 1.** ИБХИ для мидий с контрольной станции Рейнеке 2

Для мидий из загрязненных районов величина ИБХИ достоверно повышена (рис. 2, 3).



**Рис. 2.** ИБХИ у мидий из загрязненных районов (б. Лазурная, м. Ахлестышева).

По мере приближения к кутовым частям заливов, по мере возрастания загрязнения, величина ИБХИ увеличивается, что подтверждает адекватное отражение экологической ситуации на станциях по молекулярным биомаркерам и ИБХИ.

Закономерности, отмеченные для мидий, в целом отмечаются и у мохнаторукого краба. Наибольшая величина ИБХИ была у крабов из эстуария наиболее загрязненной реки Раздольной.

Величина ИБХИ отражает пространственно-временную вариабельность воздействия загрязнения и соответствующий экологический риск. Биологическое значение величины биомаркера отражает увеличение количества белка и/или его активности при усилении воздействия.

Разработанный ИБХИ создан на основе набора данных для того, чтобы суммировать стандартизированные индивидуальные значения и классифицировать районы работ. Наивысшее значение индекса соответствует наиболее загрязненному району. Метод также позволяет дать простое графическое изображение величины индекса, для чего использована лепестковая диаграмма. Этот тип графика не только отражает значение индекса, но и позволяет рассчитать его величину по площади получившихся фигур.

Однако ИБХИ имеет смысл только в тех случаях, когда выбраны биомаркеры, адекватно отражающие внешнее воздействие. В нашей работе использованы биомаркеры раннего нарушения, соответствующие взаимосвязанным процессам – развитию окислительного стресса и биотрансформации. Эти процессы соответствуют эффектам токсикантов, присутствующим в местах сбора проб – органическим загрязняющим веществам типа нефтеуглеводородов, пестицидов, ПАУ [6,7].

Вычисление индексов позволяет преодолеть отрицательные результаты, полученные при использовании единичных биомаркеров, когда эффекты не выявлены, хотя воздействие имеет место. Графическое выражение ИБХИ и размещение его, например, на картах, имеет значение при представлении результатов для комплексного управления прибрежными зонами.

#### Список литературы

1. Лукьянова О.Н. Молекулярные биомаркеры. Владивосток: изд-во ДВГАЭУ, 2001. 197 с.
2. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.
3. Fonseca V.F., France S., Serafim A., Company R., Lopes B., Bebianno M.J., Cabral H.N. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps* // *Aquatic Toxicology* 102 (2011) 216–227.
4. A Pragmatic and Integrated Approach for the Evaluation of Environmental Impact of Oil and Chemical Spills at sea: Input to European Guidelines (PRAGMA). 2007.
5. Beliaeff B., Burgeot T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment // *Environm. Toxicol. Chem.* 2002. V.21, N.6. P. 1316-1322.
6. Черняев А.П., Черкашин С.А., Лукьянова О.Н. Распределение нефтяных углеводородов и оценка состояния биоты в Амурском заливе (Японское море) // *Экологическая химия*. Т.15, N 1, 2006. С. С.28-38.
7. Лукьянова О.Н., С.А.Черкашин, Л.В.Нигматулина, А.П.Черняев, Е.Л. Вейдеман, С.А. Ирейкина, Т.С. Пряжевская. Комплексная химико-экологическая оценка состояния Уссурийского залива (Японское море) // *Водные ресурсы*. 2009. Т.36, №5. С. 615- 622.

**ТИХООКЕАНСКИЕ ЛОСОСИ КАК "МОРСКАЯ ПОМПА"  
В ПЕРЕНОСЕ БИОГЕНОВ И ПОЛЛЮТАНТОВ**

О.Н. Лукьянова<sup>1,2</sup>, В.Ю. Цыганков<sup>2</sup>, М.Д. Боярова<sup>2</sup>, Н.К. Христофорова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр)  
690091 г. Владивосток, Россия, olga.lukyanova@tinro-center.ru

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, 690950 г. Владивосток, Россия

Тихоокеанские лососи в ходе нерестовых миграций обогащают прибрежные экосистемы биогенами и одновременно переносят на сушу стойкие органические загрязняющие вещества, которые аккумулируют при нагуле в океане. Определено количество ГХЦГ и ДДТ, переносимого горбушей и кетой на тихоокеанское побережье России.

*Ключевые слова:* лососи, пестициды, Охотское море, Берингово море.

Тихоокеанские лососи являются одной из массовых групп нектонных сообществ Северной Пацифики, отличаются большой пищевой ценностью и высокой численностью. Биология этих рыб к настоящему времени достаточно хорошо изучена на всех основных этапах жизненного цикла – пресноводном, эстуарном и океаническом. Но и в настоящее время объем знаний по биологии и функционированию популяций лососей остается недостаточным. В новых экологических условиях меняются лимитирующие факторы, определяющие численность и миграции лососей [1].

Область распространения этих рыб приурочена к холодным и умеренным водным массам. Основные виды, нерестящиеся на побережье российской зоны дальневосточных морей: *Oncorhynchus gorbusha* – горбуша, *O. keta* – кета, *O. masou* – сима, *O. kisutch* – кижуч, *O. tshawytscha* – чавыча, *O. nerka* – нерка. Ареал сима самый маленький, это исключительно азиатский вид. Морские ареалы кижуча и чавычи имеют непрерывное распространение через всю Северную Пацифику. Наибольшее распространение и в пресноводный, и в морской периоды жизни имеют кета и горбуша, от арктической до субтропической зоны. Так же меняется и численность лососей, над всеми видами преобладают кета и горбуша.

В связи с тем, что верхняя эпипелагиаль Северной Пацифики относительно слабо заселена другими рыбами, пищевые ресурсы этого слоя водных масс достаточны для прокорма большого количества рыб. Поэтому лососи – самые массовые рыбы верхнего слоя Северной Пацифики, на глубинах от 0 до 50 м.

По типу жизненной стратегии тихоокеанские лососи относятся к анадромным рыбам, то есть в нагульный период ведут океанический образ жизни, а нерест и раннее развитие происходит в пресной воде, в реках и озерах. Нерестовые миграции лососей являются уникальным примером направленного переноса биогенных элементов в океане. Погибающие после нереста многие миллионы экземпляров рыб оставляют на нерестилищах в составе своих тушек и скелета значительные количества органического вещества. Так, на Западной Камчатке в четные годы после нереста горбуши в пойме рек остается до 2000 тушек на 1 гектар, или до тонны азота и фосфора на га. После смерти производителей богатые азотом, фосфором и кальцием соединения ассимилируются местной биотой. Подобная «морская помпа» по переносу биогенов рассматривается как эволюционный механизм, обеспечивающий успешность развития икры и выживания молоди [2].

Во время нагула в океане и особенно перед нерестовой миграцией лососи аккумулируют резервные нейтральные липиды, как для удовлетворения энергетических затрат, так и для развития гонад во время миграций. Параллельно с накоплением липидов происходит и аккумуляция липофильных поллютантов из морской среды, как в субтропических широтах, так и в умеренной зоне. Присутствие ксенобиотиков в этих районах, удаленных от хозяйственной деятельности, является следствием глобального фона пестицидов, переносимых ветрами из районов использования (тропическая и субтропическая зона) на огромные расстояния в умеренные широты [3]. При биоаккумуляции в жировых тканях концентрация пестицидов в лососях может на порядок превышать их содержание в окружающей среде. Таким образом, мигрирующие рыбы могут выступать как векторы, переносящие органические поллютанты в процессе биотранспорта между субтропическими и южно бореальными и субарктическими экосистемами.

Цель работы состояла в определении количества стойких органических загрязняющих веществ (СОЗ) – хлорорганических пестицидов ДДТ и ГХЦГ - в органах мигрирующих на нерест лососей, и расчете общего количества СОЗ, переносимого лососями на побережье Охотского и Берингова морей.

Тихоокеанские лососи горбуша и кета были выловлены в ходе морских экспедиций ТИНРО-Центра (г. Владивосток) в Охотском море и в районе Курильских островов в Тихом океане в июне-июле 2010- 2013 г. Образцы были заморожены при  $-20^{\circ}\text{C}$ . В лаборатории каждую рыбу делили вдоль на 2 равные части, одну половину препарировали по органам, отделяя печень, мышцы и гонады, из другой половины готовили усредненную пробу. После экстракции органическими растворителями и очистки экстрактов определение массового содержания ХОП в образцах выполняли на газовом хроматографе Shimadzu GC-16A (Япония) с детектором электронного захвата ECD. Концентрацию пестицидов выражали в нг/г сырой массы. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel.

Результаты показали, что хлорорганические пестициды присутствуют во всех исследованных органах тихоокеанских лососей: мышцах, печени, гонадах самцов и самок, наибольшее содержание отмечено в гонадах. Общее содержание пестицидов в тушке рыб представлено в таблице 1.

**Таблица 1.** Концентрация (нг/г сырой массы) изомеров ГХЦГ и ДДЕ в тушке кеты и горбуши.  $M \pm m$ ,  $N=6$ .

Объект		$\alpha$ -ГХЦГ	$\beta$ -ГХЦГ	$\gamma$ -ГХЦГ	$\Sigma$ ГХЦГ	ДДЕ	$\Sigma$ ХОП
Горбуша	♂	$51.7 \pm 1.3$	$11.8 \pm 0.4$	$7.7 \pm 0.6$	$71.0 \pm 1.9$	$12.3 \pm 0.1$	$83.4 \pm 1.8$
	♀	$34.1 \pm 1.0$	$7.1 \pm 1.0$	$5.0 \pm 0.6$	$46.3 \pm 1.2$	$8.1 \pm 0.2$	$54.3 \pm 1.5$
Кета	♂	$86.6 \pm 5.8$	$78.5 \pm 44.9$	$36.6 \pm 7.0$	$201.7 \pm 56.6$	$26.8 \pm 2.3$	$228.5 \pm 59$
	♀	$75.5 \pm 15.5$	$28.2 \pm 8.1$	$29.6 \pm 18.7$	$133.3 \pm 31.5$	$3.2 \pm 0.2$	$136.4 \pm 31.4$

Концентрации пестицидов у кеты достоверно больше, чем у горбуши, что может быть связано как с различной жирностью рыб, так и длительностью нахождения в море. После ската молоди в море горбуша возвращается на нерест на следующий год, кета же может нагуливаться от двух до пяти лет, аккумулируя в органах различные поллютанты.

Концентрации изомеров ГХЦГ во всех пробах были значительно выше, чем ДДТ. В Мировом океане пестициды из тропических и субтропических областей путем атмосферного переноса осаждаются в высоких широтах. Вследствие высокой летучести ГХЦГ его содержание в Тихом океане увеличивается от субтропиков к северу. ДДТ, напротив, обладает меньшей летучестью и в наибольших концентрациях встречается в местах непосредственного применения [4]. Таким образом, более высокие концентрации ГХЦГ по сравнению с ДДТ у лососей, выловленных севернее  $40^{\circ}$  с.ш., вполне объяснимы.

Среди изомеров ГХЦГ в лососях преобладали  $\alpha$ - и  $\beta$ - формы, содержание  $\gamma$ - изомера было определяемым, но невысоким. Коэффициент  $\alpha$ -ГХЦГ/  $\gamma$ -ГХЦГ был больше 1. Во всех пробах отсутствовали ДДТ и ДДД, выявлен только ДДЕ, кроме икры кеты, где ни один из метаболитов ДДТ не был обнаружен. Данные результаты свидетельствуют о распаде исходных соединений, вносимых человеком в экосистемы – ДДТ и  $\gamma$ -ГХЦГ, т.е. о «давнем» поступлении пестицидов в океан и их нахождении в морской среде [5].

Количество лососей, мигрирующих к российскому побережью, варьирует год от года. но структура подхода сохраняется – 60-65% составляет горбуша, 20-25% - кета, 10-12% нерка, и небольшая доля приходится на кижуча и чавычу. Кета и горбуша составляют основу подхода на восточной Камчатке, восточном Сахалине, материковом побережье Охотского моря, в бассейне Амура [1]. В четном 2008 году общий вылов лососей составил 258 тыс. т, в рекордном нечетном 2009 году - 542 тыс. т, в 2010 – 324 тыс.т. С использованием различных методов определяется как общий подход лососевых, так и количество рыб, пропущенных на нерестилища. Данные о количестве лососей на нерестилищах в различных районах на побережье Северной Пацифики приводятся в отчетах Международной комиссии по анадромным рыбам NPAFC (2004–2010 NPAFC Statistical Yearbook. <http://www.npafc.org>).

Концентрация ХОП как средняя сумма ГХЦГ +ДДЕ для самцов и самок в тушке горбуши составляла 68.85 нг/г, кеты – 182. 5 нг/г сырой массы. Средняя масса одного экземпляра горбуши равна 1.3 кг, нерестовой кеты - 3.5 кг. Таким образом, одна горбуша содержит до 90 мкг пестицидов, а одна кета – до 640 мкг.

На основании этих данных было рассчитано общее количество пестицидов, переносимых двумя основными в российских водах видами лососей в районы нерестилищ на побережье Охотского и Берингова морей (таблица 2).

За три года наибольшее количество пестицидов пришло в бассейн Амура, около 23 кг. Данное количество год от года варьирует, но вместе с тем показывает, что с каждым годом общее содержание пестицидов на конкретном нерестилище увеличивается. Поскольку эти соединения достаточно устойчивы, они могут циркулировать в экосистеме долгое время и передаваться по пищевой цепи, оказывая тем самым влияние на наземные организмы более высокого трофического уровня.

**Таблица 2.** Общее количество хлорорганических пестицидов (г), переносимых кетой и горбушей на тихоокеанское побережье России в 2008-2010 гг.

Район	2008	2009	2010
Восточная Камчатка	518	10391	1048
Западная Камчатка	3962	470	4350
Материковое побережье Охотского моря	2760	8173	3973
Курильские острова	196	156	347
Восточное побережье Сахалина	1096	1991	1358
Бассейн Амура	1860	13068	7750
Западная часть Берингова моря	2567	1258	1405
Итого	1295	35507	20231

В основном морское распределение лососей соответствует сезонному распространению водных масс в пределах оптимального для лососей диапазона температуры воды, от 2-4° до 15-20°. Однако миграционные процессы зависят от многих факторов, например, сезона, климатических особенностей года, биологического и физиологического состояния рыб, их возраста, наличия кормовых объектов и других. Определенный вклад в миграционное поведение и успешность нереста может вносить и накопление поллютантов.

В северной части Тихого океана лососи доминируют на глубинах от 0 до 50 м. Именно в этом слое могут концентрироваться атмосферные выпадения и осевшие на частицы взвеси поллютанты. На юге границей ареалов лососей являются 38 — 40° с.ш. Эта зона соприкасается с районом так называемого Большого тихоокеанского мусорного пятна, расположенного между 140° в.д — 160° з.д. и 35° — 42° с.ш. На этом участке сконцентрированы залежи пластика и других отходов, принесенных водами Северо-Тихоокеанской системы течений. Фоторазложение пластика ведет к выделению в воду хлорорганических и полиароматических соединений, а также эстроген-подобных веществ, которые адсорбируются на частицах взвеси в эпипелагиали и могут аккумулироваться лососевыми рыбами[7]. Модуляция экспрессии генов, вызванная ксенобиотиками, приводит к проявлению ксеноэстрогенного эффекта, проявляющегося в феминизации самцов, что может нарушить половую структуру популяций.

Способность лососей аккумулировать пестициды доказана экспериментально, причем как рыбы с высоким содержанием липидов, они аккумулируют больше липофильных ксенобиотиков, чем, например, тощие рыбы [6]. Во время миграций лососи используют липиды мышц как источник энергии при развитии гонад. При этом липиды расходуются, а концентрация поллютантов в них увеличивается. Эта повышенная концентрация приводит к перераспределению поллютантов через кровь в другие органы, например, в нервную ткань, где может вызвать токсический эффект. У самок поллютанты накапливаются в гонадах, что может негативно влиять на нерест и выживаемость личинок. Концентрации пестицидов около 0,3 пг/г сырой массы способны привести к смертности до 30% популяций лососей. У лососей, мигрирующих в районах с повышенным содержанием CO<sub>2</sub>, выявлено изменение иммунных функций и повышение чувствительности к инфекциям.

Вероятно, все виды тихоокеанских лососей могут участвовать в биотранспорте пестицидов из океанических экосистем в прибрежные районы. Интенсивность этих процессов определяется воздействием поллютантов в районах нагула, выбором пищи и структурой экосистем в районах нереста. Ежегодное попадание пестицидов в районы нерестилищ и постоянное увеличение их концентрации в локальных зонах вследствие устойчивости токсикантов к внешним факторам определяет возможность экологического риска для определенных популяций, успех нереста которых может быть снижен вследствие токсичности среды.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Научный фонд» Дальневосточного федерального университета, грант 12-04-13000-33/13.*

#### Список литературы

1. Шунтов В.П., Темных О.С. Тихоокеанские лососи в морских и океанических экосистемах. Т.1. Владивосток: ТИПРО-Центр, 2008. 481 с.
2. Helfield J.M., Naiman R.J. Effects of salmon-derived nitrogen on riparian forest growth and implications for

stream productivity // Ecology. 2001. V. 82. P. 2403-2409.

3. Tanabe S. Contamination by Persistent Toxic Substances in the Asia-Pacific Region // Persistent Organic Pollutants in Asia: Sources, Distributions, Transport and Fate. Developments in Environmental Science. 2007. V. 7. P. 773- 817.

4. Wania F., Mackay D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants // Env. Sci. Technol. 1996. V.30. P.390A-396A.

5. Ровинский Ф.Я., Воронова Л.Д., Афанасьев М.И., Денисова А.В., Пушкарь И.Г. Фоновый мониторинг загрязнения экосистем суши хлороорганическими соединениями. Л.: Гидрометеиздат, 1990. 270 с.

6. Krummel E.M., Macdonald R.W., Kimpe L.E. et al. Delivery of pollutants by spawning salmon // Nature. 2003. V.425. P. 255-256.

7. Moore C., Moore S. L., Leecaster M. K. et al. A comparison of plastic and plankton in the North Pacific Central Gyre // Marine Pollution Bulletin. 2001. V.42. N 12. P. 1297-1300.

**УДК: 636.02:597.55:576.344**

### **СОДЕРЖАНИЕ НЕПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ ЖАБР НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ МАЛЫХ РЕК ЗАПАДНОГО ПОДОЛЬЯ**

Б.З. Ляврин, Ю.И. Сеник В.Я. Бияк, В.А. Хоменчук, В.З. Курант

*Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка,  
46027 ул. М. Кривоноса 2, г. Тернополь, Украина, bohdan.lyavrin@gmail.com*

Представлены результаты исследования липидного состава тканей жабр наиболее распространенных пресноводных видов рыб малых рек Западного Подолья – карпа, карася, окуня, и щуки. Изучены межвидовые различия в содержании липидов в жабрах исследованных видов рыб.

*Ключевые слова:* липиды, рыбы, жабры, малые реки, Западное Подолье.

Рост антропоического воздействия на водную среду обострило проблему выживания организмов в стрессовых условиях, создаваемых накоплением токсичных веществ. Известно, что ответ организма на действие токсиканта является результатом взаимодействия двух процессов: повреждения (деструкция) и защиты (компенсаторная адаптация) [1]. Их соотношение определяет уровень токсичности водной среды по отношению к рыбам.

Будучи одним из основных компонентов биологических мембран, липиды влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, создают межклеточные контакты, выполняют функции вторичных мессенджеров в передаче сигналов в клетку.

Именно поэтому особый интерес вызывает изучение особенностей обмена и содержания индивидуальных классов нейтральных липидов в тканях жабр некоторых пресноводных видов рыб.

Объектами исследования были карп чешуйчатый – *Cyprinus carpio* L., щука обыкновенная – *Esox lucius* L., карась серебристый – *Carassius gibelio* Bloch, и окунь обыкновенный – *Perca fluviatilis* L. массой 290-330 г, 200-350 г, 150-230 г, та 170-230 г. соответственно. Для исследования рыб отбирали из рек Серет, Стрыпа и Золотая Липа, которые находятся в трех зонах, отличных по характеру антропогенного воздействия, непосредственно перед экспериментом. Так, река Золотая Липа - урбонагруженная зона, Серет - сельско-хозяйственно нагруженная зона, Стрыпа - рекреационная зона. Для биохимического исследования содержания липидов и их отдельных классов были использованы образцы жабр. Ткань измельчали на холоде в стеклянных гомогенизаторах с последующим экстрагированием общих липидов из ткани хлороформ-метаноловой смесью в отношении 2:1 по методу Фолча [2]. Количество общих липидов в ткани определяли весовым методом после отгонки экстрагирующей смеси и выражали в мг/г влажной ткани.

Разделение липидов на отдельные фракции проводили методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии на пластинках "Sorbfil" (Россия) [2]. Подвижной фазой служила смесь гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты в соотношении 70:30:1. Полученные хроматограммы проявляли в камере, насыщенной парами йода. Для идентификации отдельных фракций липидов использовали специфические реагенты и очищенные стандарты [3]. Количество неполярных липидов определяли бихроматным методом [2].

Результаты исследований были статистически обработаны с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office 2013, и t-критерия Стьюдента для определения достоверной разницы,  $p < 0.05$ .

Известно, что количество общих липидов свидетельствует об активности анаболических процессов и мобилизации липидов в качестве источника энергии или об их использовании в адаптивных перестройках метаболизма и структурных компонентах клетки [4]. Как видно из результатов исследования, общее содержание липидов (табл. 1) в жабрах карпа, взятого из рек Серет и Стрыпа находится практически на одном уровне и значительно превышает их содержание в рыбах, взятых из р. Золотая Липа. Известно, что характер распределения липидов в тканях и органах различных видов и экологических групп зависит от условий среды, двигательной активности, возраста и прочих факторов.

**Таблица 1.** Содержание общих липидов в тканях жабр исследуемых видов рыб, (мг/г ткани)

Вид рыбы \ Река	Серет	Стрыпа	Золотая Липа
Карп	26.68 ± 0.53	28.07 ± 0.41*	14.67 ± 0.67*
Щука	19.42 ± 0.95	21.67 ± 0.98*	15.37 ± 1.25*
Карась	19.73 ± 1.03	21.20 ± 0.98	09.00 ± 0.58*
Окунь	22.37 ± 1.15	23.37 ± 1.30	10.43 ± 0.45*

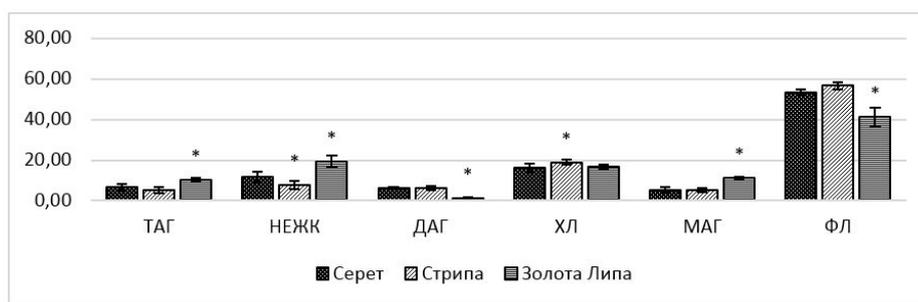
Примечание: \*- Здесь и далее разница по сравнению с данными представителей р. Серет статистически достоверна,  $p < 0.05$ ,  $n=5$ .

Похожая картина накопления липидов жабрами наблюдается у исследованных карасей, взятых из этих же водоемов, где их содержание в тканях жабр снижается в ряду рек Стрыпа→Серет→Золотая Липа.

Размещение основных запасов жира в мышечной ткани характерно для хищных видов, в частности щуки и окуня. По содержанию липидов в жабрах исследованных хищных видов, таких как щука и окунь, наблюдается иная картина. Высокое содержание липидов наблюдали в жабрах щуки из р. Стрыпа, несколько ниже содержание у представителей данного вида из р. Серет и самое низкое – у рыб из р. Золотая Липа.

Достоверная разница в содержании липидов в жабрах окуня обнаружена у представителей данного вида выловленных из разных водоемов, где их содержание снижается в ряду рек Стрыпа→Серет→Золотая Липа.

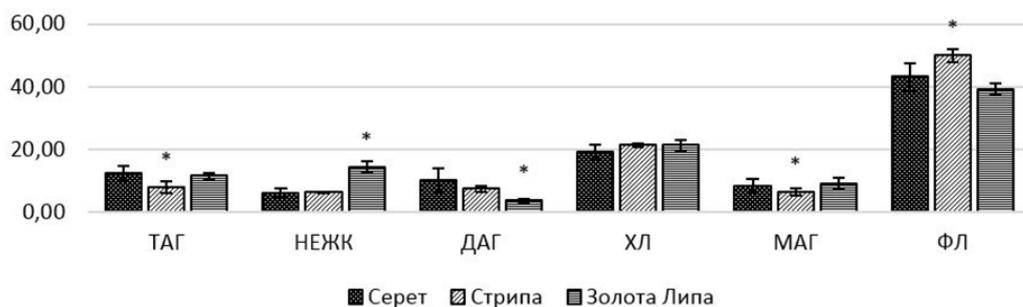
Полученные данные о содержании фракций нейтральных липидов в тканях жабр карпа из исследуемых водоемов показывают, что количество триацилглицеролов (ТАГ) значительное в карпа из р. Золотая Липа (рис. 1), несколько ниже оно у рыб из р. Золотая Липа, и р. Стрыпа. Известно, что ТАГ являются одним из факторов стабилизации клеточных мембран, и в стрессовых условиях они выступают предшественниками образования диацилглицеролов (ДАГ) и неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) [5]. Содержание НЭЖК отличается лишь у представителей из р. Золотая Липа. ДАГ и моноацилглицеролы (МАГ) занимают место посредников в синтезе ТАГ и фосфолипидов. Низкое содержание этих фракций в тканях жабр карпа из р. Серет, на фоне высокого содержания фосфолипидов, указывает на направление липидного метаболизма, а именно на синтез структурных липидов [6]. Содержание холестерина (ХЛ) и НЭЖК не отличается у рыб из исследованных водоемов, за исключением представителей из р. Стрыпа, где их содержание несколько ниже.



**Рис. 1.** Содержание отдельных классов неполярных липидов (в % от общего количества липидов) в клетках жабр карпа.

Распределение отдельных классов липидов в тканях жабр щуки имеет сходный характер (рис. 2). Содержание ТАГ, как и в исследованных тканях карпа, практически равно у представителей из р. Серет и р. Золотая Липа, и значительно ниже у рыб из р. Стрыпа. Имеющееся высокое содержание НЭЖК у представителей из р. Золотая Липа свидетельствует о преобладании в их метаболизме процессов

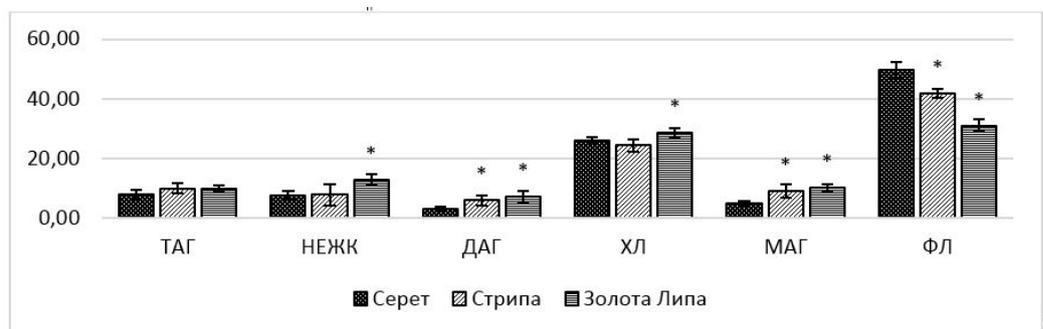
липолиза. Содержание фосфолипидов не отличается у рыб из трех водоемов, что указывает на постоянство состава структурных элементов клетки – биомембран, основными составляющими которых являются именно фосфолипиды. Известно, что интенсивность синтеза фосфолипидов, а соответственно и их содержание в тканях, может выступать как своеобразная защита клеток организма от проникновения через их мембрану токсикантов, путем ее уплотнения. Концентрация свободного холестерина, который наряду с фосфолипидами влияет на проницаемость мембран и обеспечивает их ультраструктуру и функциональную активность, практически равная у рыб из исследованных водоемов. Высокое содержание МАГ, что превосходит их концентрацию у щук из р. Стрыпа, выявлено у представителей рек Серет и Золотая Липа. Процент ДАГ в жабрах исследованных рыб снижается в ряде представителей из г. Серет→Стрыпа→Золотая Липа.



**Рис. 2.** Содержание отдельных классов неполярных липидов (в % от общего количества липидов) в клетках жабр щуки.

Процентное соотношение классов неполярных липидов в исследованных тканях карася отличается от такового у карпа и щуки (рис. 3). Концентрация ТАГ у карасей из исследованных рек практически равная, несколько ниже их содержания у представителей р. Серет. Накопление ТАГ является типичной реакцией на действие токсикантов, можно предположить единый механизм участия ТАГ в стабилизации мембран при токсическом действии, поскольку увеличение содержания их соотносится с уплотнением и уменьшением текучести мембран [6], что свидетельствует об их участии в формировании барьеров, препятствующих проникновению токсиканта в клетку.

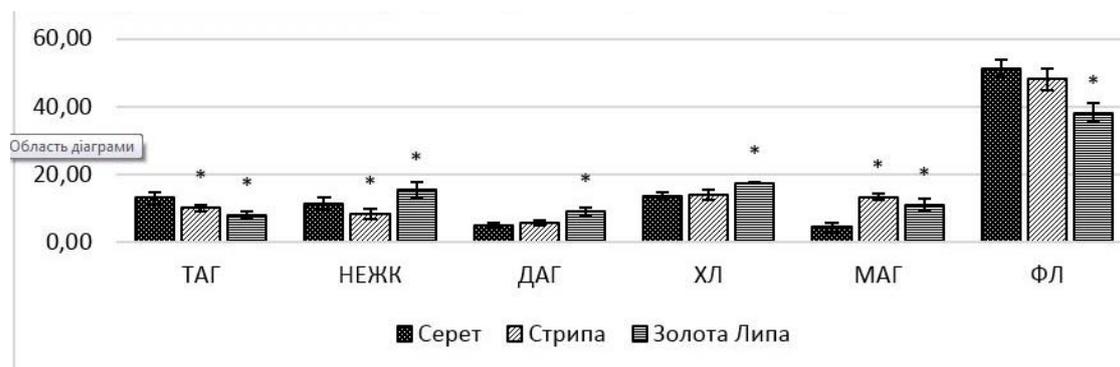
Содержание холестерина и фосфолипидов не отличается у рыб из исследованных рек, за исключением концентрации ФЛ карасей, где их количество снижается у представителей из рек Серет→Стрыпа→Золотая Липа. Концентрация НЭЖК у рыб из р. Серет и р. Стрыпа находится на одном уровне, однако содержание этих веществ у представителей из р. Золотая Липа несколько выше. Содержание промежуточных продуктов липидного обмена, таких как ДАГ и МАГ, отличается у представителей исследованных водоемов и указывает на направленность обмена липидов.



**Рис. 3.** Содержание классов неполярных липидов (в % от общего количества липидов) в клетках жабр карася

Концентрация ТАГ в клетках жабр окуня уменьшается в ряду представителей из рек Серет–Стрыпа–Золотая Липа (рис. 4). Известно, что триацилглицеролы используются для синтеза фосфолипидов и увеличения пула неэтерифицированных жирных кислот, содержание которых, как

показали наши исследования, в тканях жабр окуня носит обратнопропорциональный характер к содержанию ТАГ.

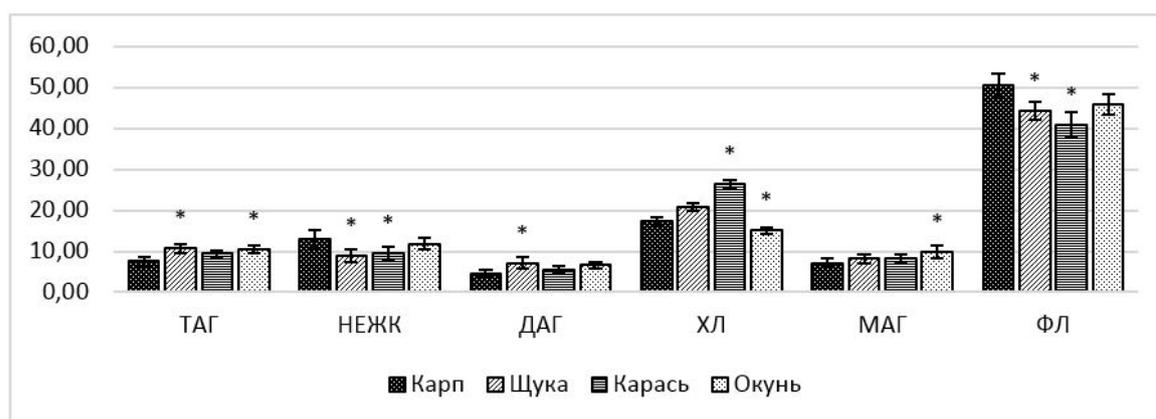


**Рис. 4.** Содержание отдельных классов неполярных липидов (в % от общего количества липидов) в клетках жабр окуня.

Увеличение количества холестерина, как правило, сопровождается уменьшением разреженности клеточных липидов и их избирательной проницаемости, снижением катионной проницаемости мембраны, ингибированием большинства липолитических ферментов. Концентрация фосфолипидов статистически отличается лишь у представителей из р. Золотая Липа, что указывает на большую активность синтеза структурных липидов по сравнению с представителями других исследованных водоемов. Концентрация свободного холестерина несколько выше у рыб из р. Золотая Липа по сравнению с его содержанием у рыб из других исследованных водоемов. Процентное содержание ДАГ, и МАГ в тканях окуня статистически отличается лишь у рыб из р. Золотая Липа.

Межвидовой анализ содержания отдельных классов неполярных липидов в тканях карпа, щуки, карася и окуня дал следующие результаты (рис. 5): концентрация ТАГ, как основного источника энергии и структурного материала является видоспецифической, и практически равной у мирных (каarp и карась), и у хищных видов (щука, окунь). Разница, вероятно, вызвана особенностями обменных процессов, трофикой и двигательной активностью.

Известно, что свободный холестерол наряду с фосфолипидами влияет на проницаемость мембран, обеспечивает их ультраструктуру и функциональную активность, а также активность многих мембраносвязанных ферментов и систем пассивного транспорта [7], механическую плотность бислоя мембран.



**Рис. 5.** Межвидовое сравнение содержания классов неполярных липидов (в % от общего количества липидов) в клетках жабр исследуемых видов рыб (\*- Здесь разница по сравнению с данными карпа статистически достоверная,  $p < 0.05$ ,  $n=9$ ).

Так, содержание холестерина наиболее низкого уровня – у карпа и окуня, а самое высокое оно у карася. Щука занимает промежуточное положение по этому показателю.

Изменение общего содержания неэтерифицированных жирных кислот, как предшественников синтеза липидов, так и продуктов их распада в тканях рыб, является одним из критериев оценки направления липидного метаболизма: снижение их количества является свидетельством активации синтеза липидов, а увеличение – липолиза. Значительный рост количества неэтерифицированных

жирных кислот свидетельствует о формировании катаболического стресс-синдрома в условиях интоксикации. Так высокое содержание НЭЖК найдено в клетках жабр карпа и окуня может свидетельствовать о преобладании липолитических процессов в их тканях, по сравнению с другими видами, у которых содержание НЭЖК находится на практически одном уровне.

Концентрация фосфолипидов, как основных структурных элементов биологических мембран, у исследованных нами видов отличается незначительно, за исключением их содержания в клетках жабр щуки и карася.

Количество ДАГ в исследованных тканях трех видов рыб находится на одинаковом уровне, в то время как концентрация этих веществ у щуки несколько выше.

Устойчивость мембран, приспособленных к неблагоприятным факторам, связывают с качественными и количественными изменениями в их составе триацилглицеролов (ТАГ), диацилглицеролов (ДАГ), неэтерификованных жирных кислот (НЭЖК), холестерина (ХЛ), моноацилглицеролов (МАГ) и фосфолипидов (ФЛ).

Таким образом, на основе полученных данных о содержании липидов и соотношения их классов в жабрах исследованных видов рыб, взятых из различных водоемов, можно спрогнозировать низкий уровень адаптации к условиям среды у всех представителей с из. Золотая Липа, по сравнению с рыбами из других исследованных водоемов. Смещение липидного метаболизма в сторону липолиза свидетельствует о формировании катаболического стресс- синдрома в условиях интоксикации.

Список литературы:

1. Романенко В. Д. Арсан О. М., Соломатина В. Д. Механизмы температурной акклимации рыб. — К.: Наукова думка, 1991. — 192с.
2. Орел Н. М. Биохимия липидов. — Минск, 2007. — 37с.
3. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 322с.
4. Климов А. Н. Никульчева А. Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. — СПб.: Питер-ком., 1999. — 512с.
5. Lewis R.N.A.H. McElhaneу R. N. Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming properties of lipid bilayer membranes: calorimetric and <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids // *Biophys. J.* — 2000. — Vol. 79. — № 3. — P.1455-1464.
6. Katz B. Relationship of aquatic organisms to the letality of toxicants: a broad overview with emphasis on membrane permeability // *Aquatic toxicology.* — Philadelphia: American society for testing and materials. — 1989. — P.62-76.
7. Gulik-Krzywicki T. Structural studies of the associations between biological membrane components // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1995. — Vol. 105. — № 1. — P.161-214.

УДК 574

#### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 У РАЗНЫХ ВИДОВ ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ И ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД В УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ КАДМИЯ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ**

Е.В. Мадьярова<sup>1</sup>, Ю.А. Лубяга<sup>1</sup>, Д.В. Аксенов-Грибанов<sup>1</sup>, Т. Люкенбах<sup>3</sup>, М.А. Тимофеев<sup>1,2</sup>,  
Ж.М. Шатилина<sup>1</sup>, К.П. Верещагина<sup>1</sup>, М.Д. Димова<sup>2</sup>, Д.С. Бедулина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО "ИГУ", НИИ биологии

664003 г., Иркутск, Ленина, 3, Россия, [madyarovae@gmail.com](mailto:madyarovae@gmail.com)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «ИГУ»

664003 г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, Россия

<sup>3</sup>Центр экологических исследований им. Гельмгольца

UFZ, 04318 г. Лейпциг, ул. Пермозештрассе, 15, Германия

Молекулярно-биохимическими методами выявлены отличия в экспрессии белков и генов БТШ70 у трех видов амфипод: байкальских *Eulimnogammarus cyaneus*, *E. verrucosus* и палеарктического *Gammarus lacustris* в ответ на совместное воздействие CdCl<sub>2</sub> и гипертермии.

*Ключевые слова:* Байкал, амфиподы, БТШ70, кадмий

С развитием цивилизации возрастает антропогенная нагрузка на среду обитания человека и животных. Высокие темпы индустриализации производственной деятельности в сочетании с

интенсивной урбанизацией и широким промышленным использованием ресурсов акваторий, атмосферы, почв и недр стали причиной многих существенных изменений экосистем. Среди многочисленных загрязнителей особое место занимают соли тяжелых металлов. Опасность этих ксенобиотиков заключается в их способности к биоаккумуляции, то есть накоплению в тканях живых организмов [1]. Попадая в водную среду, соли тяжелых металлов оказывают негативное влияние на гидробионтов [2]. Токсичность солей тяжелых металлов, поступающих в водоем с грунтовыми и сточными водами, для водных экосистем возрастает с повышением температуры. Это особенно актуально в условиях глобального изменения климата [3].

В ходе эволюции живые организмы приобрели ряд неспецифических защитных механизмов, позволяющих им справиться с воздействием стрессовых факторов. Одним из ключевых клеточных механизмов стресс-резистентности является экспрессия и синтез белков теплового шока (БТШ). К наиболее изученным из них относятся БТШ с молекулярной массой в области 70 кДа – БТШ70. Гены этих белков высоко консервативны и схожи у большинства организмов [4]. Такая степень консерватизма свидетельствует об исключительно важной роли БТШ70 в защите клеток от повреждений стрессовыми факторами.

Особенно актуально изучение подобных механизмов в экосистемах, до недавнего времени не сталкивающихся с негативным влиянием солей тяжелых металлов. К таким экосистемам относится озеро Байкал. Фауна Байкала развивалась длительное время в стабильных, изолированных условиях. В результате этого сформировался уникальный фаунистический комплекс с высокой степенью биоразнообразия и эндемизма в ряде групп [5]. Одной из таких групп в озере являются амфиподы (Amphipoda, Crustacea), представленные в Байкале более чем 350 видами и подвидами. Амфиподы обитают в широком диапазоне условий среды, в том числе температурных, и представляют собой удобную модель для изучения молекулярных и клеточных механизмов стресс-резистентности [6]. Благодаря явлению «несмешиваемости» байкальского и палеарктического фаунистических комплексов [5], байкальская фауна развивалась относительно изолировано от Палеарктической, окружающей озеро. Увеличивающееся в последние годы антропогенное воздействие на экосистему Байкала и Байкальского региона совместно с глобальным изменением климата может негативно сказаться на экосистеме озера, нарушив барьер несмешиваемости фаун. В связи с этим, изучение механизмов неспецифической резистентности к стрессовым факторам среды у потенциальных палеарктических вселенцев в Байкал и у узкоспециализированных байкальских эндемиков представляется актуальным.

Целью данного исследования было: определить способность трех ключевых видов амфипод (двух байкальских и одного палеарктического) к активации клеточного механизма неспецифической резистентности - БТШ70 при совместном воздействии хлорида кадмия ( $CdCl_2$ ) и повышенных температур.

В качестве объектов исследования были выбраны два вида байкальских эндемичных амфипод, контрастно отличающиеся по отношению к температуре - литоральный термоустойчивый *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.) и сублиторальный термочувствительный *E. verrucosus* (Gerstf.). В качестве потенциального палеарктического вселенца был выбран обитающий в мелких озерах в прибрежной зоне озера Байкал, но до сих пор отсутствующий в самом Байкале, термоустойчивый *Gammarus lacustris* Sars.

Сбор амфипод осуществляли с помощью гидробиологического сачка с глубины до 1 м в летние месяцы 2014 в пос. Большие Коты (Южный Байкал). Байкальских амфипод вылавливали в зоне литорали оз. Байкал, *G. lacustris* – ловили в небольшом озере в 3 км от байкальского побережья.

Амфипод содержали отдельно по видам, в аэрируемых аквариумах, при температурах, соответствующих предпочитаемым рачками в условиях термопреферендума [6]. В экспериментах использовали взрослых, здоровых и активно плавающих рачков. Предварительно акклиматизированных амфипод (3-5 суток) экспонировали в термостатируемых аквариумах с постоянной аэрацией. Инкубация животных происходила в течение 0.5; 1; 3; 6 часов при температурах акклиматизации (контроль), в условиях «мягкого теплового шока», соответствующих оптимальным, повышенным на 10°C, и в условиях «острого теплового шока», соответствующих температуре гибели 50% особей за 24 часа (LT50). Параллельно экспонировали две экспериментальных группы: при описанных температурах и при совместном воздействии этих температур с добавлением  $CdCl_2$  в концентрации, соответствующей LC10 (lethal concentration – летальная концентрация, при которой гибло 10% от общего числа животных в сутки) для каждого вида. В таблице 1 указаны температурные условия эксперимента. В ходе экспозиции живых рачков замораживали в жидком азоте и фиксировали в тризоле для последующего биохимического и молекулярного анализов.

Таблица 1.

	<i>E. verrucosus</i>	<i>E. suanensis</i>	<i>G. lacustris</i>
"Оптимальная температура" (термопреферендум)	6 °C	10 °C	15 °C
"Мягкий тепловой шок" (+10 к ОТ)	16 °C	20 °C	25 °C
"Острый тепловой шок" (T=50% смертности в течение 24 ч)	24 °C	26 °C	27 °C

Для выделения РНК использовали животных весом от 200 до 500 мг, которых гомогенизировали с использованием 0,5-1 мл Qiazol Reagent (Qiagen, USA) в гомогенизаторе MM400 (Retsch, Germany). К смеси добавляли 200 мкл хлороформа, аккуратно перемешивали и центрифугировали. Верхнюю фазу переносили на MaXtract гель (Qiagen, USA), для лучшего отделения РНК от геномной ДНК по прилагаемому протоколу. Далее из водной фазы была изолирована РНК согласно протоколу для miRNeasy набору. РНК элюировали с колонок 30 мкл воды. Для обратной транскрипции использовали 5 мкг РНК, на которой синтезировали кДНК, с использованием Oligo(dT)18 праймера (Fermentas, USA, #SO131) и обратной транскриптазы H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas, USA, #EP0452) по инструкции фирмы производителя.

Экспрессию гена *bmi70* оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems). Реакцию проводили в объеме 12.5 мкл с использованием набора SensiMix SYBR Low-ROX (Bioline) с финальной концентрацией 3 mM MgCl<sub>2</sub> и 250 нМ каждого праймера.

Для амплификации гена-мишени (*bmi70*) и референтных генов (*β-actin*, *gapdh*, *Efla*) использовали специфичные праймеры: для гена *β-actin* прямой – GCTGCGGTGTTTCATCTCATTTCTC, обратный TTCGTCTGGACTTGGCTGGTC; для гена *gapdh* прямой – TTGCCGCCCTCAGCCTTG, обратный – CTCAGGTGGTCGCCGTC AAC; для гена *Efla* прямой – CTCGGTGCTGTCCATCTTGTTG, обратный – GGCTGATTGTGCTGTGCTGATC; для гена *hsp70* прямой – CCAAGATGAAGGAGACTGCTGATG, обратный – CGCCGTGGGTTTCGTTGATAATC. Количественная ПЦР проводилась при следующих условиях: 94 °C 4 мин; 35 циклов 95 °C 20 сек, 60 °C 20 сек и 72 °C 20 сек. Экспрессию гена *bmi70* измеряли методом сравнения параметра относительной экспрессии ΔΔCt [7].

Для определения содержания БТШ70 проводили денатурирующий электрофорез с последующим вестерн-блоттингом. Вестерн-блоттинг осуществляли методом полусухого переноса на PVDF мембрану (GE Healthcare, UK) [8]. Мембраны по очереди выдерживали от 30 мин. до 1 часа в растворе моноклональных антител к БТШ70 (Sigma-Aldrich, # H5147, разведение 1:5000) и 4 часа в растворе вторичных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой (antimouse IgG:AP Conj., Stressgen # SAB-101, разведение 1:1000). Содержание БТШ70 выравнивали на уровень актина. Для детекции актина использовали антитела (Sigma-Aldrich, # A2668, разведение 1:1000) и вторичные антитела (Sigma, # A9919, разведение 1:1000). Окрашенные мембраны, сканировали и подвергали денситометрическому анализу при помощи программы ImageJ [9]. Уровень оптической плотности бэндов БТШ70 в каждом образце нормализовали по актину.

Как показали полученные результаты, хлорид кадмия приводил к повышению содержания белка или экспрессии генов БТШ70 при различных температурах у всех исследованных видов. Отмечали межвидовые отличия в реакции повышения экспрессии или увеличения содержания белка при разных температурах и при совместном воздействии кадмия и температуры (Табл. 2). У байкальского эндемичного *E. suanensis* увеличение содержания БТШ70 (белка или мРНК) в присутствии хлорида кадмия отмечали уже при оптимальной температуре. В условиях «мягкого теплового шока» увеличение содержания белка или экспрессии генов БТШ70 наблюдали у термочувствительного *E. verrucosus* и палеарктического *G. lacustris*. Совместное воздействие «мягкого теплового шока» и хлорида кадмия вело к увеличению содержания белка или мРНК БТШ70 у всех исследованных видов. Экспозиция в условиях «острого теплового шока» приводила к увеличению содержания белка или усилению экспрессии генов БТШ70 у обоих видов байкальских амфипод, тогда как для палеарктического *G. lacustris* такого повышения показано не было. При совместном воздействии «острого теплового шока» и хлорида кадмия отмечали увеличение содержания белка или мРНК БТШ70 у обоих байкальских видов, при этом у палеарктического *G. lacustris* происходило кратковременное снижение экспрессии генов БТШ70 через 0.5 ч. от начала экспозиции с последующим восстановлением до контрольных значений (Табл. 2).

Таблица 2.

	<i>E. verrucosus</i>		<i>E. cyaneus</i>		<i>G. lacustris</i>	
	6°C	10°C	10°C	15°C	15°C	15°C
"Оптимальная температура" (термопреференция)	+Cd	-Cd	+Cd	-Cd	+Cd	-Cd
			↗			
"Мягкий тепловой шок" (+10 к ОТ)	16°C	20°C	20°C	25°C	25°C	25°C
	+Cd	-Cd	+Cd	-Cd	+Cd	-Cd
	↗	↗	↗		↗	↗
"Острый тепловой шок" (T-50% смертности в течение 24 ч)	24°C	26°C	26°C	27°C	27°C	27°C
	+Cd	-Cd	+Cd	-Cd	+Cd	-Cd
	↗	↗	↗	↗	↘	

Наблюдаемые результаты связаны с основной функцией БТШ70 в клетке – функцией молекулярных шаперонов, обеспечивающих фолдинг вновь синтезированных или рефолдинг частично-денатурированных белков. При разного рода протеотоксических воздействиях, вызванных критическими температурами или прямым воздействием ионов кадмия на белковые молекулы, в клетке происходит многократное усиление экспрессии и синтеза молекулярных шаперонов. Структурные и функциональные особенности молекулярного механизма экспрессии и синтеза БТШ70 у двух видов байкальских амфипод были описаны в наших предыдущих работах [10].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о большей чувствительности к кадмию неспецифической системы стресс ответа БТШ70 у байкальского *E. cyaneus*, активацию экспрессии или увеличение содержания БТШ70 при воздействии CdCl<sub>2</sub> у которого отмечали уже при оптимальной температуре. При всех температурных воздействиях CdCl<sub>2</sub> также вызывал усиление экспрессии белков и генов БТШ70. Кратковременное снижение экспрессии генов БТШ70 при совместном воздействии «острого теплового шока» и хлорида кадмия у палеарктического *G. lacustris* может свидетельствовать о превышении уровня протеотоксического воздействия, что привело к частичной дестабилизации механизма экспрессии и синтеза молекулярных шаперонов. Наиболее устойчивым к протеотоксическому воздействию CdCl<sub>2</sub> показан термочувствительный байкальский *E. verrucosus*, активацию экспрессии БТШ70 в присутствии CdCl<sub>2</sub> для которого отмечали при температурах, являющихся стрессовыми для этого вида, таким образом, это повышение может быть в большей степени обусловлено температурным воздействием, чем воздействием CdCl<sub>2</sub>.

Повышенная устойчивость *E. verrucosus* к CdCl<sub>2</sub> может быть связана с более низкими предпочитаемыми температурами и, соответственно, более низкой скоростью общего метаболизма, благодаря чему накопление кадмия происходит менее активно, чем у более мелких и теплолюбивых *E. cyaneus* и *G. lacustris*. Кроме этого, относительно крупные размеры и большая толщина экзоскелета также могут служить факторами, повышающими устойчивость к кадмию у этого вида. Наблюдаемая большая чувствительность к хлориду кадмия при оптимальных температурах и в условиях «мягкого теплового шока» у байкальского *E. cyaneus* по сравнению с палеарктическим *G. lacustris* может свидетельствовать о наличии опасности вытеснения байкальского вида палеарктическим при его вселении в оз. Байкал в условиях антропогенного воздействия и глобального изменения климата.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-00501\_a программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «ИГУ») и совместной программы академических обменов DAAD - Минобрнауки РФ М. Ломоносов 2014-2015.

#### Список литературы

1. Богдановский Г.А. Химическая экология: Учебное пособие. Москва Изд-во МГУ. - 1994. – С. 237.
2. Oxidative stress in fish induced by pesticides / A. Slaninov, M. Smutna, H. Modra et al. // Neuroendocrinology Letters 30 (SUPPL.1). – 2009. - P. 2-12.
3. Kerr R. A. Atlantic climate pacemaker for millennia past, decades hence? / R.A. Kerr // Science. - 2005. - V. 309. - P. 41 - 42.
4. Mayer M. P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism / M. P. // Trends in Biochemical Sciences. – 2013. – P 507–514.
5. Kozhova O.M., Izmesteva L.R. 1998. Lake Baikal: Evolution and Biodiversity. The Netherlands: Backhuys Publishers. Leiden, 1998. - 447 p.

6. Тимофеев М. А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 2011. - 384 с.
7. Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes / J. Vandesompele, F. Pattyn, B. Poppe, et al // *Genome Biology*. – 2002. – V 3. – I. 7. – P 0034.1–0034.11.
8. Towbin H., Staehelin T., Gordon T. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *PNAS USA* – 1979. – V. 76. – P. 4350–4354.
9. Ferreira T., Rasband W. *ImageJ User Guide*. - 2012.- P. 198.
10. Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baika / D.S. Bedulina, M.B. Evgen'Ev, M.A. Timofeyev, et al // *Molecular Ecology*. – 2013. – V. 25. – I. 5. – P. 1416-1430.

УДК 595.324:574.632

### ОТЕК РАКОВИНКИ CLADOCERA (CRUSTACEA)

А.В. Макрушин<sup>1</sup>, А.С. Семенова<sup>2</sup>, О.П. Дубовская<sup>3</sup>, Е.Б. Фефилова<sup>4</sup>,  
Н.В. Родионова<sup>5</sup>, В.И. Лазарева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 пос. Борок Ярославская обл. Россия, makru@ibiw.yaroslavl.ru;

<sup>2</sup>Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,  
236022 Калининград, ул. Дм. Донского, 5. Россия, a.s.semenowa@gmail.com

<sup>3</sup>Институт биофизики Сибирского отделения РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/50 и Сибирский федеральный университет,  
660041 Красноярск, Свободный, 79. Россия, dubovskaya@ibp.krasn.ru;

<sup>4</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН  
167982 Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28. Россия, fefilova@ib.komisc.ru;

<sup>5</sup>Институт озераведения РАН. 105199 С.-Петербург, ул. Севастьянова, 9. Россия, nleptodora@gmail.com.

Среди Cladocera Куршского залива, Ладожского озера, луж Большеземельской тундры, Нювчимского водохранилища, озер Дарвиновского заповедника и Зап. Саяна встречаются особи с отечной раковинкой. Вероятная причина заболевания – загрязнение вод.

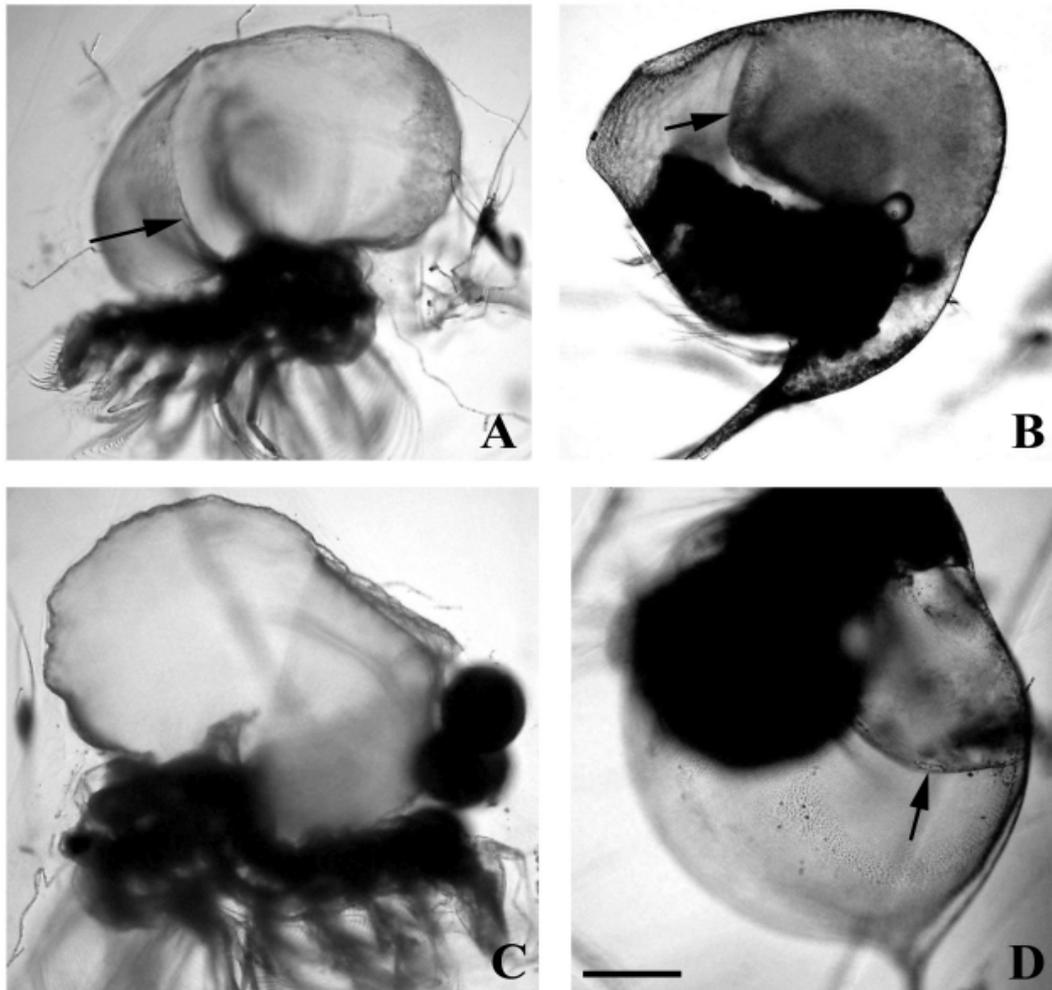
*Ключевые слова:* Cladocera, токсикоз.

Загрязнение вод приняло глобальный характер. Видимо, в связи с этим у Cladocera стал обычным отек раковинки. Отек – это избыточное накопление жидкости во внеклеточных пространствах. Раковинка этих рачков (кроме *Polyphemiformis* и, вероятно, *Moinidae* и *Penilia*) состоит из двух слоев гиподермы, соединенных протоплазматическими мостиками. Между слоями гиподермы, омывая мостики, циркулирует кровь. Отек раковинки заключается в ее расслоении и заполнении пространства, образовавшегося между разошедшимися слоями гиподермы, жидкостью. Расслаиваться может участок раковинки или она вся. Впервые это заболевание у Cladocera описала, насколько нам известно, В.А.Сергеева [6]. Позже были опубликованы посвященные ему статьи других авторов [1-5]. Цель сообщения – привлечь внимание гидробиологов к ухудшающемуся состоянию планктонных организмов пресных вод.

Просмотрены фиксированные 4% формалином пробы, собранные в 2007-2013 годах. В Куршском заливе (Балтийское море) особи с отечной раковинкой встречались среди *Bosmina* sp., *Chydorus* sp., *Daphnia* sp., *Diaphanosoma* sp. и *Limnoscida frontosa*, в Ладожском озере – среди *Leptodora kindtii*, *L. frontosa*, *Diaphanosoma* sp., *Daphnia* sp., *Ceriodaphnia* sp. и *Bosmina* sp., в Нювчимском водохранилище (бассейн Вычегды притока Северной Двины) – среди *Sida crystallina* и *L. frontosa*, в озерах Дарвиновского заповедника (Вологодская обл.) Дубровском, Змеином и Кривом – среди *Bosmina* sp., *Diaphanosoma* sp., *Holopedium gibberum* и *Daphnia* sp., в лужах Большеземельской тундры (республика Коми) – среди *Daphnia pulex* и *Chydorus* sp., в горных озерах Радужном, Каровом и Ойском (Западный Саян Красноярский край) – среди *H. gibberum* и *Daphnia* spp. Озера, расположенные в Дарвиновском заповеднике, загрязняются только с атмосферными осадками. Все виды природопользования в нем отсутствуют. В остальные водоемы, пробы из которых мы осматривали, загрязнение поступает и с суши, и из воздуха.

Отек раковинки у разных видов выглядит по-разному. У представителей родов *Holopedium*, *Limnoscida*, *Diaphanosoma* и *Leptodora* листки гиподермы раковинки примерно одинаковой твердости. Поэтому, когда жидкость начинает изнутри на них давить, растягиваются оба листка. Вследствие этого

раковинка принимает форму пузыря, прикрепленного к спинной стороне рачка. На рисунке 1А изображен *H. gibberum* из оз. Ойского с полностью расслоившейся раковинкой, которая из-за заполнения пространства между слоями гиподермы жидкостью превратилась в пузырь. Оболочкой передней его половины служит наружный листок гиподермы раковинки, оболочкой задней – внутренний. Видна указанная стрелкой граница между передней и задней половинами пузыря. Она до расслоения раковинки была ее краем. При отеке раковинки яйца из выводковой сумки вытесняются. На рисунке 1С показан *H. gibberum* из оз. Ойского. Видно, что в результате полного расслоения раковинки образующийся пузырь из выводковой сумки выталкивает два яйца.

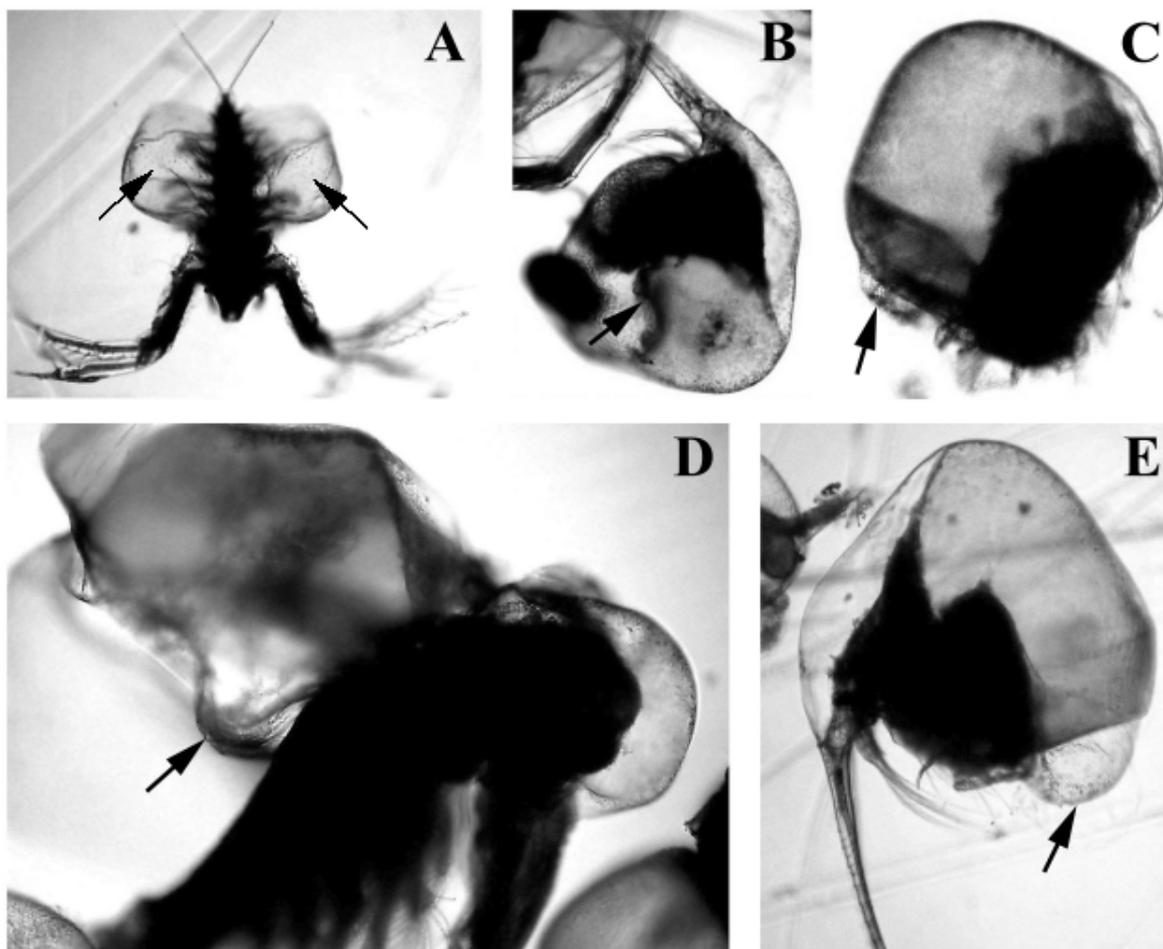


**Рис. 1.** Cladocera с отечной раковинкой. А – *Holopedium gibberum*, В – *Bosmina* sp., С – *Holopedium gibberum*, D – часть тела *Daphnia* sp. Масштаб всюду 200 мкм

В отличие от *Holopedium*, *Limnosida*, *Diaphanosoma* и *Leptodora* у представителей родов *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Bosmina*, *Chydorus* и *Sida* наружный листок гиподермы раковинки тверже внутреннего. Поэтому он у них при отеке раковинки свою форму сохраняет, и отечная раковинка с боков обхватывает туловище рачка продолжает. Растягивается только внутренний листок гиподермы и пузырь растет внутри выводковой сумки. На рисунке 1В изображена *Bosmina* sp. из Куршского залива. В ее выводковой сумке пузырь. Стрелка указывает на ту часть его оболочки, которая была внутренним листком гиподермы раковинки. На рисунке 1D изображена часть тела *Daphnia* sp. из оз. Ойского. В ее выводковой сумке пузырь. Стрелка указывает на ту часть его оболочки, которая была внутренним листком гиподермы раковинки. На рисунке 2В изображена *Bosmina* sp. из Куршского залива. Пространство ее выводковой сумки более чем наполовину заполнено пузырем. Хорошо виден его неровный край, на который указывает стрелка. Пузырь вытесняет из выводковой сумки яйца.

На рисунке 2С изображен *Chydorus* sp. из Куршского залива. Его выводковая сумка заполнена пузырем, край которого, указанный стрелкой, высовывается из нее. На рисунке 2D изображена *S.*

*crystallina* из Ньючимского водохранилища. В ее выводковой сумке пузырь. Стрелка указывает на ту часть его оболочки, которая была внутренним листком гиподермы раковинки. На рисунке 2Е изображена *Bosmina* sp. из Куршского залива. Ее выводковая сумка заполнена пузырем, край которого, указанный стрелкой, выступает наружу. Рисунок, похожий на рисунок 2Е, опубликован В.А. Сергеевой [6], которая пузырь, высовывающийся из выводковой сумки у *Bosmina longispina* из Ладожского озера, называет «крупным образованием типа опухоли».



**Рис. 2.** Cladocera с отечной раковинкой. А – *Diaphanosoma* sp., В – *Bosmina* sp., С – *Chydorus* sp., D – *Sida crystallina*, Е – *Bosmina* sp. Масштаб тот же.

Туловище у Cladocera с отечной раковинкой из-за давления пузыря отгибается вперед, как показано на рисунках 1В, D и 2В, С, Е. У *Diaphanosoma* и *Daphnia* створки раковинки в пробах бывают распахнутыми. Это иногда позволяло рассмотреть на внутренней их стороне пузыри. На рисунке 2А изображена *Diaphanosoma* sp. из Куршского залива. Посредине распахнутых створок раковинки видны две указанные стрелками нечетко очерченные области. Это, вероятно, отеки.

Ответить на вопрос, отечна раковинка у той или иной особи или нет, не всегда просто. Хорошо виден пузырь у *L. frontosa* и *S. crystallina*. Он хорошо виден и у *Daphnia* sp., *Chydorus* sp. и *Bosmina* sp., но только если он большой и высовывается из выводковой сумки (рис. 2С, Е), а у *H. gibberum* – когда раковинка становится пузырем (рис. 1А, С). У *Bosmina* sp., *Chydorus* sp., *Daphnia* sp., если пузырь, находящийся внутри выводковой сумки, не высовывается из нее, рассмотреть его сквозь раковинку трудно. Трудно судить о состоянии раковинки, если она смята или повреждена, что часто наблюдалось у *H. gibberum* и *Diaphanosoma* sp.

При обсуждении с коллегами структур, называемых нами отеком или пузырем, они высказывали сомнение, что эти структуры встречаются у живых особей, и задавали вопрос – а являются ли они следствием фиксации. Не являются. Отек раковинки наблюдался у живых *L. kindtii* [2, 3]. Гистологические фиксаторы сохраняют прижизненное состояние тканей. В статьях [1, 4, 5]

опубликованы фотографии гистологических срезов *L. frontosa*, с отечной раковинкой. Эти рачки были зафиксированы жидкостью Буэна, т.е. фиксатором гистологическим.

В Куршском заливе у *Daphnia* sp. и *Diaphanosoma* sp. доля особей с отечной раковинкой в среднем за 2007-2013 годы составляла 0.1%, доходя иногда до 3-4%. У *Bosmina* sp. и *Chydorus* sp. в этом заливе в среднем за эти годы доля особей с отечной раковинкой была 6% и 7%, доходя иногда до 50-70%. В Нювчимском водохранилище у *S. crystallina* их доля была 63%, у *L. frontosa* – 17%, в оз. Радужном – у *H. gibberum* – 12%. В Ладожском озере у *L. frontosa* доля особей с отечной раковинкой колебалась на разных станциях между 31% и 84%, у *Daphnia* sp. – между 29% и 67%, у *L. kindti* она была 19%. Эти данные занижены, т.к. отек раковинки во многих случаях рассмотреть не удавалось.

Отек раковинки – патология легко обнаруживаемая. Возможно, Cladocera страдают и другими заболеваниями, вызванными загрязнением вод, для выявления которых нужны иные подходы. Проблема заболеваний планктонных организмов – частный случай более общей проблемы экологически обусловленных заболеваний, которым ныне подвержены растения, рыбы, наземные и водные млекопитающие, а также люди.

#### Список литературы

1. Голубков С.М., Макрушин А.В. Патологические явления у Cladocera (Crustacea) из восточной части Финского залива // Гидробиол. журн. 2012. Т. 48. №4. С.31–34.
2. Макрушин А.В. О нарушении размножения *Leptodora kindti* (Cladocera, Crustacea) в Волге // Гидробиол. журн. 2003. Т. 39. №2. С.116–119.
3. Макрушин А.В., Запруднова Р.А. О патологическом изменении выводковой сумки *Leptodora kindti* (Cladocera, Crustacea) // Зоолог. журн. 2000. Т. 79. №6. С. 742–744.
4. Макрушин А.В., Голубков С.М. Гистопатологическое обследование Cladocera (Crustacea) из восточной части Финского залива // Региональная экология. 2010. №4. С. 36–39.
5. Макрушин А.В., Голубков С.М., Асанова Т.А. и др. Проявление глобального экологического кризиса на организменном уровне // Тр. Зоол. ин-та РАН. Приложение 3. 2013. С. 33–40.
6. Сергеева В.А. Состояние и распределение зоопланктона в очагах загрязнения Ладожского озера // Сб. научных трудов ГосНИОРХ. 1988. Вып. 285. С. 114–128.

УДК 547.915: 639.215.2

### ОСОБЕННОСТИ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ЩУКИ (*ESOX LUCIUS* L.) ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ КАДМИЯ

В.М. Марценюк, Ю.И. Сеник, В.Я. Бияк, В.А. Хоменчук, В.З. Курант

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка  
г. Тернополь, Украина, jurasenyk08@gmail.com

Исследованы изменения содержания фосфолипидов в клетках гепатопанкреаса щуки при действии 0,005 и 0,02 мг/л рыбохозяйственных ПДК ионов кадмия. Установлено, что при действии токсиканта наблюдаются дозозависимые изменения отдельных фракций фосфолипидов и их соотношения.

*Ключевые слова:* щука, кадмий, фосфолипиды, гепатопанкреас.

Исследование проведено на двухлетках щуки массой 350 - 400 г, содержащихся в аквариумах объемом 200 л с отстоянной водопроводной водой, при следующих условиях: содержание  $O_2$  -  $7,5 \pm 0,5$  мг/л  $CO_2$  -  $2,5 \pm 0,3$  мг/л, pH -  $7,8 \pm 0,1$ . В каждом аквариуме содержалось по 5 рыб.

Исследовали влияние 0,005 мг/л и 0,02 мг/л  $Cd^{2+}$ , что представляет собой, соответственно, 0,5 и 2 рыбохозяйственных предельнодопустимых концентраций (ПДК). Необходимые концентрации ионов металлов в воде создавали растворением соли  $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$  квалификации "х.ч."

Период акклимации рыб составлял 14 суток, что является достаточным для формирования адаптивного ответа на действие стресс-фактора.

После указанного срока рыб декапитировали и на холоде отбирали переднюю долю гепатопанкреаса. Исследуемую ткань гомогенизировали в охлажденном растворе следующего состава: 0,22 М сахараза,  $10^{-4}$  М ЭДТА и 0,01 М трис-НСI (pH 7,2) в соотношении навеска ткани: объем раствора 1:5.

Для экстрагирования общих липидов к гомогенатам добавляли хлороформ-метаноловую смесь в отношении 2:1 по методу Фолча. Время экстрагирования составляло 12 часов. Нелипидные примеси из экстрактов удаляли отмыванием 1% раствором KCl.

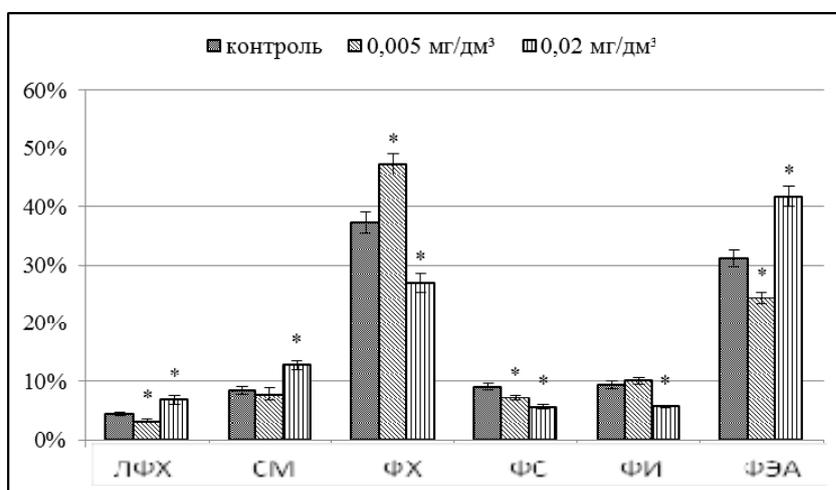
Разделение липидов на отдельные фракции проводили методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии в герметичных камерах на пластинках "Sorbfil", перед работой пластинки активировали 30 минут при температуре 105<sup>0</sup>С в сушильном шкафу.

Системой растворителей для разделения фракций фосфолипидов была смесь хлороформ-метанол-ледяная уксусная кислота-дистиллированная вода в соотношении 60:30:7:3. Полученные хроматограммы проявляли в камере, насыщенной парами йода, для идентификации отдельных фракций липидов использовали специфические реагенты и очищенные стандарты, при этом выявлены следующие фракции фосфолипидов: сфингомиелин (СМ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилэтанолламин (ФЭА).

Содержание фосфолипидов в тканях определяли по количеству неорганического фосфора по методу Васьяковского [7].

Все полученные данные обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

В гепатоцитах щуки при экспозиции 0,005 мг/дм<sup>3</sup> ионов Cd<sup>2+</sup> отмечается активация анаболических преобразований фосфолипидного компонента гепатоцитов, подтверждением чего является увеличение содержания фосфатидилхолина в 1,27 раза (p <0,05; рис. 1) и достоверное снижение содержания лизофосфатидилхолина, соответственно, в 1,35 раза.



**Рис. 1.** Содержание отдельных фракций фосфолипидов в клетках гепатопанкреаса рыб при действии ионов кадмия (M±m, n=5)

Синтез ФХ, вероятно, является следствием активации преобразования ФС→ФХ с участием фосфатидилсериндекарбоксилазы и дальнейшего метилирования ФЭА. Косвенным подтверждением этого является снижение количества фосфатидилэтанолламина и фосфатидилсерина, соответственно, в 1,28 и 1,24 раза (p <0,05).

Влияние сублетального количества металла в гепатоцитах щуки активировало деструкцию фосфолипидов. Так, отмечается достоверное снижение содержания фосфатидилхолина и одновременное накопление лизофосфатидилхолина, что, вероятно, является следствием активации ионами кадмия лизосомальной фосфолипазы A<sub>2</sub> [6] и, соответственно, деструкции внешнего липидного слоя мембраны.

Снижение содержания основного липидного компонента внешнего слоя мембран клеток также может быть связано с активацией ионами кадмия преобразования ФХ в СМ с участием церамидхолинфосфотрансферазы [3]. Косвенным подтверждением таких изменений является достоверное увеличение содержания сфингомиелина в 1,51 раза. Такие изменения индуцируют увеличение плотности липидного бислоя и, соответственно, снижение его проницаемости для ионов металла [1].

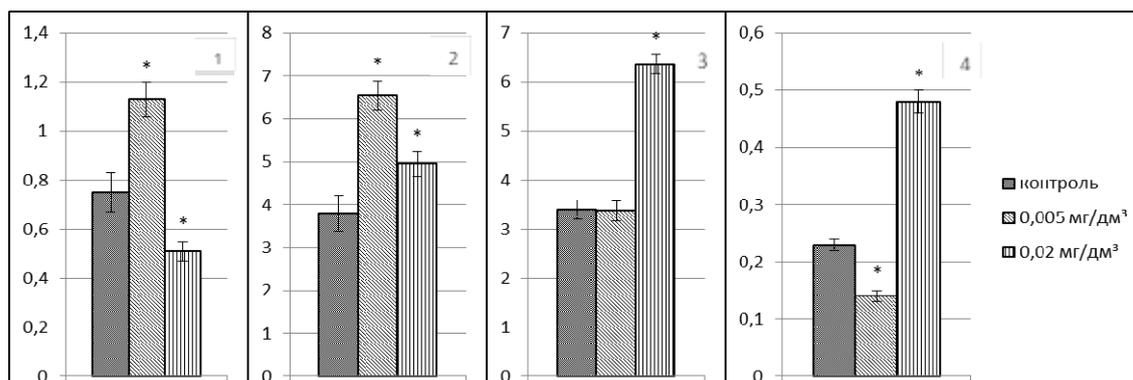
Увеличение содержания основного липидного компонента внутреннего слоя мембран, очевидно, является следствием ингибирования ионами Cd<sup>2+</sup> преобразования ФЭА в ФХ с участием метилтрансфераз [2] и его синтеза с фосфатидилсерина с участием фосфатидилсериндекарбоксилазы. Подтверждением этого предположения является достоверное снижение количества последнего в клетках гепатопанкреаса в 1,61 раза.

Воздействие повышенных концентраций металла в печени рыб индуцировало достоверное снижение в 1,74 раза количества ФИ, что можно объяснить активацией ионами Cd<sup>2+</sup> фосфолипазы С [5] и фосфолипазы A<sub>2</sub> [4].

Оценку биологических изменений фосфолипидного спектра осуществили на основе коэффициентов отношения содержания фракций этих фосфолипидов (рис. 2).

В печени щуки наблюдается достоверный рост в 1,51 раза показателя  $[\text{ФХ}/(\text{ФЭА}+\text{ФС}+\text{ФИ})]$ , что показывает интенсификацию синтеза ФХ из его предшественников. Подтверждением этого является увеличение соотношения ФХ/ФС в 1,60 раза и отсутствие достоверных изменений показателя ФЭА/ФС. Снижение соотношения СМ/ФХ обусловлено достоверным накоплением фосфатидилхолина и отсутствием достоверных изменений содержания СМ.

При действии  $0,02 \text{ мг/дм}^3$  металла наблюдается снижение показателя  $[\text{ФХ}/(\text{ФЭА}+\text{ФС}+\text{ФИ})]$  в 1,47 раза, что указывает, как на интенсификацию деструкции внешнего липидного бислоя, так и подтверждает развитие адаптивного ответа на действие токсиканта.



**Рис. 2.** Изменения соотношения фракций фосфолипидов в клетках гепатопанкреаса рыб при действии ионов кадмия ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ):

1.  $\text{ФХ}/(\text{ФЭА}+\text{ФС}+\text{ФИ})$
2.  $\text{ФЭА}/\text{ФС}$
3.  $\text{ФХ}/\text{ФС}$
4.  $\text{СМ}/\text{ФХ}$

Общая тенденция к росту соотношения ФХ/ФС и ФЭА/ФС обусловлена активацией метаболизма фосфолипидов. Так, анализ фосфолипидного состава гепатоцитов рыб показал достоверное увеличение количества ФЭА и снижение содержания ФХ. Эти изменения могут быть следствием активации преобразования фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин, вследствие его декарбоксилирования, в то же время рост показателя ФХ/ФС обусловленный значительным снижением концентрации ФС.

При действии исследованных концентраций токсиканта отмечается снижение ( $p < 0,05$ ) соотношения СМ/ФХ, что, вероятно, является следствием синтеза ФХ, ведь содержание СМ практически не отличалось от контрольных значений. В то же время при действии сублетальной концентрации  $\text{Cd}^{2+}$ , исследуемое соотношение выросло в 2,09 раза. Такие изменения этого показателя указывают на интенсификацию ферментативного превращения фосфатидилхолина в сфингомиелин.

#### Список литературы:

1. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs /J.C. McGeer, C. Szebedinszky, D.G. McDonald et al.// *Aquat. Toxicol.* 2000. Vol. 50, № 3. P. 231-243.
2. Kodaki T., S. Yamashita Phosphatidylethanolamine methylation pathway // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 15428-15435.
3. Leslie J.M., Buckley J.T. Phospholipid composition of gold fish (*Carassius auratus* L.) liver and brain and temperature-dependence of phosphatidylcholine synthesis // *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. Vol. 53B, № 3. P. 335-337.
4. Maeshima Y., Makino H. Molecular mechanism of cell injury // *Contrib Nephrol.* 2003. Vol. 139. P. 32-43.
5. Panfoli I., Burlando B., Viarengo A. Effects of heavy metals on phospholipase C in gill and digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. // *Comparative Biochem. and Physiol.* 2000. Vol. 127, Part B. P. 391-397.
6. Role of phospholipase A2 in the cytotoxic effects of oxalate in cultured renal epithelial cells /Y. Kohjimoto, L. Kennington, C.R. Scheid et al.// *Kidney Int.* 1999. Vol. 56. P. 1432-1441.
7. Vaskovsky V.E., Kastetsky E.V., Vasedin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // *J. Chromatogr.* 1985. Vol. 114. P. 129-141.

**УЧАСТИЕ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ  
В ПРОЦЕССАХ АДАПТАЦИИ И ДИСАДАПТАЦИИ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ  
К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

А.А.Мехтиев<sup>1</sup>, Н.Дж. Мустафаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана  
Баку, AZ1100, Шариф-заде,2, arifmekht@yahoo.com*

<sup>2</sup>*Институт зоологии НАН Азербайджана*

Статья посвящена исследованию методом непрямого иммуноферментного анализа уровней нового серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка (СМАБ), находящегося в прямой зависимости от уровня серотонина, и биомаркера цитохрома P-450 в печени, жабрах и головном мозге восточной быстрянки (*Alburnoides bipunctatus eichwaldi*), выловленной в реках Худат, Акстафачай, Кура и Аракс, протекающих по территории Азербайджана. Было обнаружено заметное снижение уровня цитохрома P-450 и СМАБ в печени и жабрах у рыб, выловленных в реке Акстафачай, относительно значений у рыб из реки Худат, не загрязнённой поллютантами. В печени и жабрах у рыб из рек Кура и Аракс наблюдалось значительное разнонаправленное изменение уровней цитохрома P-450 и СМАБ: снижение уровня цитохрома P-450 против повышения уровня СМАБ. В головном мозге у рыб из реки Акстафачай наблюдалось некоторое снижение цитохрома P-450 и значительное повышение уровня СМАБ у рыб из рек Кура и Аракс. Полученные результаты анализируются с позиции процессов адаптации и дисадаптации водных организмов к воздействию поллютантов.

В настоящее время наряду с широкомасштабными исследованиями биомаркеров, позволяющих выявить наличие воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды на организм, не менее актуальным является изучение молекулярных механизмов адаптации и дисадаптации к этим факторам. Актуальность данной проблемы связана с тем, что не всегда неблагоприятные факторы окружающей среды могут оказывать негативные воздействия на ткани организма, приводящие к мутагенным изменениям и оксидативному повреждению клеток, поскольку возможно подключение эндогенных адаптационных механизмов, способных защитить их от влияния неблагоприятных факторов. К такому рода известным защитным системам относятся, в частности, белки теплового шока с молекулярной массой 70 кДа, нивелирующие воздействие на ткани организма высокой температуры, кислого и щелочного значений pH, асфиксии, ионизирующего излучения и эпилептических судорог [1]. Задачей данного исследования являлось изучение характера изменений биомаркера цитохрома P-450 и серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка (СМАБ), находящегося в прямой зависимости от уровня серотонина [2], в тканях особей восточной быстрянки, отловленных в различных по степени промышленного загрязнения реках Азербайджана.

Опыты выполнены на головном мозге, печени и жабрах восточной быстрянки (*Alburnoides bipunctatus eichwaldi*), выловленной в реках Худат, Акстафачай, Кура и Аракс, протекающих в регионах Азербайджана. Для исключения влияния изменённого уровня гормонов на исследуемые показатели рыб отлавливали в 10-18 декабря. Сразу после отлова у животных извлекали головной мозг, печень и жабры и замораживали.

Уровень СМАБ и цитохрома P-450 в тканях рыб определяли методом непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах. При проведении анализа в качестве антигенов использовали суммарные белки головного мозга воблы, а также суммарные белки головного мозга, печени и жабр, экстрагированные в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,2-7,4), содержащем 0,3 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 0,1%-ный тритон X-100 и доведённые до концентрации 20 мкг/мл с помощью 0,1 М буфера трис-HCl (pH 8,6). Каждую пробу дублировали дважды и по завершении реакции вычисляли среднюю арифметическую. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд. В качестве первых антител использовали кроличьи иммуноглобулины к белку СМАБ или к цитохрому P-450 (StressGen Bioagents Company, США), а в качестве вторых антител – противокроличьи козы иммуноглобулины с конъюгированной пероксидазой хрена (Sigma, Германия). Визуализацию реакции осуществляли с помощью субстрата пероксидазы хрена – 0,05%-ного раствора ортофенилендиамина в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере (pH 4,5). Реакцию останавливали через 20 мин после добавления субстрата путем внесения в лунки по 50 мкл 3 М раствора NaOH (в случае СМАБ) или 2 М HCl (в случае цитохрома P-450); результаты реакции считывали на фотометре для иммуноферментного анализа “Molecular Devices

Spectra Max 250” (MTX Lab Systems, Inc., США) на длине волны 492 нм (длина волны сравнения – 630 нм). Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t-критерию Стьюдента.

При анализе полученных данных были выявлены следующие закономерности. Определение уровня биомаркера цитохрома Р-450 в жабрах и печени рыб, выловленных в названных реках, выявило его резкое снижение в печени животных из рек Акстафачай (на 69%;  $p<0,001$ ), Кура (на 39%;  $p<0,001$ ) и Аракс (на 28%;  $p<0,01$ ; Рис. 1) относительно его уровня в печени животных из реки Худат. В жабрах рыб из реки Акстафачай наблюдалось заметное (на 29%) снижение уровня цитохрома Р-450 ( $p<0,001$ ) и небольшое (на 16%), но достоверное ( $p<0,05$ ) снижение его уровня в жабрах рыб из реки Куры относительно указанного показателя у рыб из незагрязнённых рек (Рис. 2).

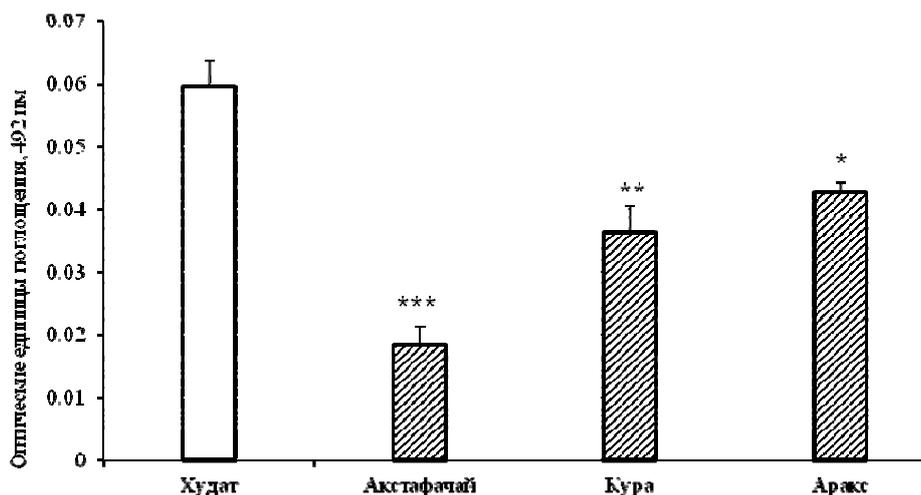


Рисунок 1. Уровень цитохрома Р-450 в печени быстрянки. \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$ .

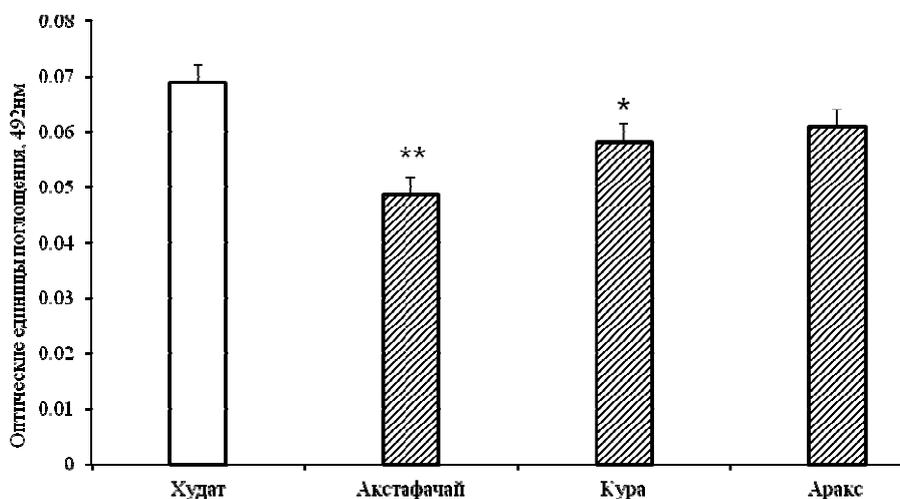


Рисунок 2. Уровень цитохрома Р-450 в жабрах быстрянки. \* -  $p<0,05$ ; \*\*\* -  $p<0,001$ .

Содержание СМАБ в жабрах и печени быстрянки, отловленной в реках Худат, Акстафачай, Кура и Аракс, протекающих по территории Азербайджана, имели сходную картину. В частности, уровень СМАБ в жабрах и печени быстрянки, отловленной в реке Акстафачай, был достоверно ниже (на 26% и 45%, соответственно;  $p<0,01$ ; Рис. 3 и 4), чем у животных из реки Худат, являющейся, по данным Министерства экологии Азербайджанской Республики, зоной, свободной от промышленных и бытовых загрязнителей [3]. С другой стороны, уровень СМАБ в жабрах и печени рыб, выловленных в реке Аракс, был значительно выше (на 64% и 43%, соответственно), чем у рыб из реки Худат ( $p<0,001$ ; Рис. 3 и 4). Уровень СМАБ также достоверно возрастал в печени у рыб из реки Куры на 29% ( $p<0,01$ ; Рис. 4).

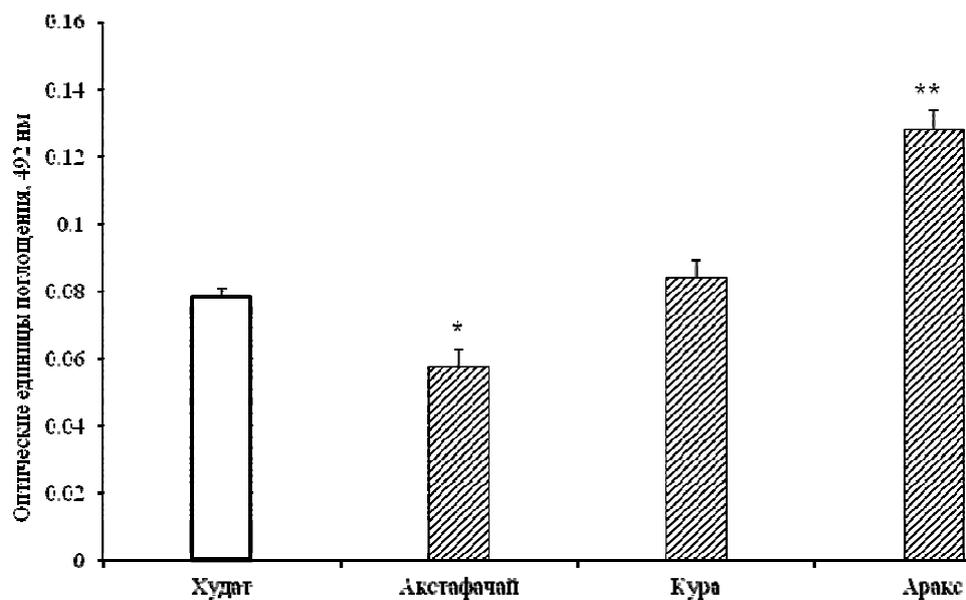


Рисунок 3. Уровень СМАБ в жабрах быстрянки. \*\* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

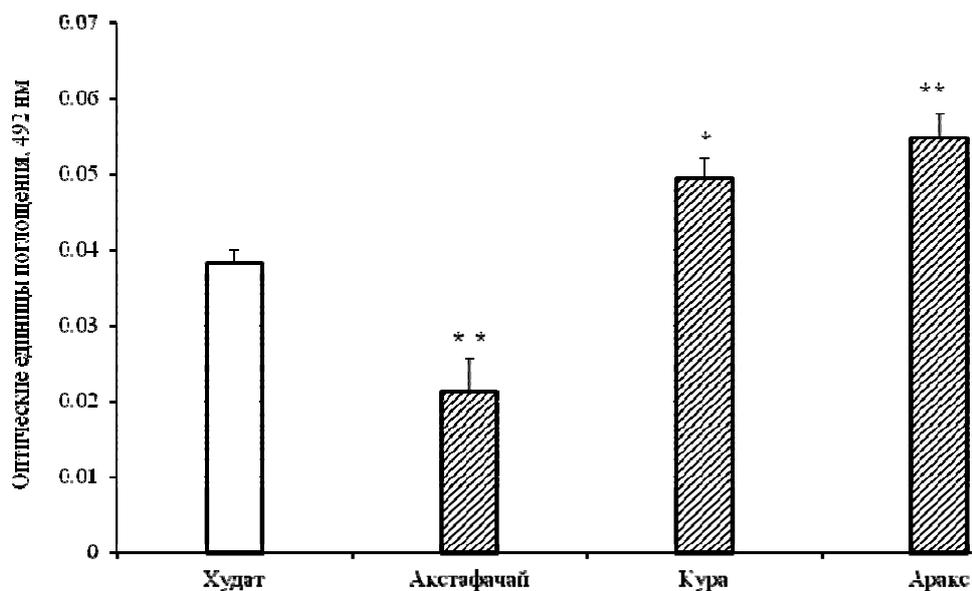


Рисунок 4. Уровень СМАБ в печени быстрянки. \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Несколько отличные результаты были получены в результате определения уровня СМАБ в головном мозге быстрянки. У рыб, выловленных в реках Кура и Аракс, уровень СМАБ в головном мозге возрастал (на 17% и 23%, соответственно;  $p < 0,001$ ), тогда как его уровень у

рыб из реки Акстафачай не отличался от этих значений у рыб из реки Худат (Рис. 5). При определении уровня цитохрома Р-450 в головном мозге было выявлено лишь его небольшое (на 14%) снижение у рыб из реки Акстафачай ( $p < 0,05$ ).

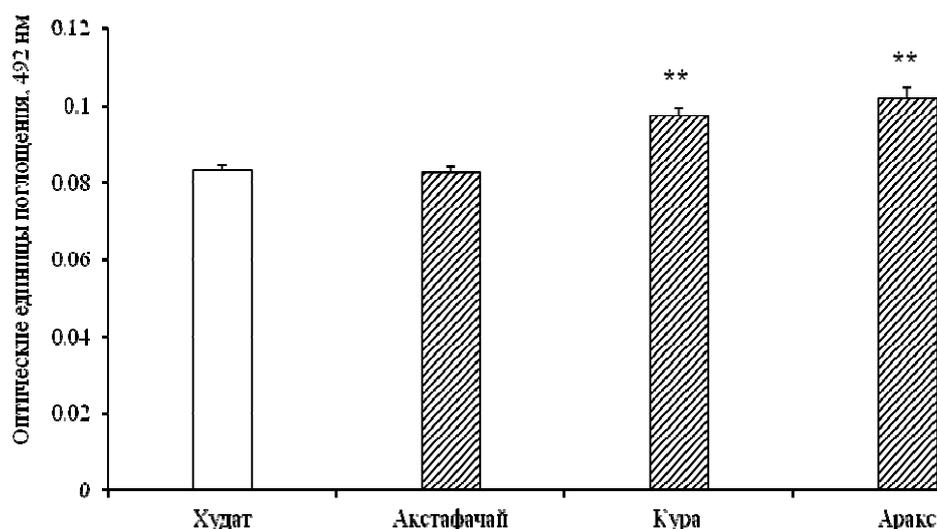


Рисунок 5. Уровень СМАБ в головном мозге быстрянки. \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Таким образом, определение уровней СМАБ и цитохрома Р-450 в печени и жабрах быстрянки выявило значительные изменения у рыб, отловленных в реках Акстафачай, Кура и Аракс относительно их значений у рыб из незагрязнённой реки Худат.

Рассмотрение уровня биомаркера цитохрома Р-450 в тканях особей быстрянки, отловленных в реках Худат, Акстафачай, Кура и Аракс, позволяет выявить степень неблагоприятного влияния загрязнителей из этих рек на функционирование исследованных тканей. Резкое снижение уровня цитохрома Р-450 в печени и жабрах рыб, отловленных в реке Акстафачай, относительно его уровня из незагрязнённой промышленными и бытовыми выбросами реки Худат, указывает на присутствие в воде этой реки загрязнителей, оказывающих негативное влияние на организм рыб. Выявленные изменения в уровне цитохрома Р-450 в печени и жабрах рыб, отловленных в реке Акстафачай, совпадают с аналогичным снижением уровня СМАБ в печени и жабрах этих рыб. Согласно данным Министерства экологии Азербайджанской Республики, уровень фенола в водах этой реки в 4 раза превышает предельно допустимую концентрацию [3]. На основании результатов ранее проведенных исследований по ингибированию с помощью СМАБ мутагенных изменений в тканях молоди осетров, содержащихся в воде, загрязнённой тяжёлыми металлами и полиароматическими углеводородами [4], а также по индукции мутагенных изменений в тканях в результате блокады активности СМАБ антителами [5] можно прийти к заключению о том, что снижение уровня СМАБ под влиянием длительной экспозиции в загрязнённой загрязнителями воде является следствием истощения ресурсов серотонинергической системы, обладающей антимутагенной активностью. Таким образом, значительное снижение уровней цитохрома Р-450 и СМАБ в печени и жабрах рыб, выловленных в реке Акстафачай, свидетельствует о выраженном негативном влиянии на их организм присутствующих в воде загрязнителей и о невозможности адаптации к ним животных.

При анализе изменения уровней цитохрома Р-450 и СМАБ в печени и жабрах у рыб, отловленных в реках Кура и Аракс, обращает на себя внимание разнонаправленный характер выявленных изменений этих показателей. В частности, у рыб, отловленных в реках Кура и Аракс, наблюдалось заметное снижение уровня цитохрома Р-450 в печени, а у рыб из реки Куры также наблюдалось снижение его уровня в жабрах, тогда как наблюдалось значительное увеличение уровня СМАБ в печени и жабрах у рыб, выловленных в реке Аракс, а также в печени рыб из реки Куры. Принимая во внимание полученные ранее данные о повышении уровня СМАБ в тканях воблы, леща и шемаи, обитающих на протяжении многолетнего периода в солоноватой воде, по сравнению с его уровнем в тканях рыб этих же видов из пресноводной среды [6], свидетельствующие об адаптивном характере этих изменений, можно прийти к заключению о том, что отмеченное выше увеличение уровня СМАБ в печени и жабрах у рыб из реки Аракс и увеличение его уровня в печени рыб из реки Куры носят компенсаторный характер и отражают адаптацию особей быстрянки к воздействию присутствующих в этих реках загрязнителей.

Анализ изменений уровня СМАБ в головном мозге у рыб, выловленных в реках Кура и Аракс, выявивших резкое повышение его содержания относительно значений рыб из реки Худат, подтверждает, с нашей точки зрения, компенсаторный характер изменений уровня этого белка в печени и жабрах рыб из реки Аракс и в печени рыб из реки Куры. В то же время содержание СМАБ в головном мозге рыб,

отловленных в реке Акстафачай, в отличие от характера его изменений в печени и жабрах у этих рыб, не различалось от его уровня у рыб из незагрязнённых рек. С другой стороны, за исключением рыб, выловленных в реке Акстафачай (небольшое снижение), уровень цитохрома P-450 в головном мозге рыб из всех исследованных рек не отличался от его уровня у рыб из незагрязнённой реки Худат. Эти результаты, по-видимому, указывают на активное участие структур головного мозга в регуляции процессов адаптации к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды.

#### Список литературы

1. Sharp F.R., Massa S.M., Swanson R.A. Heat-shock protein protection.//Trends Neurosci., 1999, V. 22, № 3, p. 97-99.
2. Мехтиев А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами.//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 129. № 8. С. 147–150.
3. Мамедова Г.М. Отчёт лаборатории геохимического режима и мониторинга загрязнения природных вод Азербайджанской Республики на февраль 2012 г. В кн.: М.А.Мамедов. Гидрография Азербайджана. Баку, Эльм. 2012. с. 52-59, 253 с.
4. Мехтиев А.А., Мовсум-заде С.К. Антимутагенная активность серотонинергической системы и подлежащие механизмы у молоди осетров (*Acipenser gueldenstaedti persicus*) и серебряных карасей (*Carassius auratus*).// Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2008. Т. 44. № 5. С. 476–481.
5. Мехтиев А.А., Палатников Г.М., Мовсум-заде С.К., Касимов Р.Ю. Возрастные изменения уровня мутаций в тканях бычков и молоди осетров в условиях блокады антителами серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка.// Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2010. Т. 46. № 5. С. 375–379.
6. Н.Дж.Мустафаев, А.А.Мехтиев. Адаптивное повышение уровня серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка в тканях пролупроходных и проходных рыб при повышении солёности воды.// Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2013, т. 49, № 6, с. 443-448.

УДК 574.64+57.084+57.087

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПО ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *DAPHNIA MAGNA* ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ «TRACKTOX»

О.В. Никитин, В.З. Латыпова

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
Институт экологии и природопользования  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, Россия, Oleg.Nikitin@kpfu.ru

В работе представлены данные по определению токсичности водной среды, содержащей микроцистин-LR, по плавательной активности *Daphnia magna*. Активность определялась при помощи новой системы компьютерного зрения «TrackTox».

*Ключевые слова:* *Daphnia*, скорость плавания, цианотоксины, оценка токсичности.

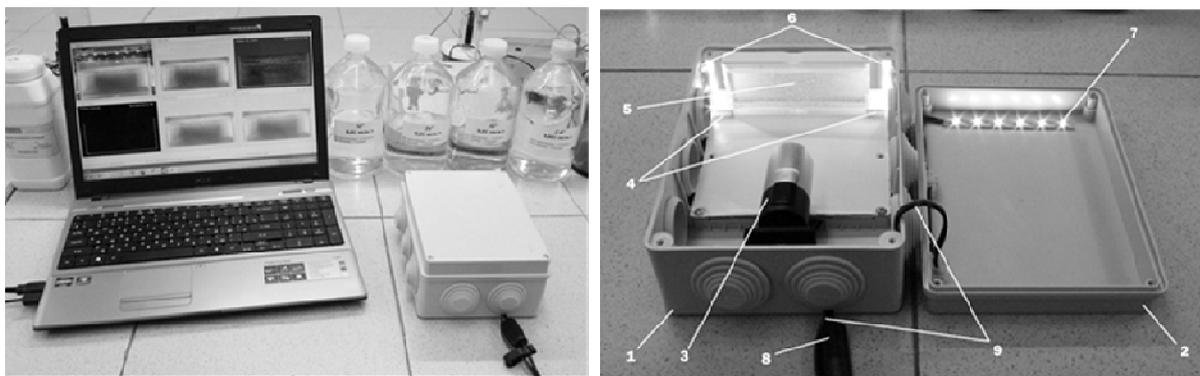
Загрязнение водной среды является одной из наиболее актуальных экологических проблем. Для оценки степени воздействия на водные экосистемы наряду с методами химического анализа активно используют биотестирование, как интегральный показатель токсического загрязнения среды [1, 2]. Это связано с тем, что химический анализ во многих случаях не позволяет оценить истинную опасность поступления загрязнителей, спрогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. По этой причине применяются методы интегральной оценки качества воды, основным из которых является биотестирование. Среди методов биотестирования важное место занимает определение токсичности с использованием низших ракообразных и в первую очередь с использованием *Daphnia magna* Stratus, 1820. Методы биотестирования на дафниях широко применяются для целей экологического контроля, как в России, так и за рубежом, в том числе и с закреплением обязательности их использования на законодательном уровне [3, 4].

В качестве тест-реакции преимущественно используют смертность рачков, а при установлении хронического токсического воздействия проводят наблюдения за изменением плодовитости и качеством потомства. Перечень реакций можно существенно расширить, если использовать дополнительные сведения по тест-объекту, основанные на его функциональных показателях, в том числе и поведенческие реакции. Это позволило бы проводить оценку качества водной среды более оперативно и отслеживать более низкие концентрации токсикантов.

На современном этапе развития техники возможно чувствительное определение наличия токсических веществ в воде по поведенческим характеристикам тест-объектов, посредством компьютерного анализа их цифровых изображений. Первые работы, связанные с оценкой токсичности среды подобными методами появились в конце 90-х годов XX в. (например, по дафниям – 1998 г., по флагеллятам – 1999, 2000 гг.). В частности, в экспериментах с дафниями предполагалась экспозиция тест-объектов в токсичной среде (около суток) и сравнение полученных данных по скоростям движения с контрольными данными. Из-за низких вычислительных мощностей компьютеров, исследователи ограничивались анализом последовательностей из нескольких десятков изображений.

В некоторых случаях этот подход используется на практике для построения биологических систем раннего оповещения о наличии в среде токсических веществ (biological early warning systems). В качестве биоиндикаторов преимущественно используют рыб и ракообразных. Так, в коммерчески реализуемой системе «Daphnia Toximeter» (bbe Moldaenke, Германия) в непрерывно проточной камере (0,5-2 л/ч) осуществляется наблюдение за плавательной активностью дафний (до 12 шт.), контролируются такие параметры как: средняя скорость, расстояние между дафниями, их размер и некоторые другие. Регистрация ухудшения качества воды осуществляется довольно оперативно ([www.bbe-moldaenke.de](http://www.bbe-moldaenke.de)). К недостаткам метода можно отнести невозможность обработки пересечений дафний в пространстве при плавании, т.е. слежение за отдельными тест-организмами не осуществляется (производится усредненная оценка). Кроме того, в тесте используется лишь профильтрованная вода, тогда как Европейская водная рамочная директива рекомендует использовать нефильтрованную воду для процедуры тестирования, т.к. при фильтрации могут быть удалены адсорбированные на взвешенных частицах токсичные вещества [5]. Также существенным недостатком является высокая стоимость системы «Daphnia Toximeter», которая в базовой комплектации составляет около 3,1 млн. руб. (65 тыс. евро). Решить ряд недостатков системы «Daphnia Toximeter» предлагается с помощью шестиканальной системы слежения за индивидуальными дафниями – «Grid Counter» [6]. Существуют и некоторые другие реализации. В России производится приборный комплекс использующий алгоритмы компьютерного зрения для оценки токсичности по инфузориям – «БиоЛабТ» ([www.energolab-bio.ru](http://www.energolab-bio.ru)). На основании анализа последовательности пар изображений, определяется количество тест-объектов и их смещение, на основании чего делается заключение об их жизнеспособности. Таким образом, неугасающий интерес к использованию технологий компьютерного зрения в экотоксикологии, показывает перспективность данного метода для оценки токсичности.

На кафедре прикладной экологии Института экологии и природопользования КФУ разработан программно-аппаратный комплекс для обнаружения и регистрации поведенческих реакций тест-объектов – «Анализатор токсичности «TrackTox» (рис. 1), реализующий алгоритмы компьютерного зрения. В частности таких алгоритмов как: получения видео с тест-объектами, применения фильтров для устранения «шумов», конвертации цветовой модели, определения граничных значений для пороговой обработки видео, получения бинарного видеопотока, его покадровой обработки с целью нахождения контуров объектов и определения центров их масс, расчета координат объектов, осуществление трекинга объектов и его визуализация на исходном видео.

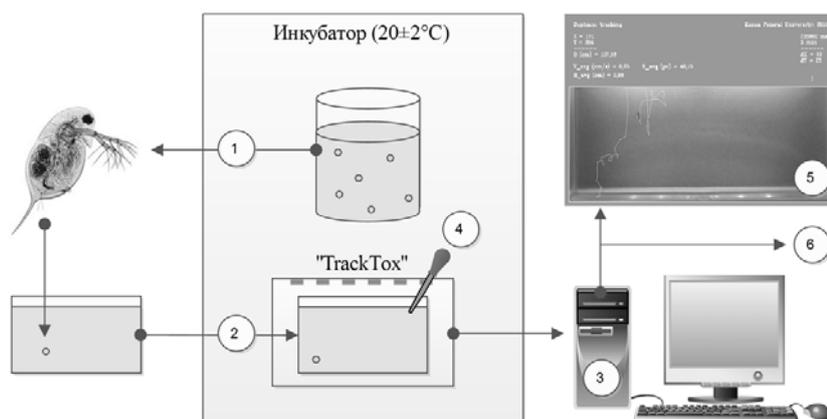


**Рис. 1.** Внешний вид и устройство прототипа программно-аппаратного комплекса «Анализатор токсичности «TrackTox». 1) корпус прибора; 2) крышка; 3) видеочамера; 4) фиксаторы тестовой камеры; 5) тестовая камера; 6) боковые светодиодные осветители (опционально); 7) верхние светодиодные осветители; 8) USB-кабель передачи видеосигнала на компьютер; 9) кабель электропитания

Аппаратная часть комплекса состоит из герметичного контейнера с фиксаторами для установки тестовой камеры с тест-организмами (объемом до 30 мл). Внутренняя часть контейнера освещается при помощи светодиодной подсветки (2500 лк). Фронтальная видеочасть (с КМОП-матрицей) обеспечивает регистрацию поведения тест-организма (рекомендуемое разрешение 640x360 пикселей, возможная частота записи – до 30 кадров/с). Электропитание может осуществляться как от сети (220 В), так и от аккумуляторных батарей, что обеспечивает портативность прибора.

Обработка и анализ получаемых данных производится управляющей станцией, состоящей из подключаемой ЭВМ и программы трекинга тест-объектов «TrackTox» [7]. Метод построен на поккадровом компьютерном анализе изображений, на которых присутствует тест-объект. Определяются следующие параметры: текущие координаты в двухмерном пространстве, скорость плавания, высота нахождения тест-объекта в камере, текущее и общее пройденное расстояние, размер тест-объекта и его ориентация в пространстве. Анализатор токсичности «TrackTox» рекомендуется использовать совместно с термостатирующим оборудованием, обеспечивающим стабильные оптимальные температурные условия для дафний ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ , например, термостат «ТСО-1/80 СПУ», климатостат «В4» или эквивалент).

В настоящее время с помощью анализатора токсичности ведутся исследования по изучению поведенческой активности *Daphnia magna* Stratus в нормальных условиях и при добавлении известных концентраций токсикантов. Для экспериментов используется лабораторная монокультура *D. magna*, выращиваемая в климатостате «В-4» по ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06. Т 16.1:2.3:3.9-06. Для анализа поведенческой активности, в данной работе использовались данные по скорости плавания. Схема эксперимента представлена на рис. 2.



**Рис. 2.** Схема определения плавательной активности дафний в эксперименте

Единичная дафния при помощи микропипетки быстро и аккуратно переносится из маточной культуры в прозрачную пластиковую тестовую камеру (100 мм Ч 45 мм Ч 10 мм) с 25 мл культивационной воды (1), далее камера переносится в анализатор токсичности (2), расположенный в термостатируемых условиях ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ). Дафнии выдерживаются 10 мин. в камере для акклиматизации, после чего в течение последующих 20 мин. производится измерение плавательной активности, т.н. «контроль» (3). Для снижения излишней чувствительности, обработка осуществляется с меньшей частотой (5 кадров/с). Для изучения воздействия единичного токсиканта, он помещается в тестовую камеру в количестве, необходимом для достижения нужной концентрации (4). Также возможен вариант реализации эксперимента, когда дафния переносится в другой контейнер с уже подготовленным раствором токсиканта или с пробой воды. После 10 минут экспозиции, в течение 20 мин. снова производится измерение плавательной активности, т.н. «опыт» (3). Таким образом, общее время экспозиции в растворе с токсикантом составляет 30 мин. В ходе всего эксперимента, данные визуализируются на экране (5), а в конце эксперимента данные по плавательной активности дафнии (~6000 измерений в контроле и опыте) передаются в текстовый файл, доступный для последующей обработки и статистического анализа (6).

В данной работе статистическая обработка выполнялась при помощи пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft, Талса, США). Вычислялись средние значения при ежеминутном усреднении (среднее арифметическое, медиана), диапазон разброса данных, интерквартильный размах (IQR), дисперсия, стандартное отклонение (SD), стандартная ошибка среднего (SE). Соответствие данных нормальному распределению проверяли визуально по графику распределения частот скоростей, а также при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Для проверки различий между двумя выборками парных измерений (контроль-опыт) применялся непараметрический Т- критерий Вилкоксона.

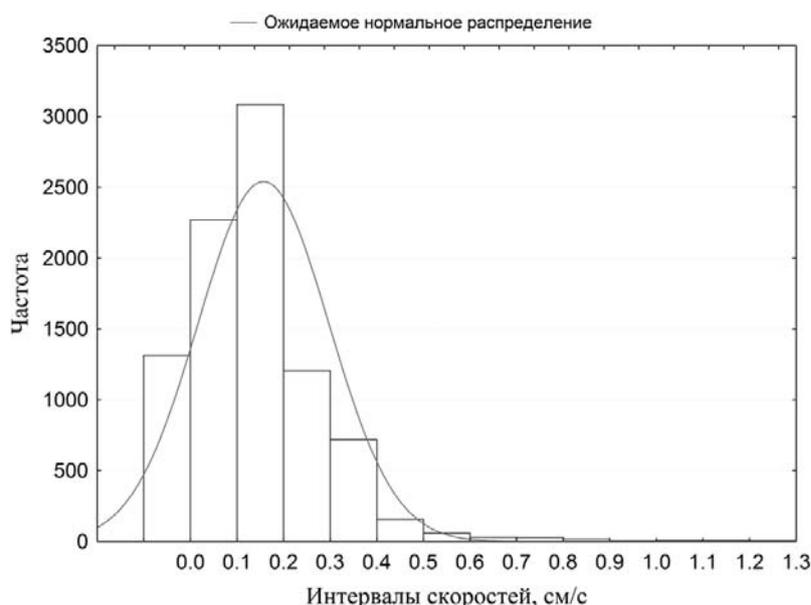
Оценку токсичности проводили по изменению (ингибирование или стимулирование) тест-функции – скорости плавания дафний (А, %) по формуле:

$$A, \% = 100 * \frac{X_{к} - X_{оп}}{X_{к}}$$

где  $X_{к}$  и  $X_{оп}$  – полученные значения тест-функции в контроле и опыте соответственно.

В качестве примера, по представленной схеме было проведено определение токсичности водной среды, содержащей цианотоксин микроцистин-LR (MC-LR) в концентрации 0.15 мкг/л. Микроцистины – одни из самых известных и широко распространенных цианобактериальных токсинов, выделяемых некоторыми видами цианобактерий при «цветении» водоемов, наиболее активно в результате эвтрофирования. Выбранная концентрация – предел обнаружения микроцистинов многими количественными методами анализа, в частности, такими как ИФА, ВЭЖХ. Раствор был приготовлен с использованием аналитического стандарта MC-LR Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США).

Было обнаружено, что распределение скоростей плавания дафний во всех случаях, как в контрольных, так и с добавлением токсиканта, отличается от нормального, коэффициент асимметрии положителен (пример распределения представлен на рис. 3). Следовательно, для описания данных лучше использовать непараметрические статистики (медиану и т.д.), тем более они более робастны при наличии выбросов, нежели параметрические статистики. Однако стоит заметить, что во многих биологических системах раннего оповещения, построенных на анализе скоростей тест-объектов, используются именно параметрические статистики, без учета закона распределения данных.



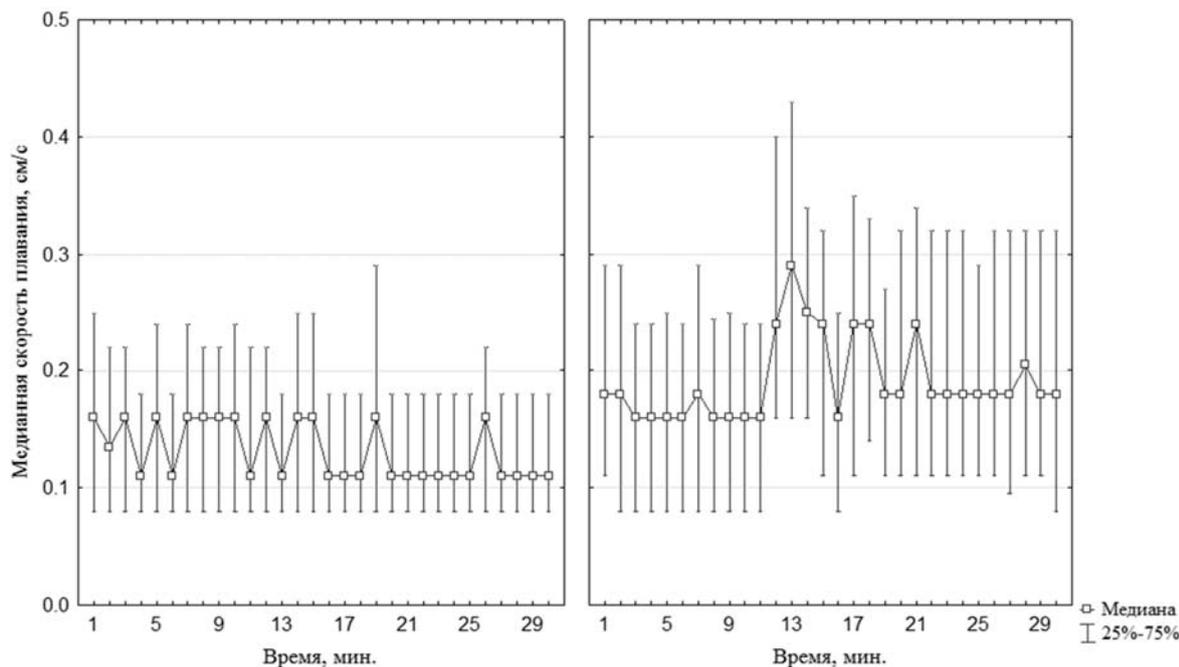
**Рис. 3.** Частоты распределения скоростей плавания дафний в контрольных условиях в одной из экспериментальных серий

Параметры плавательной активности дафний представлены в таблице. Медианная скорость варьировала от 0.11 до 0.47 см/с в контрольных условиях и от 0.20 до 0.92 см/с после внесения MC-LR. В целом, при добавлении токсиканта групповая медиана скоростей возрастала от 0.29 до 0.37 см/с, медиана изменений тест-функций составила -82%.

**Таблица.** Параметры плавательной активности дафний в контроле и в эксперименте при добавлении MC-LR в серии из 10 попарных измерений

	N	Медиана	Минимум	Максимум	IQR	Среднее	SD	SE
Контроль	10	0.29	0.11	0.47	0.16	0.25	0.12	0.04
Опыт	10	0.37	0.20	0.92	0.18	0.44	0.27	0.08

В контрольных условиях медианная скорость изменялась слабо, вокруг некой средней величины, при внесении токсиканта происходил ее рост до определенного значения, после чего она сохранялась на данном уровне, при этом разброс данных увеличивался. Пример поведенческой активности дафний в эксперименте представлен на рис. 4.



**Рис. 4.** Одна серия измерений плавательной активности дафний в контроле (слева, N=8927) и эксперименте (справа, N=8142)

T-критерий Вилкоксона показал наличие статистически значимых различий ( $T=1.00$ ,  $Z=2.55$ ,  $P=0.01$ ) между выборками парных измерений, из чего можно сделать вывод, что добавление MC-LR вызывает увеличение медианной скорости плавания дафний. Это в свою очередь можно использовать в качестве индикатора наличия микроцистинов в водной среде.

#### Список литературы

1. Blaise C., Fйrard J.-F. Small-scale freshwater toxicity investigations. Vol. 1 – Toxicity test methods. – Springer, 2005. – P. 1–68.
2. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды // Экологические системы и приборы. – 2007. – N. 6. – С. 18–20.
3. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т. 36. – N. 5. – С. 50–70.
4. US EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012. – Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2007. – 266 p.
5. Baea M.-J., Park Y.-S. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review // Science of the Total Environment. – 2014. – Vol. 466–467. – P. 635–649.
6. Jeon J., Kim J.H., Lee B.C., Kim S.D. Development of a new biomonitoring method to detect the abnormal activity of *Daphnia magna* using automated Grid Counter device // Science of The Total Environment. – 2008. – Vol. 389. – I. 2-3. – P. 545–556.
7. Никитин О.В., Латыпова В.З. Программа трекинга тест-объектов в токсикологических экспериментах «TrackTox» // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2013616983 от 30.07.2013 г. Роспатент.

## МНОГООБРАЗИЕ ТЕСТ-ФУНКЦИЙ *DAPHNIA MAGNA*: ВОЗМОЖНОСТИ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

А.С. Олькова

*Вятский государственный гуманитарный университет*  
610002, г. Киров, ул. Красноармейская, 26, Россия, *morgan-abend@mail.ru*

Обсуждаются информативность гибели и плодовитости дафний при относительно низких дозах токсикантов, вклад сезонных ритмов в проявление токсического эффекта, влияние культивационной воды на чувствительность организмов. Предложены способы регистрации трофической и двигательной активности дафний. Оценивается время созревания особей, количество абортивных яиц и мертворожденной молодежи.

*Ключевые слова:* биотестирование, *Daphnia magna*, тест-функция.

Одним из современных методов индикации состояния окружающей среды является биотестирование. В природоохранной практике данная группа методов востребована, поэтому наблюдается бурное развитие подходов, критериев, методик определения интегральной токсичности. Теоретические и прикладные основы заложены Брагинским Л.П., Строгановым Н.С., Лесниковым Л.А., Моисеенко Т.И., Филенко О.Ф., Никаноровым А.М. и другими выдающимися учеными.

Большинство методик направлено на установление острой токсичности в кратковременных экспериментах. Однако в реальных условиях чаще встречается долговременное воздействие относительно невысоких доз токсикантов. При этом ощущается недостаток методик и тест-функций для выявления хронической интегральной токсичности.

Цель работы – выявить факторы, влияющие на гибель и плодовитость низших ракообразных *Daphnia magna* Str., оценить информативность и возможность применения других тест-функций дафний.

При оценке качества компонентов среды чаще всего ориентируются на наличие или отсутствие токсичности в экспериментах на установление острой токсичности. При этом могут упускаться токсические эффекты, которые проявляются только в долговременных экспериментах.

Например, при очистке питьевой воды во многих городах в качестве коагулянта используется сульфат алюминия. Его остаточные количества по данным Водоканала г. Кирова могут достигать 5-7 ПДК. Нами проведены модельные эксперименты для определения информативности тест-функций гибели и плодовитости, рекомендованных методикой [1].

Эксперимент состоял из двух опытных вариантов: добавки 5 и 10 ПДК сульфата алюминия в расчете на алюминий. Контроль – питьевая вода без добавок.

За период острого опыта (4 дня) гибели организмов не наблюдалось, то есть пробы не оказывали токсического действия. Продлевая эксперимент для установления хронического воздействия, выявлено увеличение гибели дафний, достоверное снижение плодовитости по сравнению с контрольными значениями (табл. 1).

**Таблица 1.** Ответные реакции *Daphnia magna* на сульфат алюминия

Вариант	Смертность* за 4 дня, %	Смертность за 24 дня, %	Плодовитость**, шт./1 взрослую особь
Контроль	0	0	10,76±0,91
5 ПДК (Al3+)	0	20	8,86±1,00
10 ПДК (Al3+)	0	56,6	8,80±2,32

Примечание: \* - здесь и далее погрешность для показателя смертности в пределах, установленных методикой; \*\* - все опытные значения достоверно отличаются от контрольных.

Следовательно, при относительно невысоком загрязнении высок риск необоснованного признания пробы безвредной на основе анализа самой «грубой тест-функции» для дафний – гибели.

Это показано нами и в опытах с природными подземными водами, отобранными из эксплуатируемых скважин. Данные пробы по большинству показателей соответствовали качеству питьевой воды, однако было выявлено превышение содержания бора от 2,6 до 11 ПДК. Эти воды также

не оказывали острого токсического действия на дафний, более того и за 24 дня эксперимента смертность не превышала допустимых методикой 20 %. Но плодовитость организмов угнеталась (табл. 2).

**Таблица 2.** Результаты определения хронической токсичности проб подземных вод, загрязненных бором.

№ пробы	Кратность ПДК бора	День первого появления молоди	Плодовитость*, шт./1 взрослую особь	Смертность, %
Контроль	-	9	7,3±0,7	0
1	2,6	12	4,4±0,1	3,3
2	2,6	15-18	2,7±0,3	13,3
3	7,8	15	4,6±0,4	0
4	10,4	12	5,4±0,5	13,3
5	11,0	12	4,9±0,6	0

Примечания: \* - все опытные значения достоверно отличаются от контрольных.

Также на примере этого опыта видим, что особи в контрольной воде созревали раньше, чем в загрязненных пробах. Дни первого появления молоди в пробах заметно отличаются от контроля, где первое потомство отмечено уже на 9 сутки, тогда как в пробах на 12 и даже на 15-18 сутки при увеличении концентрации бора. То есть день первого вымета молоди может служить информативным показателем состояния тест-организмов.

Таким образом, показано на модельных и природных водах, что при риске относительно невысокого загрязнения необходимо ориентироваться на данные, получаемые в хронических опытах. Отметим, что для питьевых вод такого критерия в СанПиН не введено [2].

При дальнейшем сравнении тест-функций гибели и плодовитости, исследовали влияние сезона года на результат токсикологического эксперимента. Для этого использовали процедуру установления чувствительности культуры, рекомендованную аттестованной методикой, проводя одинаковый эксперимент во все сезоны года. Устанавливалась острая токсичность модельных растворов с возрастающими концентрациями двухромовокислого калия ( $K_2Cr_2O_7$ ). Диапазон концентраций от 0,5 до 2,5 мг/дм<sup>3</sup>. Результаты представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Результаты определения чувствительности *D. magna* к модельному токсиканту – калию двухромовокислому

Проба/ концентрация, мг/дм <sup>3</sup>	Смертность дафний к контролю, %			
	Весна	Лето	Осень	Зима
Контроль	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
0,9	3,3	0,0	3,3	26,7
1,0	10,0	10,0	3,3	10,0
1,5	56,7	60,0	73,3	80,0
2,0	100,0	96,7	86,7	100,0
2,5	100,0	100,0	100	100,0
Среднелетальная концентрация, (мг/л)				
Концентрация токсиканта, мг/л	1,43	1,36	1,44	1,22

В течение всех четырех сезонов года чувствительность дафний соответствовала пределам, установленным аттестованной методикой (0,9 - 2,0 мг/дм<sup>3</sup>). Однако в зимний период чувствительность рачков повысилась: в растворе с концентрацией 0,9 мг/дм<sup>3</sup> погибло больше 25% особей, тогда как летом в аналогичном растворе гибели не наблюдалось. В итоге среднелетальная концентрация токсиканта, соответствующая гибели 50% особей, для зимнего периода оказалась наименьшей. Такое повышение чувствительности можно объяснить общим ослаблением дафний в зимний сезон, являющийся в природных условиях периодом покоя организмов.

Эксперимент показал влияние сезонных ритмов на чувствительность низших ракообразных. Этот факт необходимо учитывать при планировании исследований и интерпретации результатов.

Влияние сезона года отражается также и на плодовитости. Данные таблицы 4 показывают, что одинаковые эксперименты по установлению хронической токсичности сульфата алюминия, проведенные весной и осенью, дают разный результат, если оценивать абсолютные значения плодовитости. При этом относительные значения плодовитости, дают основание полагать, что весенние и осенние результаты эксперимента в целом сходятся. Отмечается тенденция повышения чувствительности при увеличении дозы вещества, что необходимо подтвердить дополнительными экспериментами.

**Таблица 4.** Влияние сезона года на плодовитость *D. magna*

Вариант	Плодовитость весной		Плодовитость осенью	
	Абсолютные значения, шт./1 взрослую особь	Относительные, %	Абсолютные значения, шт./1 взрослую особь	Относительные, %
Контроль	21,5±1,8	-	10,5±1,4	-
5 ПДК (Al <sup>3+</sup> )	17,7±2,0	82,3	8,9±2,6	84,8
10 ПДК (Al <sup>3+</sup> )	17,6±3,2	81,7	6,3±2,0	60

Кроме сезона года на результат биотестирования влияет химический состав культивационной воды.

«Матрица» природной воды, используемой для культивирования тест-организмов, обладая региональными и локальными особенностями, влияет на общее состояние биообъектов, их чувствительность и устойчивость к различным соединениям.

Эффект наблюдали, например, при установлении чувствительности *D. magna* к модельному токсиканту дихромату калия. Культура тест-организмов содержалась в одинаковых условиях, рекомендованных методикой [1], но с использованием разных культивационных вод. Обе водные среды были питьевыми артезианскими водами, отличающимися по количеству минеральных солей и соответственно электропроводности (около 2 раз). В процессе калибровки чувствительности двух культур *D. magna* установили, что среднелетальная концентрация (LD<sub>50</sub>) дихромата калия для них различалась: в экспериментах с водами, в большей степени насыщенными солями, воздействие модельного токсиканта проявлялось слабее (табл. 5). Содержание организмов и периодическую калибровку проводили в течение двух лет, поэтому LD<sub>50</sub> представляем в виде интервала.

**Таблица 5.** Влияние состава культивационной воды на чувствительность *D. magna*

Характеристика культивационной воды	Содержание ионов, мг/л				Электропроводность, мкСм/см	LD <sub>50</sub> , мг/л KCr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	катионы		анионы			
Артезианская вода централизованного водоснабжения (Кировская обл.)	Na <sup>+</sup>	42,8±6,4	Cl <sup>-</sup>	19,9±2,0	610	1,2 - 1,8
	K <sup>+</sup>	0,74±0,1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21,8±3,3		
	Mg <sup>+</sup>	28,7±2,9	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	<0,2		
	Ca <sup>+</sup>	29,1±2,9	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	22,2±2,2		
Артезианская вода торговой марки «Ключ здоровья» (г. Киров)	Na <sup>+</sup>	12,8±1,9	Cl <sup>-</sup>	22,7±2,3	320	0,9 - 1,3
	K <sup>+</sup>	<0,1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,6±1,0		
	Mg <sup>+</sup>	7,5±0,7	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	<0,2		
	Ca <sup>+</sup>	25±2,5	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3,9±0,4		

Полученные данные подтверждают то, что ионы солей, в частности обуславливающих жесткость воды, могут вступать во взаимодействия с рядом токсикантов, например, с тяжелыми металлами. Учеными проведены исследования, доказывающие такие реакции [3].

Отметим, что культивационная вода используется для приготовления серий разбавлений тестируемой среды, влияя на итоговый результат. Эффект был неоднократно отмечен нами в лабораторной практике [4].

В опытах на установление хронического токсического действия появляется возможность оценивать такие патологические явления, как появление абортивных яиц и мертворожденной молодежи. Такие показатели приобретают особую важность при детальной токсикологической характеристике веществ. В экспериментах по определению токсических эффектов стронция, выполненных в трех

поколениях рачков, показано значительное увеличение негативных патологических отклонений от нормы (табл. 6).

**Таблица 6.** Влияние хлорида стронция на смертность и патологические явления у *D. magna*

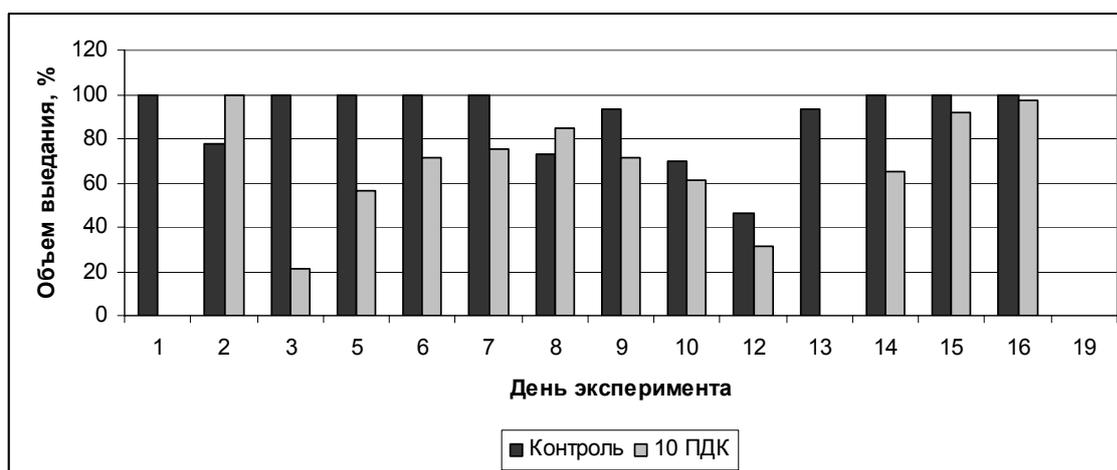
Вариант	Поколение	Смертность взрослых особей, %			Количество абортивных яиц*	Количество мертвой молоди*
		25 день	50 день	75 день		
Контроль	F1	0	2,5	80,0	0	0
	F2	0	5	86,7	2	0
	F3	0	3,3	83,5	1	0
2,5 ПДК	F1	12,5	32,5	92,5	39	8
	F2	15	62,5	92,5	54	4
	F3	25	82,5	90,0	97	9
5 ПДК	F1	10,0	46,7	100	14	8
	F2	6,7	46,7	90,0	28	6
	F3	16,7	73,3	95,0	37	5

Примечание: \* - количество абортивных яиц и мертвой молоди приведено как сумма для четырех повторностей варианта опыта.

Сделаны попытки выявить и оценить тест-функции дафний, которые проявляются до выше описанных эффектов буквально с первых минут эксперимента. Речь идет о двигательной и трофической активностях.

Трофическая активность рачков оценивалась по объёму ежедневного выедания суспензии одноклеточной водоросли *Scenedesmus quadricauda*, которая служила пищей для рачков. Для точного определения объёма выедания водорослей проводили измерение оптической плотности тестируемых растворов непосредственно после кормления и на следующий день перед очередным кормлением. Использовался прибор «ИПС-03» (измеритель плотности суспензии), специально предназначенный для регистрации подобных параметров. Затем рассчитывали долю корма, потребленную рачками за сутки.

Как в варианте опыта с добавкой 5 ПДК по (расчет на алюминий), так и с добавкой 10 ПДК, наблюдалась тенденция угнетения пищевой активности рачков. Визуально это диагностировалось через образование зеленого осадка водорослей. Наиболее ярко данный эффект проявился при большей концентрации сульфата алюминия в тестируемом растворе (рис. 1).



**Рис. 1.** Трофическая активность *D. magna* в эксперименте по установлению хронического токсического действия иона алюминия

На фоне флуктуаций трофической активности в течение эксперимента, связанных, вероятно, с развитием рачков, их созреванием и размножением, в большинстве случаев измерений наблюдается достоверное снижение объёма выедания пищи (более чем в 65% случаев). Максимально эффект проявляется в начале и в конце опыта. Как следствие особи в опытных вариантах отличались меньшими размерами тела, выцветанием покровов, а также снижалась активность их движений.

Оценку двигательной активности проводили в разные периоды эксперимента на 5, 10 и 15 день в двукратной повторности. В момент плановой смены контрольных и тестируемых вод дафний отсаживали по одной в стакан, емкостью 50 мл, с исследуемой средой в объеме 25 мл, на дне которого были проведены две перпендикулярно пересекающиеся линии (диаметры дна емкости). В течение 5 минут производили подсчет количества пресечений этих линий дафнией. Итоговое количество пересечений – это показатель двигательной активности. На примере нескольких модельных токсикантов установлено, что активность особей в контрольной среде превышала этот показатель в водах с добавками тестируемых веществ. Причем угнетение двигательной активности закономерно увеличивается при возрастании концентрации действующего вещества.

Двигательная активность является информативной чувствительной тест-функцией дафний. Но следует отметить, что при выполнении эксперимента были выявлены следующие трудности в методике: выбор оптимальной емкости и объема исследуемой среды, оптимального времени для подсчета двигательной активности. Необходима автоматизация метода.

Результаты работы позволяют сделать вывод о том, что *D. magna* является ценным тест-объектом с многочисленными тест-функциями. Кроме гибели организмов необходимо ориентироваться на такие показатели как время созревания особей, плодовитость, двигательная и трофическая активности, количество абортивных яиц и мертвой молодежи.

#### Список литературы

1. ФР 1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. – М.: Акварос, 2001. – 51 с.
2. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. – 2002.
3. Никаноров А. М., Жулидов А. В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. – Л.: Гидрометеиздат, 1991. – 312 с.
4. Олькова А.С. Проблемы биотестирования почв по аттестованным методикам // Доклады по экологическому почвоведению. - 2013. - № 1, вып. 18. - С. 165-175.

УДК: 597.44 + 615.917

### ТЕРАТОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ОПЛОДОТВОРЕНИЕ И ОПЛОДОТВОРЕННУЮ ИКРУ, ГЕНОТОКСИЧЕСКАЯ И ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ МОЛОДИ РУССКОГО ОСЕТРА НА ПРИСУТСТВИЕ В ВОДЕ ОТРАБОТАННЫХ АВТОПОКРЫШЕК

Г.М. Палатников

*Лаборатория Экологической физиологии и Токсикологии  
Института физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана, г. Баку  
AZ1100 Баку, ул.Шарифзаде 2, Азербайджан, gmpal@mail.ru*

В работе изучались: оплодотворяемость икры русского осетра в присутствии автопокрышки; их влияние на развитие заранее оплодотворенной икры; поведенческие реакции молодежи осетра на присутствие в воде автопокрышек; их генотоксическое воздействие.

В мире каждый год появляется один миллиард изношенных шин, каждая из которых содержит 100 г опасных веществ (Таб.1). Только в России ежегодный объем отработанных шин составляет 800 тыс. тонн.

Изношенные шины являются отходами, которые занимают много физического пространства, с трудом поддаются уплотнению, сбору и ликвидации. Они не поддаются биологическому разложению, и срок их разложения не поддается определению. В их состав входят опасные компоненты, такие как свинец, хром, кадмий и другие тяжелые металлы. В отсутствии надлежащего хранения и контроля, шины представляют собой угрозу для здоровья и окружающей среды.

Считается, что отходы, указанные в приложении I к Базельской конвенции, обладают одним или более опасными свойствами, указанными в приложении III, которые могут включать H11 "Токсичные вещества (вызывающие затяжные или хронические заболевания)", H12 "Экотоксичные вещества" и H6.1 "Токсичные (ядовитые) вещества"[1].

**Таблица 1.** Опасные вещества, содержащиеся в шинах. (Приложение 1 к Базельской конвенции)

Химическое наименование	Примечания	Содержание (% веса)	Содержание* (кг)
Соединения меди	Легирующий компонент металлического армирующего материала (стального корда)	Прибл. 0.02%	Прибл. 1.4 г
Соединения цинка	Окись цинка, сохраняющаяся в составе резины	Прибл. 1%	Прибл. 70 г
Кадмий	Следовые количества, т.к. соединения кадмия являются сопутствующими веществами окиси цинка	Макс. 0.001%	Макс. 0.07 г
Свинец соединения свинца	Следовые количества, т.к. являются сопутствующими веществами окиси цинка	Макс. 0.005%	Макс. 0.35 г
Кислотные растворы или кислоты в твердом виде	Стеариновая кислота, в твердом виде	Прибл. 0.3 %	Прибл. 21 г
Органогалогенные соединения	Галогенный бутилкаучук	Содержание галогенов Макс. 0.10 %	Содержание галогенов Макс. 7 г

\* В расчете на шину для легкового автомобиля весом 7 кг.

Однако до сих пор не создана экономичная технология их переработка и сотни миллионов покрышек накапливаются на свалках. В связи с этим, родилась идея заливать их цементом для утяжеления и сбрасывать в моря и океаны, создавая, таким образом, искусственные атоллы. По мнению авторов этой идеи, такие искусственные образования будут привлекать гидробионтов, и служить местом нереста для рыб.

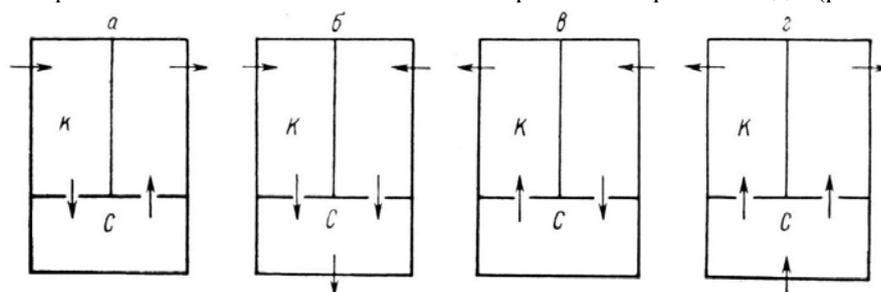
В 70-80-х годах минувшего столетия такие искусственные рифы начали создаваться у берегов Австралии, Флориды, Новой Зеландии, Ямайки, Греции, Японии и Германии. Были предприняты попытки создать подобные сооружения и у восточного побережья Каспия.

Целью нашего исследования стало выяснение влияния таких искусственных нерестилиц на оплодотворяемость икры и на развитие уже оплодотворенной икры, а так же поведенческая реакция молоди осетровых рыб на присутствие в воде автопокрышек.

Первые две серии экспериментов были проведены на икре русского осетра (*Acipenser guldenshtaedtii*) полученной на Куринском Экспериментальном Осетровом заводе методом гипофизарной инъекции.

Эти серии экспериментов проводились в кристаллизаторах. В кристаллизаторы (2 контрольных и 2 – экспериментальных) помещалось по 500 икринок. В экспериментальные, предварительно, помещалось по куску автомобильной шины. Вода в кристаллизаторах каждые 6-8 часов заменялась на свежую.

Третья серия проводилась в П-образном проточном лабиринте на 8-ми месячной молоди русского осетра. Лабиринт имел три отсека и возможность менять направление потока воды (рис.1).



**Рис.1.** Схема П-образного лабиринта и варианты протока воды. С – стартовый отсек; К – отсек с отрезком автопокрышки. Стрелками показано направление тока воды.

Подопытных рыб по 5 особей помещали в средний — стартовый отсек, а в один из двух отсеков помещался отрезок автомобильной шины, содержащий все компоненты шины. Регистрировалось перемещение рыб по отсекам, и определялась реакция избегания того или иного отсека. Направление протока воды изменялось для каждой пятерки рыб (рис. 1, *a—z*). Наблюдение за поведением в лабиринте продолжалось в течение 1,5 ч. Поведение каждой группы рыб в лабиринте оценивалось дважды, с интервалом в 3 дня. Чтобы исключить возможность выработки условного рефлекса на положение входа в отсек шиной, её каждый раз помещали в разные отсеки.

В четвертой серии изучалось генотоксическое воздействие автомобильных шин на молодь осетровых, используя микроядерный тест, мы изучали генотоксическое воздействие присутствия в водной среде отработанных автопокрышек на молодь осетра. Эксперименты проводились на заводской молоди осетра, 10 месячного возраста.

Рыбы были размещены в 2 ваннах объемом 30 л (по 6 рыб в каждой ванне) с пресной аэрируемой водой. В одну из ванн поместили фрагмент отработанной автошины весом 1 кг. Вторая ванна была оставлена с чистой водой в качестве контроля. Рыбы выдерживались в этих условиях в течение 5 суток, а затем у всех рыб была взята кровь из хвостовой вены и приготовлены мазки крови, на предметном стекле для проведения теста на наличие микроядер и других патологий ядра у эритроцитов. Полученные препараты окрашивались по Романовскому – Гимзе стандартным красителем производства фирмы «Sigma», подсчет микроядер на 1000 эритроцитов проводили под иммерсионным объективом при увеличении 15x100. Для фотографирования использовали цифровой микроскоп «Motic».

В первой серии экспериментов, оплодотворение икры проводилось одновременно в контрольной группе и в присутствии отрезка автомобильной шины

Как показали наши опыты, оплодотворяемость икры в присутствии автопокрышки составила меньше 0,8 %, причем и оплодотворенные икринки погибли еще на ранних стадиях дробления, не достигнув стадии бластулы.

В контрольной группе оплодотворенными оказались 85% икринок, а выклев – 75%.

Во второй серии экспериментов уже оплодотворенная икра, находящаяся на стадии бластулы, была помещена в среду с отработанными покрышками. Из тысячи икринок только 20 дошли до стадии подвижного эмбриона, остальные погибли на более ранних стадиях. Из этих 20 подвижных эмбрионов, только 7 смогли разорвать яйцевую оболочку, после чего также погибли.

В контрольной группе выход здоровых личинок составил 72 %.

В третьей серии экспериментов изучались поведенческие реакции молоди русского осетра на присутствие в окружающей среде автомобильных покрышек. В отсек обозначенный буквой **К** помещался отрезок автомобильной шины, отсек **С** являлся стартовым – в него запускались подопытные рыбы.

В случаях протока воды от рыбы к шине (варианты *в* и *z*, рис.1) рыбы в первые 10-15 минут наблюдений несколько раз заплывали в отсек К, но приблизившись к шине, быстро покидали отсек и после 5-7 таких попыток больше в этот отсек не заходили.

При протоке воды по схеме *б* подопытные рыбы уже через 15 минут после начала эксперимента собирались в отсеке с чистой водой и только изредка заплывали в отсек С, но быстро его покидали, возвращаясь обратно в отсек с чистой водой.

Рыбы при помещении в лабиринт с протоком воды по схеме *a*, в течении первых же 5-10 минут концентрировались все в самом дальнем от шины отсеке, их двигательная активность резко возрастала.

Очевидно, что, распространяясь с током воды, "запах" шины отпугивает рыб, и они стремятся выйти из зоны его распространения. Даже пища, помещенная в отсек с шиной, не изменяла поведенческой реакции рыб.

В генотоксической серии экспериментов, кроме подсчета микроядер (м/я), учитывались и такие патологии ядер (п/я) в эритроцитах, как – **кариорексис**, т.е оболочка ядра клетки разрушается и нуклеиновые кислоты в виде отдельных глыбок проникают в цитоплазму клетки и **гипохромазия** - отражает нарушение процессов гемоглинообразования и заключается в малом содержании дыхательного пигмента в эритроцитах. Все эти патологии ядра являются следствием разрушения хроматина под влиянием токсиканта (рис.2). Результаты этой серии приведены в таблице 2:

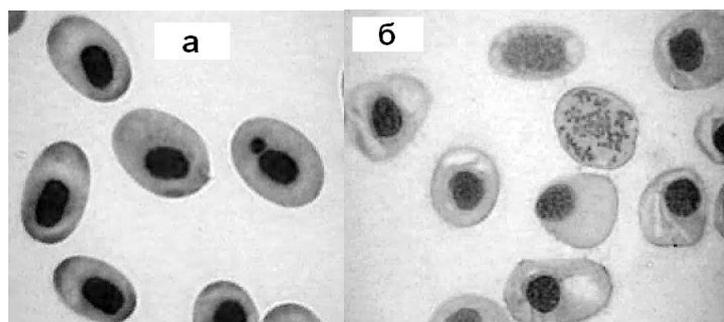


Рис. 2. Эритроциты с: а – микроядром и гипохромазией; б – кариорексис и гипохромазия.

Таблица 2. Количество патологий ядра на 1000 клеток

На 1000 клеток	Контроль	5 суток
Количество м/я	1.06 ± 0.22	13.22 ± 2.81
Количество п/я	1.49 ± 0.35	23.53 ± 5.81
Общее число патологий	2.88 ± 0.60	36.8 ± 7.35

Весной 1972 года некоммерческая группа "Искусственный риф округа Бровард" (Broward Artificial Reef — BARINC) разработала план по утилизации старых покрышек путём создания из них на морском дне самого большого в мире искусственного рифа, занимающего площадь порядка 150 тысяч квадратных метров. За несколько десятилетий было утоплено больше 2 миллионов покрышек.

Создавая искусственные рифы, авторы проекта исходили из идеи, что такие рифы обеспечат быстрое развитие морских растений, увеличат первичную продуктивность водоемов и за короткое время привлекут очень большое количество морских животных, обеспечивая им хорошие условия питания, размножения и развития.

Однако, как показали подводные съемки, «Рифы» остаются безжизненными. По прошествии 30 с лишним лет стало ясно, что план был провальным с самого начала. Так называемый Риф Осборна не только не стал приютом для рыб, ракообразных и прочих, но и начал разрушать естественную экосистему.

Наблюдая за искусственными рифами, созданными в Черном и Азовском морях, некоторые исследователи [2, 3] отмечали, что установленный риф обеспечил быстрое появление и развитие “первоначальной” морской растительности, а вскоре - привлек представителей многих видов черноморской флоры и фауны (бычки - кругляк, травяник, кнут, подкаменщик, мидии, морские желуды-балаюсы и др.); в дальнейшем наблюдалось появление икры бычков. Однако в их работах не изучались отсроченные последствия обитания этих организмов на таком субстрате.

Исследования по диффузии вредных органических веществ из автопокрышек, были проведены в США только в 1995 г и показали, что в кислой среде (почва, вода) из шин вымываются тяжелые металлы (Cu, Zn, Cd, Pb), а в щелочных средах увеличивается диффузия полициклических ароматических углеводородов (ПАУ, ПХД) [4].

В 2003 году тесты, проведенные Биркхольцем в Калифорнии, с использованием каучуковой крошки, взятой с места, где ранее хранились шины, показали наличие токсичности для бактерий, беспозвоночных, рыб и зеленых водорослей [5].

Исходя же из результатов наших экспериментов, следует, что отработанные автопокрышки обладают повышенной экотоксичностью и оказывают сильнейшее негативное воздействие на ихтиофауну.

На это же указывают и исследования, проведенные шведскими учеными, результаты которых показали, что даже за 1 день содержания радужной форели в присутствии образцов автопокрышек в печени этих рыб происходят серьезные биохимические изменения, а при увеличении сроков содержания в такой среде в желчи у этих рыб выявлено присутствие гидроксилированных метаболитов полициклических ароматических углеводородов [6]. В то же время известно, что именно ПАУ являются сильнейшими мутагенами.

Токсическое действие автопокрышек было показано и на рачках (*Daphnia magna*). В ходе исследования проверялась токсичность 12 произвольно выбранных автомобильных шин для *D. magna*, особенно в отношении высокоароматических масел. Каучук протектора шины был измельчен, с тем, чтобы смоделировать материал, образующийся в результате износа шин. В результате было установлено, что все испытанные в ходе исследования шины оказывают токсическое воздействие на *D. magna* после воздействия в течение 24 и 48 часов, и сила воздействия различных шин может различаться

на 2 порядка. Учитывая, что такое отклонение было определено для 12 произвольно выбранных шин, общее отклонение для всех марок шин, представленных на рынке, по всей вероятности, гораздо больше. Были обнаружены значительные различия в токсичности в зимний и летний периоды [7].

Все это доказывает, что создание искусственных рифов из покрышек грозит еще большим загрязнением водной среды и приведет к катастрофическим последствиям для экосистемы морей и океанов. Эту практику необходимо запретить, пока это воздействие не стало необратимым.

#### Список литературы

1. Материалы Конференции Сторон Базельской Конвенции о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением. // Девятое совещание Бали, 23-27 июня 2008 года. 58 С.
2. Мирошников В.С., Яновский Э.Г., Изергин Л.В.. Особенности формирования биоценозов на искусственных рифах в азовском море // Труды Южного Научно-Исследовательского института Морского рыбного хозяйства и Океанографии, 1998, Т. 44, с.126 – 130.
3. Чекотун А. А., Цыкало А. Л. Создание искусственного рифа и наблюдения за ним в 2002 - 2003 гг. биолого-экологический и технико-экономический анализ различных конструкций искусственных рифов. //www.artificialreefs.ru/articles/pokryshki\_rif\_ua.html
4. Демина Л.А. Вулкан на обочине.//2002.«Энергия:экономика техника, экология».с.42 -45.
5. Материалы Конференции Сторон Базельской Конвенции о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением. // 10-е совещание Колумбия, 17-21 октября 2011 года. 67 с.
6. Stepliensen E., Adolfsson-Erici M., Celander M., Hulander M., Parkkonen Jan., Hegelund T., Sturve J., Hasselberg L., Bengtsson M., Forlin L. Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber // Environ. Toxicol. and Chem. — 2003. - 22, № 12. - p. 2926-2931.
7. Wik A. Toxic components leaching from tire rubber. // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology July 2007, Volume 79, Issue 1, pp 114-119

УДК: 597:599: 577.15:574.64

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РТУТИ НА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЕ ГЛИКОЗИДАЗЫ РЫБ И МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Г.А. Пенькова, И.Л. Голованова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок, Россия, penkovds44@gmail.com*

Повышенное содержание ртути может снижать активность пищеварительных гликозидаз и сродство ферментов к субстрату, уменьшая скорость ассимиляции углеводов у животных различных систематических групп (рыбы, бурозубки, полевки).

*Ключевые слова:* ртуть, гликозидазы, рыбы, мелкие млекопитающие.

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является одной из важнейших экологических проблем. Среди тяжелых металлов, оказывающих токсическое действие на живые организмы, ртуть занимает ведущее место. Масштабы ее антропогенной эмиссии в атмосферу соизмеримы с количеством, участвующим в природном глобальном цикле. Продолжительность жизни ртути в атмосфере невелика, однако в почве и воде время ее жизни составляет сотни тысяч лет.

Поступая в организм преимущественно с водой и пищей [1], ртуть накапливается в различных органах и тканях животных. Она поражает нервную систему, вызывает изменения в почках, печени и крови, нарушает двигательную и секреторную функцию желудочно-кишечного тракта [2]. Бактериальное превращение неорганической ртути в монометилртуть – это первая стадия в процессе биоаккумуляции и миграции по трофическим цепям, как в водной, так и в наземно-воздушной среде. Органические соединения ртути наиболее токсичны, поскольку хорошо растворимы в жирах и легко проникают через биологические мембраны. Доминирующим фактором в повышении биодоступности ртути при низком ее содержании в абиотических компонентах системы является закисление воды. Высокие концентрации ртути (1-3 мг/кг) неоднократно регистрировались в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России [3]. Изучение биохимического статуса рыб с повышенным содержанием ртути в организме выявило изменения белкового, липидного и углеводного обмена, при этом отмечены деструктивные процессы в тканях, а также нарушение функции клеточных мембран [4]. При действии

ртути у млекопитающих установлены изменения активности антиоксидантных ферментов в печени и почках [5], однако действие этого металла на пищеварительные ферменты млекопитающих из природных популяций в настоящее время изучено крайне слабо.

Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, цель работы – изучить влияние накопленной в организме ртути на активность гликозидаз в кишечнике рыб и мелких млекопитающих.

В качестве объекта исследования выбраны представители водных и наземных экосистем, занимающие разный трофический уровень и доступные для массового сбора. Окунь *Perca fluviatilis* L. – один из наиболее распространенных видов, обитающих в пресных водоемах России. По типу питания – бентофаг-факультативный ихтиофаг. Мелкие насекомоядные млекопитающие – землеройки-бурозубки, отличающиеся очень высокой интенсивностью питания и общего обмена, являются важным звеном многих трофических цепей. Рыжая полевка – мелкий мышевидный грызун с коротким жизненным циклом и высокой скоростью метаболизма, является консументом первого порядка. Окунь отловлен из водоемов Рязанской области (18 экз., 37 г) и Вологодской области (12 экз., 204 г), бурозубка малая *Sorex minutus* (14 экз., 3 г) – на лесных биотопах Новгородской обл., рыжая полевка *Myodes glareolus* (12 экз., 17 г) – на лесных биотопах Воронежской обл.

Содержание ртути в слизистой оболочке кишечника и химусе определяли атомно-абсорбционным методом с использованием анализатора ртути РА-915. Активность гликозидаз  $\square$  мальтазы КФ 3.2.1.20, сахаразы КФ 3.2.1.48 и амилолитическую активность (отражающую суммарную активность  $\alpha$ -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы) определяли в гомогенатах слизистой оболочки медиального отдела кишечника и кишечного содержимого (химуса). Амилолитическую активность и активность сахаразы определяли модифицированным методом Нельсона, активность мальтазы – глюкозооксидазным методом при температуре 20°C, pH 7.4 [6]. Кинетические характеристики гидролиза углеводов – значения кажущейся константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальной скорости реакции ( $V$ ) – определяли графическим методом Лайнуивера-Берк. Результаты, представленные в виде средних значений и их ошибок ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD- тест) при  $p \leq 0.05$ .

Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике рыб. У окуня из водоемов Окского заповедника большее содержание ртути сопровождалось повышением амилолитической активности и активности мальтазы слизистой оболочки кишечника на 59 и 49% соответственно, активность сахаразы снижалась на 27% (табл. 1). В кишечном химусе отмечено лишь достоверное снижение амилолитической активности на 36%.

**Таблица 1.** Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в кишечнике окуня из водоемов Рязанской области

Показатель	Группа 1	Группа 2
Слизистая оболочка		
Содержание ртути, мкг/кг сырой массы	50.0 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	148 $\pm$ 9.50 <sup>b</sup>
Амилолитическая активность	1.68 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.67 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
Активность сахаразы	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
Активность мальтазы	8.34 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
$K_m$ гидролиза крахмала, г/л	1.22 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
$K_m$ гидролиза мальтозы, ммоль	9.59 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	8.80 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Химус		
Содержание ртути, мкг/кг сырой массы	30.0 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	123 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>
Амилолитическая активность	3.53 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	2.27 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
Активность сахаразы	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Активность мальтазы	7.15 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	6.76 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые отличия между показателями ( $M \pm m$ ) в строке,  $p < 0.05$ .

Изучение кинетических характеристик гидролиза углеводов показало, что при большом содержании ртути значения  $K_m$  гидролиза крахмала не изменяются, значения  $K_m$  гидролиза мальтозы достоверно снижаются, свидетельствуя об адаптивном увеличении фермент-субстратного сродства.

В то же время, у окуней (масса 204 г) из водоемов Вологодской обл. с нейтральным pH воды содержание ртути в мышцах в среднем составляло 110 (оз. Белое), 240 (Шекснинское водохранилище) и 610 мкг/кг сырой массы ткани (оз. Кубенское). Бóльшее содержание ртути в организме сопровождалось снижением амилолитической и сахаразной активности на 10–20%, а значения  $K_m$  гидролиза крахмала и

сахарозы увеличивались в 2–3.6 раза, отражая снижение фермент-субстратного сродства и скорости начальных этапов ассимиляции углеводов [7].

У бурозубки малой увеличение содержания ртути в слизистой оболочке кишечника сопровождается снижением амилолитической активности на 41-49%, активности мальтазы – на 19%, активность сахаразы не изменялась (табл. 2). В химусе отмечены более значительные изменения ферментативной активности: амилолитическая активность снижалась на 51-70%, активность сахаразы – на 24%, активность мальтазы – на 40-44%.

**Таблица 2.** Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в кишечнике бурозубки малой с разным накоплением ртути.

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Слизистая оболочка кишечника			
Содержание ртути, мкг/кг сырой массы	16.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	45.0 ± 4.00 <sup>b</sup>	162 ± 46.0 <sup>B</sup>
Амилолитическая активность	2.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.03 <sup>B</sup>
Активность сахаразы	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>
Активность мальтазы	9.16 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.76 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.46 ± 0.12 <sup>b</sup>
Химус			
Содержание ртути, мкг/кг сырой массы	16.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	46.0 ± 5.00 <sup>b</sup>	144 ± 64.0 <sup>B</sup>
Амилолитическая активность	4.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.06 <sup>B</sup>
Активность сахаразы	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>b</sup>
Активность мальтазы	12.8 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.64 ± 0.23 <sup>b</sup>	7.17 ± 0.22 <sup>b</sup>

Накопление ртути в тканях рыжей полевки меньше, чем у бурозубок и окуня. У полевок с большим содержанием ртути амилолитическая активность и активность сахаразы слизистой оболочки кишечника ниже на 20 и 29% соответственно (табл. 3). Значения  $K_m$  гидролиза мальтозы снижалась в 1.6 раза, что свидетельствует об адаптивном увеличении сродства ферментов к субстрату. Содержание ртути и негативное влияние на активность гликозидаз в химусе выше, чем в слизистой: амилолитическая активность снижалась на 35%, активность сахаразы – на 50%, активность мальтазы – на 21%.

**Таблица 3.** Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в кишечнике рыжей полевки с разным накоплением ртути.

Показатель	Группа 1	Группа 2
Слизистая оболочка		
Содержание ртути, мкг/кг сырой массы	3.70 ± 0.08 <sup>a</sup>	35.3 ± 9.50 <sup>b</sup>
Амилолитическая активность	24.1 ± 0.67 <sup>a</sup>	19.3 ± 0.54 <sup>b</sup>
Активность сахаразы	3.57 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.53 ± 0.06 <sup>b</sup>
Активность мальтазы	7.92 ± 0.29 <sup>a</sup>	7.92 ± 0.26 <sup>a</sup>
$K_m$ гидролиза мальтозы, ммоль	2.68 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.15 <sup>b</sup>
Химус		
Содержание ртути, мкг/кг сырой массы	17.3 ± 1.80 <sup>a</sup>	58.5 ± 2.90 <sup>b</sup>
Амилолитическая активность	10.5 ± 0.83 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.56 <sup>b</sup>
Активность сахаразы	1.30 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>b</sup>
Активность мальтазы	8.09 ± 0.13 <sup>a</sup>	6.38 ± 0.01 <sup>b</sup>

Таким образом, результаты натуральных наблюдений свидетельствуют о влиянии повышенного содержания ртути на гидролиз углеводов в кишечнике водных и наземных животных. Накопление ртути в организме млекопитающих и рыб из водоемов с нейтральным рН воды, не превышающее 200 мкг/кг, может вызывать как увеличение, так и снижение активности пищеварительных гликозидаз. В то же время, отмечено адаптивное повышение сродства ферментов к субстрату (значения  $K_m$  гидролиза углеводов снижаются), что позволяет частично компенсировать неблагоприятное влияние ртути на скорость переваривания углеводных компонентов пищи.

#### Список литературы

1. Hall B.D., Bolaly R.A., Furge R.J.P. et al. 1997. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish // Water, Air and Soil. Pollut. V. 100. № 1-2. P. 13-24.

2. Langford N. J., Ferner R.E. Toxicity of mercury // J. Human Hypertension. 1999. V. 13. P. 651–656
3. Комов В.Т. Природное и антропогенное закисление малых озер северо-запада России: причины, последствия, прогноз: Дисс. ...док. биол. наук. С-Пб.: Институт озераведения РАН. 1999. 45 с.
4. Немова Н.Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.
5. Filipak Neto F., Zanata S.M., Silva de Assis H.C. et al. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus* // Toxicol. in Vitro. 2008. V. 22. № 7. P. 1705-1713.
6. Уголев А. М., Иезуитова Н. Н., Масевич Ц. Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. 216 с.
7. Голованова И.Л., Комов В.Т. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // Вопр. ихтиол. 2005. Т. 45. № 5. С. 695-701.

УДК 597.585.1:632.954+591.543.1

### ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАПА И ИЗМЕНЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА В МОЗГЕ МОЛОДИ РОТАНА *PERCCOTTUS GLENI*

В.А. Подгорная, И.Л. Голованова, В.К. Голованов, Г.М. Чуйко

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
Ярославская обл., п. Борок, Россия, aloe@ibiw.yaroslavl.ru*

Установлено, что хроническое сублетальное действие Раундапа (2 мкг/л, экспозиция 30 сут.) не вызывает заметных изменений активности АХЭ, тогда как уровень содержания ВРБ понижается под действием токсиканта. Последующее изменение температуры среды обитания рыб путем нагрева воды со скоростью 8°C/ч, снижает уровень активности АХЭ, но повышает содержание ВРБ. В то же время нахождение рыб в термоградиенте после экспозиции в гербициде повышает активность АХЭ и снижает содержание белка в мозге. Последовательное комплексное воздействие всех исследованных факторов не вызывает достоверных изменений в состоянии холинергической системы рыб и носит, по-видимому, компенсаторный характер.

Антропогенное загрязнение пресноводных объектов - одна из актуальных экологических проблем современного индустриального общества. Оно приводит к ухудшению качества водных ресурсов, негативно влияет на состояние водных животных и экосистем, и представляет угрозу здоровью человека.

Потепление климата, аномальные изменения температурных показателей, увеличение зон термального загрязнения на протяжении нескольких последних десятилетий меняют температурную среду обитания рыб. Изменение температурного режима водоемов способствует инвазии чужеродных видов. Таким видом-вселенцем для бассейна Верхней Волги явился головешка-ротан *Perccottus glenii*, который стремительно расширяет свой ареал в России и Европе как за счёт освоения сравнительно небольших, так и крупных водоёмов, в том числе водохранилищ [1]. По температурным характеристикам (окончательно избираемой и верхней летальной температуре) ротан относится к наиболее теплолюбивым видам рыб, обитающих в пресных водоемах России [2]. Его способность быстро приспосабливаться к изменению природных и антропогенных факторов дает ему преимущества по сравнению со многими видами рыб-аборигенов. В результате многофакторного антропогенного воздействия происходит трансформация экосистем. Возросшие масштабы производства и использования пестицидов, привели к загрязнению ими окружающей среды. Наиболее значимыми по воздействию на функционирование водных экосистем являются гербициды на основе изопропиловой соли глифосата. Самый известный из них Раундап (N-(фосфонометил) глицин) – системный гербицид широкого спектра действия, начал использоваться в 70-х гг. прошлого века. Его применяют для уничтожения сорной растительности на сельскохозяйственных полях, в оросительных системах, в коллекторно-дренажных каналах и прудах. Данные литературы свидетельствуют об ингибирующем действии Раундапа на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) мозга и мышц рыб [3]. Изменение активности АХЭ, играющей важную роль в синаптической передаче нервного импульса, является чутким биоиндикатором физиологического состояния холинергической системы и организма в целом при действии любого стрессового фактора [4]. Ингибирование активности приводит к нарушению поведения и ориентации рыб в пространстве и, вероятно, может изменять терморегуляционное поведение рыб. Совместное действие антихолинэстеразных соединений и изменений температуры внешней среды на показатели холинергической системы мозга ротана ранее практически не

исследовались. В естественных условиях невозможно выделить роль отдельного фактора в формировании направленности процесса негативного влияния на рыб. Именно в лабораторных условиях, путем моделирования определенных ситуаций, можно проследить роль каждого антропогенного фактора в процессе адаптации.

Цель работы - изучить хроническое сублетальное действие гербицида Раундап и различных режимов изменения температуры внешней среды на активность АХЭ и содержание водорастворимого белка в мозге молоди ротана.

Объект исследования – сеголетки ротана, отловленные в одном из прудов Некоузского района Ярославской области. Перед экспериментом рыб содержали в аквариумах объемом 200 л с постоянной аэрацией, с 12-ти часовым периодом освещения, при температуре воды  $15.5 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 2-х месяцев адаптации. В этот период и во время эксперимента рыб кормили 1 раз в сутки личинками хирономид из расчета 4% от общей массы тела. Средняя масса сеголетков составила  $3.12 \pm 0.17$  г, длина тела –  $5.44 \pm 0.10$  см. После периода адаптации рыб разделили на 2 группы по 50 экземпляров. Рыб контрольной группы поместили в аквариум с чистой водой, опытной группы – в аквариум с водой, содержащей Раундап в концентрации 2 мкг/л, что составляет 2 ПДК. Смену воды и раствора гербицида в аквариумах производили 2 раза в неделю без отсадки рыб. Температурный и световой режимы поддерживали на прежнем уровне.

Через 30 суток экспозиции в Раундапе определяли активность АХЭ мозга и содержание водорастворимого белка (ВРБ) в каждой группе рыб. Одновременно по 6 экз из контрольных и опытных рыб были посажены в аквариумы, температуру воды в которых повышали со скоростью  $8^\circ\text{C}/\text{ч}$  до потери ими состояния равновесия (переворот на бок). Это сублетальное значение температуры фиксировали как критический термический максимум (КТМ). Кроме того по 12 экз из каждой группы были помещены в отсек термоградиента (температурный диапазон 14 -  $31^\circ\text{C}$ ) с температурой  $15^\circ\text{C}$  для определения окончательно избираемой температуры (ОИТ). В качестве критерия ОИТ выбрана среднесуточная избираемая температура, значение которой в течение трех суток варьирует незначительно ( $p > 0.05$ ). По истечении 12 суток пребывания в термоградиенте по 6 экземпляров рыб из контрольной и опытной групп также подвергали нагреву для определения КТМ [5]. После каждого из вариантов термического воздействия у рыб также определяли активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге.

Для биохимического анализа отбирали по 6 экз из контрольной и опытной групп. Рыб сразу декапитировали и извлекали целый мозг. Пробы до анализа хранили в закрытых пластиковых пробирках на 2 мл при температуре  $-18^\circ\text{C}$ . При помощи диспергатора IKA T10 Ultra-Tipgax готовили гомогенаты из целого мозга с добавлением 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.5). Гомогенаты центрифугировали на микроцентрифуге Mikro 22R при 10000g и температуре  $= 4^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Для биохимического анализа использовали супернатант.

Активность АХЭ определяли по методу Ellman et al [6] в собственной модификации, содержание ВРБ – по методу Bradford [7]. В качестве субстрата использовали иодид ацетилтиохолина (АТХ). Активность АХЭ выражали в мкмоль/мин на 1 г сырой ткани, содержание ВРБ – в мг на 1 г сырой ткани. Для приготовления раствора токсиканта использовали коммерческий препарат гербицида, имеющий торговое название "Раундап", произведенный в России по лицензии фирмы «Монсанто» (Бельгия). Концентрация Раундапа, рассчитанная по содержанию глифосата, составляла 2 мкг/л (2 ПДК). Результаты представлены в виде средних и их ошибок ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при  $p=0.05$ . Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 2.1 и Excel 2003.

Через 30 суток экспозиции в растворе Раундапа достоверных различий в активности АХЭ между контрольной и опытной группами рыб выявлено не было, однако просматривается тенденция к её снижению. В то же время содержание ВРБ под действием токсиканта достоверно уменьшилось на 32% (табл.1). Полученные данные свидетельствуют, что выбранная концентрация гербицида (2 мкг/л) не оказывает выраженного ингибирующего действия на активность АХЭ, хотя при более высоких его концентрациях эффект ингибирования по данным других авторов проявляется отчетливо [3]. В то же время снижение содержания ВРБ указывает на изменения, происходящие в организме рыб в этих условиях на метаболическом уровне.

Нагрев ротана со скоростью  $8^\circ\text{C}/\text{ч}$  показал, что его термоустойчивость после экспозиции в Раундапе не меняется, о чем свидетельствует равенство значений КТМ у рыб контрольной ( $31.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) и опытной ( $31.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ) групп. Вместе с тем, активность АХЭ у особей из опытной группы была на 29% ниже, а содержание белка на 49% выше по сравнению с рыбами контрольной группы, не подвергавшихся действию токсиканта. Эти данные свидетельствуют о происходящих в организме рыб функциональных изменениях и демонстрируют негативное влияние Раундапа в исследуемой концентрации, которое усиливается при нагреве рыб и выражается в снижении активности АХЭ после комплексного воздействия

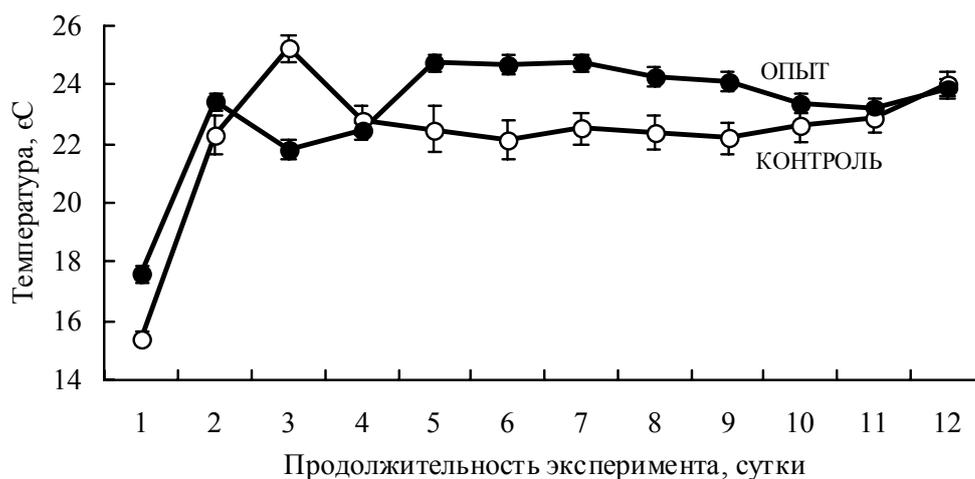
токсического и температурного факторов. В данном случае нагрев выступает в качестве функциональной нагрузки, которая усугубляет действие токсиканта на биохимическом уровне.

**Таблица 1.** Активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге ротана под влиянием Раундапа (2 мкг/л) и разных вариантов термического воздействия

Характер воздействия	Активность ХЭ, мкмоль/г ткани/ мин	Содержание белка, мг/г
Контроль до опыта	3.50±0.20	62.4±3.0
Раундап	<u>4.85±0.60</u> 4.46±0.70	<u>102.2±3.7</u> 69.2±4.8*
Нагрев	<u>4.91±0.71</u> 3.49±0.43*	<u>58.7±2.6</u> 87.3±5.9*
Термоградиент	<u>3.51±0.10</u> 5.05±0.45*	<u>73.9±10.2</u> 63.4±4.4*
Термоградиент + нагрев	<u>3.46±0.38</u> 3.25±0.20	<u>60.1±3.8</u> 54.0±2.7*

Примечание: над чертой – контроль, под чертой – опыт; \* различия достоверны (t-критерий Стьюдента,  $p \leq 0.05$ ).

При помещении рыб обеих групп после воздействия гербицида в термоградиент устойчивых однонаправленных различий в избираемой ими температуре в первые четверо суток не отмечено, хотя общий вектор в её выборе был в сторону повышения (рисунок).



**Рисунок.** Динамика избираемой в термоградиенте температуры молодью ротана контрольной и опытной (после экспозиции в Раундапе) групп в течение 12 сут [5].

Начиная с 5-х и по 9-е сут значения ОИТ у рыб обеих групп устанавливаются на стабильном уровне, незначительно варьируя в пределах  $24.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$  в опыте и  $22.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$  в контроле. Выявленные различия достоверны ( $p = 0.0002$ ). В последующие трое суток различия между группами сглаживаются и значение ОИТ выходит на уровень около  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Такой характер терморегуляционного поведения может свидетельствовать о том, что на начальном этапе термоадаптации рыбы, подвергнутые хроническому действию Раундапа, избирают более высокие температуры. Поскольку интенсивность биохимических реакций и физиологических процессов прямо зависит от температурного фактора, такой выбор, скорее всего, вызван необходимостью поддержания повышенного уровня метаболизма в организме, связанного с детоксикационными процессами. У рыб, как пойкилотермных животных, в основном присутствует внешняя терморегуляция, которая осуществляется на поведенческом уровне путем выбора оптимальной для конкретного физиологического состояния внешней температуры. Выравнивание значений ОИТ у опытных и контрольных рыб к 12 сут нахождения в термоградиенте свидетельствует о завершенности процессов детоксикации их организма от Раундапа.

Активность АХЭ у ротанов опытной группы после пребывания в термоградиенте в течение 12 сут достоверно возросла на 44%, а содержание белка снизилось на 14% контроля. Выявленные биохимические различия в холинергической системе мозга отражают характер термоадаптивных процессов в организме рыб. Известно, что активность многих ферментативных систем у рыб, в том числе и АХЭ, положительно коррелирует с температурой окружающей среды [4]. Кроме того показано, что одним из долгосрочных компонентов стресс-ответа у рыб является устойчивое до 14 сут повышение активности АХЭ в мозге [4, 8].

У контрольных и опытных рыб, испытавших действие только нагрева, значения КТМ не различались ( $31.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$  и  $31.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ), и были достоверно ниже, чем у рыб, подвергнутых нагреву после пребывания в термоградиенте ( $35,9 \pm 0,4^\circ\text{C}$  и  $36,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$ ). Это хорошо согласуется с данными о повышении значений КТМ с ростом температуры акклимации [1, 5]. На биохимическом уровне комбинированное термическое воздействие не вызвало различий в активности АХЭ у опытных и контрольных рыб, но достоверно понизило на 10% содержания ВРБ. Принимая во внимание, что только при нагреве активность АХЭ понизилась, а при нахождении в термоградиенте повысилась, это свидетельствует о компенсаторном влиянии на состояние холинергической системы предварительного нахождения рыб в термоградиенте по отношению к действию на них нагрева.

Таким образом, полученные результаты показывают, что хроническое сублетальное действие Раундапа (2 мкг/л, экспозиция 30 сут.) не вызывает заметных изменений активности АХЭ, тогда как уровень содержания ВРБ понижается под действием токсиканта. Последующее изменение температуры среды обитания рыб путем нагрева воды со скоростью  $8^\circ\text{C}/\text{ч}$ , снижает уровень активности АХЭ, но повышает содержание ВРБ. В то же время нахождение рыб в термоградиенте после экспозиции в гербициде повышает активность АХЭ и снижает содержание белка в мозге. Последовательное комплексное воздействие всех исследованных факторов не вызывает достоверных изменений в состоянии холинергической системы рыб и носит, по-видимому, компенсаторный характер.

*Исследование выполнено при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-2666.2014.4 «Экологические аспекты адаптаций и популяционная организация у рыб».*

#### Список литературы.

1. Решетников А.Н. Современный ареал ротана *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (Odontobutidae, Pisces) в Евразии // Российский журнал биологических инвазий. – 2009. – № 3. – С. 22–35.
2. Голованов В. К., Капшай Д.С., Герасимов Ю.В., Голованова И.Л., Карабанов Д.П., Смирнов А.К., Шляпкин И.В. Термоизбирание и термоустойчивость молоди головешки-ротана *Perccottus glenii* в осенний сезон года // Вопр. ихтиологии. – 2013. – Т. 53. – № 2. – С. 227–232.
3. Gluszczak L., Miron D. dos S., Crestani M., Fonseca M.B., Pedron F. de A., Duarte M.F., Vieira V.L.P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*) // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2006. – V. 65. – № 2. – P. 237–241.
4. Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Холинэстеразы пресноводных костистых рыб // В кн.: Физиология и токсикология пресноводных животных (Г.М. Чуйко ред.). – Рыбинск: ОАО «Рыбинский дом печати», 2007. С.100-139.И.Л.
5. Голованова И.Л., Аминов А.И., Капшай Д.С., Голованов В.К. Физиолого-биохимические и температурные характеристики сеголетков ротана при хроническом действии Раундапа. Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. №3. С.98-102.
6. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin-esterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961. V.7. P. 88-95.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V.72. P.248-254.
8. Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние кортикостероида дексаметазона и хендлинга на активность ацетилхолинэстеразы и содержание водорастворимого белка в мозге и печени стерляди *Acipenser ruthenus* Linneaus // Рыболовство и рыбное хозяйство. 2011. №7. С.39-43.

## ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЗНАЧЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИТОПЛАНКТОННЫХ СООБЩЕСТВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

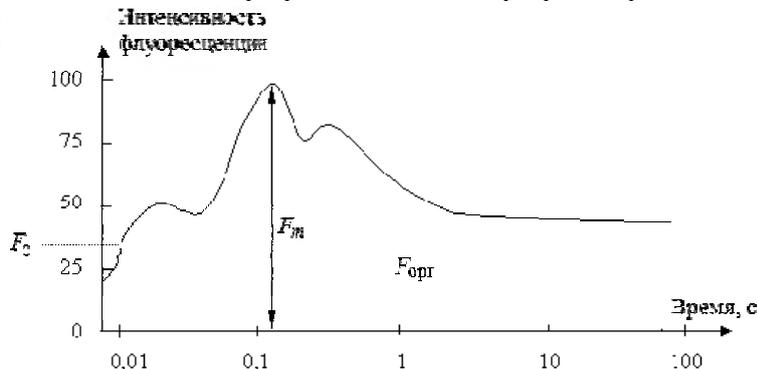
Д.В. Рисник, П.А. Бобырев, Н.Г. Булгаков, А.П. Левич

*МГУ имени М.В.Ломоносова*

*119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биофак МГУ, Россия, biant3@mail.ru*

Работа посвящена определению зависимостей между физико-химическими факторами среды и показателями флуоресценции фитопланктона. В исследовании использованы методы корреляционного и регрессионного анализа, а также метод расчета границ локальных экологических норм.

Первичные данные, используемые для анализа, были получены совместно с сотрудниками Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН) в результате измерения физико-химических факторов среды и показателей флуоресценции в поверхностных и батометрических пробах в различных районах Рыбинского водохранилища в июне-сентябре 2011 г. [1]. Сотрудниками Института биологии внутренних вод получены: физические характеристики (температура воды и воздуха, электропроводность, прозрачность); значения кислотности (рН) и щелочности; содержание минеральных веществ ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , сумма ионов); содержание биогенных элементов ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , общий азот,  $\text{PO}_4^{3-}$ , общий фосфор); содержание различных фракций органических веществ (цветность, ХПК, БПК<sub>5</sub> органический углерод во взвеси, нефтепродукты). Сотрудниками Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова получены следующие данные по флуоресценции проб (см. рис. 1):  $F_0$  – фоновый уровень переменной флуоресценции пробы (все реакционные центры фотосистемы 2, возбуждаемой светом в коротковолновой части спектра, находятся в "открытом" состоянии);  $F_m$  – максимальный уровень переменной флуоресценции пробы (все реакционные центры фотосистемы 2 находятся в "закрытом" состоянии);  $F_{\text{орг}}$  – уровень флуоресценции растворенных органических веществ. Флуоресценцию определяли по методике, разработанной на кафедре биофизики МГУ [2, 3].



**Рис. 1.** Типичная кривая индукции флуоресценции фитопланктона.  $F_0$  – фоновый уровень флуоресценции пробы,  $F_m$  – максимальный уровень переменной флуоресценции пробы и  $F_{\text{орг}}$  – уровень флуоресценции растворенных органических веществ

Кроме измеренных показателей флуоресценции проб, были рассчитаны показатели флуоресценции фитопланктона  $F_{0 \text{ фито}} = F_0 - F_{\text{орг}}$  и  $F_{m \text{ фито}} = F_m - F_{\text{орг}}$ .

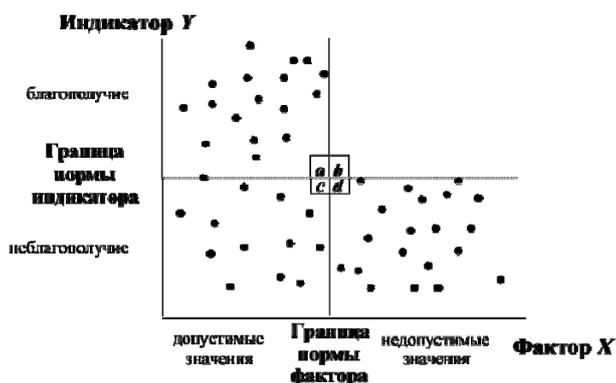
Анализ матрицы корреляций между исследуемыми показателями флуоресценции выявил, что все показатели, кроме  $F_{\text{орг}}$ , скоррелированы между собой (коэффициент корреляции  $R$  в пределах от 0.85 до 0.97 соответствует высокой силе связи по шкале Чеддока). В связи с этим для дальнейшего анализа оставили два показателя флуоресценции:  $F_{\text{орг}}$  и  $F_m$  ( $F_m$  выбран как показатель дающий максимальную связь с остальными показателями флуоресценции).

При помощи корреляционного анализа установлена заметная по шкале Чеддока ( $R = -0.78$ ) обратная связь между  $F_{\text{орг}}$  и значением рН (чем выше рН, тем ниже  $F_{\text{орг}}$ ), умеренная прямая связь ( $R = 0.57$ ) между  $F_{\text{орг}}$  и концентрацией азота нитратов, остальные связи слабые и незначимые. Линейный регрессионный анализ дал более качественные результаты: 1) коэффициент множественной корреляции между  $F_m$  и основными влияющими на него факторами составил 0.75, формула регрессии:  $F_m = -0.040 \cdot \text{Ca}^{2+} + 0.112 \cdot \text{Mg}^{2+} - 0.278 \cdot \text{Na}^+ - 0.024 \cdot \text{Cl}^- + 0.006 \cdot \text{сумма ионов} + 1.424 \cdot \text{NH}_4^+ - 22.69 \cdot \text{NO}_2^- -$

$0.369 \cdot \text{NO}_3^- - 0.077 \cdot \text{N}_{\text{общ}} + 9.668 \cdot \text{PO}_4^{3-} - 2.781 \cdot \text{P}_{\text{общ}} - 0.337 \cdot \text{pH} + 0.269 \cdot \text{щелочность} - 0.003 \cdot \text{прозрачность} + 0.052 \cdot \text{температура воды} + 0.069 \cdot \text{БПК}_5 + 2.202$ ; 2) коэффициент множественной корреляции между  $F_{\text{орг}}$  и основными влияющими на него факторами составил 0.93, формула регрессии:  $F_{\text{орг}} = -0.025 \cdot \text{Ca}^{2+} + 0.025 \cdot \text{Mg}^{2+} - 0.011 \cdot \text{Na}^+ + 0.025 \cdot \text{Cl}^- + 0.005 \cdot \text{HCO}_3^- - 0.0004 \cdot \text{сумма ионов} - 0.270 \cdot \text{NH}_4^+ - 1.275 \cdot \text{NO}_2^- - 0.322 \cdot \text{NO}_3^- - 0.0004 \cdot \text{N}_{\text{общ}} + 2.200 \cdot \text{PO}_4^{3-} - 1.428 \cdot \text{P}_{\text{общ}} - 0.153 \cdot \text{pH} - 0.002 \cdot \text{электропроводность} - 0.004 \cdot \text{температура воды} + 0.030 \cdot \text{БПК}_5 + 1.873$ . Однако стоит отметить, что статистики [4] рекомендуют использовать в корреляционном и регрессионном анализе следующее эмпирическое правило: число совместных наблюдений, используемых для анализа должно быть больше  $50 + 8g$ , где  $g$  – количество независимых переменных. В нашем случае это правило не соблюдено, т.к. число совместных наблюдений около 40, следовательно, анализ может давать недостоверные результаты.

Для более детального анализа данных в работе использовали метод установления границ локальных экологических норм (метод ЛЭН) [5, 6].

Рассмотрим принцип работы метода для случая, когда для индикатора  $Y$  благополучны высокие значения, а для фактора  $X$  допустимы – низкие (рис. 2). Границы, разделяющие "благополучные" и "неблагополучные" значения индикатора, названы границами нормы индикатора (ГНИ), границы, разделяющие "допустимые" и "недопустимые" значения фактора – границами нормы фактора (ГНФ). Если биологический показатель действительно является индикатором, отражающим воздействие исследуемого фактора, то "благополучные" значения биоиндикатора не должны соответствовать "недопустимым" значениям фактора. Соответственно область на графике зависимости биоиндикатора от фактора (область "b" на рис. 2), отвечающая за "благополучные" значения биоиндикатора, соответствующие "недопустимым" значениям фактора, должна быть пуста или близка к пустоте. Поскольку в природных условиях на биоиндикатор влияет множество факторов среды, область "c" может содержать наблюдения, с приводящими к неблагоприятию индикатора значениями факторов среды, отличных от исследуемого. Указанные особенности влекут для натурных данных необходимость поиска такой взаимосвязи между индикаторами и факторами, которая соответствует "пустоте" единственной области "b" на графике зависимости индикатора от фактора (рис. 2).



**Рис. 2.** Классы значений индикатора и фактора в реальном наблюдении (под воздействием множества факторов)

В качестве критерия, позволяющего определить положение границ, характеризующего пустоту области  $b$  и учитывающего влияние собственных распределений факторов выступает коэффициент существенности как модификация критерия С.В. Чеснокова [7]. Кроме этого критерия, алгоритм метода ЛЭН учитывает некоторые дополнительные условия: 1) область  $b$  должна быть достаточно пуста по сравнению с областями  $a$  и  $d$ ; 2) число наблюдений в областях  $a$  и  $d$  должно быть достаточно представительным, чтобы считать эти области заполненными в результате влияния фактора на индикатор, а не в результате погрешностей измерений; 3) число доступных для анализа совместных наблюдений за значениями индикатора и фактора должно быть больше 20; 4) результаты анализа должны быть значимы со статистической точки зрения, доверительная вероятность результатов должна быть больше 0.90-0.95.

Метод ЛЭН также позволяет проводить поиск двух границ нормы фактора, когда к "неблагополучию" биоиндикатора приводят как "низкие", так и "высокие" значения фактора, допустимыми же являются "средние" значения фактора. В связи с этим для анализа данных производили поиск нижней границы нормы индикатора совместно с верхней, нижней или обеими границами нормы фактора. Метод ЛЭН позволяет выявить факторы, существенно влияющие на состояние среды, ранжировать их по степени влияния (полноте вклада), определить границы нормы индикаторов и факторов, выявить достаточность программы наблюдений для описания состояния исследуемого индикатора.

Найденные методом ЛЭН существенные факторы, верхние и нижние границы их нормы, полноты их вклада в исследуемые показатели флуоресценции в Рыбинском водохранилище приведены в табл. 1. Нижняя граница нормы индикатора для показателя  $F_m$  составила 0.82, для показателя  $F_{орг}$  – 0.26. В целом для обоих показателей найдено по 20 существенных факторов, достаточность программы наблюдений за факторами, влияющими на исследуемые показатели для  $F_m$  составила 85%, для  $F_{орг}$  – 67%. Наибольший вклад в состояние экосистем вносят показатели содержания азота нитратов, содержание гидрокарбонатов и электропроводности.

**Таблица 1.** Факторы, оказывающие существенное влияние на показатели флуоресценции в Рыбинском водохранилище, и их границы нормы. Факторы упорядочены по убыванию полноты их вклада в состояние показателей. ГНФ – граница нормы фактора

Индикатор	Фактор	Верхняя ГНФ	Нижняя ГНФ	Полнота	Количество точек в выборке
$F_m$	$\text{NO}_2^-$ , мг N /л	0.002		0.68	41
	$\text{NO}_3^-$ , мг N /л	0.023		0.68	41
	$\text{HCO}_3^-$ , мг/л	105.5	94.6	0.62	41
	электропроводность, мкСм/см	188		0.59	41
	БПК <sub>5</sub> , мг/л		1.56	0.56	40
	сумма ионов, мг/л	159		0.53	41
	$\text{Ca}^{2+}$ , мг/л	27.3		0.53	41
	$\text{Mg}^{2+}$ , мг/л	7.29		0.50	41
	температура воды, °С		19	0.41	41
	прозрачность, см	90		0.41	41
	щелочность, мг/л		1.5	0.38	41
	$\text{Cl}^-$ , мг/л	3.55		0.35	41
	$\text{SO}_4^{2-}$ , мг/л	20.2		0.35	41
	ХПК, мг/л		33.8	0.35	41
Индикатор	Фактор	Верхняя ГНФ	Нижняя ГНФ	Полнота	Количество точек в выборке
$F_m$	$\text{Na}^+$ , мг/л	3.22		0.32	41
	$\text{NH}_4^+$ , мг N /л		0.04	0.32	41
	$\text{PO}_4^{3-}$ , мг P /л		0.013	0.29	41
	$\text{P}_{общ}$ , мг P /л		0.045	0.26	41
	цветность, град		45	0.26	41
	$F_{орг}$	$\text{NO}_3^-$ , мг N /л		0.12	0.60
pH		7.5		0.56	41
электропроводность, мкСм/см		187		0.47	41
$\text{HCO}_3^-$ , мг/л		101.3		0.42	41
$\text{PO}_4^{3-}$ , мг P /л		0.033	0.012	0.42	41
сумма ионов, мг/л		159		0.37	41
$\text{Ca}^{2+}$ , мг /л		27.3		0.37	41
$\text{Mg}^{2+}$ , мг/л		7.17		0.37	41
$\text{C}_{орг}$ , мг/л во взвеси		1.6		0.37	35
ХПК, мг/л		38.9	33.1	0.37	41
$\text{Na}^+$ , мг/л		2.99		0.33	41
$\text{NO}_2^-$ , мг N /л			0.003	0.33	41
$\text{Cl}^-$ , мг/л		3.55		0.28	41
$\text{P}_{общ}$ , мг P /л		0.06		0.28	41
Щелочность, мг/л		1.6		0.28	41
Цветность, град			45	0.23	41
$\text{NH}_4^+$ , мг N /л			0.03	0.21	41
$\text{N}_{общ}$ , мг N /л			1.01	0.21	41
БПК <sub>5</sub> , мг/л		1.99	1	0.21	40
Прозрачность, см			90	0.21	41

Таким образом, можно сделать вывод, что показатель флуоресценции органических веществ, вероятно, целесообразнее исследовать при помощи регрессионного анализа, однако для корректного анализа необходимо увеличить число наблюдений до 200. При наличии же ограниченного набора данных целесообразнее использовать метод ЛЭН. Для максимального уровня флуоресценции пробы и других скоррелированных с ним показателей флуоресценции метод ЛЭН позволяет лучше описать зависимость от факторов среды в сравнении с корреляционным и регрессионным анализом.

*Работа частично поддержана грантами РФФИ № 14-04-00143, 13-04-01027.*

#### Список литературы

1. Данные совместных измерений биологических и физико-химических характеристик экосистемы Рыбинского водохранилища / Бикбулатов Э.С., Бикбулатова Е.М., Бобырев П.А., Булгаков Н.Г., Ершов Ю.В., Конюхов И.В., Копылов А.И., Корнева Л.Г., Лазарева В.И., Левич А.П., Литвинов А.С., Масленникова Т.С., Митропольская И.В., Осипов В.А., Отюкова Н.Г., Поддубный С.А., Пырина И.Л., Рисник Д.В., Рожков Г.В., Соколова Е.А., Степанова И.Э., Цельмович О.Л. // – М.: МАКС Пресс, 2014 (в печати)
2. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла / Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлев О.В., Погосян С.И. // – М.: МАКС Пресс, 2010. – 116 с.
3. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. Методика измерений обилия и индикации изменений состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты. – М.: Альтекс, 2012. – 136 с.
4. Green, S. B. How many subjects does it take to do a regression analysis? // *Multivariate Behavioral Research*, 26, 1991. – P. 499-510.
5. Методические проблемы анализа экологических данных и пути их решения: метод локальных экологических норм / Левич А.П., Булгаков Н.Г., Рисник Д.В., Милько Е.С. // Доклады по экологическому почвоведению. – 2013. – Т. 18. № 1. – С. 9–22.
6. "In situ"-технология установления локальных экологических норм / Левич А.П., Булгаков Н.Г., Максимов В.Н., Рисник Д.В. // Вопросы экологического нормирования и разработка системы оценки состояния водоемов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – С. 32-57.
7. Чесноков С. В. Детерминационный анализ социально-экономических данных. – М.: Наука, 1982. – 168 с.

УДК 577.161.6

### ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИЙ ЧЕРНОМОРСКИХ ХРЯЩЕВЫХ РЫБ К УСЛОВИЯМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

И.И.Руднева<sup>1</sup>, Н.С. Кузьмина<sup>1</sup>, Е.Н. Скуратовская<sup>1</sup>, И.И. Дорохова<sup>1</sup>, С.О. Омельченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт биологии южных морей*

*299011, Севастополь, пр. Нахимова, 2, Россия, svg@mail.ru*

<sup>2</sup>*Крымское государственное научно-производственное предприятие*

*«Центр стандартизации, сертификации и метрологии»,*

*235600, Симферополь, ул. Крымской Правды, 61, Россия*

Рассмотрены механизмы биохимической адаптации хрящевых рыб Черного моря, обитающих в условиях загрязнения морской среды. Показано модифицирующее действие загрязнения на биомаркеры печени и крови трех видов эласмобранхий.

*Ключевые слова:* антиоксиданты, аминотрансферазы, тяжелые металлы

В настоящее время в мире насчитывается около 500 видов хрящевых рыб. Исследование их физиолого-биохимических характеристик представляет особый интерес для выяснения основных закономерностей эволюции и адаптаций морских организмов к условиям обитания. Изменение климата, загрязнение морской среды в результате хозяйственной деятельности человека, а также перелов крайне негативно отразились на популяциях эласмобранхий и привели к снижению их численности, биоразнообразия, ухудшению физиологического состояния и воспроизводства [1]. В связи с этим изучению морских хрящевых рыб уделяется в настоящее время повышенное внимание с целью разработки мероприятий по их охране, организации рационального вылова или запрета на него в случае малочисленных или исчезающих видов.

Хрящевые рыбы обладают рядом особенностей, которые делают их весьма уязвимыми к изменениям среды обитания. У них отсутствует плавательный пузырь, система формирования костной

ткани, в их крови содержится большое количество мочевины и оксида триметиламина (ТМО), обеспечивающих осморегуляцию. Помимо этого, они характеризуются медленными темпами размножения и развития эмбрионов. Поскольку хрящевые рыбы относятся к древним организмам, то исследование их адаптаций к современным условиям, где существенным фактором является влияние на природные сообщества хозяйственной деятельности человека, представляется важным и актуальным. Кроме того, если отклики костистых рыб на действие загрязнения изучены достаточно подробно, то хрящевым в этом плане уделено значительно меньше внимания, несмотря на то, что в последнее время наблюдается резкое сокращение их численности и биоразнообразия.

В Черном море обитают три вида хрящевых рыб – акула катран *Squalus acanthias* и два вида скатов морская лисица *Raja clavata* и морской кот *Dasyatis pastinaca*, уловы которых сокращаются в последнее время. Исследуемые виды характеризуются разными экологическими особенностями. Скаты относятся к бентосным организмам, обитающим в придонных слоях воды, часто зарываются в песок и ведут малоподвижный образ жизни. Акула-катран принадлежит к придонно-пелагическим активно плавающим видам. Все три вида – хищники, спектр питания которых одинаков и включает мелких рыб, моллюсков, ракообразных [2].

Цель настоящей работы - анализ некоторых биомаркеров крови и печени хрящевых рыб Черного моря, обитающих в акваториях, подверженных антропогенному влиянию. В качестве такой акватории была выбрана Севастопольская бухта, экологическое состояние которой достаточно хорошо изучено, в том числе проанализированы экотоксикологические аспекты на примере массовых видов костистых рыб [3].

Исследовали три вида хрящевых рыб Черного моря, отловленных в прибрежных водах Севастополя: акула катран *S. acanthias*, морская лисица *R. clavata* и скат-хвостокол *D. pastinaca*, относящиеся к разным экологическим группам, как было отмечено выше. Уровень токсичных элементов меди, свинца, кадмия, цинка, ртути и мышьяка определяли в мышечных тканях рыб атомноабсорбционным методом. Анализировали биомаркеры печени и крови рыб: активность антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ, ПЕР и ГР), аминотрансфераз (АЛТ и АСТ), холинэстеразы, а также определяли содержание олигопептидов в исследуемых тканях согласно стандартным методам.

Результаты обрабатывали статистически, используя ANOVA, корреляционный анализ между значениями исследованных показателей осуществляли с помощью стандартной компьютерной программы CURVEFIT.

Исследования показали, что содержание токсичных элементов в тканях хрящевых рыб различается (Таблица 1). Их уровень в мышцах рыб распределялся следующим образом  $Zn > As > Cu > Pb > Hg > Cd$ . При этом для большинства исследованных элементов он выше в тканях скатов по сравнению с акулой. Это обусловлено большим загрязнением придонных слоев воды и грунтов, а также пищи, которой питаются бентосные скаты. В дальнейшем представлял интерес сравнить биомаркеры трех видов хрящевых рыб и соотнести их значения с уровнем накопленных токсичных элементов в тканях.

**Таблица 1.** Содержание токсичных элементов в мышцах хрящевых рыб Черного моря ( $mg\ kg^{-1}$ ,  $M \pm m$ )

Токсичные элементы	Виды			ПДК
	<i>Squalus acanthias</i>	<i>Dasyatis pastinaca</i>	<i>Raja clavata</i>	
Cu	0,32±0,02	0,41±0,01	0,36±0,01	10,0
Pb	0,23±0,01	0,36±0,1	0,22±0,01	1,0
Cd	0,015±0,003	0,015±0,005	0,015±0,005	0,2
Zn	4,15±0,04	4,6±0,3	4,0±0,2	40,0
As	1,52±0,12	4,52±0,4	2,06±0,1	5,0
Hg	0,18±0,01	0,26±0,06	0,25±0,04	0,4
Всего	6,41±1,60	10,16±2,20	6,90±1,50	-

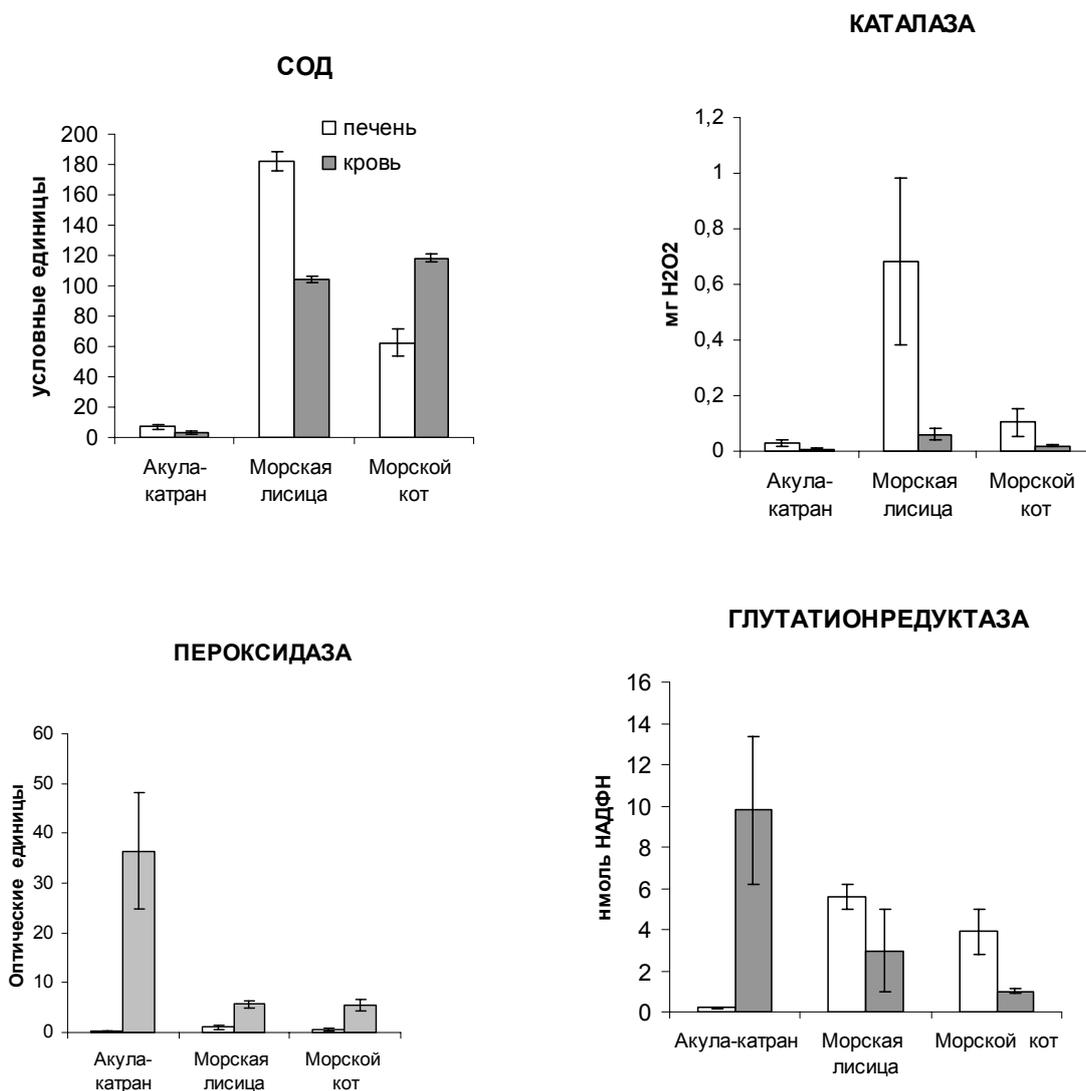
Обнаружены существенные вариации значений биомаркеров крови и печени элазмобранхий, имеющих выраженный тканеспецифический характер. Так, активность антиоксидантных ферментов в печени скатов была выше, чем в печени акулы (Рис. 1). Активность СОД и каталазы проявляла такую же тенденцию в крови исследуемых видов, однако активность пероксидазы и глутатионредуктазы имела противоположную направленность.

Не были установлены корреляции между активностью антиоксидантных ферментов в печени и содержанием токсичных элементов в мышцах рыб, за исключением ртути. При этом уравнение регрессии было нелинейным и выражалось формулой

$$Y = X/(AX + B),$$

где  $Y$  - значение активности фермента (в соответствующих единицах  $\cdot \text{мг}^{-1}\text{белка} \cdot \text{мин}^{-1}$ ),  $X$  - концентрация ртути ( $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  сырой массы),  $A$  и  $B$  - коэффициенты, зависящие от активности фермента.

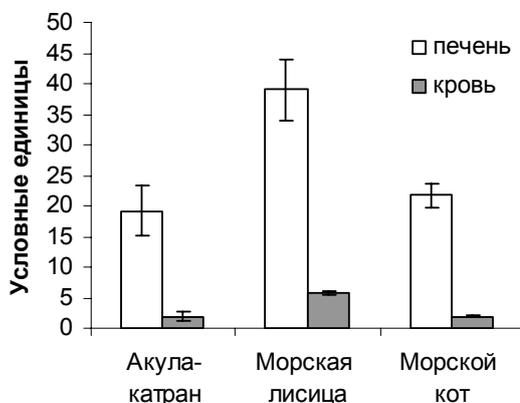
Коэффициенты корреляции между содержанием ртути и активностью различных антиоксидантных ферментов имели близкие значения. Так, например, корреляция между содержанием ртути и активностью СОД составила  $r=0.95$ , между уровнем Hg и активностью каталазы 0.78, для пероксидазы и глутатионредуктазы корреляции были  $r=0.84$  и  $r=0.98$  соответственно. Липофильные свойства метилртути способствуют ее проникновению через мембрану клетки, что приводит к ее повреждению, в том числе в результате индукции перекисного окисления липидов и особенно ПНЖК. Ртуть обладает способностью быстро накапливаться в тканях и практически не выводится из них [4]. При этом Hg взаимодействует с SH-группами белков и инактивирует их. Можно предположить, что накопление ртути в тканях рыб оказывает существенное влияние на состояние антиоксидантной системы и модифицирует окислительно-антиоксидантный баланс у хрящевых рыб.



**Рис. 1.** Активность антиоксидантных ферментов в печени и крови хрящевых рыб Черного моря ( $\text{мг} \cdot \text{белка}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ,  $M \pm m$ )

Не было обнаружено значительных различий в активности холинэстеразы в печени рыб, также как не были установлены существенные корреляции между активностью фермента в печени и содержанием токсичных элементов в тканях.

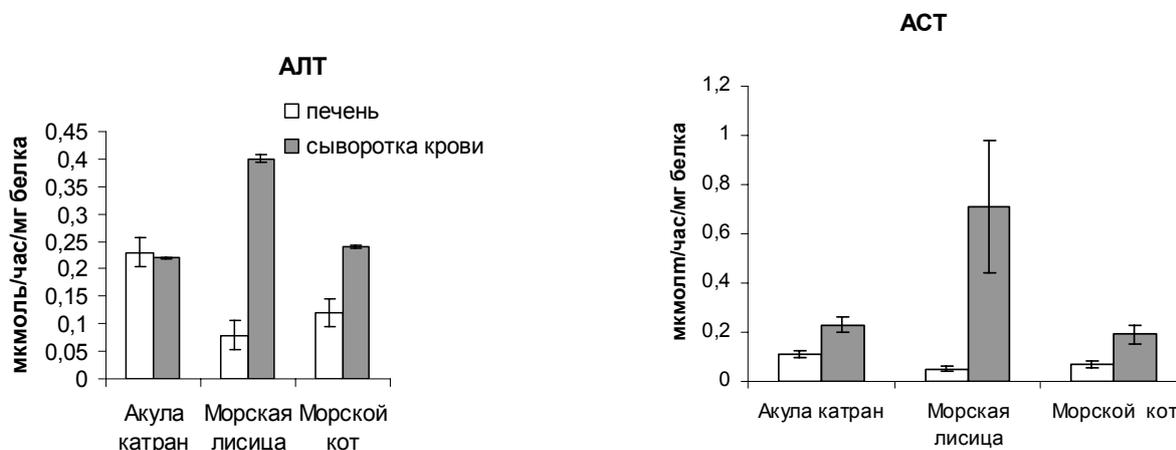
Содержание олигопептидов, характеризующих уровень эндогенной интоксикации, в печени рыб значительно превышало их концентрацию в крови (Рис. 2). При этом данный показатель был существенно выше в тканях морской лисицы по сравнению с показателями двух других исследуемых видов.



**Рис. 2.** Содержание олигопептидов в печени и крови хрящевых рыб Черного моря ( $10^{-3}$  мг белка<sup>1</sup>,  $M \pm m$ )

Следует отметить, что информация об этих компонентах в тканях рыб практически отсутствует, хотя представляет определенный интерес, так как олигопептиды образуются в результате реакций деградации белков, в том числе и при биотрансформации их поврежденных форм [5]. При этом наблюдаемые различия в содержании этих компонентов у трех исследуемых видов могут быть связаны с особенностями биотопа, так как акула-катран и морской кот обитают на меньших глубинах (100-180 м), тогда как морская лисица – на глубине 200 м и более [2]. Была отмечена высокая корреляция ( $r=0.82$ ) между активностью холинэстеразы и уровнем олигопептидов в печени рыб. Влияние глубины обитания на исследуемые биохимические показатели обнаружены и другими исследователями [6]. Можно предположить, что олигопептиды могут выполнять роль трансммиттеров в тканях эласмобранхий, так как среди них достаточно много биологически активных компонентов. Не исключено, что наряду с мочевиной и ТМО они также могут участвовать в осморегуляции хрящевых рыб.

Установлены межвидовые различия активности аминотрансфераз в тканях эласмобранхий: в печени акулы активность АЛТ и АСТ была выше, чем у скатов, тогда как в крови наибольшие значения активности ферментов отмечены у морской лисицы (Рис. 3). Обнаружена выраженная отрицательная корреляция между содержанием ртути и активностью АЛТ и АСТ в печени ( $r=0.72$  and  $r=0.62$  соответственно). Можно предположить, что накопление ртути в тканях рыб приводит к связыванию металла с SH-группами белков и ферментов, что в значительной степени ингибирует их активность.



**Рис. 3.** Активность аминотрансфераз в печени и в сыворотке крови хрящевых рыб Черного моря ( $M \pm m$ )

Таким образом, выявленные существенные видовые различия трех исследуемых хрящевых рыб Черного моря во многом определяются как особенностями их экологии, существованием в разных биотопах, так и уровнем загрязнения последних. Специфические условия Черного моря (наличия аноксической зоны, повышенные концентрации сероводорода, высокий уровень загрязнения) в значительной степени модифицируют эволюционно сложившиеся биохимические адаптации хрящевых рыб, анализ которых имеет важное прогностическое значение для разработки мероприятий по их охране.

#### Список литературы

1. Treberg J. R., Martin A.R., and Driedzic W. R. Muscle Enzyme Activities in a Deep-Sea Squaloid Shark, *Centroscyllium fabricii*, Compared With Its Shallow-Living Relative, *Squalus acanthias*. J. Exp. Zool. 2003. V. 300A. P.133-139.
2. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. Из-во Наука, Ленинград. 1964. 552 с.
3. Rudneva, I.I. Ecotoxicological studies of the Black Sea ecosystem. The Case of Sevastopol Region. Nova Science Publishers, Inc. NY.2011. 62 pp.
4. Storelli M.M., Giacominielli - Stuffer R., Storelli A., Macotrigiano G.O., Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and blufin tuna from the Mediterranean Sea: a comparative study. Mar. Pollut. Bull. 2005. V.50. P. 903-1007.
5. Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2003. V. 13. P. 57-149.
6. Solй M, Baena M, Arnau S, Carrasson M, Maynou F, Cartes JE. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. Environ Int. 2010. V.36 (2). P. 202-211.

УДК 546:597.554:547.963.3

### РОЛЬ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ РЫБ К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

Ю.И. Сенник, Б.З. Ляврин, В.Я. Бияк, В.А. Хоменчук, В.З. Курант

*Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка  
г. Тернополь, Украина*

Исследованы особенности белкового обмена у карпа под действием ионов марганца, цинка, меди и свинца. Установлена важную роль белкового обмена в процессах адаптации организма рыб к воздействию повышенных концентраций ионов металлов.

*Ключевые слова:* карп, ионы металлов, белковый обмен, адаптация.

Ионы металлов, поступающие в окружающую среду из антропогенных источников загрязнения, существенно влияют на состояние водных экосистем. Это проявляется в увеличении их содержания в воде, донных отложениях и биоте, что ведет к снижению продуктивности водных экосистем и к потенциальной опасности для человека.

Функционально соединения металлов играют важную роль в жизнедеятельности всех организмов, в том числе и гидробионтов. Входя в состав многих органических веществ, или вступая с ними во взаимодействие, они влияют на протекание многих биохимических процессов. Ионы металлов способны образовывать в тканях животных прочные связи с различными биологически активными центрами, в частности, с серосодержащими лигандами, которые могут содержаться в белках и аминокислотах. В значительной мере их действие связано с ферментами, которые содержат в своем составе ионы металлов, или активируются ими [5].

Как микроэлементы, металлы влияют на выполнение белками их разнообразных функций, информационную способность нуклеиновых кислот и на другие важные биохимические процессы [7]. Такое воздействие может быть стимулирующим, подавляющим или нейтральным, в зависимости от природы металла, концентрации и формы его нахождения в воде.

Повышение уровня загрязнения пресных водоемов требует поиска объективных методов биомониторинга, а также разработки эффективных протекторов к действию различных токсикантов и средств коррекции биопродуктивных процессов у гидробионтов. Для успешного решения этих задач необходимо глубокое изучение механизмов поддержания функциональной активности организма путем компенсаторно-адаптивных реакций ответа на действие факторов водной среды.

Основным критерием, который определяет физиолого-биохимический статус организма, является поддержание в нем гомеостатического уровня определенных метаболитов, которые занимают центральное место в регуляции обмена веществ, соотношении анаболических и катаболических процессов, формировании физиологической реакции организма. В описанных процессах ведущая роль принадлежит белковому обмену.

Объектом исследования был карп (*Cyprinus carpio* L.) двухлетнего возраста массой 300-350 г. Эксперименты проводились в 200-литровых аквариумах, которые заполняли отстоянной водопроводной водой, с поддержанием постоянного газового и температурного режимов, которые не отличались от естественных. Содержание кислорода в воде аквариумов составил 7,0-8,0 мг/л, углекислого газа - 2,2-2,8 мг/л. Значение рН было близким 7,7-7,9.

Изучалось влияние ионов марганца, цинка, меди и свинца в двух концентрациях, отвечающих 2 и 5 рыбохозяйственным предельно допустимым концентрациям (ПДК). При этом концентрации исследуемых металлов в пересчете на ионы, были следующие: марганца - 2,4 и 6,0 мг/л; цинка - 2,0 и 5,0 мг/л; меди - 0,2 и 0,5 мг/л и свинца - 0,2 и 0,5 мг/л.

Содержание марганца, цинка и меди определяли на атомно-адсорбционном спектрофотометре С-115, свинца на S-600 и выражали в граммах на килограмм влажной массы в тканях и в нанограммах на миллиграмм белка.

Общее содержание белков в тканях определяли биуретовым методом [1], активность общей АТФ-азы определяли по методике [4], аланин-и аспаратаминотрансферазы по [3], глутаматдегидрогеназы согласно методике [6].

На основании общих положений теории стресса и адаптации, а также анализа полученных нами экспериментальных данных можно предложить рабочую схему влияния ионов металлов на белковый обмен в организме карпа (рис.).

Универсальной реакцией гидробионтов на действие токсикантов является развитие стресс-катаболического синдрома, в результате чего нарушается метаболический гомеостаз организма. В нашем случае под гомеостазом мы понимаем не только постоянство внутренней среды вообще, но и работу отдельных функциональных систем, направленных на развитие компенсаторно-адаптивной реакции.

Сначала организм пытается бороться с токсикантами на уровне их проникновения в жабры путем снижения активности транспортных АТФ-аз. Однако, в случае поступления в организм избыточного количества ионов металла в процесс детоксикации включаются все органы и ткани. При этом в скелетных мышцах усиливается протеолиз белков, что ведет к росту количества свободных аминокислот, которые вступают в реакции переаминирования и дезаминирования, а также формируют адаптивный пул аминокислот крови. При интоксикации в мышцах рыб наблюдается снижение активности аэробного пути продуцирования энергии и усиление гликолиза.

С током крови свободные аминокислоты транспортируются в печень, где усиливает их переаминирования в АлАТ и АсАТ реакциях, дезаминирования в НАД(Н) - глутаматдегидрогеназной реакции и повышается их использования в синтезе адаптивных белков-металлотIONEИНОВ. Повышенные концентрации ионов тяжелых металлов усиливают глюконеогенез в печени рыб с одновременным функционированием глюкозо-аланиновой цикла, способствует поддержанию метаболического гомеостаза в организме. Наряду с этим смещение реакции с участием НАДФ(Н) - глутаматдегидрогеназы в сторону образования глутамата является причиной изъятия  $\alpha$  - кетоглутарата из цикла трикарбоновых кислот и нарушения энергетического обмена в печени и мышцах карпа.

Поскольку в результате интоксикации в тканях карпа возрастает образование аммиака, то возникает необходимость его обезвреживания и выведения из организма. Активное участие в этих процессах принимает глутамат, который связывает аммиак, образуя нетоксичный глутамин, и транспортирует его с током крови к жабрам. В жабрах глутамин расщепляется, и аммиак выводится из организма.

Учитывая вышесказанное, следует сделать вывод о важной роли белкового обмена в процессах адаптации организма карпа к воздействию повышенных концентраций ионов металлов. При этом стоит отметить, что описанные закономерности являются универсальными для любых адаптаций и, возможно, что эти перестройки генетически детерминированы. Именно поэтому данное направление исследования представляет значительный теоретический и практический интерес, поскольку понимание универсальных механизмов биохимической адаптации позволит найти средства регуляции процессов их формирования и поддержания высокого уровня функциональной активности молекул, которые их обеспечивают.

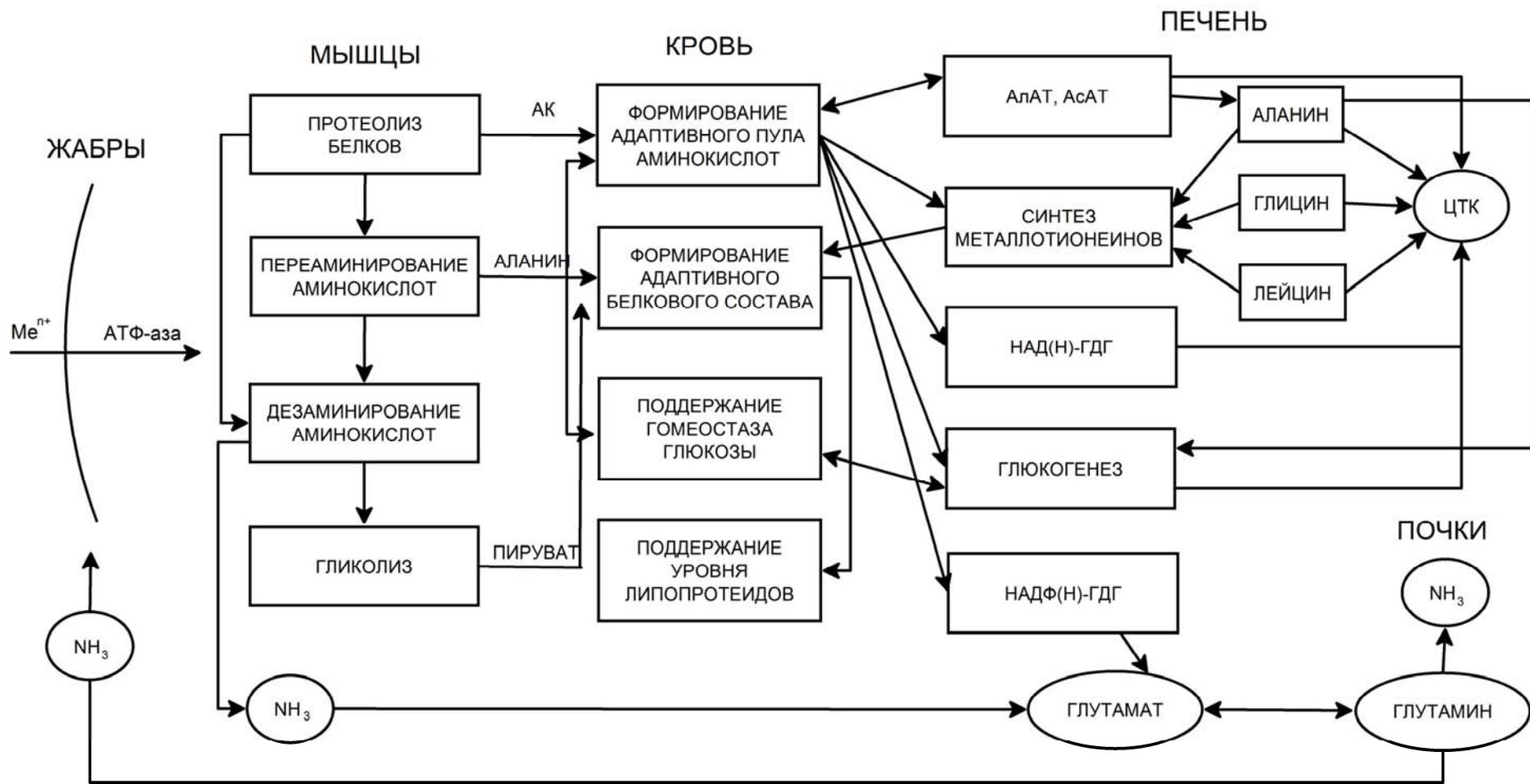


Рисунок. Схема особенностей белкового обмена в организме карпа за действия ионов металлов [2]

## Список литературы

1. Бейли Д. Методы химии белков. – М.: Мир, 1965. 266 с.
2. Курант В.З. Роль білкового обміну в адаптації риб до дії іонів важких металів: Автореф. дис... докт. біол. наук: 03.00.10. – Київ, 2003. 38 с.
3. Пасхина Т.С. Инструкция по определению глутамикоаспарагиновой и глутамикоаланиновой трансминаз (аминофераз) в сыворотке крови человека. – М.: Здоровье, 1974. – 22 с.
4. Dang Z., Lock R.A.C., Flik G. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP-ase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper // J. Exp. Biol. 2000. Vol.203. P. 379-387.
5. Disilvestro R.A., Cousins R.J. Physiological ligands for copper and zinc // Ann. Rev. Nutr. 1983. Vol.3. P. 261-288.
6. Glock G.E., Mc Lean P. A preliminary investigation of the hormonal control on the hexose monophosphate oxidative pathway // Biochem. J. 1955. Vol.61, N2. P. 390-395.
7. Martin B.R. Bioinorganic chemistry of metal ion toxicity // Metal ions in biological systems. – New-York and Bassel, 1988. Vol.20. P. 21-65.

## УДК 574.64

### ВОЗДЕЙСТВИЕ ХЛОРАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РАКОВ *ASTACUS LEPTODACTYLUS*

С.В. Сладкова<sup>1</sup>, С.В.Холодкевич<sup>1,2</sup>, И.С Куклина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности НИЦЭБ РАН  
197110, Санкт - Петербург, Корпусная ул., 18, Россия, sladkova\_sv1@mail.ru*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет, Институт наук о Земле  
Санкт - Петербург, Университетская набережная, 7-9, Россия*

<sup>3</sup>*Факультет рыболовства и охраны вод Университета Южной Чехии,  
389 25, Водняны, Чешская Республика*

Методом неинвазивной регистрации кардиоактивности изучено воздействие хлорамина на функциональное состояние раков *Astacus leptodactylus*. Показано, что они реагируют на появление токсиканта в воде, суточное воздействие негативно сказывается на функциональном состоянии.

*Ключевые слова:* раки, кардиоактивность, токсическое действие, биоиндикатор

Антропогенное загрязнение водоемов может приводить к ухудшению качества водной среды, губительно сказываясь на функциональном состоянии наиболее чувствительных к загрязнениям биоиндикаторных видов животных. В связи с этим изучение реакций сердечно-сосудистой системы таких гидробионтов на загрязнение поверхностных вод имеет большое значение для создания систем экологического мониторинга. Известно, что частота сердечных сокращений (ЧСС) речных раков и других водных животных отражает совокупное воздействие различных стрессоров на организм, а также может показывать, достаточен ли уровень их энергетики для нормального роста и размножения. Таким образом, ЧСС и ее характеристики могут использоваться в качестве индикаторов функционального состояния, которое, в свою очередь, в значительной степени определяется качеством среды обитания.

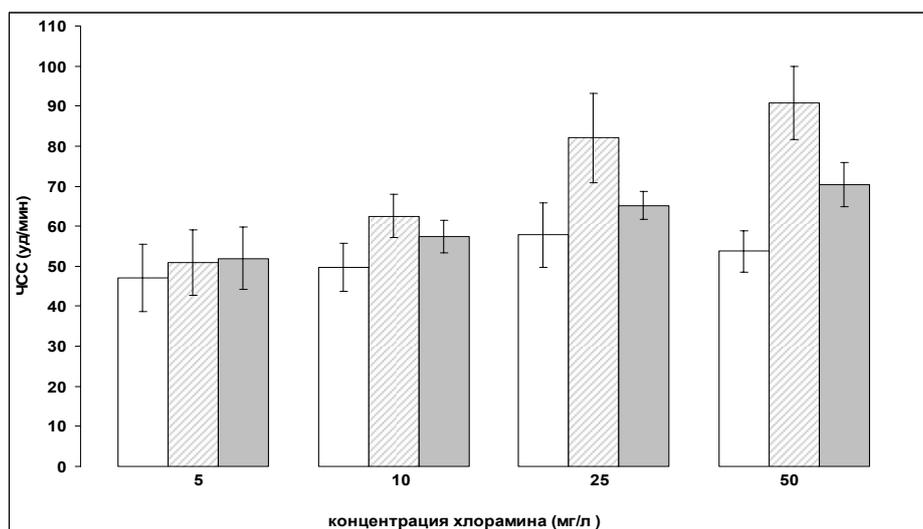
В настоящее время показано, что изменением ЧСС пресноводные раки реагируют на присутствие в воде таких антропогенных загрязнителей как тяжелые металлы, фенол и его производные, и другие [1,2]. Влияние хлорорганических соединений на кардиоактивность раков практически не изучалось, несмотря на то, что хлорорганические соединения, являясь сильнейшими токсикантами, могут попадать в водоемы со сточными водами. Хлор и его соединения широко используются в промышленности, в процессах водоподготовки на водопроводных станциях, при разного рода дезинфекциях, в том числе и при выращивании аквакультуры для борьбы с паразитами. Для изучения токсического воздействия на раков в настоящей работе был выбран хлорамин, потому что он применяется для дезинфекции, как в системах водоснабжения, так и в аквакультуре.

Основная цель настоящего исследования заключалась в оценке влияния хлорамина на функциональное состояние раков, которое определялось по динамике ЧСС в течение длительного времени до его воздействия в чистой воде, в воде, загрязненной хлорамином, и после воздействия в диапазоне концентраций, сравнимых с применяемыми в аквакультуре при дезинфекции.

Экспериментальная группа состояла из 12 половозрелых раков-самцов *Astacus leptodactylus* из озера Мостовое Алтайского края, не имевших признаков заболеваний, с весом  $33.6 \pm 2.0$  г и с длиной общей и карапакса, соответственно,  $109.6 \pm 6.8$  см и  $57.4 \pm 4.7$  мм. Об удовлетворительном функциональном состоянии животных, адаптированных к лабораторным условиям, до опыта судили по их подвижности, поеданию корма и хорошо выраженной реакции опистотонуса. Кардиоактивность раков изучалась путем использования волоконно-оптической системы неинвазивной регистрации и анализа ЧСС донных беспозвоночных в режиме реального времени [3, 4]. Перед началом эксперимента раков маркировали, на карапакс над областью сердца приклеивали миниатюрный держатель для крепления датчика, соединённого с фотоплетизмографом. Каждого рака помещали в отдельный непрозрачный аквариум размером  $400 \times 350 \times 195$  мм, заполненный до уровня 80-100 мм проточной дехлорированной водой. Температура воды в течение всего исследования поддерживалась на уровне 16-18°C, режим освещенности 12С/12Т, рН воды 7.2-7.4, уровень растворенного кислорода был не ниже 6 мг/л, общая жесткость 40-42 мг/л по  $\text{CaCO}_3$  и содержание нитратов не превышало 40 мг/л. Животных кормили 2 раза в неделю личинками хиронамид в количестве примерно равным 5% от веса тела рака. Длина волоконно-оптического кабеля позволяла животному свободно передвигаться по аквариуму и заходить в имеющееся в каждом индивидуальном аквариуме убежище. В этих условиях через 3-5 дней у животных устанавливался стабильный фоновый уровень ЧСС в покое  $38 \pm 7$  и регулярный суточный ритм кардиоактивности с периодом ночной активности не менее 8 часов. За день до воздействия в аквариумах устанавливали маленький аквариумный насос для циркуляции воды и подачи хлорамина, а также проводили стресс-тест, в котором рака в течение часа подвешивали в толще воды за закрепленный на его карапаксе опто-волоконный кабель так, что вода покрывала панцирь животного, но контакта с дном аквариума рак был лишен.

В экспериментах был использован хлорамин-Т, содержащий 25% активного хлора в концентрациях 5, 10, 25 и 50 мг/л. Перед добавлением в аквариумы хлорамин-Т растворяли в 0.3 л дистиллированной воды и добавляли 0.1 л в каждый аквариум через пластиковые емкости, подвешенные выше и соединенные с насосом. Такая подача токсиканта не травмировала раков, и расчетная концентрация, за счет наличия насоса-циркулятора, устанавливалась в аквариуме через 30 секунд. В течение 24 часов массовая доля активного хлора, которую определяли титрованием с йодистым калием и тиосульфатом натрия в присутствии крахмала в качестве индикатора, существенно не изменялась. За полчаса до подачи хлорамина-Т аналогичным способом подавалась дистиллированная вода для учета изменений ЧСС, вызванных производимыми манипуляциями. Во время экспозиции в растворах хлорамина-Т раков не кормили. Каждая из четырех серий экспериментов длилась 7 дней и выполнялась на 4 раках. После суточного воздействия воду меняли на чистую, и через 2 часа снова проводили стресс-тест в контрольной воде.

Сразу после подачи хлорамина-Т наблюдались изменения в кардиоактивности раков, что можно увидеть на рис.1, где представлены значения ЧСС до воздействия, сразу после подачи хлорамина-Т и в конце суточной экспозиции в каждой из четырех концентраций. Достоверных изменений ЧСС, которая в покое составляла  $40 \pm 5$  уд/мин, при подаче воды не наблюдалось, что свидетельствует о том, что повышение ЧСС в первые минуты воздействия инициирует исключительно хлорамин-Т. Из рисунка также видно, что при всех концентрациях, за исключением 5 мг/л, характер изменения ЧСС был практически одинаковым. На подачу токсиканта раки реагируют резким кратковременным (не более 30 минут) повышением ЧСС. В процессе экспозиции через некоторое время (примерно 1-2 часа, в зависимости от концентрации токсиканта) наблюдается повторное стойкое повышение ЧСС – вторая волна реакции на токсикант, которое сохраняется на следующий день после ночной активности и держится до конца экспозиции. Такая динамика кардиоактивности раков, вероятно, связана сначала с сенсорным восприятием, а далее - с токсическим воздействием хлорамина на организм и попыткой животного его компенсировать, поддержать гомеостаз. Такая компенсация всегда сопровождается дополнительными затратами энергии. Необходимо отметить, что по мере возрастания концентрации, изменения ЧСС становятся более выраженными. Так, при воздействии хлорамина-Т в концентрации 50 мг/л величина первичного подъема ЧСС раков составляет почти 100% и почти сразу переходит во вторую волну реакции, а ЧСС в конце экспозиции на 25% превышает фоновое значение до экспозиции.

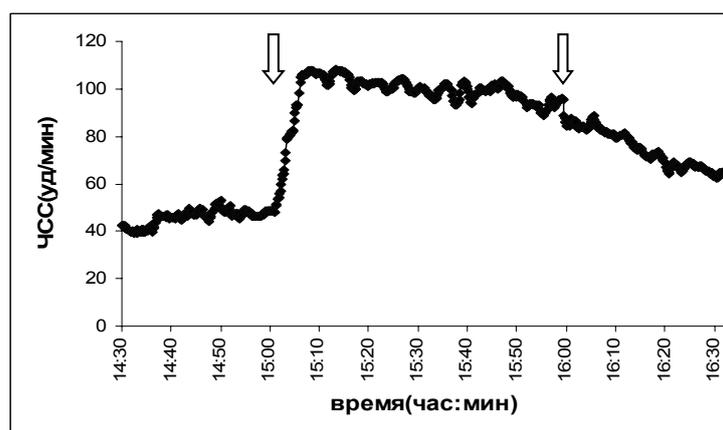


**Рис.1.** ЧСС раков (n=4 для каждой группы) до экспозиции (светлые столбики), сразу после подачи хлорамина (заштрихованные столбики), в конце экспозиции (серые столбики). Высота столбца соответствует среднему значению ЧСС за 30 минут, вертикальная черточка - стандартное отклонение.

Имеющиеся в настоящее время в литературе данные свидетельствуют о том, что в ответ на химические воздействия информация от периферических рецепторов, поступающая в центральные нервные структуры, опосредованно отражается в показателях деятельности кардиосистемы [5]. Это позволяет успешно использовать характеристики ЧСС раков в качестве биомаркеров в системах мониторинга качества воды в реальном времени [3, 4].

Были отмечены также некоторые различия в поведении животных. При содержании хлорамина в воде 5 и 10 мг/л раки оставались в дневное время в убежище. При 25 и 50 мг/л они проявляли отчетливую реакцию избегания: через пять минут от начала воздействия выходили из убежища, начинали перемещаться по аквариуму, но после 8-12 минут возвращались в убежище.

Применяемый, в настоящем исследовании стресс-тест позволяет оценить предельные возможности кардиосистемы раков при вынужденной активности, которые определяются энергетическим статусом животного. Типичная реакция здорового животного на стресс-тест - подвес на оптоволоконном кабеле, проявляется в повышении ЧСС (на 100% и более) и поддержании этого уровня во время подвеса в пределах 10% разброса значений ЧСС [6]. В наших экспериментах раки продемонстрировали такую реакцию (рис.2) только до химического воздействия.



**Рис.2.** ЧСС раков до воздействия хлорамина (n=4) в тесте на подвес. Стрелками отмечено начало и конец подвеса.

Ослабленные же животные не в состоянии поддерживать высокий уровень ЧСС при воздействии нагрузки и постепенно снижают его более чем на 30% в течение 1-часового тестирования. Раки, подверженные суточному воздействию хлорамина в концентрациях 25 мг/л и особенно 50 мг/л, показали повышение средней ЧСС во время теста всего на 52% и 40% соответственно (табл.1), что свидетельствует о значительном расходе энергии во время экспозиции и о явном ухудшении функционального состояния.

**Таблица 1.** Повышение ЧСС\* раков (n=4 для каждой группы) в стресс-тесте (подвес).

	контроль	5мг/л	10мг/л	25 мг/л	50мг/л
ЧСС* до подвеса, уд/мин	45±5	52±8	51±5	53±9	68±5
ЧСС во время подвеса, уд/мин	97±10	92±15	93±17	81±16	95±8
Увеличение ЧСС, %	115	78	82	52	40

\* - среднее значение ЧСС за час со стандартным отклонением.

Суточное воздействие хлорамина 5 или 10 мг/л не приводит к заметному ухудшению функционального состояния животных, однако дополнительные затраты энергии в течение химической экспозиции сказываются на показателях в стресс-тесте, а именно – ответная реакция организма заключается в повышении ЧСС уже не более чем на 80%, что свидетельствует о влиянии и этих доз хлорамина-Т на организм раков. Подобные результаты были получены Бамбером и Деpledжем [7] при оценке функционального состояния береговых крабов *Carcinus maenas*, взятых из разных мест. Крабы из рек с плохим качеством воды также показали снижение ЧСС при воздействии физических нагрузок.

Анализируя все полученные в настоящем исследовании результаты можно утверждать, что речные раки *Astacus leptodactylus* реагируют на появление в воде хлорамина-Т, и поэтому могут быть использованы в качестве биоиндикаторов в системах мониторинга качества воды, особенно если эта вода содержит хлорорганические соединения потенциально опасные для водной флоры и фауны. Применяемые в аквакультуре концентрации хлорамина-Т, в случаях длительного воздействия, являются токсичными для раков, как представителей пресноводных гидробионтов, ухудшают их функциональное состояние и поэтому при случайном попадании в водоемы со сточными водами чрезвычайно опасны для гидробионтов.

#### Список литературы

1. Styrihave B, Rasmussen AD, Depledge MH (1995) The influence of bulk and trace metals on the circadian rhythm of heart rates in freshwater crayfish, *Astacus astacus* // Mar Pollut Bull 31:87–92
2. Кузнецова Т.В., Сладкова С.В., Холодкевич С.В. Оценка функционального состояния раков в нормальной и токсической среде по их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2010, т. 46, № 3, с. 203-210.
3. Холодкевич С.В. Биоэлектронный мониторинг уровня токсичности природных и сточных вод в реальном времени // Экологическая химия. 2007. т.16 (4), с. 223-232.
4. Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L., Fedotov V.P., Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations // Journal of Environmental Bioindicators, 2008, V. 3, № 1, p. 23-34.
5. Федотов В.П. Системы хемовосприятия у десятиногих раков. //Ж. эвол. биохим. и физиол. 2009, т. 45, № 1, с. 3-24.
6. Сладкова С.В., Холодкевич С.В., Удалова Г.П. Биоэлектронная система непрерывного мониторинга качества очищенных сточных вод сбрасываемых в Невскую губу // Наш общий Финский залив. Сборник материалов I научной конференции СПбГУ, посвященной «Году Финского залива – 2014» СПб., 2012., с. 223-228
7. Bamber, S.D., and Depledge, M.H. Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments // Marine Biology, 1997, 129, p. 667-672.

УДК 577.15:579.68(574.63:579.22)(285.3)

#### **АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ВОДОЕМОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АНТРОПОПРЕССИИ**

Е.В. Старосила, Г.Н. Олейник

*Институт гидробиологии НАН Украины  
04210, Киев, пр. Героев Сталинграда, 12, Украина, jenua\_star@ukr.net*

Приведены результаты микробиологического мониторинга урбанизированных водных объектов г. Киева (Украина). Оценку активности фермента выполняли, учитывая суммарный, ферментативный и неферментативный распад перекиси водорода. Отмечено угнетение ферментативного пути разложения перекиси водорода в исследованных водных объектах.

Процесс трансформации естественных природных ландшафтов в искусственные под влиянием застройки, так называемая урбанизация природы, — распространенное действие. В условиях города антропопрессии подвергаются все компоненты природной среды, что приводит к нежелательным, а иногда необратимым, их изменениям. В последнее время значительно ухудшается экологическое состояние водных объектов, находящихся в городской черте. В мегаполисах с массивным промышленным сектором, транспортными коммуникациями, зонами многочисленных застроек, организованным сбросом сточных вод, значительными рекреационными нагрузками, водные объекты подвергаются интенсивному загрязнению, что приводит к изменению их экологического состояния. Водные объекты городов призваны выполнять функцию естественных дренажных сетей. Они собирают, концентрируют и отводят поверхностный и подземный стоки. Большинство русел рек, сохранившихся в условиях мегаполисов, в той или иной степени зарегулированы, сток частично перехвачен, изменена его динамика, долины многих притоков засыпаны, снижен водообмен. Водоёмы больших городов необходимы не только для отдыха, реабилитации и релаксации населения, но и для поддержания видового биоразнообразия экосистем. В столице Украины городе Киеве практически не осталось водных объектов в их природном состоянии. Активное техногенное и антропогенное влияние превратило водоёмы в специфические природно-антропогенные системы.

Показателями состояния гидросистемы, ее экологических зон и процессов формирования качества водной среды могут быть параметры жизнедеятельности микроорганизмов в воде, донных отложениях и на погруженных субстратах. Между бактериями, абиотическими и биотическими факторами среды существуют прямые и обратные связи и зависимости, которые отражаются на морфологии и функционировании микроорганизмов. Поступающие в водные объекты загрязнения, вследствие физико-химических и биологических процессов, в основном, осаждаются и сорбируются донными отложениями. Неотъемлемый компонент экосистемы донных отложений — микроорганизмы. Они, обладая широким спектром ферментов, способны утилизировать загрязнения различного характера. Более того, активность некоторых ферментов может служить индикатором при биотестировании наличия загрязняющих веществ в почве, воде и донных отложениях. Один из таких ферментов — каталаза, позволяющая оценить интенсивность функционирования и адаптационные возможности бактериоценоза, способствующие его выживанию в различных условиях среды обитания.

Целью проводимых исследований была оценка в донных отложениях каталазной активности, как показателя интенсивности микробиологических процессов.

Биологические процессы сопровождаются окислительными реакциями, вследствие которых в результате переноса двух электронов на молекулу кислорода, образуется перекись водорода, обладающая токсическим действием на клетки. Для нейтрализации  $H_2O_2$  у аэробных микроорганизмов существуют защитные механизмы, в основе которых лежит способность продуцирования ферментов, катализирующих реакции разрушения токсичных форм кислородсодержащих соединений. К таким ферментам относится каталаза. Разложение перекиси водорода одновременно один из источников пополнения при протекании энергетических процессов в бактериальной клетке запасов высокоэнергетических материалов. Каталаза не только внутриклеточный фермент, она также активно выделяется микроорганизмами в среду их обитания и, обладая высокой устойчивостью, может накапливаться и долгое время сохраняться в ней. Распад перекиси водорода в донных отложениях и воде может происходить как ферментативным, так и неферментативным путем — минеральными и органическими катализаторами, содержащимися в отложениях.

Посезонно исследовали активность каталазы в донных отложениях водных объектов в черте г. Киева. В 2011–2012 гг.: р. Десенка — выше жилого массива (станция 1); р. Днепр в районе Русановских садов — садово-дачный поселок с выходом участков к воде (ст. 2); р. Днепр в районе Русановской протоки — садово-дачные участки и городской жилой массив (ст. 3); в озерах Редькино — район министерских дач (ст. 4) и Иорданское — городской жилой массив и промышленный квартал (ст. 5); а также весной 2014 г.: в оз. Бабино — жилой массив (ст. 6). Пробы донных отложений имели различный характер. На ст. 1 они были представлены темными заиленными песками (глубина отбора проб 2,5 м), на ст. 2 и 3 — черными песчанистыми илами с остатками раковин моллюсков (глубина отбора проб 2,5–3 м), на ст. 4, 5 и 6 — светлыми песками с остатками раковин беспозвоночных (глубина отбора проб, соответственно 1 и 3 м, 4 м, 1 м). Перечисленные объекты характеризуются различными режимами проточности и подвергаются разнофакторному антропогенному воздействию.

Для анализов использовали верхний слой отобранных дночерпателем отложений (монолиты толщиной до 5 см), так как он характеризуется наибольшим микроразнообразием. Поверхностный слой наиболее активно контактирует с водой и в нем наиболее интенсивно

протекают процессы ассимиляции и трансформации различных соединений. Активность каталазы в них определяли титрометрическим методом, основанным на измерении количества неразложившейся  $H_2O_2$  при ее взаимодействии с отложениями. Расчет активности каталазы выполняли по формуле, учитывающей суммарное, ферментативное и неферментативное разложение перекиси водорода, и выражали в  $мг H_2O_2/час \cdot г$  [1].

Весной в донных отложениях исследуемых водных объектов величины суммарного разложения перекиси водорода колебались от 0.010 до 0.615  $мг H_2O_2/час \cdot г$ . При участии каталазы разлагалось 0.005–0.232  $мг H_2O_2/час \cdot г$ , а неферментативным путем — 0.003–0,384  $мг H_2O_2/час \cdot г$  перекиси водорода.

В заиленных черных песках р. Десенка (ст. 1) в среднем 84.9% общего распада  $H_2O_2$  разлагалось химическим путем. В донных отложениях в районе Русановских садов (ст. 2) неферментативное разложение перекиси водорода в среднем в 1.7 раза превалировало над ферментативным. В песках оз. Редькино (ст. 4) на глубине 1 м ферментативный и неферментативный распад  $H_2O_2$  протекали почти одинаково, а на глубине 3-х м — 83.3%  $H_2O_2$  разлагалось химическим путем. В светлых песках оз. Бабино (ст. 6) ферментативное разложение перекиси водорода превалировало над неферментативным и составляло 65.3%.

Таким образом, в весенний период максимальные значения суммарного разложения перекиси водорода были зафиксированы в донных отложениях в районе садово-дачных участков, расположенных по берегу реки (ст. 2). Неферментативное разложение  $H_2O_2$  было максимальным в донных отложениях р. Десенка (ст. 1) и оз. Редькино на глубинном участке (ст. 4).

Летом в отложениях изучаемых водоемов суммарное разложение перекиси водорода варьировало в пределах от 0.070 до 0.838  $мг H_2O_2/час \cdot г$ , т. е. по сравнению с показателями, зарегистрированными весной возросло в среднем в 2 раза. Ферментативным путем разлагалось 0.016–0.454  $мг H_2O_2/час \cdot г$ , неферментативный распад составлял 0.035–0.816  $мг H_2O_2/час \cdot г$ .

Донные отложения р. Десенка (ст. 1) характеризовались наибольшими суммарными величинами разложения  $H_2O_2$ , чем в другие сезоны. Отмечено угнетение ферментативного процесса по сравнению с неферментативным в среднем в 1.6 раза. В донных отложениях в районе Русановских садов (ст. 2) практически 100% перекиси водорода разлагалась неферментативным путем. В серо-черных илах в районе Русановской протоки (ст. 3) в результате действия фермента разлагалась около 30% от общего распада перекиси водорода. В донных отложениях оз. Редькино (ст. 4) и песке с отчетливым запахом дизельного топлива оз. Иорданское (ст. 5) ферментативное и химическое разложения перекиси водорода было равным.

Итак, в летний период суммарные показатели разложения перекиси водорода, как и в весенний, были максимальными в илах в районе Русановских садов (ст. 2). Неферментативный распад  $H_2O_2$  в донных отложениях всех изучаемых водоемов превалировал или был равен ферментативному.

Осенью в донных отложениях урбанизированных водных объектов суммарное разложение перекиси водорода колебалось от 0.030 до 0.038  $мг H_2O_2/час \cdot г$ . Неферментативный процесс разложения перекиси водорода (0.027–0.038  $мг H_2O_2/час \cdot г$ ) превалировал над ферментативным.

В темных песках р. Десенка (ст. 1) и в районе Русановских садов (ст. 2) суммарное разложение перекиси водорода было на порядок ниже, чем в другие сезоны и полностью протекало химическим путем (100%). В песках оз. Редькино (ст. 4) ферментативный распад перекиси водорода был в 8 раз меньше, чем неферментативный. Таким образом, осенью химическое разложение перекиси водорода во всех изучаемых водных объектах было выше, чем ферментативное.

Бактериальное население водоемов существенно влияет на процессы круговорота органического вещества и самоочищения в водных экосистемах. В донных отложениях накапливаются органические соединения природного и антропогенного происхождения, которые в мелководных водоемах могут быть источником вторичного самозагрязнения. Содержащиеся в илах вещества подвергаются деструкции бентосным сообществом, при этом бактериобентосу принадлежит ведущая роль. Активность каталазы в донных отложениях водоемов показатель антропогенного загрязнения и токсикологической ситуации, а также индикатор интенсивности процесса деструкции органического вещества. Тесная положительная коррелятивная связь между активностью каталазы и деструкцией органического вещества в донных отложениях, опосредовано свидетельствует об интенсивности процессов его разложения [2].

В результате мониторинга было установлено, что суммарный распад перекиси водорода в донных отложениях исследуемых водоемов находился в пределах 0.010–0.838  $мг H_2O_2/час \cdot г$  и был характерным для водоемов с неблагоприятной экологической ситуацией [2, 3]. Анализ полученных результатов свидетельствует, что в отложениях всех изучаемых водных объектов в летне-осенний сезоны была существенно снижена активность каталазы. Известно, что снижение

ферментативной активности в донных отложениях, наблюдается в местах антропогенного загрязнения гидросистем [2]. За период наблюдений урбанизированных водоемов в мегаполисе доля химического разложения  $H_2O_2$  колебалась в среднем от 43 до 100%. Полученные данные могут быть важным параметром, отражающим функциональное состояние бактериобентоса, а также четким индикатором слабой интенсивности процесса деструкции органического вещества в донных отложениях исследуемых водных объектов.

Известно, что высокий уровень активности каталазы необходим для обезвреживания перекиси водорода до воды и молекулярного (неактивного) кислорода. Также, разрушения перекиси водорода в донных отложениях водоемов протекает вследствие химических (неферментативных) реакций при участии веществ восстановленной природы биогенного и антропогенного происхождения [2–4]. Низкий окислительно-восстановительный потенциал в донных отложениях в водных объектах регистрируют не только на глубине, а и в поверхностном слое даже при хорошем кислородном режиме в воде. При антропопрессии в донных отложениях возникают ниши, в которых могут протекать процессы метаногенеза, сульфатредукции, денитрификации, обуславливающие снижение окислительно-восстановительного потенциала [5]. Высокий процент химического распада перекиси водорода в водоемах, может быть обусловлен значительным содержанием в донных отложениях гумусовых веществ, которые, как известно, обладают восстановительными свойствами. Некоторые авторы отмечают ингибирование активности каталазы тяжелыми металлами, которые депонируются в донных отложениях [3].

Преобладание химического процесса разложения перекиси водорода над ферментативным в донных отложениях исследуемых урбанизированных водоемах мегаполиса может свидетельствовать о сдвиге в них редокс-потенциала в сторону восстановленных условий, а также присутствии недоокисленных соединений, тяжелых металлов, пестицидов, фенолов, катализирующих химический процесс распада перекиси водорода. С одной стороны, это может быть сигналом плохой экологической ситуации в водных объектах столицы. С другой, химическое расщепление перекиси водорода в этих водных объектах может играть положительную роль в процессах ее улучшения и жизнедеятельности гидробионтов.

#### Список литературы

1. Петерсон Н.В., Курьяк Е.К., Франчук Е.К. Определение активности каталазы почв // Микробиол. журн. – 1984. – Т. 46, № 2. – С. 85–87.
2. Oleynik G.N., Starosila Ye.V. Structure and functioning of bacterioplankton and bacteriobenthos in the water bodies with high content of inorganic nitrogen // Hydrobiological Journal. – 2010. – Vol. 46, N 6. – P. 26–36.
3. Олейник Г.Н., Белоконь В.Н., Кабакова Т.Н. Бактериобентос и содержание тяжелых металлов в донных отложениях Сасыкского водохранилища // Гидробиол. журн. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 21–31.
4. Максимова Э.А., Максимов В.Н., Колесническая Г.Н., Максимов В.В., Щетинина Е.В. Микробиологическая индикация и оценка состояния донных отложений Южного Байкала // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 399–404.
5. Дзюбан А.Н. Оценка экологического состояния водохранилищ по критериям бактериобентоса // Гидробиол. журн. – 2004. – Т. 40, № 4. – С. 73–79.

УДК 546.49:582.232

### ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РТУТИ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРОСЛИ

А.П. Стецюк, О.А. Рылькова, В.С. Муханов, С.Б. Гулин

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского  
г. Севастополь, Россия, alex-ra-777@mail.ru*

Тяжелые металлы относятся к особо опасным загрязнителям водной среды. Они поступают в водоемы с промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми стоками. Опасность воздействия этих поллютантов связана с тем, что, циркулируя длительное время в гидросфере, они аккумулируются в гидробионтах, преимущественно в начальных звеньях трофических цепей. Ответные реакции одноклеточных водорослей на действие тяжелых металлов являются достаточно быстрыми, вследствие чего структурные характеристики фитопланктона могут служить репрезентативными показателями состояния водных экосистем [2, 3].

Цель работы – экспериментальное исследование биологического воздействия ртути на одноклеточные водоросли с помощью проточной цитометрии.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1 – изучение действия ртути на темпы деления и размерные характеристики пресноводных, морских и галофильных одноклеточных водорослей;

2 – определение и анализ зависимости «доза-эффект» в отношении токсического воздействия на структурные, биопродукционные и физиологические характеристики фитопланктона.

В работе использовали монокультуры водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer., *Dunaliella salina* Teod., *Platymonas viridis* Rouch, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Анализ проб проводили с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения СХР (рис. 1).

Общую численность клеток микроводорослей определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и автофлуоресценции в красной области спектра (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Концентрацию клеток микроводорослей рассчитывали по скорости потока пробы 60 мкл мин<sup>-1</sup>, времени счёта 360 сек. и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (минимум 3000 кл.). Контроль качества измерений проводили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check™ (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе. Калибровку цитометрических измерений размеров клеток по каналу FS проводили с помощью разноразмерных (0.2 – 10 мкм) флуоресцентных микросфер (Beckman Coulter, Molecular Probes, США). Размеры клеток (L, мкм) рассчитывали на основе данных канала FS как величину «диаметра эквивалентной сферы» (ДЭС), объём которой равен объёму клетки независимо от её морфологии. Обработку цитометрических данных проводили с помощью программного обеспечения Flowing Software v. 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland, [www.floowingsoftware.com](http://www.floowingsoftware.com)).

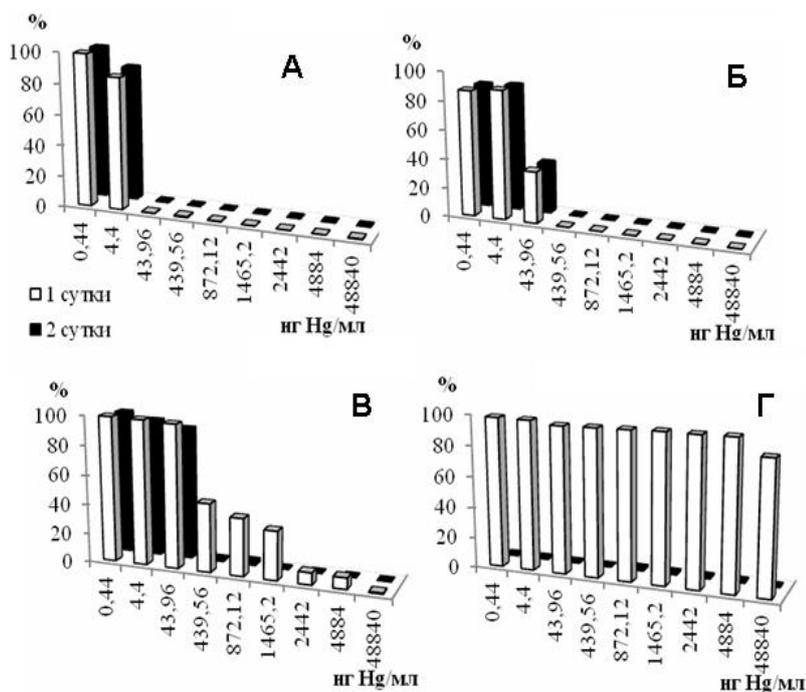
При проведении эксперимента из исходных культур отбирали по 10 мл аликвот, в которые вносили насыщенный раствор сулемы (HgCl<sub>2</sub>) разной концентрации. Цитометрические измерения (численность, размерный спектр и пигментный состав клеток) проводили через 30 мин. после начала экспозиции, а затем один раз в сутки.



**Рис. 1.** Проточный цитометр Cytomics FS 500, Beckman Coulter, США

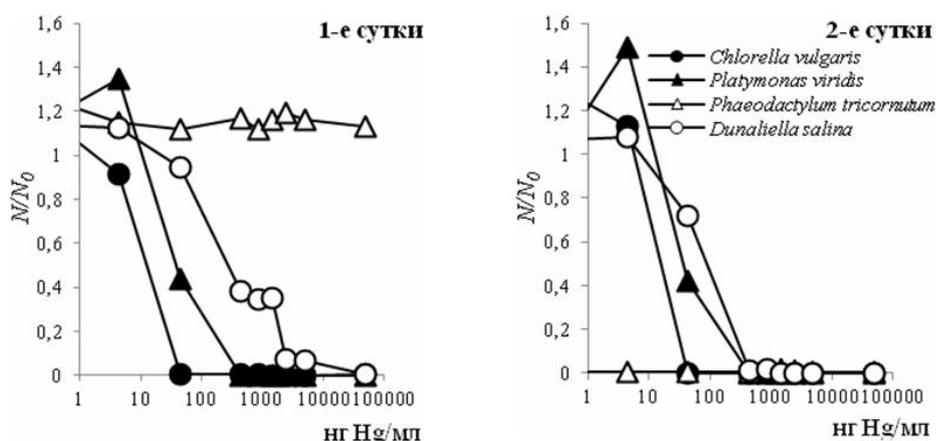
Часть проб была параллельно исследована с помощью инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS 100-F увеличение 400x). По микрофотографиям с помощью программного обеспечения ImageJ были проведены линейные измерения клеток и рассчитан их объём.

Нами обнаружено, что доли живых клеток после воздействия токсиканта в культурах водорослей отличались. Для *Chlorella vulgaris* Beijer. и *Platymonas viridis* Rouch этот показатель резко снизился, начиная с концентрации 44.0 нг Hg·мл<sup>-1</sup>. Для *Dunaliella salina* Teod., подобная тенденция наблюдалась при воздействии концентрации на порядок выше (439.6 нг Hg·мл<sup>-1</sup>) Несколько отличалась картина, полученная для *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin – в течение первых суток во всех концентрациях количество живых клеток практически не изменилось, а сутки спустя - все клетки были нежизнеспособны (рис. 2).



**Рис. 2.** Доля живых клеток (%) в культурах водорослей при воздействии различной концентрации ртути. А - *Chlorella vulgaris* Beijer., Б - *Platymonas viridis* Rouch, В - *Dunaliella salina* Teod., Г - *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

В течение 1-х суток при минимальных концентрациях ртути (0,44 и 4,4 нг Нг·мл<sup>-1</sup>), численность водорослей либо не изменялась (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Dunaliella salina* Teod.), либо несколько увеличивалась (*Platymonas viridis* Rouch), либо снижалась (*Chlorella vulgaris* Beijer.). При концентрации ртути 44,0 нг Нг·мл<sup>-1</sup> и более нами зафиксировано снижение плотности популяции водорослей для всех культур кроме *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Необходимо отметить, что численность водорослей в последней культуре на 2-е сутки была практически равна нулю при любых концентрациях ртути. Для некоторых водорослей процесс адаптации к воздействию токсиканта выражался в повышении темпов деления клеток при небольших его концентрациях, а далее происходило угнетение темпов роста водорослей (рис. 3).

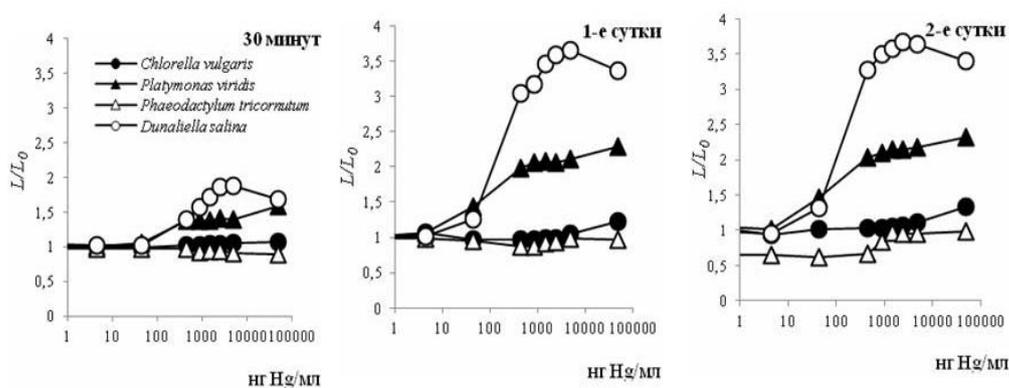


**Рис. 3.** Зависимость численности ( $N$ ) клеток в культурах водорослей от концентрации ртути в питательной среде.  $N_0$  – контроль

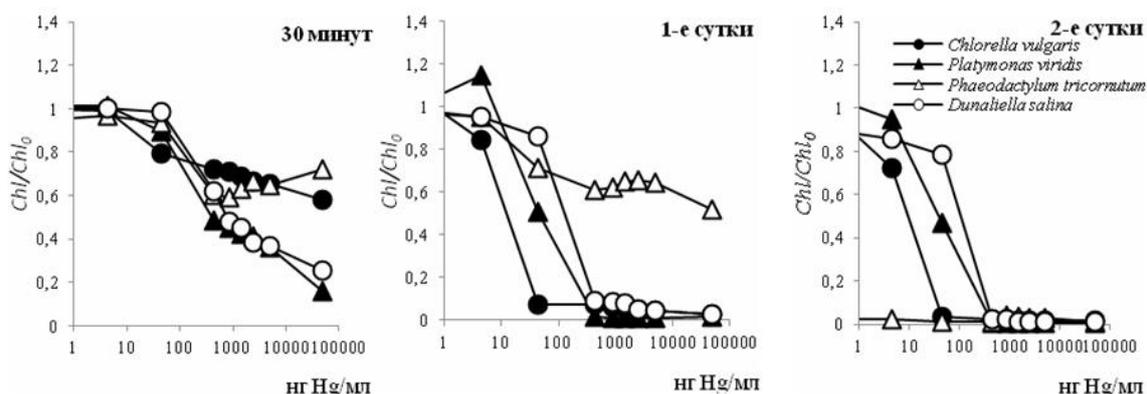
Наиболее существенные изменения касались таких показателей как размеры клеток и интенсивность флуоресценции хлорофилла. Эти изменения наблюдались нами уже через 30 мин. и усиливались в течение 1-2 суток. Так размеры клеток в культурах крупноразмерных водорослей (*Dunaliella salina* Teod., и *Platymonas viridis* Rouch), в результате стресса, при концентрации ртути

439.6 нг Hg·мл<sup>-1</sup>, увеличивались в 2-4 раза. Для мелких водорослей (*Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin. и *Chlorella vulgaris* Beijer.) повышение было не столь значительно или вообще не наблюдалось. Согласно литературным данным [3], клетки *Phaeodactylum tricornerutum* при воздействии тяжелых металлов часто лишались концевых выростов и в популяции начинали преобладать мелкие клетки, что было обнаружено и в наших экспериментах.

Одновременно с увеличением размеров клеток происходила перестройка в их пигментном составе при увеличении концентрации ртути примерно с 40 нг Hg·мл<sup>-1</sup> – интенсивность флуоресценции хлорофилла снижалась, более чем на порядок, вплоть до полного его разрушения. Наименьшие изменения через сутки произошли в культуре *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin., однако на вторые сутки эксперимента интенсивность флуоресценции пигмента для всех клеток в этой культуре практически равнялась нулю. Интересно отметить, что концентрации металлов, лишь незначительно снижающие численность водорослей, вызывали заметное падение содержания пигментов. Известно, что токсическое действие тяжелых металлов проявлялось в снижении уровня фотосинтетических пигментов в клетках водорослей, особенно хлорофилла «а» и увеличении его неактивной формы - феофитина [3].



**Рис. 4.** Зависимость размеров ( $L$ ) клеток в культурах водорослей от концентрации ртути в питательной среде.  $L_0$  – контроль



**Рис. 5.** Зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла ( $Chl$ ) в культурах водорослей от концентрации ртути в питательной среде.  $Chl_0$  – контроль

Возможность одновременного использования проточной цитометрии и микроскопии позволило нам более детально исследовать изменения, происходящие в популяции клеток в культуре. Так как наиболее устойчивой к воздействию ртути оказалась *Dunaliella salina* Teod., более детальные исследования были проведены на культуре этой водоросли.

Нами показано резкое снижение (почти на порядок) флуоресценции хлорофилла в расчете на клетку, начиная с концентрации ртути 439.56 нг Hg·мл<sup>-1</sup>. На цитограммах, полученных в пробах с соответствующей концентрацией ртути, по оси ординат четко прослеживается расслоение

кластера. Необходимо отметить, что такой низкий уровень флуоресценции обычно типичен для мертвых клеток. По оси абсцисс, в пробах с теми же концентрациями ртути, мы наблюдали увеличение размеров клеток в среднем в 2.5 раза (рис. 6).

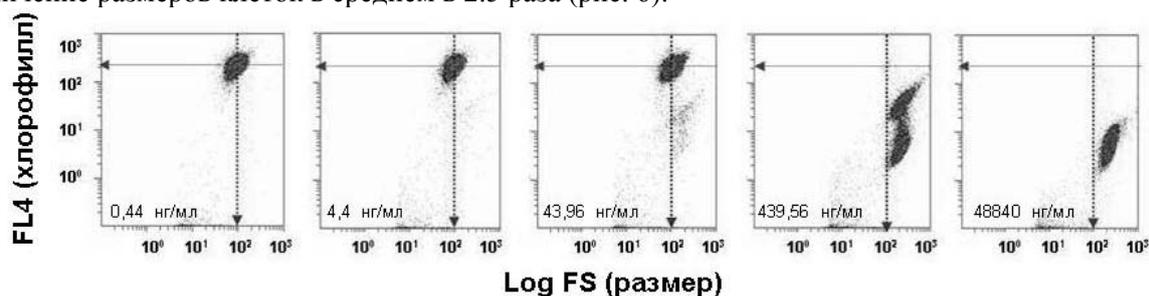


Рис. 6. Результаты цитометрии при воздействии ртути на культуру *Dunaliella salina* Teod.

Для детализации морфологических изменений клеток водорослей эти же пробы были исследованы микроскопически. При концентрации токсиканта 439.56 нг Hg·мл<sup>-1</sup> в пробах появлялись максимально крупные клетки, а начиная с концентрации 48840 нг Hg·мл<sup>-1</sup>, практически все водоросли были мертвы, имели разрушенную клеточную стенку или сильно уплотненную оболочку, хотя размеры их были несколько меньше (рис. 7).

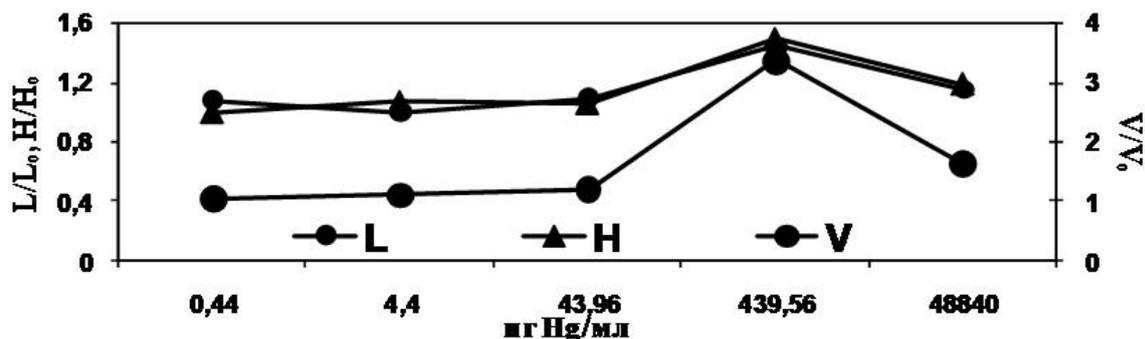


Рис. 7. Изменение линейных размеров (D – длина, Н – ширина) и объема (V) клеток *Dunaliella salina* после суточной экспозиции в зависимости от концентрации ртути в среде.

Известно, что реакции одноклеточных водорослей на добавки тяжелых металлов могут быть связаны с нарушением проницаемости клеточной оболочки, о чем свидетельствует выход из клеток калия [3]. Это приводит к изменению внутриклеточного ионного баланса и нередко сопровождается морфологическими аномалиями, в частности – появлением в культуре крупных округлых или удлинённых клеток с толстой клеточной оболочкой, что приводит к существенному возрастанию размерной гетерогенности популяции в целом [1, 3]. Вероятно, при этом происходит нарушение митотического цикла и ионного баланса клеток, усиливается внутриклеточное осмотическое давление, что и приводит к увеличению относительного размера клеток. При концентрации более 400 нг Hg·мл<sup>-1</sup> наступает «интерфазная гибель» клеток, и постепенно происходит их полное разрушение.

Полученные данные могут быть использованы при разработке критериев токсикологического нормирования антропогенной нагрузки на морские экосистемы.

#### Список литературы

1. Гулин С.Б. Действие ионизирующего излучения и ртути на одноклеточные водоросли: радиационно-экотоксикологическое исследование // Морск. Экол. журн. - 2013. - Т. 7. - № 3, - С.31-38.
2. Филенко О.Ф. Водная токсикология. М.: Изд-во МГУ, 1988. 154 с.
3. Капков В. И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем: автореф. дисс. докт. биол. наук. – М., 2003. – 42.

**СОЧЕТАННОЕ ВЛИЯНИЕ ГИПОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ОСВЕЩЕННОСТИ  
НА МИТОЗ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS L.*)**

М. Г. Таликина, В. В. Крылов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, tmg888@mail.ru*

Изменение светового режима и статуса магнитного поля в течение суток влияет на ряд показателей митотического деления бластомеров плотвы. Показано, что отклонение от естественных условий развития зародышей, в частности, в режиме полного отсутствия света и в гипомангнитной среде, приводит к торможению завершающих стадий делений дробления и повышению уровня хромосомных aberrаций.

Свет и магнитное поле Земли - естественные факторы окружающей среды. Суточные колебания этих геофизических параметров сформировали эволюционно сложившийся ритмический характер функциональной деятельности биологических систем на разных уровнях их структурной организации [1].

Вопрос о взаимовлиянии этих двух факторов на митотический процесс, особенно на ранних этапах индивидуального развития, имеет большое значение в исследованиях внешних воздействий на клеточном уровне, так как при этом необходимо учитывать специфику циркадного ритма биологического тест-объекта. Митоз – генетически детерминированный процесс с выраженной суточной динамикой, его главный итог состоит в равном распределении наследственного материала и субклеточных структур в две образующиеся дочерние клетки. Отклонение от нормы высокоспециализированных событий этого процесса чревато несбалансированными хромосомными наборами, дестабилизацией генома и онтогенетическими нарушениями [2].

Цель настоящей работы – рекогносцировочно оценить реакцию зародышей плотвы в период непрямого деления бластомеров на разные режимы освещенности и статуса магнитного поля. Воздействия сочли целесообразным начать с момента оплодотворения, когда ещё не заложены структуры будущего организма и тем самым с большей вероятностью определить эффект их прямого влияния.

Схема эксперимента включала экспонирование в течение 24 ч. кристаллизаторов с развивающейся икрой от оплодотворения до стадии поздней бластулы в условиях естественного и “нулевого” магнитного поля и нескольких режимов освещения: 1) естественная смена дня и ночи (16 ч. свет + 8 ч. ночь), 2) ночь (24 ч) и 3) день (24 ч.). По техническим причинам экспонирование зародышей последнего из перечисленных вариантов в гипомангнитных условиях оказалось невозможным.

Цитогенетический анализ проводили на тотальных давленных препаратах, окрашенных ацетоорсеином, учитывали общее число просматриваемых клеток, норму и видимые морфологические отклонения по стадиям митоза - метафазы, анафазы и телофазы. Критериями нарушений были хромосомные и хроматидные мосты и полумосты, отставание хромосом при расхождении к полюсам и наличие их фрагментов в цитоплазме [3]. Для анализа использовали в каждом из вариантов не менее 20 зародышей. Показателями митотической активности служило общее число делящихся клеток в %. Суммарную долю aberrантных анафаз и телофаз выражали в % от общего числа митозов в каждом из опытных вариантов.

Для создания гипомангнитных условий на обмотку каждой из трех пар колец Гельмгольца подавали ток такой силы, чтобы генерируемое магнитное поле (МП) было равным по силе и противоположно направленным вектору геомагнитного поля (ГМП) по каждой компоненте. При этом в центре системы колец Гельмгольца за счет суперпозиции генерируемое постоянное МП в значительной степени компенсирует ГМП. Непосредственно перед экспериментом и после него гипомангнитные условия в центре системы колец Гельмгольца контролировались с помощью магнитометра НВ0302А (НПО ЭНТ).

Из данных, приведенных в таблице, отметим ряд позиций, свидетельствующих о достаточно высоком и избирательном уровне ответной реакции развивающейся клеточной ассоциации зародышей плотвы на выбранные режимы внешних воздействий. Происходит достоверное увеличение пролиферативной активности бластомеров в двух опытных вариантах с гипомангнитным полем, но с разными условиями освещения, в частности, естественного (день, 16 ч. + ночь, 8 ч.) и полного его отсутствия (ночь, 24 ч.). Митотический индекс в первом случае составил 67.2, во втором – 61.3 промилле, против 50.4 промилле в контроле.

**Таблица.** Показатели митоза зародышевых клеток плотвы *Rutilus rutilus* (L.) в после экспозиции в разных условиях освещения и магнитного поля

Показатели	Режим освещения в течение суток				
	день + ночь (16 ч.+ 8 ч.), естественное магнитное поле	день + ночь (16 ч. + 8 ч.), гипомагнитное поле	ночь (24 ч.), естественное магнитное поле	ночь (24 ч.), гипомагнитное поле	день (24 ч.), естественное магнитное поле
Все бластомеры	5 195	4 365	4 236	4 635	4 217
Все митозы	252	292	157	280	188
Нормальные митозы, ‰	46.8	60.6	36.7	53.1	40.6
Аберрантные митозы, ‰	1.6	6.6	2.8	8.2	2.7
Митотический индекс, ‰	48.4 ± 3.3	67.2 ± 1.6*	39.5 ± 4.5	61.3 ± 3.3*	43.3 ± 3.5
Митотический индекс, CV	13.83	4.92	23.12	10.71	16.29
В % от всех митозов:					
все метафазы	50.38 ± 3.29	58.97 ± 5.18	56.30 ± 3.02	53.06 ± 2.32	52.3 ± 6.53
все анафазы и телофазы	49.62 ± 3.29	41.03 ± 5.18**	43.69 ± 3.02**	46.93 ± 2.32	47.69 ± 6.53
нормальные митозы	96.8	90.1	92.4	86.4	90.5
аберрантные митозы	3.2	9.9	7.6	13.6	9.5

В этих же вариантах отмечено существенное снижение коэффициента корреляции митотического индекса, указывающее на снижение вариабельности этого показателя и примерно равную восприимчивость зародышей тестируемых факторов.

Освещенность и статус магнитного поля могут выступать как самостоятельные факторы влияния на митоз бластомеров. Примером этого служит статистически значимое и примерно равное увеличение соотношения числа начальных и снижение числа завершающих стадий митотического цикла в сочетанном варианте с естественным освещением в “нулевом” магнитном поле и в варианте с полным отсутствием освещения в режиме естественного геомагнитного поля.

Во всех вариантах сочетанных режимов освещения и магнитных условий, в сравнении с естественными условиями развития (день, 16 ч. + ночь, 8 ч.), возрастает процент клеток с абберантными митозами. Наиболее выражен тератогенный эффект в ходе митотического деления зародышевых клеток в варианте развития зародышей в полной темноте в условиях естественного гипомагнитного поля (13.6 % против 3.2% в контроле).

Таким образом, увеличение общей митотической активности бластомеров в двух опытных вариантах демонстрирует чувствительность определенных клеточных (или биохимических структур) к гипомагнитной среде и отсутствию света. Конкрегизация их в рамках настоящей работы не была нашей задачей, мы можем лишь констатировать сам факт инициации непрямого деления клеток. Аналогичный эффект, но не сопровождающийся блокадой заключительных фаз митоза, отмечен нами в экспериментах по воздействию на зародыши плотвы типичной магнитной бури [4]. В связи с обсуждаемым феноменом, кажется уместным мнение о том, что при воздействии внешнего сигнала на метаболизм клетки, вне зависимости от его природы, первая реакция связана с усилением белково-синтетической функции клеток и коррекцией ионного гомеостаза клетки с особой его ролью в обеспечении заряженных двухвалентных ионов. В частности, отмечают значительное влияние полифункциональных ионов  $Ca^{++}$ , участвующих в работе многих ферментных систем, в реализации процессов оплодотворения, дробления и в сохранении структуры и функции клеточных мембран [5].

Переход клетки к митотическому делению и его успешная реализация осуществляется только по завершении синтеза ДНК и обеспечивается так называемым «фактором, стимулирующим митоз», который синтезируется в цитоплазме в конце интерфазы [2]. В нашем случае во всех опытных вариантах, наряду с тератогенным эффектом, отмечена одна общая тенденция, а именно, переход значительного числа клеток-рекрутов в стадию метафазы и явное торможение митоза на заключительных его стадиях. Вполне возможно, что отклонение от нормы развития этого процесса, вызвавшее конкретные изменения митотического деления бластомеров плотвы, обусловлено нарушением эволюционно сложившегося оптимального баланса двух внешних факторов – освещения и магнитного поля.

#### Список литературы

1. Ашоф Ю. Биологические ритмы. М.: Мир, 1984. 262 с.
2. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М.: Академкнига, 2004. 495 с.
3. Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Наука, 1992. 272 с.
4. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Крылов В.В. Реакция животных и растительных клеток на действие типичной магнитной бури // Геофизические процессы и биосфера. 2013. Т. 12. № 1. С. 14-21.
5. Бродский В.Я. Клеточная теория. Развитие в исследованиях межклеточных взаимодействий // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 5. С. 323-333.

УДК: 574.64: 546.49:582.263.1(262.5)

#### **ЭКВИДОЗИМЕТРИЧЕСКИЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РТУТИ НА МАКРОФИТЫ НА ПРИМЕРЕ ЧЕРНОМОРСКОЙ ВОДОРОСЛИ *Ulva rigida* C. Agardh**

Н.Н. Терещенко, В.Н. Поповичев, А.П. Стецюк, С.Б. Гулин

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского  
299011, просп. Нахимова, 2, Севастополь, Россия, natalter@ukr.net*

В работе приведены результаты экспериментальных исследований токсического действия ртути в широком диапазоне её концентрации в морской воде на процессы жизнедеятельности (аккумуляция  $^{14}C$  и прирост биомассы) и выживаемости черноморской многоклеточной зеленой

водоросли *Ulva rigida* C. Agardh. Для эквидозиметрической характеристики этого воздействия проведена оценка экологического Грей-эквивалента ртути для водоросли.

*Ключевые слова:* ртуть, *Ulva rigida*, Чёрное море, эквидозиметрическая оценка, Грей-эквивалент

Современная экологическая ситуация характеризуется наличием в водных экосистемах многих, негативно влияющих на биоту, антропогенных факторов, а в ряде случаев, усилением воздействия природных факторов до таких уровней интенсивности, которые вызывают повреждающие эффекты или даже гибель гидробионтов. Эта проблема стоит остро и в отношении Чёрного моря, как внутреннего водоёма, широкомасштабно подверженного техногенному воздействию [1].

Для решения многих вопросов рационального природопользования и сохранения видового разнообразия важно развитие нового направления в экологии, сопряжённого с экотоксикологией и хеморадиоэкологией, – радиохемозкологической эквидозиметрии [2, 3], которая посвящена сравнительной оценке влияния разных загрязнителей, как химических, так и радиоактивных, и определению их эквивалентных доз воздействия на биоту. Эквидозиметрия призвана служить основой оценки экологической опасности, а также выбора экологически приемлемых нагрузок на экосистемы, формируемых различными факторами. Это особенно важно в эпоху технического прогресса, когда количество и интенсивность факторов возрастает и необходима единая система оценки воздействия на общем дозиметрическом основании, которым может служить всеобщая единица эквидозиметрической оценки влияния факторов. И хотя это весьма непростая задача, поскольку природа факторов и механизмы их воздействия, а также реакция живых организмов и их сообществ многообразны и сложны, уже проведён ряд исследований, которые направлены на её решение [2-6]. Обосновано использование ионизирующего излучения в качестве стандарта сравнительной оценки радиохемозкологического воздействия [2-4] и предложена общая единица эквидозиметрической оценки поражающего действия любого фактора – экологический Грей-эквивалент, выражаемый для химических токсикантов в Грей/микромоль/литр (Гр/мкмоль/л) [2-4, 7].

Одним из наиболее опасных загрязнителей морских экосистем является ртуть, которая относится к тяжелым металлам. Она обладает высокой токсичностью и способностью накапливаться в морских организмах и донных отложениях [8]. Ртуть относится к токсикантам природного происхождения, но поток, которых в природные экосистемы усиливается антропогенной деятельностью. Основными источниками загрязнения прибрежных акваторий Чёрного моря являются промышленные стоки, отходы водного транспорта, агрохимические технологии в сельском хозяйстве, сжигание каменного угля [1, 8-12].

Для характеристики уровня токсического действия тяжелых металлов используют молярную токсичность и по ней выстраивают ряд токсичности этих металлов для данных организмов. Ртуть занимает первое место в ряду молярной токсичности тяжелых металлов для водорослей, как и для многих других организмов:  $Hg > Cu > Cd > Fe > Cr > Zn > Co > Mn$  [9].

Повышенные концентрации ртути в речных и морских водах отрицательно воздействуют на состояние водных экосистем. Концентрация хлорида ртути 0.002 – 0.250 мг/л вызывает у растений задержку роста [12, 13]. При концентрации ртути 0.1 мкг/л подавляется жизнедеятельность одноклеточных морских водорослей [1, 13]. Предельно допустимая концентрация (ПДК) ртути для морской воды принята 100 нг Hg/л [8, 10].

Настоящая работа посвящена исследованию токсического влияния ртути на представителя массовых черноморских зеленых многоклеточных водорослей – *Ulva rigida* C. Agardh (ульва) и проведению количественной эквидозиметрической оценки этого влияния.

Объект исследования – талломная водоросль *U. rigida* – массовый черноморский вид, рекомендованный для культивирования, обладающий разнообразным промышленным ресурсным потенциалом [14]. Талломы ульвы отбирали в прибрежной зоне севастопольских бухт на глубине 0.1 - 2 м, в период с мая по июль 2013 г.

Влияние ртути на морские организмы оценивают в токсикологических исследованиях по биологическим показателям их жизнедеятельности и выживаемости [10, 11]. В качестве исследуемых показателей жизнедеятельности водорослей нами были выбраны количественные параметры: коэффициент накопления ( $K_n$ ) ульвой радиоактивного углерода ( $^{14}C$ ), характеризующий его аккумуляцию водорослью, как показатель её метаболических и фотосинтетических процессов, а также – прирост биомассы и выживаемость водоросли. Кроме того, путём микрофотосъёмки с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100-F, проводили визуальную качественную оценку состояния пигментной системы данной водоросли.

В морской воде, отобранной для эксперимента, определяли исходную концентрацию ртути с использованием метода непламенной атомно-абсорбционной спектрофотометрии (метод холодного пара) [15]. Измерения проводили на анализаторе ртути «Юлия-2» с чувствительностью

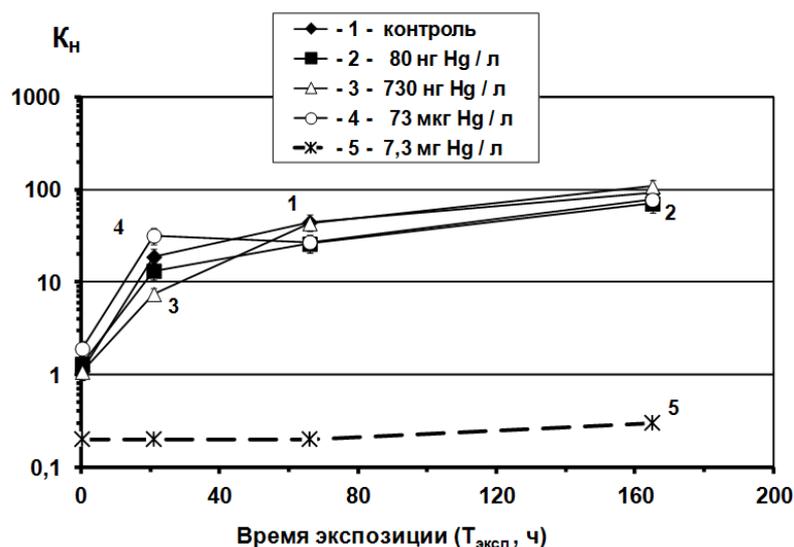
1 нг. Ошибка определения не превышала 20 %. Диапазон концентраций ртути, исследованный в экспериментах, включал как концентрации ниже ПДК, так и уровни многократно превышающие её. Для создания более высоких концентраций ртути в экспериментах в морскую воду вносили её добавки в форме водного раствора сулемы ( $\text{HgCl}_2$ ). В каждом последующем аквариуме, согласно общепринятой методике токсикологических исследований [9, 10], концентрацию ртути увеличивали в 2, 5,  $n \times 10$  раз. При изучении прироста и выживаемости ульвы максимальная добавка ртути составляла в первом эксперименте  $7.7 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$ , а во втором и третьем экспериментах –  $7.7 \times 10^5$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$ . Исследования накопления ульвой радиоуглерода проводили в диапазоне добавок ртути от 73 до  $7.3 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$ .

Эквидозиметрическую оценку воздействия ртути на макроводоросли производили с использованием литературных данных по поражающему действию ионизирующего излучения на водоросли, используя показатель  $\text{LD}_{50}$  [7, 16, 17]. Экологический Грей-эквивалент ртути, выраженный в Гр/(мкмоль  $\text{Hg}/\text{л}$ ) определяли, как отношение величины дозы ионизирующей радиации и молярной концентрации ртути, при действии которых выживаемость водорослей составляла 50 % [4, 6, 7, 17].

Исследование кинетики накопления  $^{14}\text{C}$  ульвой проводили при разных концентрациях ртути в морской воде (1-й вариант – контроль (7 нг  $\text{Hg}/\text{л}$ ), 2-й – 5-й варианты, соответственно, с концентрацией ртути в воде – 80, 730,  $7.3 \times 10^4$  и  $7.3 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$ ). При этом была зафиксирована первая краткосрочная 15-минутная экспозиция влияния ртути на накопление  $^{14}\text{C}$  ульвой. Высокая концентрация ртути в воде ( $7.3 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$ ) с первых минут эксперимента действовала угнетающе на процессы метаболизма водоросли. В целом наблюдали разнонаправленные изменения интенсивности накопления  $^{14}\text{C}$  ульвой. В диапазоне концентраций 7 – 730 нг  $\text{Hg}/\text{л}$  коэффициенты накопления –  $K_n$   $^{14}\text{C}$  не различались. При концентрации  $7.3 \times 10^4$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$  наблюдали увеличение, а при концентрации  $7.3 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$  – резкое угнетение аккумуляции радиоуглерода водорослью. Увеличение  $K_n$   $^{14}\text{C}$  при концентрации  $7.3 \times 10^4$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$  можно рассматривать как адаптационную реакцию водоросли на острое воздействие химического токсиканта, а резкое угнетение накопления радиоуглерода при концентрации  $7.3 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$  – как свидетельство превышения адаптивного потенциала водоросли.

При более длительных экспозициях (до 7-ми суток) тенденции изменения  $K_n$   $^{14}\text{C}$  ульвой в полулогарифмическом масштабе представлены на рис. 1.

На седьмые сутки эксперимента, в пределах 20%-ной погрешности определения значений  $K_n$   $^{14}\text{C}$  ульвой, уровни накопления радиоуглерода водорослью при концентрациях ртути 80 –  $7.3 \times 10^4$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$  достоверно не отличались друг от друга, при этом абсолютные значения  $K_n$  варьировали в диапазоне от 70 до 108 единиц. Однако при концентрации ртути в воде равной  $7.3 \times 10^6$  нг  $\text{Hg}/\text{л}$  значение  $K_n$  составляло 0.3 (рис. 1). Во время всего эксперимента при этой концентрации ртути в воде значения  $K_n$   $^{14}\text{C}$  ульвой были меньше единицы и изменялись в пределах значений 0.2 – 0.3, что указывало на отсутствие биоаккумуляции  $^{14}\text{C}$  водорослью. При этом уже через 1 сутки происходило осветление окраски водоросли, а в дальнейшем и полное обесцвечивание её, что указывает на разрушение зелёного пигмента в хлоропластах водоросли в этих условиях.

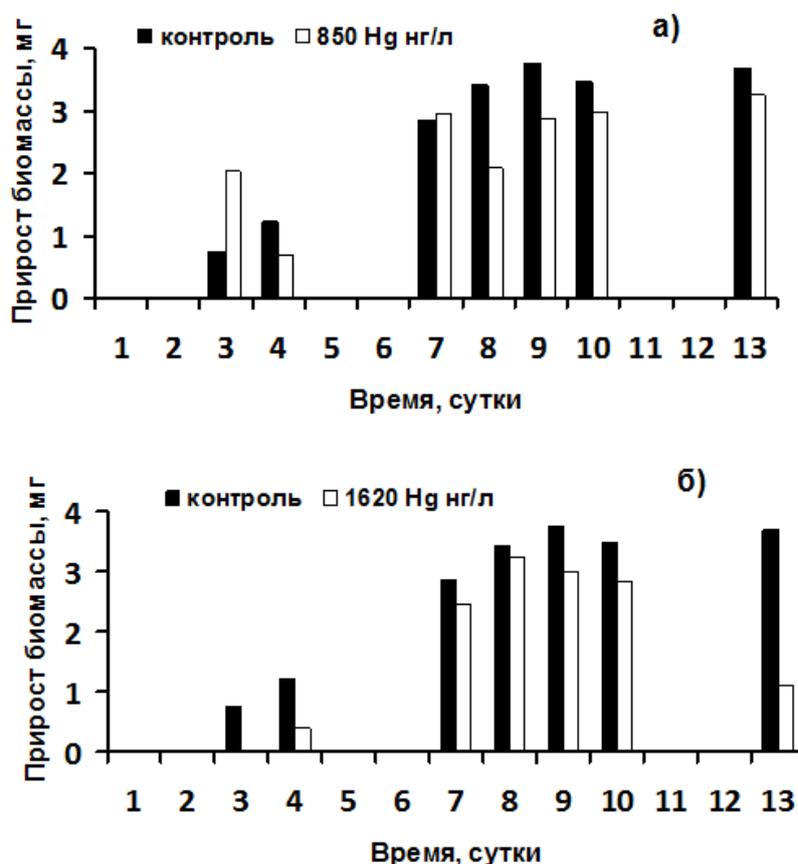


**Рис. 1.** Кинетика накопления  $^{14}\text{C}$  зелёной водорослью *Ulva rigida* при разных концентрациях ртути в морской воде, где  $K_n$  – коэффициент накопления  $^{14}\text{C}$

Исследование изменения прироста биомассы ульвы при разных концентрациях ртути в воде показало, что изменение его происходило разнонаправленно. При этом для концентраций ртути до 850 нг Hg/л, включительно, на 13-е сутки прирост биомассы фактически сравнялся с таковым в контроле, а для концентраций равных и выше 1520 нг Hg/л – резко снизился (для концентрации 1520 нг Hg/л - в 4 раза) (рис. 2). Уменьшение прироста биомассы ульвы в два раза по отношению к контролю было характерно для концентрации ртути в воде  $7.7 \times 10^4$  нг Hg/л.

При концентрации  $7.7 \times 10^5$  нг Hg/л наблюдения за приростом биомассы водорослей были прекращены после 9 суток эксперимента из-за гибели водорослей. При визуальном наблюдении за состоянием пигментной системы водорослей в аквариумах с максимальными концентрациями ртути в воде (как и при микрофотосъёмке) было отмечено выраженное осветление окраски фрагментов ульвы. В аквариумах с летальными концентрациями ртути ( $7.7 \times 10^5$  нг Hg/л и  $7.7 \times 10^6$  нг Hg/л) произошло полное обесцвечивание талломов, очевидно, в результате разрушения хлорофилла, и гибель всех образцов ульвы. Во время исследования выживаемости ульвы при концентрациях в диапазоне  $160-7.7 \times 10^3$  нг Hg/л наблюдали её уменьшение только на 9 и 10 сутки эксперимента.

При концентрации  $7.7 \times 10^4$  нг Hg/л выживаемость снизилась до 85 % на 4-е сутки эксперимента и к концу эксперимента составила 70 %, а при концентрации  $7.7 \times 10^5$  нг Hg/л она вначале снизилась и составила 71 %, а на седьмые сутки была равна нулю. Следовательно, самая низкая концентрация ртути в воде, которая вызвала для ульвы 100 % летальный эффект всех образцов, составляла  $7.7 \times 10^5$  нг Hg/л. Полулетальная концентрация ртути в воде в наших экспериментах составляла  $7.7 \times 10^4$  нг Hg/л или 77 мкг Hg/л, что составляет 0,4 мкмоль Hg/л. Экологический Гр/эквивалент в отношении ртути составил для ульвы 2500 Гр/(мкмоль Hg/л), что свидетельствует о высокой токсичности ртути и достаточно высокой устойчивости ульвы к ртутному загрязнению.



**Рис. 2.** Кинетика прироста биомассы зелёной многоклеточной водоросли *Ulva rigida* при концентрации ртути в воде: А) – 850 нг Hg/л; Б) – 1620 нг Hg/л

Таким образом, в результате экспериментального изучения токсического действия ртути на многоклеточные черноморские водоросли вида *Ulva rigida* С. Agardh было установлено, что на начальном этапе действия ртути наблюдали разнонаправленные колебания значений изучаемых

количественных параметров, при этом в диапазоне концентраций до 850 нг Hg/л к 13-ым суткам прирост биомассы восстанавливался, а при концентрациях 1620 нг Hg/л и выше он снижался. Концентрации ртути в воде в диапазоне 1620 –  $7.7 \times 10^6$  нг Hg/л оказывали угнетающее влияние на показатели жизнедеятельности водоросли: прирост биомассы, выживаемость и состояние пигментной системы. При этом уровни накопления ульвой  $^{14}\text{C}$  при концентрациях ртути 80 –  $7.3 \times 10^4$  нг Hg/л достоверно не отличались друг от друга в пределах 20 % погрешности. Абсолютные значения  $K_n$  варьировали в пределах от 70 до 108 единиц. Концентрация  $7.3 \times 10^6$  нг Hg/л вызвала ингибирование аккумуляции ульвой  $^{14}\text{C}$  уже через 15 минут от начала эксперимента, при этом  $K_n$  радиоуглерода были ниже единицы и составляли 0.2 – 0.3. Пребывание ульвы в воде при концентрации  $7.3 \times 10^6$  нг Hg/л в дальнейшем привело к полному обесцвечиванию её талломов. При изучении выживаемости водоросли в диапазоне концентраций  $7.7 \times 10^5$  –  $7.7 \times 10^6$  нг Hg/л к 13-ым суткам наблюдали 100 % летальный эффект. Концентрация ртути, вызывавшая снижение выживаемости *U. rigida* в 2 раза составляла  $7.7 \times 10^4$  нг Hg/л.

Проведённая экологическая эквидозиметрическая оценка молярной токсичности ртути для *U. rigida* позволила оценить экологический Гр/эквивалент в отношении ртути для *U. rigida* на уровне 2500 Гр/(мкмоль Hg /л). Для сравнения, отметим, что для менее токсичного тяжелого металла, такого как медь, Гр/эквивалент для представителей красных черноморских многоклеточных водорослей составлял 241 Гр/(мкмоль Cu/л) [6].

#### Список литературы

1. Polikarpov G.G., Zaitsev Y.P., Zats V.I., Radchenko L.A. Pollution of the Black Sea (Levels and sources), Proceedings of the Black Sea Symposium, Ecological Problems and Economical Prospects, 1991, Publ. by The Black Sea Foundation for Education, Culture and Protection of Nature, Istanbul, 1994. – P. 15–42.
2. Polikarpov G.G. Effects of nuclear and non-nuclear pollutants on marine ecosystems // Marine Pollution: Proceedings of a Symposium Held in Monaco, 5-9 October 1998, IAEA-TECDOC-1094, Vienna, 1999. – P. 38–43.
3. Polikarpov G.G. Biological aspect of radioecology: objective and perspective. // Comparative Evaluation of Environmental Toxicants. Proceedings of the International Workshop on Comparative Evaluation of Health Effects of Environmental Toxicants Derived from Advanced Technologies, Chiba, January 28-30, 1998. Tokyo, Kodansha Scientific LTD, 1998. – P. 3–15.
4. Fuma S., Miyamoto K., Takeda H., Yanagisawa K. et al., Ecological effects of radiation and other environmental stress on aquatic microcosm, International Workshop on Comparative Effects of Health Effects on Environmental Toxicants Derived from Advanced Technologies. National Institute on Radiological Sciences: Abstracts, 1998, P. 21–22.
5. Поликарпов Г.Г., Цыцугина В.Г. Сравнение цитогенетической и экосистемной эффективности действия радиоактивных и химических мутагенов в гидросфере // Докл. НАН Украины. – 1999. – № 6. – С. 199–202.
6. Tereshchenko N.N., Vladimirov V.B. Equidosimetric comparison of efficiency of effects of gamma-irradiation and chemical toxic agents (copper and phenol) on the red algae of the Black Sea / Equidosimetry. – Netherlands: Springer, 2005. – P. 73–78.
7. Поликарпов Г.Г. Концептуальная модель зональности хронического действия мощностей доз ионизирующих излучений в природе / Радиоэкологический отклик Чёрного моря на чернобыльскую аварию / Под ред. Г.Г. Поликарпова, В.Н. Егорова. – Севастополь: «ЭКОСИ-Гидрофизика», 2008. – С. 351–357.
8. Костова С.К., Егоров В.Н., Поповичев В.Н. Многолетние исследования загрязнения ртутью Севастопольских бухт (Черное море) // Экология моря. – 2001. – Вып. 56. – С. 99–104.
9. Холопов Ю.А. Тяжёлые металлы как фактор экологической опасности. – 2003. – Самара: СамГАСП. – 16 с.
10. Трахтенберг И.М., Коршун М.Н. Ртуть и ее соединения // Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I – IV групп: Справ. Изд. / Под ред. В.А. Филова. – Л.: Химия, 1988. – С. 170–188.
11. Беспамятников Г.П., Кротов Ю. А. Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. – Л.: Химия, 1985. – 304 с.
12. Титова В.И., Дабахов М.В., Дабахова Е.В. Экотоксикология тяжелых металлов. – Н.Новгород: НГСХА, 2001. – 135 с.
13. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах: Контроль и оценка влияния: Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 288 с.
14. Калугина-Гутник А.А. Фитобентос Чёрного моря. – Киев: Наук. думка, 1975. – 323 с.
15. Прокофьев А.К., Степанченко Т.В. Методы определения токсичных загрязняющих веществ в морской воде и донных осадках. – М.: Гидрометеиздат, 1981. – С. 34–42.
16. Поликарпов Г.Г. Радиохемозология, коэволюция и экоэтика Чтения памяти Н.В. Тимофеева-Ресовского. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2000. – С. 52–61.
17. Santschi P. H., Honeyman B.D. Radionuclides in Aquatic Environments. Radiation Physics and Chemistry, 1989. – Vol. 34. – № 2. – P. 213–240.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ШАЛФЕЕВ  
(ЛЕКАРСТВЕННОГО, СУХОСТЕПНОГО И ЭФИОПСКОГО)  
ДЛЯ РАКООБРАЗНЫХ *D. MAGNA***

А.В. Ткачева, М.С. Смолянский

*Волгоградское отделение – ФГБНУ «ГосНИОРХ»  
400001 г. Волгоград, ул. Пугачевская, д.1, Россия, navov@mail.ru*

В работе исследуется токсичность водных вытяжек из 3-х видов шалфеев (лекарственного, сухостепного, эфиопского) методом биотестирования - на стандартных пресноводных тест-организмах - зоопланктонных ветвистоусых ракообразных – *Daphnia magna*.

В мировой практике в последние десятилетия приобретают все большую популярность лекарственные препараты на основе растительного сырья, т.к. практически не дают побочных эффектов, что является их преимуществом перед синтетическими лекарственными средствами. Основным показателем качества лекарственного растительного сырья служит содержание в нем биологически активных веществ.

Биологически активные вещества – вторичные метаболиты растений - играют важную роль в получении бактерицидных и фунгицидных препаратов в фармакологической промышленности и при изготовлении фитопрепаратов в косметике и бытовой химии[1].

Так, к примеру, в современной официальной и народной медицине применяются шалфеи, в виде отваров, настоек и экстрактов, и используются в качестве спазмолитического, противовоспалительного, антимикробного и мочегонного средства при почечно–каменной болезни, как полоскание при стоматитах и катарах верхних дыхательных путей[1, 2].

При использовании шалфеев в лечении важно знать токсичность их водных вытяжек для организмов. Наиболее чувствительными к содержанию каких-либо вредных веществ в компонентах среды являются водные планктонные организмы. Поэтому в данной работе основное внимание было уделено установлению токсичности водных вытяжек из 3-х видов шалфеев (лекарственного, сухостепного, эфиопского) методом биотестирования - на стандартных пресноводных тест-организмах - зоопланктонных ветвистоусых ракообразных – *Daphnia magna*.

Объектом исследования явились пробы водных экстрактов шалфеев: Лекарственного (*Salvia officinalis* L.), Сухостепного (*Salvia tesquicola* Klok. Et Pobed) и Эфиопского (*Salvia aethiopis* L.) (таблица 1) как в отдельности, так и в смесях 1:1 (Лекарственный и Эфиопский; Лекарственный и Сухостепной; Сухостепной и Эфиопский), представленные Волгоградским Государственным Университетом (ВолГУ) в лабораторию гидрохимии и токсикологии Волгоградского отделения ФГБНУ «ГосНИОРХ» с целью определения их токсичности для *Daphnia magna*.

Фитохимическое исследование сырья растений, при делении на основные группы биологически активных (действующих) веществ проводили методами, принятыми для анализа лекарственного растительного сырья, установленные Всероссийским Институтом Лекарственных Растений (ВИЛР) и Институтом биохимии растений Академии Наук Российской Федерации. Присутствие биологически активных веществ в извлечениях из сырья растений устанавливали с помощью качественных реакций [5].

Все водные экстракты исследованных растений представляют собой густую жидкость (от светло-коричневого до темно-коричневого цвета) с сильным и стойким бальзамическим ароматом. Легко растворимы в воде. Переносят длительное хранение в холодильнике, при этом не теряя своих свойств.

Исследования водных вытяжек на стандартных пресноводных тест-объектах - зоопланктонных ветвистоусых ракообразных – *Daphnia magna* Straus- проводили на однородном материале, синхронизированном по времени размножения рачков. В опыт брали односуточных рачков, длительность эксперимента – 4 суток (96 ч). В остром эксперименте рачков не кормили.

Для опытов использовали аквариумную отфильтрованную воду, содержащую весь естественный набор химических компонентов и биологических микрокомпонентов. Эксперимент проводили в лабораторных условиях при температуре воды 21 – 22°C. Плотность посадки односуточных дафний в опыте и контроле составляла 10 экз. на 100мл. В остром эксперименте рачков не кормили. В конце биотестирования визуально подсчитывали количество живых дафний. Живыми считали дафнии, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже 15 с. после его легкого встряхивания. Остальных дафний считают погибшими. Опыты проводили в 3-х кратной повторности. Каждому опыту соответствовал контроль. По

окончании опытов рассчитывали параметры токсичности ЛК<sub>50</sub> за 96 ч[3] методом пробит – анализа.

**Таблица 1.** Сравнительная характеристика трех видов шалфеев

Параметры	Шалфей лекарственный (Salvia officinalisL.)	Шалфей сухостепной (Salvia tesquicola Klok.Et Pobed)	Шалфей эфиопский (Salvia aethiopsis L.)
География распространения	Родина растения – Средиземноморье. Культивируется в Молдове, Краснодарском крае и на Украине.	Западная Сибирь и Северный Казахстан. В нашей стране произрастает в южной половине европейской части, Предкавказье, на юге Западной Сибири.	Америка, Европа, Западная и Средняя Азия, Европейская часть России, Кавказ, лесостепные районы Украины.
Местообитание	Выращивается шалфей на плантациях лекарственных и эфирномасличных растений, изредка – в садах.	Обитает в степях, на сухих лугах, опушках, по окраинам дорог и полей, на пустырях, у жилья, преимущественно на выходах известняка и песках.	Растет на склонах балок и речных долин, на меловых и известковых обнажениях, опушках и полянах. Любит хорошо дренированные почвы, открытые солнечные участки.
Химический состав	Листья содержат эфирное масло (0.5 – 2.5%), в состав которого входят цинеол, туйон, пинен, сальвен, борнеол, цедрен, камфора и витамины группы В, Р, РР и С. Так же листья содержат дубильные и смолистые вещества, алкалоиды, органические кислоты (олеаноловая, урсоловая, хлорогеновая, фенолкарбоновые), фенольные соединения – производные кофейной кислоты – дубильные вещества (4 %).	Листья содержат эфирное масло (до 0.53%), в состав которого входят цинеол, туйоны, пинен, сальвен, борнеол, камфора и цедрен; алкалоиды, дубильные вещества, фитонциды. Из надземной части растения выделены и идентифицированы 4 флавоноидных соединения – гликозиды лютеолина и хризозериола: цинарозид, сколимосид, 7-О-Д-глюкуронидлютеолина и 7-О-Д-глюкуронидхризозериола.	Растение содержит алкалоиды, дубильные вещества, флавоноиды. В корнях найдены дитерпеноидсальвиписон, хиноны. В надземной части – эфирные масла, дитерпеноидфитол, стероиды. В стеблях, листьях, соцветиях – эфирное масло, в состав которого входят альфа-пинен, бета-пинен, лимонен, линалол, бернеол, кариофиллен, камфора. Содержание эфирного масла в листьях и цветках состав шалфея эфиопского (к концу цветения) достигает 0,06%. В семенах содержится жирное масло, в составе которого найдены пальмитиновая, пальмитолеиновая, стериновая, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты.
Применение	Применение обусловлено его дезинфицирующими, противовоспалительными, вяжущими, кровоостанавливающими, антимикробными, смягчительными свойствами.	Применяется при желудочно – кишечных заболеваниях, воспалении мочевого пузыря, для лечения ангины, стоматита. Растение обладает вяжущим, противовоспалительным, антимикробным действием, уменьшает потоотделение и секрецию молока. Используется в парфюмерии.	Лечение заболеваний желудочно-кишечного тракта, печени, почек, вирусных инфекций, ангины, бронхита, полиартрита, радикулита, неврита, диабета. Он помогает при таких заболеваниях, как гипертония, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, стимулирует работу надпочечников.

Экспериментальные данные исследования токсичности водных вытяжек из растений представлены в таблицах 2 и 3.

**Таблица 2.** Динамика выживаемости *D. magna* при различных концентрациях водных экстрактов из растений

Концентрация экстракта, мг/л	Выживаемость, % от контроля		
	Шалфей лекарственный	Шалфей сухостепной	Шалфей эфиопский
Контроль (без экстракта)	100	100	100
0.5	100	100	100
1.0	100	100	100
2.5	60	60	100
5.0	20	20	100
10.0	0	0	100
15.0	0	0	100
20.0	0	0	100
25.0	0	0	80
50.0	0	0	20
100.0	0	0	0

После проведения эксперимента было выявлено, что экстракт шалфея эфиопского обладает меньшей биологической активностью и токсическим эффектом, чем водные экстракты шалфея сухостепного и шалфея лекарственного, т.к. при концентрации 20 мг/л все тест-организмы выжили, в отличие от всех других, которые показали полную гибель тест-организмов уже при концентрации 10 мг/л.

1 мг/л экстракта шалфея не вызывает каких-либо нарушений жизнедеятельности *D. magna* на протяжении всего опыта для шалфея лекарственного и шалфея сухостепного. Полная гибель рачков наблюдалась в экстракте из шалфея эфиопского в концентрации 100мг/л.

**Таблица 3.** Динамика выживаемости *D. magna* при различных концентрациях водных экстрактов из растений в смесях

Концентрация экстракта, мг/л	Выживаемость, % от контроля		
	Лекарственный и Сухостепной	Сухостепной и Эфиопский	Эфиопский и Лекарственный
Контроль (без экстракта)	100	100	100
0.5	100	100	100
1.0	80	80	100
2.5	40	60	100
5.0	20	40	80
10.0	0	2	60
15.0	0	0	20
20.0	0	0	0
25.0	0	0	0
50.0	0	0	0
100.0	0	0	0

Среди смесей наибольшая токсичность выявилась у смеси шалфея лекарственного и шалфея сухостепного. Гибель организмов отмечалась уже при концентрации - 10 мг/л. Для смеси шалфеев лекарственного и сухостепного и смеси шалфеев сухостепного и эфиопского недействующей концентрацией являлась 0.5 мг/л, которая не вызывала гибель тест-организмов, а для смеси шалфеев эфиопского и лекарственного – 2.5 мг/л. Отмечено, что наименьшей биологической активностью обладала смесь шалфея эфиопского и шалфея лекарственного, которая вызывала полную гибель рачков при концентрации 20мг/л. Как видно из таблицы 2, в отдельности, эти растения действовали на жизнеспособность рачков по-разному.

По результатам выживаемости организмов в различных концентрациях водных вытяжек рассчитали параметры токсичности методом пробит-анализа и определили кратность их разбавления [3]. Полученные результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4.** Обобщенные экспериментальные данные по токсичности водных экстрактов для зоопланктона

Название проб шалфеев	ЛК <sub>50</sub> за 96 часов	Кратность разбавления
Лекарственный	3	33.3
Сухостепной	3	33.3
Эфиопский	38	2.6
Лекарственный и Сухостепной	2.2	45.5
Сухостепной и Эфиопский	4.5	22.2
Эфиопский и Лекарственный	10	10

Согласно полученным данным, можно отметить, что все представленные пробы проявили различную токсичность. Наименьшую токсичность проявил шалфей эфиопский. Его разбавление составляет всего в 2.6 раза. Чистые смеси шалфея Лекарственного и шалфея Сухостепного необходимо разбавлять в 33.3 раза. Смесь шалфея лекарственного и шалфея сухостепного оказалась самой токсичной для рачков. Его разбавление составляет в 45.5 раза.

По результатам исследований выживаемости зоопланктонных организмов в пробах водных вытяжек из растений сделан вывод об их различной токсичности. Из всех исследуемых проб среднетоксичным оказался шалфей эфиопский и смесь шалфея эфиопского и лекарственного, высокотоксичными оказались все остальные пробы. Все изученные шалфеи имеют разный химический состав и, как следствие, различную степень влияния на жизненные функции дафний, это, вероятно, зависит от характера их воздействия на биохимические процессы в организме гидробионтов.

Выполненная оценка токсичности будет способствовать рациональному использованию вытяжек из растений с целью снижения их негативного влияния на здоровье человека. Шалфей эфиопский (*Salvia aethiopsis* L.) представляет практический интерес для разработки в перспективе на его основе антибактериальных и противовоспалительных лекарственных средств для наружного и внутреннего применения.

#### Список литературы

1. Гусев Н.Ф. «Лекарственные и ядовитые растения, как фактор биологического риска»/ Н.Ф. Гусев, О.Н. Немершина, Г.В. Петрова, А.В. Филиппова. – Оренбург: Издательский центр ОГАУ. – 2011. – 400 с.
2. Киосев П.А. Полный справочник лекарственных растений.–М.: Эксмо, 2005., 992с.
3. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадочных сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР.1.39.2007.03222. Изд . «АКВАРОС», М., 2007 г.
4. Приказ Росрыболовства № 695 от 04.08.09 «Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения».
5. Решетникова М.Д. Химический анализ биологически активных веществ лекарственного растительного сырья и продуктов животного происхождения. Учебное пособие / М.Д. Решетникова, В.Ф. Левинова, А.В. Хлебников и др.; под ред. проф. Г.И. Олешко. – Пермь: 2004. – 335 с.

УДК: 574.64+59.08

### **ТОКСИЧЕСКОЕ И ТЕРАТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ НА ГИДРОБИОНТОВ РАЗЛИЧНОЙ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ**

И.И. Томилина, В.А. Гремячих, Л.П. Гребенюк, Е.И. Головкина

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, i\_tomilina@mail.ru*

Исследовано действие сублетальных концентраций металлических наночастиц (золота, серебра, цинка и титана) на гидробионтов различной систематической принадлежности

(ветвистоусых рачков цериодафний, личинок двукрылых насекомых хирономид и икромечущую аквариумную рыбку данио) в условиях хронического эксперимента. Отмечено, что наиболее чувствительный – тест-объект - цериодафнии. Урачков под влиянием исследуемых наноматериалов была значительно снижена плодовитость. Угнетение воспроизводство потомства – главная опасность любых токсикантов, в том числе и наночастиц, т.к. несет угрозу для продуктивности водоема и может сказаться на стабильности и состоянии водных экосистем.

*Ключевые слова:* наночастицы, металлы, токсичность, гидробионты

В настоящее время быстрыми темпами развиваются нанотехнологии - технологии направленного получения и использования веществ и материалов с размерами частиц менее 100 нанометров. Наночастицы и наноматериалы обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в микро- и макроскопической формах [1].

Для подавляющего числа наноматериалов токсикологическая характеристика либо отсутствует, либо представлена ограниченным числом тестов, методология и результаты которых часто взаимно несопоставимы. Эксперименты по воздействию наночастиц на живые организмы проводили лишь с некоторыми типами наночастиц на отдельных видах животных (дафнии, рыбы, мыши, крысы) и растений (кукуруза, соя, капуста, морковь) [2]. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что обычно в экспериментах изучали однократное воздействие наночастиц, затрагивающее незначительную часть жизненного цикла животного. Данные, касающиеся хронического воздействия и последствий воздействия на весь жизненный цикл небольших концентраций наночастиц, крайне малочисленны и разобщены [3]. При этом количество промышленно производимых наноматериалов ежегодно существенно увеличивается, что указывает на практическую невозможность охарактеризовать в ближайшее время безопасность всех важнейших наноматериалов.

Все перечисленное свидетельствует о том, что наноматериалы, обладая иными физико-химическими свойствами и биологическим действием по сравнению с традиционными аналогами, следует отнести к новым видам материалов и продукции, характеристика потенциального риска которых для здоровья экосистем и человека является обязательной.

Цель работы - оценить токсическое и тератогенное действие сублетальных концентраций металлических наночастиц (золота, серебра, цинка и титана) на гидробионтов различной систематической принадлежности в условиях хронического эксперимента.

Токсическое и тератогенное действие различных металлических наночастиц исследовали на тест-объектах, широко распространенных в экотоксикологической практике: ветвистоусых рачках цериодафниях (*Ceriodaphnia affinis* Lillijeborg, 1862), личинках двукрылых насекомых хирономид (*Chironomus riparius* Meigen, 1804) и икромечущей аквариумной рыбке (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822).

В качестве токсикантов использовали суспензии наночастиц ZnO и TiO<sub>2</sub> и коллоидные растворы золота и серебра, полученные методом диспергирования в отстоянной артезианской воде на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в режиме 0.5 А, 44 кГц непосредственно перед опытом. Диапазон исследованных концентраций для разных наночастиц и тест-объектов приведен в соответствующих таблицах. У цериодафний в хронических экспериментах определяли выживаемость, продолжительность жизненного цикла и индивидуальную плодовитость животных: суммарную плодовитость (общее количество молоди, отрожденное одной самкой в течение всей жизни) и интенсивность размножения рачков (суммарная плодовитость по отношению к продолжительности жизни) [4, 5]. Основные регистрируемые показатели влияния наночастиц металлов на личинок комара *Ch. riparius* – смертность животных, изменение линейных размеров после 20-суточной экспозиции, морфологические деформации структур ротового аппарата [6]. У *D. rerio* регистрировали смертность эмбрионов, продолжительность эмбрионального развития, % выклева свободных предличинок, их выживаемость после выклева и отклонения в эмбриональном развитии [7].

Все эксперименты проводили в двух повторностях. Поддерживали оптимальные условия среды: температуру воды – 24 ± 2°C, pH 7.5–8.0, растворенный кислород – на уровне насыщения. Контрольные группы тест-животных содержали в отстоянной водопроводной воде.

Данные представляли в виде средних значений и их ошибок ( $\bar{x} \pm SE$ ). Результаты обрабатывали статистически, используя метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и процедуру LSD-теста при уровне значимости  $p = 0.05$  [8].

В разных сериях опытов средняя продолжительность жизни рачков *C. affinis* варьировала от 16 до 53 суток, что составляло 57–116 % контроля (табл.1). Наименьшая продолжительность жизни рачков зарегистрирована при экспонировании в 0.01 мг/л суспензии оксида цинка и  $5 \times 10^{-5}$

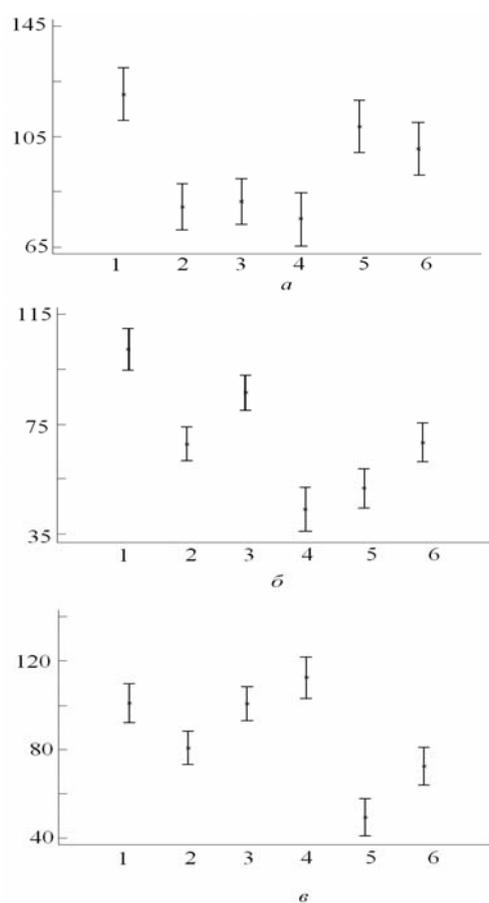
коллоидного раствора наночастиц серебра. Повышенная продолжительность жизни (116% контроля) отмечена в 0.01 мг/л наночастиц золота. В среднем по выборкам без учета концентрации веществ продолжительность жизненного цикла при действии изученных наночастиц была ниже контрольных значений, для металлооксидных разница была статистически достоверной (рис. 1).

**Таблица 1.** Изменение биологических показателей цериодафний при действии различных наночастиц

Вещество	Концентрация, мг/л	Суммарная плодовитость, % от контроля	Продолжительность жизненного цикла, % от контроля
TiO <sub>2</sub> (анатаз)	0.002	51.1±7.5	78.8±6.8
	0.02	80.6±11.1	88.5±7.0
	0.2	55.1±7.8	71.8±8.5
	2.0	74.8±9.6	78.5±7.6
TiO <sub>2</sub> (рутил)	0.002	99.2±7.2	98.2±5.0
	0.02	90.4±11.4	86.8±9.3
	0.2	69.8±8.9	71.2±6.6
	2.0	77.6±11.5	68.4±6.4
ZnO	0.001	76.6±14.0	85.4±15.2
	0.005	35.0±7.3	82.8±13.9
	0.01	25.5±7.3	57.0±10.8
Ag	2*10 <sup>-6</sup>	61.3±8.7	95.1±10.1
	1*10 <sup>-5</sup>	53.9±5.9	93.4±8.2
	5*10 <sup>-5</sup>	33.3±7.3	67.9±11.1
Au	0.001	55.6±8.4	91.6±10.5
	0.01	72.1±6.1	116.0±32.9
	0.1	71.3±7.8	94.0±9.1

Средняя суммарная плодовитость во всех сериях опытов не достигала контрольных значений, в отдельных случаях была снижена до 25% контроля (рис.1). Данный показатель пропорционален средней продолжительности жизни рачков, за исключением особей, экспонированных в растворах золота, у которых при сохранении нормальной продолжительности жизни плодовитость была снижена на 30-50% по сравнению с контролем, вследствие уменьшения количества молоди в помете. Коэффициенты корреляции между средней суммарной плодовитостью и средней продолжительностью жизни составили: в анатазе – 0.62, рутиле – 0.73, цинке – 0.91, серебре – 1.0, золоте – 0.56 при  $p=0.0000$ . При экспонировании цериодафний в наночастицах оксида цинка зафиксированы самые низкие показатели продолжительности жизни и средней суммарной плодовитости и, соответственно, самые высокие – интенсивности размножения (рис. 1).

Исследованные концентрации всех наночастиц не влияли на выживаемость личинок хирономид *Chironomus riparius*, снижали линейные размеры тела, замедляли метаморфоз и вызывали увеличение числа особей с патоморфологическими изменениями структур ротового аппарата (табл. 2). Доля деформированных личинок возрастала во всех экспериментальных группах животных. Характер деформаций ротового аппарата зависел от состава экспериментальной среды. Основную часть деформированных структур ротового аппарата личинок хирономид составляли антенны. Доля изменённых сильнохитинизированных структур ротового аппарата (ментум, мандибулы) превышала контрольные значения в 2-7 раз, достоверно от них не отличаясь. Значительное смещение процентного соотношения деформированных структур ротового аппарата личинок *Ch. riparius* в сторону нарушения антенн – закономерность, выявленная при воздействии на личинок ионов тяжелых металлов. Причины деформаций, возникающих у личинок хирономид при действии неблагоприятных факторов, до конца не выяснены. Предположительно это могут быть мутации, вызванные повреждениями ДНК. Многочисленные тератогенные изменения структур ротового аппарата личинок *Ch. riparius* в эксперименте, могут иметь ту же природу.



**Рис. 1.** Влияние сублетальных концентраций наночастиц металлов на среднюю продолжительность жизненного цикла (а), суммарную плодовитость (б) и интенсивность размножения (в) цериодафний по оси ординат - % от контроля, по оси абсцисс – 1-контроль, 2 – диоксид титана (анатаз), 3 – диоксид титана (рутил), 4- оксид цинка, 5- золото, 6- серебро.

**Таблица 2.** Морфологические показатели личинок *Chironomus riparius* при действии различных наночастиц

Вещество	Концентрация, мг/л	Соотношение деформированных структур ротового аппарата, %			Доля личинок с морфологическими деформациями, %	Доля личинок IV возраста, %
		ментум, мандибулы	комплекс верхней губы	антенны		
TiO <sub>2</sub> (анатаз)	0.00002	8.4	25.3	66.4	42.9	47.6
	0.0002	11.8	26.6	61.6	32.1	25.8
	0.002	5.3	15.8	78.9	72.7	-
	0.02	16.7	23.1	60.2	46.0	58.7
	0.2	10.6	17.4	72.1	36.3	44.7
TiO <sub>2</sub> (рутил)	2.0	15.5	24.8	59.8	41.9	26.3
	0.002	11.6	21.3	67.1	40.9	31.6
	0.02	11.1	13.9	75.0	43.3	42.0
	0.2	13.6	23.2	63.3	33.8	20.6
ZnO	2.0	17.4	24.6	58.0	35.9	45.9
	0.2	8.4	23.4	68.3	25.6	81.6
	2.0	23.5	23.8	52.8	20.1	42.6
	10.0	42.7	15.0	48.1	40.6	32.7
	20.0	19.0	30.4	50.7	28.7	40.1
Ag	2*10 <sup>-6</sup>	38.5	15.4	46.2	23.8	23.5
	1*10 <sup>-5</sup>	26.1	21.7	52.2	60.0	90.0
	5*10 <sup>-5</sup>	26.3	31.6	42.1	50.0	100.0
Au	1.0	10.7	39.3	50.0	18.8	100.0
	10.0	22.8	27.8	49.4	35.9	86.4
	100.0	34.9	25.8	39.4	38.6	58.6
контроль		<b>15.0</b>	<b>25.0</b>	<b>60.0</b>	<b>&lt;12</b>	<b>70</b>

Наночастицы металлов влияли и на динамику выклева предличинок *Danio rerio*. Однако не для всех концентраций и веществ эти различия были статистически значимыми. Так, в суспензиях анатаза и рутила выклев был более растянут во времени: если в контроле 100% выклев происходил за 12 часов, то в опытных вариантах – за 24. Отмечены случаи возникновения уродств при экспонировании в различных наночастицах, как на стадии эмбрионов, так и на стадии предличинок. В контроле аномалий развития не отмечено.

Оценивая полученные данные с позиций чувствительности тест-объектов различной систематической принадлежности, можно сказать, что все гидробионты (ветвистоусые ракообразные, личинки насекомых и рыбы) оказались в большей или меньшей степени чувствительными к воздействию различных металлических наночастиц. Наиболее чувствительным тест-объектом были цериодафнии, т.е. организм-фильтратор, наиболее токсикорезистентным – рыбы *D. rerio*. В большей степени наноматериалы влияли на воспроизводство водных беспозвоночных, угнетая их плодовитость. Снижение воспроизводства потомства – главная опасность любых токсикантов, в том числе и наночастиц, т.к. это несет угрозу для продуктивности водоема и может сказаться на стабильности и состоянии водных экосистем.

#### Список литературы.

1. Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О. Международные подходы к оценке токсичности и опасности наночастиц и наноматериалов // Токсикол. вестник. 2011. № 6. С. 53–57.
2. Моргалёв Ю.Н., Хоч Н.С., Моргалёва Т.Г. и др. Биотестирование наноматериалов: о возможности транслокации наночастиц в пищевые сети // Рос. нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 11–12. С. 98–102.
3. Крысанов Е.Ю., Павлов Д.С., Демидова Т.Б., Дгебуадзе Ю.Ю. Наночастицы в окружающей среде и их влияние на гидробионтов // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 4. С. 1–8.
4. Mount D.I., Norberg T.J. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test // Environ. Toxicol. Chem. 1984. V. 3. P. 425–434.
5. Томилина И.И., Гремячих В.А., Мыльников А.П., Комов В.Т. Изменение биологических параметров пресноводных гетеротрофных жгутиконосцев и ветвистоусых ракообразных при действии нано- и микрочастиц оксидов металлов // Биология внутр. вод. 2011. № 4. С. 79–89.
6. Warwick W.F. Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: indexing antennal deformities in *Chironomus Meigen* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1985. V. 42. № 12. P. 1881–1914.
7. Zhu X., Zhu L., Duan Z. et al. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage // J. Environ. Sci. and Health. 2008. V. 43. № 3. P. 278–284.
8. Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. N.Y.: W.H. Freeman and Co, 1995. 887 p.

УДК: 597.554.3: 574.64 + 597:538

### ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕЙСТВИЯ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ НА АКТИВНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ МОЛОДИ ПЛОТВЫ К ДЕЙСТВИЮ МЕДИ И ЦИНКА

А.А. Филиппов, А.И. Аминов, И.Л. Голованова, В.В. Крылов, Ю.В. Чеботарева, Ю.Г. Изюмов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, andron@ibiw.yaroslavl.ru*

Действие магнитной бури в эмбриогенезе приводит к разнонаправленным изменениям активности и чувствительности гликозидаз сеголеток плотвы к действию ионов меди и цинка.

*Ключевые слова:* магнитная буря, эмбриогенез, медь, цинк, гликозидазы, плотва.

Глобальное антропогенное загрязнение окружающей среды химическими соединениями, по-прежнему, остается серьезной экологической проблемой. Среди загрязняющих веществ особое место занимают соли тяжелых металлов. Медь и цинк относятся к числу приоритетных загрязнителей природных вод, а их концентрации в районах техногенного загрязнения могут достигать нескольких миллиграммов на 1 л [1]. В то же время они – незаменимые микроэлементы, входящие в состав ряда ферментов и участвующие во многих биохимических реакциях. Но и биогенные элементы, присутствуя в избытке, токсичны для живых организмов. Попадая в

организм рыб вместе с водой и пищей, они могут оказывать прямое и опосредованное влияние на ферменты пищеварительного тракта.

В естественных условиях гидробионты подвергаются комплексному действию ряда факторов как антропогенной, так и естественной природы. При этом действие одних факторов может изменять чувствительность организма к действию других. Ранее при исследовании отдаленных последствий раздельного и совместного действия ионов меди и низкочастотного магнитного поля (МП) были установлены разнонаправленные изменения активности пищеварительных гликозидаз молоди плотвы. При совместном действии этих факторов наблюдалось как усиление негативного эффекта, так и сглаживание эффектов раздельного действия факторов [2].

Магнитная буря (МБ) – это возмущение геомагнитного поля (ГМП) длительностью от нескольких часов до нескольких суток, связанное с взаимодействием возмущённых потоков солнечного ветра и магнитосферы Земли. МБ могут различаться по интенсивности и общей картине, однако даже самые сильные возмущения по своей силе очень редко превышают 1% от напряжённости ГМП. Но и такой относительно слабый фактор может вызывать значительные биологические эффекты [3]. Экспозиция карповых рыб (каarp *Cyprinus carpio*, карась *Carassius carassius*) в МБ приводит к изменению активности внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -зависимых цистеиновых протеиназ и пищеварительных гидролаз кишечника [3]. При этом МБ продолжительностью 20 ч. вызывает значительное снижение активности кишечных гликозидаз, особенно у голодных рыб, и слабо влияет на активность протеиназ [4]. Сведения об отдаленных последствиях действия МБ в период раннего онтогенеза на пищеварительную функцию рыб отсутствуют.

Цель работы – изучить отдаленные последствия действия МБ во время разных отрезков эмбриогенеза на активность гликозидаз кишечника молоди плотвы и их чувствительность к раздельному и совместному действию ионов меди и цинка *in vitro*.

Объектом экспозиции в МБ была икра плотвы *Rutilus rutilus* (L.). Половые продукты получены от 8-ми самок и 6-и самцов, пойманных на нерестилище Рыбинского водохранилища в мае 2012 г. Осеменение икры проводили сухим способом, после чего икру (около 3 тыс. шт. для каждого варианта опыта) помещали в кристаллизаторы с речной водой, которую меняли дважды в сутки. Развитие икры проходило при температуре 16–18°C. Опыты проводили во время спокойной геомагнитной обстановки. МБ воспроизводили в диапазоне частот 0-5 Гц в экспериментальной установке, позволяющей компенсировать в рабочем объеме флуктуации ГМП и создавать заданные пользователем сложные трехкомпонентные магнитные поля. Опыт проведен в шести вариантах экспериментальных условий. Один кристаллизатор с развивающимися эмбрионами плотвы на протяжении всего эксперимента находился в условиях естественного ГМП (контроль). Другой кристаллизатор находился в гипомагнитных условиях (индукция основного вектора ГМП скомпенсирована до  $0 \pm 0.9$  мкТл) с момента оплодотворения икры до вылупления предличинок. Четыре кристаллизатора с развивающимися эмбрионами плотвы (в течение первых 24 ч эмбриогенеза; в промежутки с 24 до 48 ч, с 48 до 72 ч и с 72 до 96 ч после оплодотворения) последовательно помещали в экспериментальную установку, где воспроизводили МБ длительностью 24 ч. Выбранные отрезки эмбриогенеза плотвы охватывают период от оплодотворения до гастрюляции (первые 24 ч) и разные стадии органогенеза (24–96 ч). После рассасывания желточного мешка по 500 личинок из каждого варианта опыта поместили в пруды с естественной кормовой базой на 4 месяца. Смертность плотвы в прудах была минимальна и не зависела от применённого воздействия.

Комплексную оценку отдаленных последствий действия МБ на эмбрионы плотвы проводили на основе анализа активности пищеварительных гликозидаз у 4-месячной молоди. Для определения активности гликозидаз готовили ферментативно-активные препараты из слизистой оболочки кишечника от 20 рыб для каждого из вариантов опыта.

Для изучения влияния  $Cu$  и  $Zn$  *in vitro* ферментативно-активные препараты предварительно инкубировали в присутствии сернокислых солей меди ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) и цинка ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) или их смеси 1:1 в течение 1 ч. Концентрации ионов  $Cu$  и  $Zn$ , рассчитанные по общему содержанию металла в соли, составляли 0.1–25 мг/л.

Амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал –  $\alpha$ -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20) оценивали по приросту гексоз методом Нельсона в модификации Уголева с соавторами [5]. Для определения активности мальтазы глюкозооксидазным методом применяли набор для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Активность ферментов

определяли в пяти повторностях с учётом фона (количества конечных продуктов реакции в исходном гомогенате) и выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации в расчёте на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/г·мин). Нормальность распределения исследуемых показателей проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. При сравнении результатов проводили дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей оценкой достоверности различий при помощи LSD-теста,  $p \leq 0.05$ .

Высокий уровень активности гликозидаз и значений размерно-весовых показателей сеголеток контрольной и опытных групп свидетельствуют о высокой функциональной активности пищеварительной системы и удовлетворительной кормовой базе выростных прудов.

**Таблица 1.** Активность гликозидаз ( $M \pm m$ ) сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* контрольной и опытных групп

Показатели	Контроль	Гипо-магнитные условия	Временной интервал действия МБ от момента оплодотворения икры, ч			
			0–24	24–48	48–72	72–96
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин	24.1 ± 1.65	25.1 ± 1.09	20.5 ± 0.58*	30.3 ± 1.00*	27.3 ± 1.19	23.9 ± 0.33
Активность мальтазы, мкмоль/г·мин	18.9 ± 0.51	17.8 ± 0.31	21.8 ± 0.51*	24.9 ± 0.46*	16.7 ± 0.93	20.2 ± 0.47

Примечание.  $M \pm m$  – среднее значение показателя и его ошибка; МБ – магнитная буря в диапазоне частот 0–5 Гц; \* – отличия от контроля достоверны ( $p < 0.05$ ).

Активность гликозидаз сеголеток плотвы контрольной и опытных групп приведена в таблице 1. В гипомагнитных условиях достоверных изменений активности гликозидаз не выявлено. Действие МБ в течение первых 24 ч. после оплодотворения приводит к снижению амилолитической активности на 15% по сравнению с контролем. Однако активность мальтазы повышается на 15% от контроля. Действие МБ в интервале 24–48 ч. вызывает увеличение амилолитической активности на 26%, активности мальтазы – на 32% по сравнению с контролем. Активность гликозидаз при действии МБ в течение 48–72 ч. и 72–96 ч. после оплодотворения достоверно не изменяются.

**Таблица 2.** Изменения амилолитической активности (% контроля) в кишечнике сеголетков плотвы при действии магнитной бури в присутствии ионов меди и цинка *in vitro* ( $p < 0.05$ ).

Фактор	Изменения амилолитической активности, % от контроля (0 мг/л)				
	Концентрация металла, мг/л				
	0.1	1	5	10	25
Медь					
Контроль	=	+10	-21	-44	-90
МБ (48-72 ч)	-14	-20	-68	-93	-94
Цинк					
Контроль	=	-16	-14	-16	-19
МБ (48-72 ч)	-44	-21	-34	-40	-46
Медь и цинк					
Контроль	-13	-21	-56	-69	-94
МБ (48-72 ч)	-37	-39	-71	-97	-99.6

Примечание. Здесь и в таблице 3. эффекты: «+» – позитивный, «-» – негативный, «=» – близкий к контролю.

Несмотря на то, что при действии МБ в интервале 48–72 ч. после оплодотворения изменения уровня амилолитической активности не выявлено, установлены достоверные изменения чувствительности гликозидаз к действию ионов Cu и Zn *in vitro* (табл. 2).

Так, в контрольном варианте торможение амилолитической активности при действии ионов Cu на 21–90% выявлено лишь при концентрации металла 5–25 мг/л, в опытном варианте отмечено

последовательное снижение ферментативной активности на 14–94% во всем диапазоне концентраций металла.

Усиление чувствительности показано и при действии ионов Zn: снижение амилолитической активности в контрольном варианте составило 14–19%, в опытном варианте – 21–46%. Наибольшее снижение ферментативной активности отмечено при совместном действии ионов Cu и Zn: на 13–94% в контрольном, и на 37–99% в опытном варианте. В большинстве случаев показана прямая зависимость степени торможения амилолитической активности от концентрации металла.

При действии МБ активность мальтазы достоверно не изменялась, тем не менее, как и в случае с амилолитической активностью, отмечено изменение чувствительности к действию ионов Cu и Zn (табл. 3).

**Таблица 3.** Изменения активности мальтазы (% контроля) в кишечнике сеголетков плотвы при действии магнитной бури в присутствии ионов меди и цинка *in vitro* ( $p < 0.05$ ).

Фактор	Изменения амилолитической активности, % от контроля (0 мг/л)				
	Концентрация металла, мг/л				
	0.1	1	5	10	25
Медь					
Контроль	+27	=	=	-10	-36
МБ (48-72 ч)	=	=	=	+10	=
Цинк					
Контроль	-18	-12	+12	=	=
МБ (48-72 ч)	=	+20	+23	+10	+17
Медь и цинк					
Контроль	=	+9	+18	+25	+35
МБ (48-72 ч)	=	+8	+16	+28	+60

При раздельном действии ионов Cu и Zn в контрольном варианте наблюдаются разнонаправленные изменения активности мальтазы. В варианте с МБ отмечено повышение уровня ферментативной активности в присутствии ионов Cu на 10% лишь при концентрации 10 мг/л, в присутствии ионов Zn – на 10–23% в более широком диапазоне концентраций. Зависимости силы эффекта от концентрации ионов Cu и Zn не выявлено. При совместном действии ионов Cu и Zn наблюдается линейное повышение активности мальтазы на 9–35% в контрольном варианте, и на 8–60% в опытном.

Ранее была установлена высокая чувствительность пищеварительных гидролаз плотвы к действию химических (хлорофос, нитрозогуанидин, медь) и физических (МП, температура) факторов в период раннего онтогенеза [2, 6]. Так, действие переменного МП (500 Гц, 150 мкТл) на икру плотвы в течение 60 ч после оплодотворения приводило к росту активности сахаразы в кишечнике, но не изменяло амилолитическую активность. Действие низкочастотного МП (72.5 Гц, 150 мкТл) в период от оплодотворения до гастрюляции повышало амилолитическую активность у сеголеток плотвы, но при этом активность сахаразы снижалась [2].

В нашей работе показано, что гипомагнитные условия не влияют на активность исследованных гликозидаз. Действие МБ на разных отрезках эмбриогенеза приводит к разнонаправленным изменениям активности кишечных гликозидаз. Наибольшие изменения отмечены в первые 48 ч. после оплодотворения. Ранее при исследовании отдаленных последствий действия органических соединений (хлорофос и нитрозогуанидин) в эмбриональный период было установлено, изменение чувствительности гликозидаз молоди плотвы к ионам Cu и Zn *in vitro*. [6]. При исследовании отдаленных последствий действия магнитной бури показано увеличение чувствительности гликозидаз к действию ионов Cu и Zn приводящее к снижению амилолитической активности (максимальное снижение составило 99,6%) и увеличению активности мальтазы (максимальное увеличение составило 60%). Разнонаправленные эффекты на амилолитическую активность (отражающую суммарную активность  $\alpha$ -амилазы, глюкоамилазы и мальтазы) и активность мембранного фермента мальтазы в один и тот же отрезок эмбриогенеза могут быть связаны с неодинаковым влиянием МБ на процессы синтеза панкреатических ( $\alpha$ -амилаза) и собственно кишечных гликозидаз. Поскольку существует несколько изоформ  $\alpha$ -амилазы, глюкоамилазы и мальтазы, нельзя исключить и молекулярную разнокачественность гликозидаз, функционирующих в кишечнике сеголеток плотвы контрольной и опытных групп.

Таким образом, при изучении отдаленных последствий действия МБ на разных отрезках эмбриогенеза установлено изменение активности гликозидаз и их чувствительности к действию ионов меди и цинка у развивающихся сеголеток плотвы. Действие МБ на эмбрионы в отрезок 0–24 ч после оплодотворения вызывает снижение амилолитической активности, активность мальтазы повышается. В отрезок 24–48 ч наблюдается повышение активности всех исследованных ферментов. Гипомагнитные условия не изменяют активность гликозидаз. При действии МБ в интервале 48–72 ч, несмотря на отсутствие изменений уровня ферментативной активности, установлены достоверные изменения чувствительности гликозидаз к действию ионов Cu и Zn. Чувствительность ферментов, гидролизующих крахмал, усиливается в большей мере по сравнению с собственно мембранными ферментами. Полученные данные могут быть использованы для прогнозирования естественного воспроизводства рыб и развития гидролитической функции кишечника в условиях естественных колебаний магнитного поля Земли.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-04-31170-мол\_а.*

#### Список литературы

1. Перевозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб.: Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва, 1999. 228 с.
2. Голованова И.Л., Филиппов А.А., Крылов В.В., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г. Действие магнитного поля и меди на активность гидролитических ферментов у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 2013. Т. 53. № 2. С. 227–232.
3. Krylov V. V., Zotov O.D., Klain B.I. et al. An experimental study of the biological effects of geomagnetic disturbances: The impact of a typical geomagnetic storm and its constituents on plants and animals // J. Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics. 2014. V. 110–111. P. 28–36.
4. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В., Крылов В.В., Петров Д.В. Влияние магнитной бури на активность протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб // Известия РАН. Сер. биологическая. 2014. № 2. С. 161–167.
5. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. 216 с.
6. Filippov A.A., Golovanova I.L. The effect of organic toxicants on sensitivity of intestinal glycosidases to Cu and Zn in juvenile roach // Inland Water Biology. 2012. Vol. 5. № 1. P. 140–146.

УДК 632.95+597:599

#### УРОВНИ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ПТИЦАХ ВОСТОЧНОЙ И ЮГО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ ОХОТСКОГО МОРЯ

В.Ю. Цыганков<sup>1</sup>, М.Д. Боярова<sup>1</sup>, О.Н. Лукьянова<sup>1,2</sup>, Н.К. Христофорова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет  
690950, Владивосток, Приморский край, Россия, [tsig\\_90@mail.ru](mailto:tsig_90@mail.ru)

<sup>2</sup>Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр)  
690091, Владивосток, Приморский край, Россия

<sup>3</sup>Тихоокеанский институт географии ДВО РАН  
690041, Владивосток, Приморский край, Россия

В работе исследуются уровни содержания хлорорганических пестицидов (ГХЦГ и ДДТ) в морских птицах (*Larus schistisagus*, *Aethia cristatella*, *Aethia pusilla*, *Fulmarus glacialis*, *Oceanodroma furcata*), собранных в восточной и юго-восточной части Охотского моря.

*Ключевые слова:* ГХЦГ, ДДТ, морские птицы, Охотское море.

Хлорорганические пестициды являются стойкими токсичными липофильными веществами, запрещенными в большинстве стран мира. На рубеже 1960-70 годов в разных районах мира была отмечена массовая гибель популяций диких птиц. Причиной этого оказалось активное использование ХОП. В результате отравления эндринем погибли куропатки, фазаны; дильдрином – белоголовые орланы, гуси; дихлордифенилтрихлорэтаном (ДДТ) – бакланы, пеликаны, чайки; линданом – скворцы [1, 3, 9].

После запрета пестицидов гибель птиц значительно снизилась, но случаи гибели от отравления ХОП продолжались. Важно, что, на территориях, загрязненных ХОП, птицы особенно чувствительны к другим группам химических токсикантов. Например, присутствие

дихлордифенилдихлорэтилена (ДДЕ) маскирует эффект отрицательного воздействия ртути на репродуктивные функции [1, 4].

В ряде экспериментов были выявлены критические концентрации ХОП в мозге птиц. Летальные дозы пестицидов являются видоспецифичными и находятся в диапазоне от 4 (для желтушника и японского перепела) до 65 (для воробьев) мг/кг [7].

В Великобритании впервые была отмечена корреляция между истончением яичной скорлупы и ухудшением размножения популяций сокола-сапсана и ястреба-перепелятника в местах использования стойких хлорорганических инсектицидов. Толщина скорлупы уменьшилась к концу 1960-х годов, по сравнению с 1940 годом, у 9 из 17 исследованных видов на 5-19%. Исследования в Соединенных штатах Америки и Канаде тоже выявили некоторую степень истончения скорлупы. Толщина и вес скорлупы уменьшились на 20% у многих видов птиц [6, 7, 8].

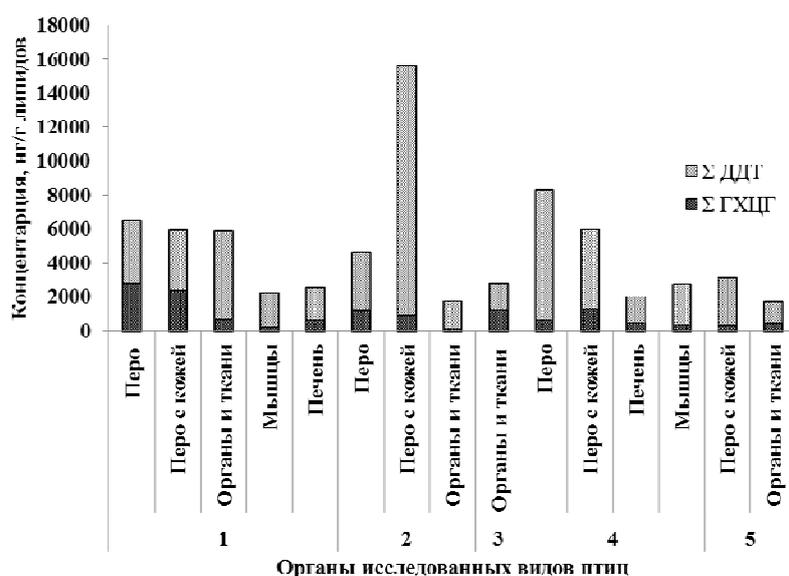
Птицы являются полезными биоиндикаторами для мониторинга загрязнения хлорорганическими поллютантами окружающей среды, поскольку часто они находятся на высоком трофическом уровне пищевой пирамиды. Неперелетные птицы могут отражать фоновое загрязнение мест своего обитания. Если же локальных источников загрязнения нет, то они отражают глобальное загрязнение в результате трансграничного переноса вещества и энергии [5, 6].

Целью данной работы явилось определение концентрации изомеров гексахлорциклогексана (ГХЦГ), ДДТ и его метаболитов (дихлордифенилдихлорэтан (ДДД), ДДЕ) в морских птицах восточной и юго-восточной части Охотского моря.

Исследовано 13 образцов птиц, собранных в июне и октябре 2012 г., принадлежащих к 5 видам (тихоокеанская чайка *Larus schistisagus*, большая конюга *Aethia cristatella*, конюга-крошка *Aethia pusilla*, глупыш *Fulmarus glacialis* (белая и темная морфы), серая качурка *Oceanodroma furcata*) из восточной и юго-восточной части Охотского моря. Исследованы различные органы, в зависимости от размера птиц: перо, перо с кожей, печень, мышцы, тушки целиком.

Липиды извлекали из гомогенизированных органов экстракцией *n*-гексаном с последующим разрушением жировых компонентов концентрированной серной кислотой [2]. Определение массового содержания хлорорганических пестицидов в биоматериале выполняли на газовом хроматографе Shimadzu GC-16A с детектором электронного захвата ECD. Капиллярная колонка Shimadzu HiCap CBP5. Температура колонки – 210°C, инжектора – 250°C, детектора – 280°C. Газ-носитель – аргон, давление на входе – 2 кг/см<sup>2</sup>, делитель потока 1:60, скорость потока газа-носителя через колонку – 0,5 мл/мин. Для идентификации индивидуальных веществ использовали рабочие стандартные растворы ХОП в диапазоне концентрации 1-100 мкг/мл.

ХОП были обнаружены во всех исследованных образцах. Общее содержание пестицидов в органах различных птиц варьировало от 13 до 16095 нг/г липидов. В перьях диапазон значений составил от 29 до 8289 нг/г липидов, в перьях с кожей – от 1568 до 16095, в печени – от 1680 до 2478, в мышцах – от 2230 до 3000, в тушках – от 13 до 15113 нг/г липидов. Средние суммарные концентрации пестицидов в отдельных органах приведены на рис. 1.



**Рис. 1.** Средняя суммарная концентрация ХОП (сумма изомеров ГХЦГ, ДДТ и его метаболитов) в органах морских птиц: 1 – глупыш *Fulmarus glacialis* (белая и темная морфы), 2 – большая конюга *Aethia cristatella*, 3 – конюга-крошка *Aethia pusilla*, 4 – тихоокеанская чайка *Larus schistisagus*, 5 – серая качурка *Oceanodroma furcata*.

$\gamma$ -ГХЦГ обнаружен только в некоторых пробах: в перьях и перьях с кожей глупышей в диапазоне 178-468 нг/г липидов, в печени тихоокеанской чайки концентрация составила 160 нг/г липидов,  $\beta$ -ГХЦГ – в единичных образцах: в июне в перьях большой конюги, в тушке крошечной конюги; в октябре в печени глупыше. Общий диапазон  $\beta$ -ГХЦГ составлял 555-1152 нг/г липидов.  $\alpha$ -ГХЦГ найден практически во всех образцах от 161 до 3025 нг/г липидов, за исключением глупыша и тихоокеанской чайки.

В тушках максимальные концентрации ХОП наблюдаются у глупышей (5816 нг/г липидов), минимальные – у серой качурки (1705 нг/г липидов).

В перьях максимальная суммарная концентрация ХОП выявлена у тихоокеанской чайки, минимальная – у глупыша (всего 29 нг/г, тогда как у чайки 8289 нг/г липидов).

В перьях с кожей максимальная концентрация суммы ХОП и суммы метаболитов ДДТ была выявлена у большой конюги (16095 и 15276 нг/г липидов, соответственно), минимальная – у тихоокеанской чайки (1568 и 1016 нг/г липидов, соответственно).

Разный уровень аккумуляции пестицидов у отдельных видов в первую очередь отражает пищевые особенности, состав рациона, миграции, содержание жира в отдельных органах. Следовательно, северные виды птиц – модели глобального загрязнения хлорорганическими поллютантами, которые демонстрируют актуальность международной проблемы загрязнения водной и воздушной сред жизни.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №12-04-32043/13 и Программы «Научный фонд» ДВФУ № 12-04-13000-33/13.*

#### Список литературы

1. Ровинский Ф.Я., Воронова Л.Д., Афанасьев М.И. и др. Фоновый мониторинг загрязнения экосистем суши хлорорганическими соединениями. Л.: Гидрометеиздат. 1990. 270 с.
2. Цыганков В.Ю., Боярова М.Д. Способ подготовки пробы для газохроматографического определения пестицидов в биоматериале / Федеральный институт промышленной собственности (ФИПС). Заявка на изобретение № 2013144081 RU от 01.10.2013.
3. Jorundsdottir H., Iofstrand K., Svavarsson J. et al. Organochlorine Compounds and Their Metabolites in Seven Icelandic Seabird Species – a Comparative Study // Environ. Sci. Technol. 2010. Vol. 44. P. 3252–3259.
4. Knudsen L.B., Sagerup K., Polder A. et al. Halogenated organic contaminants and mercury in dead or dying seabirds on Bjornoya (Svalbard). Norwegian polar institute. 2007. 45 p.
5. Kunisue T., Watanabe N., Subramanian A.N. et al. Accumulation features of persistent organochlorines in resident and migratory birds from Asia // Environ. Pollut. 2003. Vol. 125. P. 157-172.
6. Quemerais B., Lemieux C., Lum K.R. Concentrations and sources of PCBs and organochlorine pesticides in the St. Lawrence River (Canada) and its tributaries // Chemosphere. 1994. Vol. 29. №3. P. 591-610.
7. Tanabe S., Subramanian A. Bioindicators of POPs: Monitoring in Developing Countries. Publisher: Trans Pacific Press. Japan. 2006. 190 p.
8. Tanabe S., Tanaka H., Tatsukawa R. Polychlorobiphenyls, DDT and hexachlorocyclohexane isomers in the Western North Pacific ecosystem // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1984. № 13. P. 731-738.
9. Wania F., Mackay D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants // Environ. Sci. Technol. 1996. Vol. 30. №9. P. 390-396.

УДК 57.044

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОФОБНОГО АДСОРБЕНТА «РУССОРБ» ДЛЯ УДАЛЕНИЯ НЕФТИ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДЫ, ВЛИЯНИЕ НА АДАПТАЦИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ГИДРОБИОНТОВ**

Г.В. Шведчиков, Е.А. Мовчан, Н.В. Кулева

*Санкт-Петербургский государственный университет  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9, Россия, kuleva@mail.ru*

В работе смоделирован процесс удаления нефти из водной среды отечественным гидрофобным адсорбентом Руссорб, запатентованным Шведчиковым Г.В., и показано, как влияет нефть и удаление ее сорбентом на жизнеспособность жаброногих ракообразных *Artemia salina*.

*Ключевые слова:* гидрофобный адсорбент, нефть, жизнеспособность гидробионтов.

Борьба с загрязнением водной среды нефтью превратилась в одну из важнейших проблем на Земле. Добыча нефти в непосредственной близости от рек в Тюменской области, республике Коми

и других нефтедобывающих регионах приводит к тому, что жителям приходится пользоваться речной водой с повышенной концентрацией нефтепродуктов. Экспериментально установлены нефротоксический и бластомогенный эффекты сырой нефти.

При разливах на поверхности воды образуется нефтяная пленка, которая препятствует газообмену между водной и воздушной средой, в связи с чем значительно сокращается количество растворенного в воде кислорода и увеличивается количество углекислого газа. Это затрудняет жизнедеятельность аэробных гидробионтов, приводит к гибели промысловых рыб. Нефтяная пленка преграждает доступ не только кислороду, но и свету. Уменьшение светового потока приводит к гибели фитопланктона, составляющего основу кормовой базы гидробионтов и определяющего стабильное развитие морских и пресноводных экосистем.

Поэтому разработка методов удаления нефтяных загрязнений является актуальной задачей экологической токсикологии. Существуют термические, механические, химические, микробиологические и физико-химические методы ликвидации разливов нефти. В практике борьбы с разливами нефти довольно часто используются детергенты, эмульгирующие нефтяную пленку. Их количество может достигать 25 процентов от массы нефти, а их токсичность для гидробионтов оказывается выше, чем самой нефти. Эмульгированная нефть легко проникает в организм гидробионтов и может в них накапливаться.

С экологической точки зрения из веществ, связывающих нефть, относительно безопасными могут быть плавающие на поверхности воды вещества при условии их последующего удаления. Такие сорбенты с высокой степенью плавучести и высокой поглощательной способностью (8–10 кг нефти на 1 кг сорбента) одновременно должны быть безопасными для гидробионтов.

В качестве такого сорбента можно использовать активированный уголь, но он очень дорог и трудно наносится на поверхность воды. Гораздо удобнее нанести на поверхность воды, обладающие большой плавучестью сорбенты, приготовленные из природных пористых материалов. Для придания им лучших адсорбционных свойств на их гранулы наносят вещества, придающие им гидрофобные и олеофильные свойства. Одним из таких сорбентов является полученный на опытно-промышленной установке адсорбент «Руссорб». Его преимущества перед другими сорбентами заключаются в следующем.

1. Высокая эффективность поглощения и удержания нефтепродуктов.
2. 100-процентная флотационная способность как чистого, так и насыщенного нефтью сорбента.
3. Стабильность свойств сорбента при длительном контакте с водной средой и почвой.
4. Возможность извлечения сорбированного нефтепродукта с сохранением его исходных характеристик.
5. Возможность использования сорбента в безотходном экологически безопасном цикле сорбция-регенерация-сорбция.
6. Возможность простой безопасной утилизации насыщенного нефтью сорбента (в качестве топлива или добавления в асфальтовую массу).

Сорбент «Руссорб» поглощает не только нефть, но и ряд ароматических углеводородов: бензол, толуол, ксилол и др. Сорбент запатентован в России – Патент РФ №2255804 Шведчиков Г.В. Способ получения сорбента для нефти, нефтепродуктов и жидких углеводородов. Бюлл. изобретений (2005) №19. Патент РФ №2340393. Шведчиков Г.В. Способ получения сорбента для жидких углеводородов. Бюлл. Изобретений(2008) №34.

Сорбент прошел биотестирование на клеточном тест-объекте (гранулированной сперме быка) и оценку острой токсичности на дафниях в Санкт-Петербургском лабораторном центре Госсанэпиднадзора. В остром опыте была продемонстрирована его безвредность для дафний.

Цель настоящей работы – смоделировать процесс удаления нефти из водной среды сорбентом «Руссорб» в модельной системе, содержащей биообъекты, и показать, как меняется их жизнеспособность в зависимости от времени экспозиции с нефтью и сорбентом «Руссорб»:

- а) в присутствии различных концентраций нефти (серия опытов 1)
- б) после удаления нефти сорбентом (серия опытов 2)
- в) в присутствии и нефти и сорбента (серия опытов 3)
- г) в присутствии одного сорбента (серия опытов 4).

Исследования проводились с использованием в качестве тест-объекта науплиальных стадий жаброногих ракообразных *Artemia salina* L.- вида, широко распространенного в солоноватоводных водоемах. Рачки *Artemia* хорошо разводятся в аквариумах, в первые дни могут нормально существовать без кормления, рекомендованы в качестве тест-объекта для изучения различного вида загрязнений водной среды.

В сериях опытов 1–3 нефть добавляли в концентрациях 2,5, 10, 20, 40,75 мл на 1 л воды.

В серии 4 сорбент добавляли в количестве необходимом для удаления соответствующей концентрации загрязняющего вещества, что составляло от 15 до 150 мг. В ходе предварительного эксперимента было установлено, что имеет значение не количество сорбента, а степень покрытия им водной поверхности.

Для эксперимента брали двухдневных науплиусов, выведенных в лабораторных условиях и содержащихся при температуре 20–22 °С. Регистрировали особенности поведения и смертность животных, которую выражали в процентах. Смертность определяли тотальным просмотром экспериментальных сосудов под бинокляром МБС-1.

В сосуды емкостью 20 мл помещали 100 особей. Результаты отслеживали через 12, 24, 36, 48 и 60 часов.

Результаты эксперимента серии 1 показывают, что основной отход организмов под действием токсиканта происходит на 3-и сутки, в загрязненной воде погибало от 49 до 84 процентов организмов. В серии 2, когда нефтяное загрязнение было убрано сорбентом, смертность составила 26–42 процента (табл.).

В серии 3, с оставленным отработанным сорбентом, отмечен максимальный отход особей. В серии 4 смертность организмов на третьи сутки эксперимента составила от 4 до 18 процентов, причем в первые 24 часа она была нулевой.

Наблюдения за поведением науплиусов показали, что в загрязненной воде организмы в основном находятся в подавленном состоянии; они скапливаются у дна, движения судорожные. В течение третьих суток в поведении организмов в загрязненной и очищенной воде заметны явные различия. В первом случае они малоподвижны, во втором основная масса нормально подвижных особей находится в толще воды.

По-видимому, причиной массовой гибели организмов через 60 часов экспонирования с нефтью является накопление дефицита кислорода в сосуде с гидробионтами и резкое увеличение у них гипоксии. Показателем этого служит поведение науплиусов.

**Таблица.** Смертность науплиусов *Artemia salina* через 60 часов экспонирования с нефтью различной концентрации до и после обработки сорбентом.

Концентрация нефти, мл/л	Смертность до обработки сорбентом, %	Смертность после обработки сорбентом, %
2	49	26
5	70	41
10	51	36
20	84	42
40	72	35
75	70	38
Контроль	9	

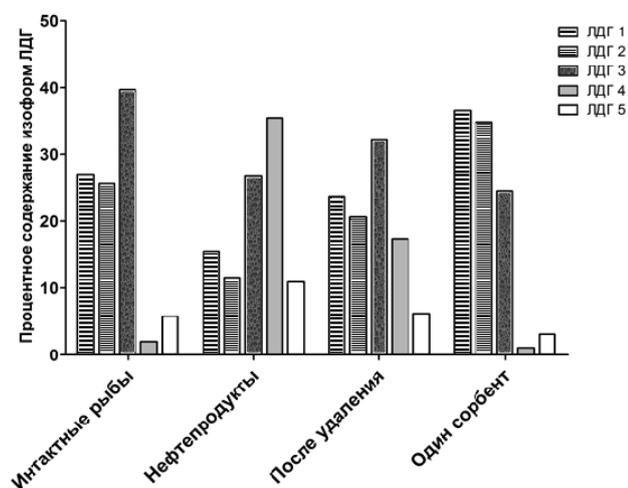
Величина положительного эффекта применения сорбента и его четкое проявление на третьи сутки после разлива нефти позволяют предположить, что он главным образом связан с механической очисткой поверхности водной среды от нефтяной пленки.

У животных гипоксия вызывает множество физиологических реакций, которые улучшают доставку кислорода тканям или толерантность к клеточной гипоксии. Молекулярные основы этих реакций достаточно хорошо изучены у млекопитающих, у них ключевую роль играют индуцируемые гипоксией транскрипционные факторы (HIFs). Это семейство транскрипционных факторов состоит из разнообразных альфа-субъединиц, образующихся при гипоксическом состоянии организма, димеризующихся с бета-субъединицами и связывающимися с регуляторными областями генов-мишеней. При этом изменяются скорости экспрессии более 70 генов, участвующих в регуляции роста сосудов, формировании эритроцитов, метаболизме железа и катехоламинов, а также утилизации и метаболизме глюкозы [1].

Недавние исследования гипоксии у рыб обнаружили сходство их механизмов с таковыми млекопитающих и показали, что при гипоксии усиливается транскрипция консервативных в эволюции генов [2]. В частности у толерантных к гипоксии рыб вида *Fundulus heteroclitus* усиливается экспрессия в печени более древней, участвующей в анаэробном гликолизе формы лактатдегидрогеназы В[3]. Также было показано, что степень индукции экспрессии гена Ldh В, вызванная гипоксией, зависит от уровня и продолжительности гипоксии. При содержании кислорода 0.5 % экспрессия увеличивалась в 4–5 раз и становилась максимальной через 48 часов.

Интересно, что при искусственном загрязнении водной среды нефтью увеличение экспрессии анаэробных изоформ лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в крови устойчивых к гипоксии ротанов *Percottus*

*glehni* Dybowski также наблюдали на третьи сутки [4]. У интактных рыб (см. рисунок) представительство анаэробных изоформ ЛДГ 5 и 4 минимально, при добавлении в воду нефтепродуктов оно значительно повышалось (более 40%). При удалении сорбентом нефти оно становилось суммарно менее 15 %. При этом добавление и последующее удаление адсорбента в отсутствие нефти не изменяло этот показатель по сравнению с контрольными интактными рыбами.



**Рисунок.** Изменение состава изоферментов ЛДГ в крови устойчивых к гипоксии рыб при воздействии на них нефти и после удаления ее с помощью сорбента «Руссорб».

Можно полагать, что у ракообразных существуют аналогичные механизмы адаптации, повышающие их устойчивость к гипоксии и позволяющие им сохранять жизнеспособность при образовании нефтяной пленки на поверхности воды. Поэтому освобождение их от нефтяной пленки с помощью сорбента «Руссорб» после 12–60 часов экспозиции с нефтью обнаруживает повышение их жизнеспособности по сравнению с загрязненной водой.

Известно, что сырая нефть содержит парафиновые, ароматические и полициклические углеводороды. Лабораторные исследования по экспонированию рыб в воде с сырой нефтью обнаружили индукцию систем цитохрома P450 в их тканях, однако достаточных доказательств, позволяющих связать эти наблюдения с токсичностью полициклических углеводородов для рыб, получено не было [5].

Поэтому основной причиной уменьшения жизнеспособности биообъектов при контакте с нефтью является гипоксия, появляющаяся в результате нарушения газообмена между водной и воздушной средой.

Удаление сорбентом «Руссорб» нефтяной пленки и удаление после этого использованного сорбента является оптимальной мерой для значительного увеличения жизнеспособности ракообразных *Artemia salina* независимо от концентрации нефти (в диапазоне 5–75 мл/л) и времени экспонирования (12–60 часов).

#### Список литературы

1. Firth J.D., Ebert B.L., Ratcliffe P.J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem.* 1995, 270 (36), p.21021-21027.
2. Nikinmaa M, Rees BB Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005, 288(5) p.1079-1090.
3. Rees B.B., Figueroa YG, Wiese TE, Beckman BS, Schulte PM. A novel hypoxia-response element in the lactate dehydrogenase-B gene of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol.* 2009, 154(1), p.70-77.
4. Кулева Н.В., Шведчиков Г.В. Применение молекулярных биомаркеров для оценки состояния водной среды. Сб. тезисов 22 Всеросс. съезда физиологов, Волгоград, Волгомед, 2013, с.281.
5. Lee R.F., Anderson J.W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Mar Pollut Bull.* 2005; 50(7), p.705-723.

УДК 628.394.6:

**ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАРБОКСАМИДНЫХ ФУНГИЦИДОВ  
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ЭМБРИОНАЛЬНОЕ И РАННЕЕ ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ  
РАЗВИТИЕ БЫЧКОВЫХ И ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

Н.И. Щербакова, О.А. Зинчук, Е.С. Строева

ФГУП «АзНИИРХ»

344002 Ростов-на-Дону, ул. Береговая, 21в, Россия, riasfp@aanet.ru

В работе исследуется влияние карбоксаимидных фунгицидов нового поколения Этабоксама и Боскалида на эмбриональное и раннее постэмбриональное развитие бычковых и осетровых рыб. Показано, что карбоксаимидные фунгициды в пороговых концентрациях вызывают нарушения эмбриогенеза, замедляют рост мальков бычка-кругляка и предличинок осетровых рыб, проявляют выраженное тератогенное действие, способствуя развитию необратимых патоморфологических изменений. Установленные пороги чувствительности осетровых и бычковых рыб к действию фунгицидов позволяют определить, что для рыб, находящихся на ранних стадиях развития, Боскалид токсичнее Этабоксама. Наибольшее токсическое действие Боскалид проявляет по отношению к эмбрионам и малькам бычка-кругляка. Его пороговая концентрация для эмбрионов и мальков бычка-кругляка по результатам всех проведенных исследований составила 0.1 мг/л. Дается оценка тератогенного риска карбоксаимидных фунгицидов для бычковых и осетровых рыб.

Пестицидное загрязнение является существенным экологическим фактором, который вызывает ухудшение условий жизнедеятельности и воспроизводства гидробионтов, играющих важную роль в биологической продуктивности и формировании качества воды водоемов. Выполнялись исследования по оценке степени токсического действия фунгицидов нового поколения – карбоксаимидов Этабоксама и Боскалида на эмбрионов и мальков бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus (Pallas)*), эмбрионов и предличинок осетровых рыб – бестера (*Huso huso L. x Acipenser ruthenus L.*) и осетра (*Acipenser guldenstaedti*).

Икра бычка-кругляка собиралась в природном морском водоеме (Таганрогский залив) в период массового нереста. Оплодотворенную в естественных условиях икру на стадии ранней гаструлы снимали с субстрата и помещали в емкости с растворами фунгицидов. Продолжительность эксперимента составляла 14 суток. Икра осетровых была получена в заводских условиях и затравлена на стадии четырех бластомеров. Продолжительность эксперимента от начала дробления до выклева составляла 5 суток.

Токсическое действие карбоксаимидов на развивающихся эмбрионов рыб оценивали по следующим показателям: выживаемость, длительность инкубационного периода, скорость прохождения стадий, патоморфологические признаки выклюнувшихся рыб.

Влияние фунгицидов на раннее постэмбриональное развитие изучали на мальках бычка-кругляка, выклюнувшихся в лабораторных условиях, и на предличинках осетровых рыб, полученных в производственных условиях. Экспозиция опытов на мальках бычка-кругляка составляла 7 суток, на предличинках осетровых рыб – 6 суток (от выклева до полного рассасывания желточного мешка). В течение экспериментов наблюдали за выживаемостью и поведенческими реакциями мальков и предличинок. В конце опытов определяли темп линейного и весового роста организмов, проводили тератологический анализ. У предличинок осетровых оценивали скорость рассасывания желточного мешка по содержанию общих липидов на 6-е сутки эксперимента.

Исследования токсического действия карбоксаимидов на эмбриональное развитие рыб показали, что с увеличением концентраций фунгицидов возрастала длительность инкубационного периода, увеличивалось количество аномальных эмбрионов, снижалась выживаемость оплодотворенной икры бычка-кругляка и осетровых рыб (таблица 1). Расчет токсикометрических параметров производился на основе показателя выживаемости эмбрионов. Недействующие, пороговые и среднететальные концентрации фунгицидов позволили определить, что Этабоксам и Боскалид обладают высокой степенью токсичности для исследуемых организмов.

В растворах со всеми исследованными концентрациями фунгицидов (0.1–5.0 мг/л) период гаструляции эмбрионов бычка-кругляка проходил синхронно с контролем. В дальнейшем в растворах Этабоксама и Боскалида с концентрациями 0.5–5.0 мг/л отмечено специфическое лизирующее действие фунгицидов на зародышевую оболочку. Оболочка эмбрионов размягчалась, истончалась, теряла свою упругость, что приводило к преждевременному выклеву несформированных зародышей на 6–10 сутки эмбриогенеза и их гибели. В растворах Этабоксама с концентрацией 5.0 мг/л и Боскалида с концентрацией 2.5 мг/л погибли все эмбрионы бычка-

кругляка, высокая гибель отмечалась также в растворах фунгицидов с концентрацией 1.0 мг/л. Этабоксам в концентрации 0.1 мг/л и Боскалид в концентрации 0.05 мг/л не оказывали токсического действия на развитие эмбрионов бычка-кругляка.

**Таблица 1.** Выживаемость и показатели эмбриогенеза бычковых и осетровых рыб при действии карбоксамидов, рассчитанные токсикометрические параметры

Объект исследований	Концентрация, мг/л	Длительность инкубационного периода, сутки	Количество уродливых особей на выклев*, %	Гибель*, %	Токсикометрические параметры, мг/л
<b>Этабоксам</b>					
Эмбрионы бычка-кругляка	0.1	14	0	0	ЛК <sub>16</sub> =0.31
	0.5	14	0	21.43	ЛК <sub>50</sub> =1.54
	1.0	10	8.0	42.86	ЛК <sub>84</sub> =3.52
	5.0	-	-	100.00	
Эмбрионы осетра	0.1	5.5	0	0	ЛК <sub>16</sub> =0.21
	0.5	5.1	23.91	19.3	ЛК <sub>50</sub> =0.74
	1.0	4.5	78.57	75.44	ЛК <sub>84</sub> =2.58
	5.0	-	-	100.00	
<b>Боскалид</b>					
Эмбрионы бычка-кругляка	0.05	14	0	0	ЛК <sub>16</sub> =0.14
	0.1	14	0	16.67	ЛК <sub>50</sub> =0.45
	0.5	14	0	22.22	ЛК <sub>84</sub> =1.43
	1.0	10	14.28	80.56	
	2.5	-	-	100.00	
Эмбрионы бестера	0.1	4.4	0	0	ЛК <sub>16</sub> =0.25
	0.25	4.8	0	15.09	ЛК <sub>50</sub> =0.49
	0.5	5.4	15.56	73.58	ЛК <sub>84</sub> =0.70
	1.0	-	-	100.0	

Примечание.\* – Количество уродливых и погибших особей в растворах фунгицидов представлено с учетом наблюдаемой патологии и естественной гибели в контроле (поправка Аббота).

Периоды дробления и гастрюляции эмбрионов осетровых рыб проходили синхронно с контролем в растворах Этабоксама и Боскалида с концентрацией 0.1–0.5 мг/л. Массовая гибель эмбрионов осетровых в растворах фунгицидов наблюдалась в периоды гастрюляции и особенно нейруляции. В растворах Этабоксама с концентрацией 5.0 мг/л и Боскалида с концентрацией 1.0 мг/л погибли все эмбрионы, высокий процент гибели отмечался также в растворах с концентрациями 1.0 мг/л Этабоксама и 0.5 мг/л Боскалида. Этабоксам в растворах с концентрациями 0.5–5.0 мг/л оказывал лизирующее действие на зародышевые оболочки осетра, аналогичное таковому в эксперименте с бычком-кругляком. Преждевременно (на стадиях 30–33) зародыши выходили из оболочек несформированные, имеющие многочисленные признаки аномального развития, что способствовало их быстрой гибели. Чем выше была концентрация, тем большее количество эмбрионов подвергалось разрушающему действию фунгицида, а время инкубации икры сокращалось. Так, в концентрации Этабоксама 0.5 мг/л длительность инкубационного периода составила 5.08 суток, в концентрации 1.0 мг/л – 4.5 суток. В максимальной концентрации 5.0 мг/л гибель эмбрионов наступила на 30–31 стадиях развития. В растворах Боскалида с концентрацией 0.5 мг/л наблюдалось отставание в развитии эмбрионов с конца гастрюляции. Выклев наступил на сутки позже. В растворах с концентрацией Боскалида 0.25 мг/л развитие эмбрионов проходило синхронно с контрольной группой вплоть до 35–36 стадий развития, однако выклев наступил на 6 часов позже и был растянут во времени. Этабоксам и Боскалид в концентрации 0.1 мг/л не оказывали токсического действия на развитие эмбрионов осетровых рыб.

Следующая серия опытов была проведена на мальках бычка-кругляка и предличинках осетровых рыб. Рассчитанные на основе показателя выживаемости рыб среднелетальные концентрации позволили определить, что по степени острой токсичности Этабоксам и Боскалид относятся к группе малотоксичных пестицидов для предличинок осетровых рыб (50.0 мг/л < ЛК<sub>50</sub> < 500.0 мг/л), в то время как для мальков бычка-кругляка Этабоксам является среднетоксичным (5.0 мг/л < ЛК<sub>50</sub> < 50.0 мг/л), Боскалид – высокотоксичным.

**Таблица 2.** Выживаемость и токсикометрические параметры карбоксамидов для бычка-кругляка и осетровых рыб

Объект исследований	Экспозиция опыта, сутки	Концентрация, мг/л	Гибель, %	Токсикометрические параметры, мг/л	Экспозиция опыта, сутки	Концентрация, мг/л	Гибель, %	Токсикометрические параметры, мг/л
<b>Этабоксам</b>								
Мальки бычка-кругляка	3	1.0	0	ЛК <sub>16</sub> =2.53 ЛК <sub>50</sub> =8.98 ЛК <sub>84</sub> =31.83	7	0.5	0	ЛК <sub>16</sub> =0.82 ЛК <sub>50</sub> =1.67 ЛК <sub>84</sub> =3.39
		2.5	10.0			1.0	10.0	
		5.0	35.0			2.5	80.0	
		10.0	45.0			5.0	100.0	
Предличинки осетра	2	5.0	0	ЛК <sub>16</sub> =45.75 ЛК <sub>50</sub> =73.47 ЛК <sub>84</sub> =92.43	6	0.5	0	ЛК <sub>16</sub> =1.98 ЛК <sub>50</sub> =14.62 ЛК <sub>84</sub> =39.94
		10.0	0			1.0	10	
		50.0	20.0			5.0	25	
		100.0	100.0			10.0	40	
<b>Боскалид</b>								
Мальки бычка-кругляка	3	0.1	0	ЛК <sub>16</sub> =0.20 ЛК <sub>50</sub> =0.71 ЛК <sub>84</sub> =2.54	7	0.05	0	ЛК <sub>16</sub> =0.15 ЛК <sub>50</sub> =0.51 ЛК <sub>84</sub> =0.95
		0.5	30.0			0.1	10.0	
		1.0	70.0			0.5	40.0	
		5.0	100.0			1.0	100.0	
Предличинки бестера	2	10.0	0	ЛК <sub>16</sub> =23.74 ЛК <sub>50</sub> =56.47 ЛК <sub>84</sub> =90.95	6	0.5	0	ЛК <sub>16</sub> =0.77 ЛК <sub>50</sub> =1.63 ЛК <sub>84</sub> =3.42
		25.0	20.0			1.0	20.0	
		50.0	35.0			2.5	75.0	
		100.0	100.0			5.0	100.0	

Клиническая картина отравления мальков бычка-кругляка и предличинки осетровых в растворах с высокими концентрациями фунгицидов характеризовалась следующими симптомами: с первых часов интоксикации у рыб нарушалась двигательная активность, они залегали на дно экспериментальных сосудов, периодически совершали скачкообразные движения и всплывали к поверхности. С увеличением времени воздействия развивалась полная потеря двигательной активности, снижение реакции на механическое раздражение (укол иглой).

Результаты изучения развития мальков бычка-кругляка, предличинки осетра и бестера при действии карбоксамидов представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Морфометрические показатели мальков бычка-кругляка и предличинки осетровых рыб при действии карбоксамидов

Тест-объект	Экспозиция опыта, сутки	Концентрация, мг/л	Длина, мм	Масса, мг
<b>Этабоксам</b>				
Мальки бычка-кругляка	7	Контроль	8.76±0.153	3.87±0.157
		0.1	8.82±0.134	3.79±0.104
		0.5	8.31±0.189	3.56±0.100
		1.0	8.61±0.098	3.12±0.203*
Предличинки осетра	6	Контроль	19.84±0.18	38.26±0.59
		0.5	19.58±0.18	38.19±0.98
		1.0	19.07±0.16*	37.72±1.43
		5.0	18.51±0.27*	32.91±1.58*
<b>Боскалид</b>				
Мальки бычка-кругляка	7	Контроль	7.99±0.184	5.0±0.512
		0.05	7.82±0.176	3.81±0.609
		0.1	7.82±0.148	3.49±0.250*
		0.5	7.77±0.867	3.68±2.93*
Предличинки бестера	6	Контроль	20.99±0.09	34.45±0.52
		0.1	20.96±0.13	34.67±0.70
		0.25	20.33±0.15*	28.23±0.62*
		0.5	17.78±0.15*	22.56±0.44*

Примечание: \* – Различия по сравнению с контролем достоверны (p>0.05)

Действие фунгицидов на мальков бычка-кругляка проявлялось в снижении массы рыб, при этом линейные размеры мальков соответствовали росту контрольных организмов. В растворах с концентрацией Этабоксама 1.0 мг/л весовой рост мальков бычка-кругляка снижался на 19 %, а в растворах с концентрациями Боскалида 0.1 и 0.5 мг/л расхождение с контролем составило 26 и 30%.

С увеличением концентраций Этабоксама и Боскалида происходило снижение темпа линейного и весового роста предличинки осетровых рыб. Длина предличинки осетра, развивающихся в опытных растворах Этабоксама с концентрациями 1.0 и 5.0 мг/л, была достоверно ниже контроля на 4 и 7 % соответственно. Масса предличинки осетра снижалась на 14 % только в максимальной концентрации Этабоксама 5.0 мг/л. При действии Боскалида происходило более существенное угнетение линейного и весового роста предличинки бестера. В растворах Боскалида с концентрациями 0.25 и 0.5 мг/л длина предличинки бестера была ниже контрольных величин на 3–15 %, а масса на 18–35 %.

Морфогенез и рост являются ведущими процессами в постэмбриональный период развития рыб, при этом происходит интенсивное расходование желточной массы. Под влиянием пестицидов утилизация желтка может изменяться, что является показателем эффективности его конвертирования в массу личинок. Результаты наблюдений за скоростью рассасывания желточного мешка у предличинки осетровых рыб под влиянием фунгицидов представлены в таблице 4.

Количество общих липидов у предличинки осетра, развивающихся в растворах Этабоксама с концентрацией 5.0 мг/л, было выше на 29 %, чем у предличинки в контроле. При действии Боскалида расхождение с содержанием общих липидов у контрольных особей было еще более выражено. В растворах Боскалида с концентрациями 0.25 и 0.5 мг/л количество липидов у предличинки бестера превышало контрольные значения на 120 и 243 % соответственно. Увеличение содержания общих липидов у предличинки осетровых рыб на фоне снижения темпов линейного и весового роста свидетельствует о замедлении скорости рассасывания желточного мешка и нарушении липидного обмена при действии карбоксамидов.

**Таблица 4.** Содержание общих липидов у предличинки осетровых рыб на 6-е сутки действия карбоксамидов

Объект исследований	Фунгицид	Концентрация, мг/л	Содержание общих липидов, мг %
Предличинки осетра	Этабоксам	Контроль	2.87±0.29
		0.5	2.98±0.17
		1.0	3.01±0.30
		5.0	3.72±0.11*
Предличинки бестера	Боскарид	Контроль	1.28±0.35
		0.1	2.07±0.44
		0.25	2.81±0.41*
		0.5	4.39±0.45*

Примечание: \* – Различия по сравнению с контролем достоверны ( $p > 0.05$ )

Установленные пороги чувствительности осетровых и бычковых рыб к действию фунгицидов позволили определить, что для рыб, находящихся на ранних стадиях развития, Боскарид токсичнее Этабоксама. Наибольшее токсическое действие Боскарид проявлял по отношению к эмбрионам и малькам бычка-кругляка, для которых он был высоко токсичен уже в острых экспериментах. Его пороговая концентрация для эмбрионов и мальков бычка-кругляка по результатам всех проведенных исследований составила 0.1 мг/л.

Оценка тератогенной опасности карбоксамидов. Тератологический анализ, проведенный на стадии выклева рыб, показал, что у эмбрионов бычка-кругляка в растворах карбоксамидов с концентрацией 1.0 мг/л наблюдалось искривление туловищного и хвостового отделов тела, нарушение пигментации покровов тела (рисунок 1). Фунгициды в концентрации 0.5 мг/л не оказывали тератогенного действия на выклюнувшихся эмбрионов бычка-кругляка.



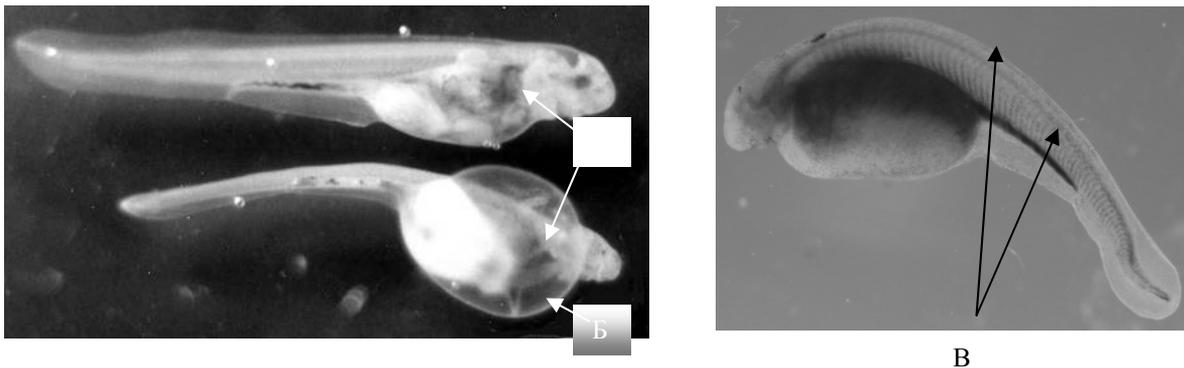
**Рис. 1.** Тератогенные эффекты карбоксамидов у выклюнувшихся эмбрионов бычка-кругляка

Для выклюнувшихся эмбрионов осетровых рыб степень тератогенного действия *Этабоксама* носила дозозависимый характер – с увеличением концентраций возрастало количество патоморфологических признаков. В растворах Этабоксама с концентрациями 0.5 и 1.0 мг/л у эмбрионов осетра наблюдалась водянка перикардиальной полости, кровоизлияния в перикардиальной полости и области печени, дефект плавниковой оторочки (отсутствие в туловищной части тела), С-образное искривление туловища (рисунок 2).

В растворах Боскалида с концентрацией 5.0 мг/л у выклюнувшихся эмбрионов бестера был выявлен только один тип патологии – С-образное искривление туловища.

В растворах с концентрацией 0.1 мг/л Этабоксама и 1.0–2.5 мг/л Боскалида тератогенного действия фунгицидов на выклюнувшихся эмбрионов осетровых рыб не выявлено.

Тератологический анализ, проведенный в период постэмбрионального развития рыб, показал, что Этабоксам и Боскалид в исследованном диапазоне концентраций 0.1–10.0 мг/л и 0.05–1.0 мг/л не оказывали тератогенного действия на мальков бычка-кругляка.



**Рис. 2.** – Тератогенные эффекты *Этабоксама* у выклюнувшихся эмбрионов осетра:

А – геморрагии, Б – водянка перикардиальной полости, В – С-образное искривление туловища, дефект плавниковой оторочки

У предличинок бестера, находившихся в растворах Боскалида с концентрациями от 0.1 мг/л до 0.5 мг/л, патологий развития не обнаружено, однако в более высокой концентрации 1.0 мг/л количество уродливых особей составило 100 %. У предличинок отмечались многочисленные геморрагии в брюшной полости, пузырчатость желточного мешка, недоразвитие головного отдела – уменьшение роострума, слабая пигментация радужины, в единичных случаях наблюдалось искривление туловища.

Оценку тератогенного риска фунгицидов нового поколения для воспроизводства популяций азовских рыб проводили по разработанному в ФГУП «АзНИИРХ» «Способу оценки токсического действия пестицидов на водные объекты» [Патент на изобретение № 2446396].

В результате математической обработки данных по аномальному развитию эмбрионов рыб в растворах карбоксамидов рассчитывалась пороговая концентрация по показателю тератогенеза ( $\mathcal{E}_{тер}K_{16}$ ) методом пробит-анализа по В.Б. Прозоровскому [Прозоровский В.Б. 1962], основанным на прямолинейной взаимосвязи между концентрацией и эффектом, выраженным в пробитах. Мету тератогенности фунгицидов для эмбрионов рыб определяли по величине коэффициента пороговых концентраций ( $K_{п}^{эмб}$ ), т.е. отношения порога летального действия к порогу тератогенного действия:

$$K_{п}^{эмб} = \frac{LK_{16}}{\mathcal{E}_{мер}K_{16}}$$

Величина  $K_n^{эмб}$  позволяет определить степень потенциальной опасности пестицида определенного химического класса в отношении возможности развития тератогенного эффекта. Величина  $K_n^{эмб}$  превышающая 1, свидетельствует об избирательном действии пестицида на развитие эмбрионов рыб. Согласно предложенной классификации пестициды, у которых величина  $K_n^{эмб} < 1$  являются умеренно опасными для эмбрионов рыб, если  $K_n^{эмб} = 1-5$  – опасными,  $K_n^{эмб} = 5-10$  – высокоопасными. Величина  $K_n^{эмб} > 10$  свидетельствует о чрезвычайной опасности пестицида (таблица 5).

**Таблица 5.** Классификация пестицидов по степени тератогенной опасности

Коэффициент пороговых концентраций, $K_n^{эмб}$	Класс опасности
> 10	I – чрезвычайно опасные
5–10	II – высокоопасные
1–5	III – опасные
< 1	IV – умеренно опасные

В таблице 6 представлены результаты оценки тератогенной опасности карбоксамидов. Согласно проведенным исследованиям карбоксамиды являются умеренно опасными пестицидами по степени их тератогенности для осетровых и бычковых рыб.

**Таблица 6.** Параметры токсичности и тератогенности карбоксамидов для эмбрионов рыб

Фунгицид	Тест-объект	ЛК <sub>16</sub> , мг/л	Э <sub>тер</sub> К <sub>16</sub> , мг/л	Коэффициент пороговых концентраций, $K_n^{эмб}$ (класс опасности)
Пенфлуфен	бычок-кругляк	0.53	–	–
	стерлядь	0.39	0.22	1.77 (III)
Бикасафен	бычок-кругляк	0.48	0.87	0.55 (IV)
	бестер	0.52	0.77	0.68 (IV)
Этабоксам	бычок-кругляк	0.31	2.00	0.16 (IV)
	осетр	0.21	0.40	0.53 (IV)
Боскалид	бычок-кругляк	0.14	1.09	0.13 (IV)
	бестер	0.25	0.51	0.49 (IV)

Таким образом, проведенные исследования показали, что карбоксамидные фунгициды нового поколения даже в низких концентрациях оказывали существенное токсическое действие на бычковых и осетровых рыб в период раннего онтогенеза. Карбоксамиды вызывали нарушения развития и выклева эмбрионов, замедляли рост мальков бычка-кругляка и предличинок осетровых рыб, проявляли выраженное тератогенное действие, способствуя развитию необратимых патоморфологических изменений. Результаты исследований свидетельствуют о потенциальной опасности этих фунгицидов для воспроизводства бычковых и осетровых рыб в случае попадания их в рыбохозяйственные водоемы.

Список литературы:

1. Левина И.Л., Щербакова Н.И., Полуян А.Я. Способ оценки токсического действия пестицидов на водные объекты, Патент на изобретение № 2446396
2. Прозоровский В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности// Фармакол. И токсикол. 1962. Т.25, № 1. С. 115-120

**ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ P-450 И b5 И АКТИВНОСТЬ НАДФ-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КАРПА**

Б. В. Яковенко, О. Б. Мехед, Е. В. Искевич

*Черниговский национальный педагогический университет имени Т. Г. Шевченко  
Ул. Г.Полуботка, 53, г. Чернигов, Украина, 14033, Mekhedolga@mail.ru*

Изучалось влияние пестицида (Зенкор), поверхностно - активного вещества (натрий лаурилсульфат) на содержание цитохромов P-450 и b5, активность НАДФН - генерирующих ферментов (глюкозо -6- фосфатдегидрогеназы и 6 – фосфоглюконатдегидрогеназы) печени и белых мышц карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.).

*Ключевые слова:* Зенкор, натрий лаурилсульфат, цитохромы P-450 и b5, глюкозо -6- фосфатдегидрогеназа, 6 – фосфоглюконатдегидрогеназа.

На сегодняшний день в результате антропогенной деятельности образуется большое количество токсичных для организма веществ (промышленные отходы, пестициды, препараты бытовой химии, лекарственные средства и др.). Гидрофильные ксенобиотики выводятся из организма в неизменном виде с мочой, гидрофобные могут задерживаться в тканях, связываясь с белками или образуя комплексы с липидами клеточных мембран. Со временем накопление в клетках тканей инородного вещества приводит к нарушению их функций. Для удаления таких соединений в процессе эволюции выработались механизмы их детоксикации и выведения из организма. Система обезвреживания включает множество разнообразных ферментов, под действием которых практически любой ксенобиотик может быть модифицирован. Среди них особую роль играет система гемопротеидов P-450 и b5, а также НАД + и НАДФ + - редуктазы, локализованные в микросомах клеток [1-3]. Реакции, которые осуществляет эта система, направлены на защиту живых организмов от накопления в них гидрофобных соединений. Цитохромы P-450 и b5, а также НАДН - и НАДФН - редуктазы образуют монооксигеназную систему. В отличие от других гемопротеидов, обладающих, как правило, в клетке только одним видом активности и строго определенной функцией, P-450 является уникальным, ведь субстраты его действия и реакции, которые он катализирует, разнообразны. Из многочисленных компонентов этой системы только цитохром P-450 способен активировать молекулярный кислород с участием электронов, донором которых являются НАДФН и цитохром b5 .

Цель исследования: изучение влияния пестицида (Зенкор), поверхностно - активного вещества (натрий лаурилсульфат) на содержание цитохромов P-450 и b5, активность НАДФН - генерирующих ферментов (глюкозо -6- фосфатдегидрогеназы - КФ 1.1.1.49 и 6 - фосфоглюконатдегидрогеназы - КФ 1.1.1.44) печени и белых мышц карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.).

Исследования проводились в ноябре-декабре 2013 года на двухлетках карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) массой 180-250 г. По данным ихтиопатологических наблюдений на рыбах возбудителей паразитических болезней не выявлено. Опыты по изучению влияния токсикантов проводили в модельных условиях - аквариумах объемом 200 дм<sup>3</sup> с отстоянной водопроводной водой, в которых рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 40 дм<sup>3</sup> воды. Период адаптации составлял 3 суток, влияния токсикантов - 14 суток. Рыб не кормили. Во всех случаях осуществляли контроль и поддерживали постоянный гидрохимический режим воды. Рыбу содержали в трех вариантах: контроль, действие Зенкора и действие натрия лаурилсульфата. Концентрацию ксенобиотиков, которая соответствовала двум предельно допустимым концентрациям создавали путем внесения 40%-ного порошка натрия лаурилсульфата, концентрация Зенкора составляла 0.2 мг/дм<sup>3</sup> и достигалась внесением 70%- го порошка Зенкора. Вся работа проводилась в соответствии с конвенцией Совета Европы о защите позвоночных животных, которых используют в научных целях.

Для исследования использовали печень и белые мышцы, гомогенизировали в 0.05 М трис - HCl буфере (pH 7.5), содержащем 0.025 М сахарозы, 0.005 М MgCl<sub>2</sub>, 0.025 М KCl, 0.008 М CaCl<sub>2</sub>. После 60 мин экстракции при 4°C гомогенаты центрифугировали 20 мин при 6000 об / мин. Состояние монооксигеназной системы оценивали по содержанию цитохромов P-450 и b5. Определение содержания цитохрома b5 основано на измерении разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм гемопротеидов, а цитохрома P-450 - на измерении величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома P-450 с окисью углерода при 450 нм. Измерение содержания цитохромов b5 [4] и P450 [5] проводили в суспензии микросом на спектрофотометре (по двухлучевой схеме). В каждую из кювет вносили по 3 мл инкубационной смеси.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы определяли в надосадочной жидкости спектрофотометрически по восстановлению НАДФ при 340 нм [6]. Активность ферментов выражали в мкмольх НАДФ, восстанавливаемого ферментами, в расчете на 1 мг белка за минуту. Содержание белка в микросомальной фракции тканей определяли по методу Лоури [7].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программы "Excel" из пакета "Microsoft Office-2003" и программ Statistika 6.0.

В результате проведенных исследований было установлено, что содержание цитохрома b5 в печени карпа чешуйчатого под влиянием Зенкора снизилось на 28.13%, а в результате действия лаурилсульфата - на 21.19%. В белых мышцах снижение содержания цитохрома b5 незначительное и, по сравнению с данными контрольной группы рыб, составляет в условиях интоксикации Зенкором 12.5%, а в условиях интоксикации натрий лаурилсульфатом – 18.75%. Что касается содержания цитохрома P-450, то под влиянием Зенкора его содержание снизилось в 1.4 раза. Влияние натрий лаурилсульфата обусловило уменьшение содержания данного цитохрома в 1.3 раза. Содержание цитохрома P-450 в белых мышцах карпа чешуйчатого под действием Зенкора и натрий лаурилсульфата одинаково, изменения по сравнению с данными контрольной группы рыб составляют 27.3%.

Итак, установлено, что содержание цитохромов b5 и P-450 в печени и белых мышцах рыб в условиях интоксикации Зенкором и натрий лаурилсульфатом снизилось во всех тканях рыб экспериментальных групп. Указанные изменения цитохрома P-450, вероятно, обусловлены активацией процессов перекисного окисления липидов в микросомах, что приводит к деградации молекул цитохрома P-450. Снижение содержания цитохрома b5, возможно, связано с нарушениями в функционировании электронотранспортной цепи. Все эти факторы могли привести к развитию оксидативного стресса.

В результате исследования было выявлено, что активность НАДФН - генерирующих ферментов под действием Зенкора и натрий лаурилсульфата снизилась в тканях рыб экспериментальных групп по сравнению с контролем.

В частности, количественные показатели активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы в условиях интоксикации Зенкором снизились на 5.3 % в печени и на 19.3 % в белых мышцах от данных контрольной группы рыб. Аналогичные изменения наблюдались в условиях интоксикации лаурилсульфатом.

В печени карпа активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы уменьшилась на 19.3 %, а в белых мышцах - на 12.5 %. Активность 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы в печени и белых мышцах рыб также снизилась по сравнению с показателями контрольной группы животных. Установлено, что активность 6-фосфоглюконат дегидрогеназы при действии Зенкора в печени уменьшилась на 8.8 %, в белых мышцах - на 9.7 %. В условиях интоксикации лаурилсульфатом активность фермента в белых мышцах уменьшается на 13.9 %, а в печени достоверные изменения активности фермента составляют 24.5 %.

Таким образом установлено, что натрий лаурилсульфат и Зенкор снижают активность НАДФН - генерирующих дегидрогеназ печени и белых мышц карпа. Возможно, это вызвано нарушением липидного обмена и разрушительным влиянием на монооксигеназные системы, повлекшее интоксикацию организма рыб.

Выводы.

1. Установлено снижение содержания цитохромов P -450 и b5 в тканях печени и белых мышцах карпа в условиях интоксикации Зенкором и натрий лаурилсульфатом. Возможно это вызвано гиперпродукцией свободных радикалов и активных форм кислорода, которые создают предпосылки для развития окислительного стресса.

2. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при использовании Зенкора в количестве 2 предельно допустимые концентрации уменьшается в печени на 5.3 %, а в белых мышцах на 19.3 %. В условиях интоксикации натрий лаурилсульфатом – на 19.3 % и 12.5 % соответственно.

3. Активность 6- фосфоглюконат-дегидрогеназы под действием таких же доз Зенкора уменьшается в печени на 8.8 %, а в белых мышцах - на 9.7 %. В условиях интоксикации натрий лаурилсульфатом - на 13.9 % и 24.5 %, соответственно.

Список литературы

1. Bondy S.C. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species // *Biochem. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 48. — P. 155-159.
2. Caro A.A. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1 // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2004. — Vol. 44. — P. 27-42.

3. Chen X.-L. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases // *Curr. Pharm. Des.* — 2004. — Vol. 10. — P. 879- 891.
5. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // *J. Biol. Chem.* —1964. —V. 239. —P. 2379– 2385.
6. Koop D.R. Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 by 3-amino-1,2,4-triazole // *Chem. Res. Toxicol.* —1990. —№3. —P. 377–383.
7. Bottomley R. H., Pilot H. C., Potter V. R., Morris H. P. Metabolic adaptations in rat hepatomas. Reciprocal relationship between threonine dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Canc. Res.* — 1963. — Vol. 23, N 1. — P. 400–409.
8. Lowry O.H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. - № 1. — P. 265-275.

УДК 574.5.087+574.64

### ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ИХ РОЛЬ В МОНИТОРИНГЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Я.В. Сокоиков

*Московское представительство Шелтек АГ  
119334 Москва, ул. Косыгина, 19, Россия, Yaroslav.Sokovikov@scheltec.ru*

В лекции рассмотрены принципы работы и применения основных методов инструментального химического анализа, применяемых в мониторинге окружающей среды, токсикологических исследованиях и практике лабораторий природоохранных организаций. Разобраны основные области применения, преимущества и недостатки методов на примере оборудования компании Perkin Elmer.

Научно-технический прогресс и развитие различных производств, кроме несомненной пользы для человечества, имеет и ряд отрицательных последствий для экосистемы Земли. В частности, с каждым годом возрастает поступление в экосистемы различных веществ, ранее никогда не существовавших на планете, т.н. ксенобиотиков. Эти вещества, встраиваясь в биохимические циклы экосистем, приводят к масштабным нарушениям нормальной деятельности экосистем, заболеваниям и гибели живых организмов. Проблема контроля за загрязнителями окружающей среды является одной из важнейших в системе мониторинга и охраны экосистем. Данная проблема усугубляется необходимостью не только обнаруживать и количественно контролировать содержание ксенобиотиков, но и продуктов их распада и превращения в экосистемах. Для проведения объективного контроля за загрязнением окружающей среды первостепенную роль играют различные современные методы инструментального химического анализа. Данные методы широко используются в современных лабораториях по охране окружающей среды, как государственных надзорных органов, так и предприятий.

Рассмотрим основные методы инструментального химического анализа, используемые для мониторинга загрязнения окружающей среды на примере оборудования компании Perkin Elmer. Компания Perkin Elmer одна из старейших приборостроительных фирм в мире, ведет свою деятельность в области приборостроения с 1944 года. Производство оборудования для контроля за состоянием окружающей среды является одной из приоритетных задач компании, что отражается в ее логотипе (environmental health / human health). Компания известна своими многочисленными достижениями в области инструментального анализа, в том числе и Нобелевской премией за создание капиллярных колонок для газовой хроматографии. Для решения задач в области охраны окружающей среды и мониторинга загрязнений компания выпускает приборы для следующих направлений:

1. Неорганический анализ – контроль содержания большинства элементов, прежде всего т.н. тяжелых металлов в воде, почве, организмах, пищевых продуктах, различных изделиях
2. Газовая и жидкостная хроматография – количественный анализ различных органических веществ – ксенобиотиков (таких как фенолы и их производные, формальдегид и ацетальдегид, пестициды, ПАВ и т.д.) в воде, почве, организмах, пищевых продуктах, различных изделиях
3. Масс-спектрометрия – идентификация и количественное определение органических веществ – ксенобиотиков и продуктов их превращения и распада в окружающей среде, пищевых продуктах и различных изделиях
4. Молекулярная спектроскопия (УФ/Вид и ИК) – количественное определение анионов и катионов в объектах окружающей среды, в том числе и сильнотоксичных (цианиды, роданиды), а также нефтепродуктов. Также ИК-спектроскопия используется для идентификации отдельных загрязнителей.
5. Термоанализ и совмещенные методы анализа – анализ сложных матриц (почв, донных отложений, растительных объектов) с выделением отдельных компонентов и их последующей идентификации спектральными методами анализа. Также термоанализ (в частности дифференциальная сканирующая калориметрия) используется в биохимических анализах в области исследования токсикологических изменений в естественных физиологических процессах.

Контроль за тяжелыми металлами и другими токсичными элементами (мышьяк, кадмий, селен и др.) стал обязательным в современных системах мониторинга состояния окружающей среды. Данные элементы обязательно определяются в воде как для питьевых и санитарно-гигиенических нужд, так и в сточных водах, в природных водоемах. Особенно высокие требования предъявляются к водоемам рыбохозяйственного назначения. Современная законодательная база и действующая

нормативная документация, как в России, так и в других странах мира, уделяет повышенное внимание к содержанию этих элементов в окружающей среде, прежде всего в воде, а также в почвах, сельхоз продукции, различных изделиях, используемых в повседневной жизни человека (игрушки, косметика, медицинская техника и принадлежности, посуда и т.д.). Широкое распространение этих загрязняющих компонентов в различных сложных матрицах предъявляет повышенные требования к точности, воспроизводимости, простоте анализа различных образцов. Современные методы неорганического анализа, допущенные в нормативной документации для проведения подобного рода анализа, следующие – атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС, ААС), оптико-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС, ICP-OES), масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС, ICP-MS). Разберем отдельно каждый метод. В методе ААС раствор, содержащий анализируемые атомы, попадает в атомизатор, где все вещества, содержащиеся в растворе (как в виде индивидуальных веществ, так и в виде ионов), атомизируются. Далее через полученный «атомный пар» пропускается свет с определенной для каждого типа атомов длиной волны. Данный свет селективно поглощается тем или иным видом атомов пропорционально концентрации этих атомов в пробе. По снижению интенсивности света, приходящего на детектор, можно судить о концентрации данных атомов. Для атомизации необходимы достаточно высокие температуры, поэтому современные АА спектрометры обычно имеют один из двух или оба вида атомизаторов – в пламени (обычно кислород-ацетиленовом или закись азота/ацетилен) – наиболее простой, но и не самый точный и подходящий для всех элементов, и графитовую печь, где атомизация достигается нагреванием пробы до высоких температур. Для компенсации влияния неспецифического поглощения других атомов, находящихся в пробе, используются различные виды коррекции, наиболее распространены и позволяют достигнуть наилучших результатов дейтериевая коррекция и коррекция Зеемана. Более подробно с теорией и особенностями ААС анализа, как и других упоминаемых в этой лекции методах, можно ознакомиться в специальной литературе[1]. Из всех методов современного инструментального неорганического анализа метод ААС является одним из самых проработанных с точки зрения метрологии, оценки мешающих влияний и методов их устранения, а также с точки зрения нормативной базы. Особый вклад в развитие метода ААС внесли отечественные ученые школы профессора Б.В. Львова (Санкт-Петербург) и ученые фирмы Perkin Elmer, работавшие в 70-х годах совместно. Многолетний опыт разработки и производства приборов для атомной абсорбции компании Perkin Elmer воплотился в новом ААС PinAAcle 900 – компактном универсальном спектрометре. Для более простых применений и для сложных условий эксплуатации предлагаются спектрометры AAnalyst 200/400.

Основным недостатком метода ААС является то, что это одноэлементный метод анализа, т.е. за одно измерение определяется один элемент. Для анализа небольшого количества образцов и ограниченного количества элементов это не является препятствием, но с увеличением количества определяемых элементов и анализируемых образцов встает необходимость повышения производительности неорганического анализа. При этом становится востребованным другой метод – ИСП-ОЭС. В этом методе проба вводится в факел аргоновой плазмы (при температуре около 6000°C), где она не только атомизируется, но и ионизируется. При этом атомы (точнее уже ионы) испускают специфичные для каждого атома спектры, которые регистрируются специальными матричными детекторами. Интенсивность линий спектра пропорциональна концентрации атомов. Плазма может наблюдаться как аксиально (вдоль факела плазмы), так и радиально (поперек факела). В первом случае удобно анализировать микро содержания элементов, во втором – макро содержания. ИСП-ОЭС спектрометры PerkinElmer имеют оба типа наблюдения в одном приборе с автоматическим переключением типа наблюдения в зависимости от выбранных элементов. В области многоэлементного анализа хорошо зарекомендовали себя ИСП-эмиссионные спектрометры серии Optima 8x00, имеющие отличные аналитические характеристики при минимальном (среди аналогичных приборов) расходе аргона, благодаря применению новейших технологий. Кроме того, различные технологические решения в области обработки сигналов позволяют снизить влияние других элементов на результаты измерений, повысить точность анализа даже в сложных матрицах. Достигнуть наиболее низких пределов обнаружения позволяет другой метод многоэлементного анализа – ИСП-МС. В этих спектрометрах ионизированные в аргоновой плазме элементы поступают в масс-селективный детектор (обычно это квадруполь). Там ионы разделяются по массам (точнее по соотношению массы к заряду, но поскольку практически все ионы однозарядные, то мы говорим по массе) и детектируются при помощи электронного умножителя. Современные ИСП-МС спектрометры позволяют детектировать подавляющее большинство элементов в диапазоне от десятков % до ppq. Основная проблема этого метода – т.н. изобарные наложения, т.е. одновременный анализ ионов с одинаковой массой, например  $Fe^+$  и  $AgO^+$  с массой 56. Для устранения этих влияний используются различные методы: столкновительные и реакционные ячейки, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. ИСП масс-спектрометры серии NexION с технологией универсальной ячейки позволяют решить практически любые задачи в области неорганического анализа.

Важным элементом качественного неорганического анализа является пробоподготовка. Для анализа образцов на современных спектрометрах проба должна быть переведена в раствор. Наиболее оптимальны для этого микроволновые системы разложения, позволяющие разложить любую твердую пробу и перевести ее в раствор. При этом для экологических и природных проб предъявляются повышенные требования безопасности к микроволновым системам разложения. Это, прежде всего, контроль давления и температуры в каждом автоклаве (особенно важно для гетерогенных проб, что характерно для природных проб), полнота разложения (особенно для проб с высоким содержанием кремния, что характерно для проб почв и донных отложений), полнота перевода всех содержащихся в пробе элементов в раствор без потерь (это особенно актуально для таких токсичных и летучих элементов как ртуть и мышьяк), производительность и простота в эксплуатации. Всем этим требованиям отвечает продукция компании Berghof, представленная в России компанией SchelTec AG.

Для анализа органических токсикантов и загрязнителей традиционно используются хроматографические методы – газовая и жидкостная хроматографии. В методе газовой хроматографии жидкая проба испаряется в специальном устройстве – инжекторе в токе газ-носителя, затем компоненты пробы разделяются на хроматографической колонке по специфичным временам удерживания и детектируются с помощью специализированных детекторов: пламенно-ионизационных, электронно-захватных, азотно-фосфорных и т.д., обладающих специфичной чувствительностью к различным классам органических веществ. Иногда в качестве детектора могут выступать квадрупольные или время-пролетные масс-спектрометры, которые позволяют не только количественно определять содержание компонентов, но и идентифицировать их по масс-спектрам. Газовые хроматографы Clarus комплектуются под задачи заказчика, в том числе масс-спектрометрическим детектором SQ8 и различными приставками. На основе GX Clarus построены специализированные анализаторы для сложных применений. Для ввода пробы могут использоваться как стандартные инжектора, так и специализированные приставки – парофазного дозирования, очень удобные для определения летучих органических загрязнителей в воде, и термодесорбционные, используемые для анализа воздуха. В случае если анализируемые компоненты не обладают летучестью (полиароматические углеводороды, многие сложные фенольные токсиканты и т.д.), удобнее использовать жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В этом случае пробу вводят в поток жидкости, которая в отличие от газовой хроматографии в этом методе, выполняет роль элюента. Компоненты пробы также разделяются на специальных ВЭЖХ колонках и детектируются на специализированных детекторах, специфичных для тех или иных классов соединений. Традиционно это УФ/Вид детектора (в том числе и с диодной матрицей, позволяющей получать УФ спектры соединений), флуоресцентные и рефрактометрические детектора. Также в качестве детекторов ВЭЖХ системы могут снабжаться масс-спектрометрами для одновременной идентификации загрязнителей. Системы Flexag обеспечивают решение задач для ВЭЖХ и ультра-ВЭЖХ благодаря широкому выбору насосов и детекторов, в том числе и масс-спектрометрических – квадрупольного SQ300 и времяпролетного AxION, который может работать с системой прямого ввода DSA.

Методы молекулярной спектроскопии основываются на специфичном поглощении проходящего через вещество излучения различными структурно-групповыми фрагментами молекул вещества. Традиционно в контроле окружающей среды применяют методы УФ/Вид спектроскопии, ИК-Фурье спектроскопии и люминесцентной спектроскопии. Наиболее традиционным является применение УФ/Вид спектроскопии. В этом случае через пробу пропускается свет в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм. Количественный анализ осуществляется на основе закона Бугера-Ламберта-Бэра, согласно которому количество поглощенного света прямо пропорционально концентрации поглощающего компонента. На этом методе основан традиционный анализ большого количества катионов и анионов, формальдегида, фенолов, окрашенных соединений (всем знакомы приборы типа КФК, ФЭК). Классический анализ основывается на добавлении к пробе специфичных реактивов, которые образуют с аналитом окрашенные комплексы, концентрацию которых по калибровкам и определяют на спектрофотометрах. Данный метод относительно прост, хорошо проработан с точки зрения метрологии и нормативного обеспечения, но имеет ряд недостатков, связанных с дополнительной пробоподготовкой, наличием большого круга мешающих влияний и т.д., хотя до сих пор остается как дешевая альтернатива (с точки зрения приборного обеспечения) более дорогим, но и более точным и чувствительным методам инструментального анализа. При использовании инфракрасного диапазона длин волн (свыше 3000 нм) начинают поглощать отдельные функциональные группы и структуры веществ. Это дает возможность с помощью метода ИК-спектроскопии идентифицировать органические вещества по структурно-групповому составу. В практике мониторинга окружающей среды метод ИК-спектроскопии используется для определения содержания нефтепродуктов в воде (как наиболее точный и специфичный), для идентификации источника загрязнения нефтепродуктами, для идентификации отдельных выделенных токсикантов. Для работы по нефтепродуктам обычно пробу экстрагируют четыреххлористым углеродом, а затем полученный экстракт анализируют на ИК-Фурье спектрометрах. Основным недостатком метода ИК-

спектроскопии для задач мониторинга окружающей среды являются мешающие влияния воды, использование солевой оптики, трудности в интерпретации спектров.

Еще один метод молекулярной спектроскопии, широко используемый в анализе объектов окружающей среды, это люминесцентная спектроскопия. При облучении пробы светом в УФ/Вид диапазоне многие вещества поглощают этот свет и затем испускают его в виде специфического спектра. Данный метод очень чувствителен для полициклических соединений, фенольных соединений, редкоземельных элементов и т.д., поэтому традиционно широко используется в практике природоохранных лабораторий. Однако, как и любой другой метод инструментального анализа, не лишен недостатков. Прежде всего, это явление гашения флуоресценции, связанное с наличием других мешающих компонентов в пробе. Для решения задач в области инфракрасной спектроскопии предлагаются спектрометры Spectrum Two – универсальные, компактные, с возможностью работы вне лаборатории и со всеми приставками для ИК-Фурье спектроскопии. Спектрометры серии Frontier позволяют решать любые исследовательские задачи в средней, ближней и дальней ИК-областях, а в сочетании с ИК-микроскопами Spotlight и системой ИК-изображения Spotlight 400 проводить анализ микрообъектов и микровключений в макрообъекты. Прецизионные спектрометры серии Lambda x50 являются мировым стандартом, как в области сертификации, так и в оптических измерениях. Для рутинных измерений используются УФ/Вид спектрофотометры серии Lambda x5 и люминесцентные спектрометры серии LS 45/55, хорошо зарекомендовавшие себя в лабораториях различных предприятий.

Методы термического анализа используются в практике лабораторий по охране окружающей среды гораздо меньше, чем другие методы инструментального анализа, хотя роль их кажется несколько недооцененной. Одним из методов термического анализа, который находит все более широкое распространение в токсикологических исследованиях объектов окружающей среды, является термогравиметрия (ТГА). В этом методе образец помещают в печь прибора и нагревают его с постоянной скоростью. Летучие компоненты, продукты разложения постепенно улетучиваются из пробы, по уменьшению массы (ТГА кривая) судят о содержании улетучивающихся компонентов. Если подобный прибор присоединить с помощью обогреваемой линии к спектральному оборудованию (ИК-Фурье или масс-спектрометрам), то можно будет идентифицировать отдельные выходящие из пробы компоненты. Таким методом возможен анализ, какими компонентами загрязнены пробы почвы или растений. Другой метод термоанализа, который может быть косвенно задействован в практике токсикологических лабораторий, является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). В этом методе изучаются термические эффекты, связанные с изменением конфигураций, фазовых состояний молекул в пробе при нагревании или охлаждении. Современные приборы для ДСК позволяют фиксировать даже очень слабые термоэффекты, связанные с денатурацией белка, изменением фазовых состояний тканей животных и растений под воздействием токсикантов, влияние этих веществ на физиологические процессы. В области термоанализа компания Perkin Elmer известна своей уникальной системой калориметрии по компенсации мощностей - DSC8000/8500, для более простых задач применяются калориметры по тепловому потоку DSC4000/6000. Системы синхронного (ТГ/ДСК) анализа STA6000/8000 позволяют проводить одновременный ТГА и ДСК анализ при температурах до 1600°C и анализ продуктов разложения на ИК-Фурье спектрометре и на ГХ-МС системе Clarus SQ8 с помощью интерфейсов TL 8000/9000.

Компания Шелтек является авторизованным дистрибьютором оборудования компании Perkin Elmer на рынке стран СНГ, Монголии и Грузии. Обладая опытом более чем 40 лет поставки данного оборудования, имея разветвленную службу поддержки и сервиса по всей территории ответственности, мы гарантируем нашим заказчикам решение их аналитических задач на высочайшем профессиональном уровне от мирового лидера в области инструментального анализа – компании Perkin Elmer.

#### Список литературы

1. Г. Юинг Инструментальные методы химического анализа. М., Мир, 1989, 608 с.

**ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ВОДНОЙ СРЕДЕ,  
КАК ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР**

О.Ф. Филенко

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра гидробиологии, 119991, г. Москва, Россия, ofilenko@mail.ru*

Потенциально токсичные вещества, в том числе и создаваемые человеком, повсеместно присутствуют в водной среде. Поскольку многие из них появляются в результате естественно проходящих процессов, то их присутствие не могло не сказываться на формировании экологической ситуации еще задолго до появления человека. Фактор присутствия потенциально токсичных веществ должен учитываться при всех оценках экологических процессов и закономерностей.

*Ключевые слова:* токсичность, потенциально токсичные вещества, гидробионты, водные экосистемы.

В последние десятилетия в лексиконе средств массовой информации и даже специалистов закрепилось представление о «ксенобиотиках», как об атрибуте антропогенного загрязнения потенциально токсичными веществами. В силу их чужеродности, эти вещества, как полагают, не имеют прообраза в естественной среде, а эволюция, соответственно, не сформировала биологических механизмов защиты и противодействия им.

**Таблица 1.** Основные показатели уровня загрязненности водных экосистем потенциально токсичными веществами [1]

Ингредиенты токсичности	Субстрат или показатель	Единицы измерения	Олиготоксичность	β - Мезотоксичность
Нефть и нефтепродукты	Вода	Доли ПДК	0 (следы)	Менее ПДК
	Донные отложения	Мг/кг	Менее 1	Менее 10
	Нефтяные пленки		Отсутствуют	Единичные
СПАВ	Вода	Доли ПДК	Менее ПДК	Равно ПДК
Фенолы	Вода	Доли ПДК	Менее ПДК	Равно ПДК
Ртуть	Вода	Доли ПДК	Менее ПДК	Равно ПДК
	Градиент вода-дно	Отношение	1 : 10	1 : 100
Медь	Вода	Доли ПДК	Менее ПДК	Равно ПДК
	Градиент вода-дно	Отношение	1 : 10	1 : 100
Тяжелые металлы (сумма)	Вода	ЛПВ	Менее 1	Около 1
	Градиент вода-дно	Отношение	1 : 10	1 : 100
ФОС	Вода	Доли ПДК	Отсутствуют	Менее ПДК
Хлорорганические пестициды	Вода	Мкг/л	$10^{-2} - 10^{-3}$	0.01 – 0.1
	Донные отложения	Мкг/кг	Менее 10	10 - 100
	Градиент вода-дно	Отношение	1 : 10 - 1 : 50	1 : 100
	Накопление в биоте: – в беспозвоночных – в рыбах-бентофагах – в хищных рыбах – в рыбоядных птицах	Коэффициент степенного отношения к содержанию в воде	10 – 100 100 1000 10000	100 100 – 1000 1000 10000
	Гибель тест-культуры за период экспозиции	Доля погибших животных	Не выше 10%	Менее 50% в течение 96 час
Биотестирование на дафниях	Поведенческие реакции	-	Нарушение репродуктивного цикла, эмбрионального развития, линьки и пр.	Слабо выраженные поведенческие реакции
	Индекс удельного биотического развития фитопланктона	Значение	> 4	1 - 4
Гидробиологические показатели	Тип биоценоза или состав населения		Многовидовой состав со стабильными доминантами	Трансформированный биоценоз (доминируют виды, не характерные для олиготоксичной зоны)
	Биопродукционные показатели	Первичная продукция (A) и деструкция (R)	Отношение A/R	> 1 0 - 1

Присутствие токсичных веществ в водной среде выявляется обычно при выявлении антропогенных источников загрязнения и оценивается в сопоставлении с уровнями ПДК (санитарно – гигиенических или рыбохозяйственных). Степень загрязненности среды такими веществами предлагается проводить в соответствие с уровнями токсичности (табл. 1).

Как полностью чуждый для естественной среды элемент присутствие таких веществ зачастую игнорируется при исследовании экологических связей и закономерностей.

Вместе с тем исследования последних десятилетий свидетельствуют о том, что многие «ксенобиотики» поступают из природных источников или образуются естественным путем, в том числе и с участием водных организмов. Особого внимания заслуживают вещества «двойного генезиса», т.е. субстанции, поступающие из антропогенных и естественных источников. Сюда входят отдельные химические элементы, в том числе и тяжелые металлы, продукты деградации биологического материала, нефтепродукты, продукты горения.

Из числа потенциально токсичных элементов, поступающих из естественных источников, обычной категорией являются металлы, в том числе – и тяжелые. В этом ряду уделяется особое внимание Fe, Al, Sr, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, As, Se, Co, Sn, Cd, Hg. Естественные фоновые концентрации металлов в некоторых регионах даже превышают рыбохозяйственные ПДК (табл. 2).

**Таблица 2.** Средне фоновое содержание металлов в речных водах (мкг/л).

Элемент	Речные воды [2,3]	ПДК <sub>рх</sub> (в пересчете на элемент)
Fe	40 - 670	100
Al	50 - 400	40
Mn	7,0 - 10	10
Zn	20	10
Cu	7,0	1
Cr <sup>3+-6+</sup>	1,0	20 - 70
Mo	1,0	1
As	2,0	50
V	1,0	1
Hg	0,07	0,01

Повышенные или чрезвычайно низкие естественные содержания некоторых элементов могут служить основанием для пересмотра перечней критериев качества среды и введения более либеральных или более жестких региональных нормативов. Однако такой пересмотр не проводится в связи с продолжающейся реорганизацией системы нормирования в нашей стране.

Особый интерес может представлять появление в водной среде разнообразных прижизненных и посмертных выделений гидробионтов, в том числе цианотоксинов и даже хлорорганических соединений [4, 5]. Загрязнение такими «ксенобиотиками» происходило не только в исторический период, но и задолго до появления человека вообще. Они обнаруживаются даже в музейных препаратах [6]. В результате потенциально токсичные вещества давно участвуют в формировании экологических взаимоотношений и в определенной степени влияют на процессы эволюции. Внимание экотоксикологов привлекают разнообразные продукты деградации остатков жизнедеятельности, включающие широкое разнообразие компонентов, в том числе фенолы, сероводород, цианотоксины, появляющиеся в результате цветения вод при эвтрофировании, происходящем в результате антропогенного и естественного загрязнения органическими веществами и биогенными элементами [4].

Формируется сложная номенклатура токсичных веществ и источников их появления в водной среде (табл. 3 - 4).

В последние годы уделяется внимание природным источникам появления в окружающей среде галогенорганических веществ. На сегодняшний день описаны сотни таких веществ [5]. Широкое разнообразие галогенорганических веществ и диоксинов естественного происхождения формируется, например, в компонентах экосистемы болот [7].

Очевидно, биота способна производить и утилизировать и другие вещества, создавать которые человечество еще не готово.

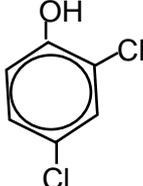
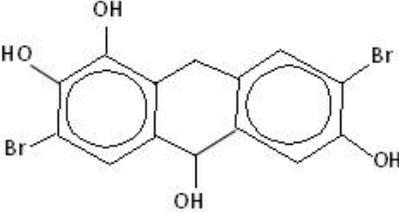
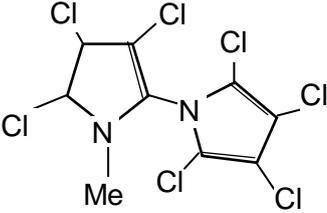
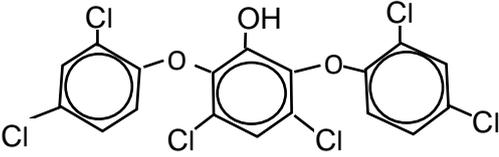
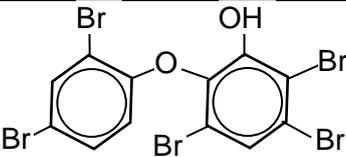
Не являются экзотикой для природной среды и нефтяные пролития. Компоненты нефти или аналогичные им соединения биогенного происхождения, всегда присутствовали в природных водах, и водные организмы с незапамятных времен имели контакт с ними.

**Таблица 3.** Цианобактерии и выделяемые ими токсичные вещества.

Виды цианобактерий	Образуемые ими токсины
<i>Anabaena bergii</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Raphidiopsis curvata</i> , <i>Umezakia natans</i>	цилиндроспермопсин
<i>Anabaena circinalis</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Lyngbya wollei</i> , <i>Planktothrix</i> sp.	сакситоксины
<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cylindrospermum</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i> sp.	анатоксин-а, анатоксин-а(S)
<i>Anabaena circinalis</i> , <i>A. flos-aquae</i> , <i>Anabaenopsis millenii</i> , <i>Aphanocapsa cumulus</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Haphalosiphon hibernicus</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>M. viridis</i> , <i>M. wesenbergii</i> , <i>M. botrys</i> , <i>Nostoc</i> spp., <i>Oscillatoria limosa</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix agardhii</i> , <i>Planktothrix mougeotii</i> , <i>Pseudanabaena</i> sp., <i>Synechocystis</i> sp.	микроцистины
<i>Nodularia spumigena</i>	нодулярины
<i>Planktothrix formosa</i>	гомоанатоксин-а

Присутствие подобных веществ неизбежно должно было производить разнообразные биологические эффекты и приводить к формированию средств противодействия, в том числе – и механизмов детоксикации. Таким образом, появление из антропогенных источников веществ, называемых ксенобиотиками или чужеродными, являются таковыми только по необычным для природы объемам, но не по их качественным признакам.

**Таблица 4.** Некоторые галогенорганические вещества естественного происхождения.

Синтезируемое соединение	Источник	Назначение соединения
	Грибы <i>Penicillium</i> sp.	Гормон
	Морские водоросли	Защита от поедателей
	Морские бактерии	Метаболит «Q1»
	Цианобактерии	Метаболит «амбигол В»
	Губки	Метаболит

Различные загрязняющие вещества как естественного, так и антропогенного происхождения, в водной среде присутствуют в относительно малых концентрациях, сопоставимых с их предельно допустимыми концентрациями. Заморные концентрации формируются, как правило, только в локальном масштабе даже при поступлениях в значительных объемах в связи с тем, что физические и химические взаимодействия быстро понижают уровень содержания загрязняющих веществ в водной толще или снижают их биодоступность. Поэтому в экологическом плане, прежде всего, актуальны хронические воздействия относительно низких концентраций потенциально токсичных веществ. Поскольку такие концентрации присутствовали в водной среде всегда, то они не могли не влиять на общий ход экологических процессов наряду с освещением, температурным режимом, присутствием биогенных веществ. Однако до настоящего времени понятие потенциально токсичных веществ ассоциировалось для экологов исключительно с катастрофическим вмешательством человека в ход естественных процессов.

Влияние низких концентраций токсикантов проявляется в разных формах. Интегральным показателем эффекта в культурах водных растений и беспозвоночных служит изменение численности клеток или особей. В широком диапазоне воздействий динамика характеризуется чередующимися периодами возрастания и снижения численности во взаимосвязи со сроками действия токсиканта и с его концентрациями. Массовая гибель гидробионтов является очевидным свидетельством интенсивного прямого или вторичного загрязнения, чаще всего антропогенного происхождения. Гибель при малых концентрациях не столь очевидна и ее учет в естественных условиях затруднен. Однако снижение численности может быть обусловлено не столько повышенной смертностью, сколько подавлением воспроизводства популяции.

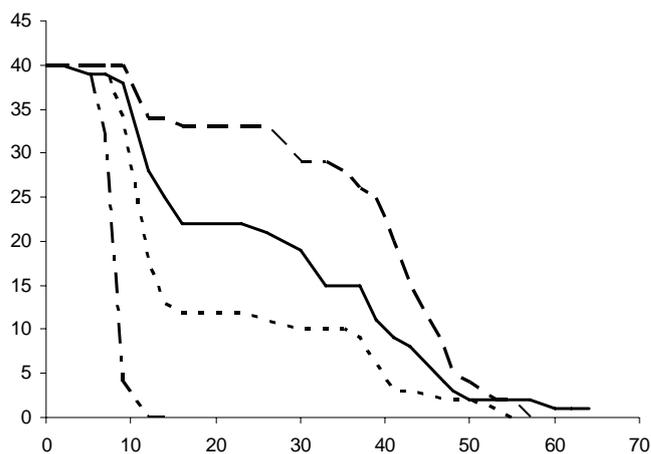
Снижение плодовитости водных животных без явной гибели показано в многочисленных лабораторных наблюдениях. Наряду с эффектами, приводящими к сокращению численности гидробионтов, при действии малых концентраций могут наблюдаться и эффекты стимуляции процессов жизнедеятельности. Подобные эффект потенциально токсичных веществ иногда называют «гормезисом» [8].

Наблюдаемые закономерности формируются за счет следующих составляющих токсического эффекта. Под механизмом действия токсиканта обычно понимается некоторая система причинно – следственных взаимоотношений в цепи процессов изменений в организме, подвергшемся действию токсиканта. При этом может идти речь о «первичных механизмах», «механизме действия», «механизме реагирования» и др. Очевидно, что первичными механизмами токсического поражения могут быть только непосредственные химические или физико – химические взаимодействия молекул токсиканта с молекулярными элементами клетки. Все последующие события могут рассматриваться в качестве вторичных механизмов.

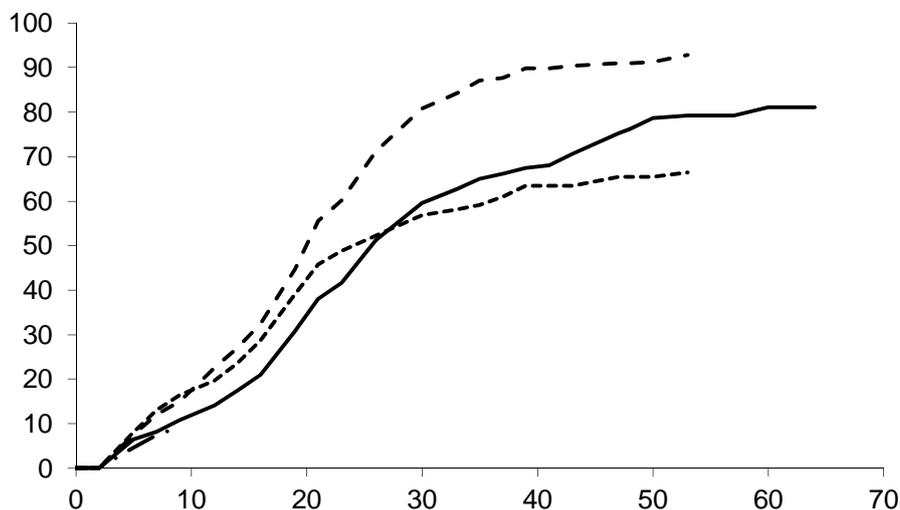
В комплексе изменений, происходящих в биологической системе при интоксикации, сочетаются деструктивные процессы, представляющие собственно механизм токсического поражения, и адаптивно – компенсаторные реакции биологической системы, направленные на ослабление или компенсацию этого поражения. При этом активность компенсационных процессов может превышать актуальные потребности организма, что приводит к «избыточному реагированию» [9]. Деструктивная и адаптивная составляющие токсического эффекта сопряжены между собой, поэтому трудно оценить абсолютный вклад каждой из них в общую картину эффекта. Гибель, сокращение плодовитости, появление морфологических аномалий, не совместимых с жизнью, отражают итоговое преобладание пассивного результата. «Активное реагирование» может приводить к ускорению роста, повышению выживаемости и повышению плодовитости.

Процессы, которые развиваются на индивидуальном уровне, трансформируются в изменения на уровне популяций и сообществ. Даже слабые влияния, сопоставимые с допустимыми концентрациями, воздействуя на некоторое звено, могут приводить к цепи последующих событий. Такая взаимосвязанность затрудняет выявление пусковых механизмов экологических перестроек.

Примеры эффектов, в которых преобладают деструктивная или компенсирующая составляющие могут служить сокращение или увеличение продолжительности жизни беспозвоночных, а также уменьшение или увеличение количества новорожденной молодежи при действии некоторых потенциально токсичных веществ (рис. 1 - 2). Обычно считается, что стимуляция всегда оказывается временным явлением, которое непременно сменяется истощением и угнетением процессов жизнедеятельности. Однако, представленные иллюстрации свидетельствуют о том, что даже такие интегральные показатели, как выживаемость и размножение при некоторых концентрациях оказывались выше, чем в контроле, на протяжении всей естественной продолжительности жизни рачков.



**Рис. 1.** Динамика численности цериодафний при действии хлористого калия [по 9]  
По оси абсцисс – сутки, по оси ординат – количество живых рачков  
— Контроль    - - - 0,1 мг/л    ..... 10 мг/л    - . - 100 мг/л

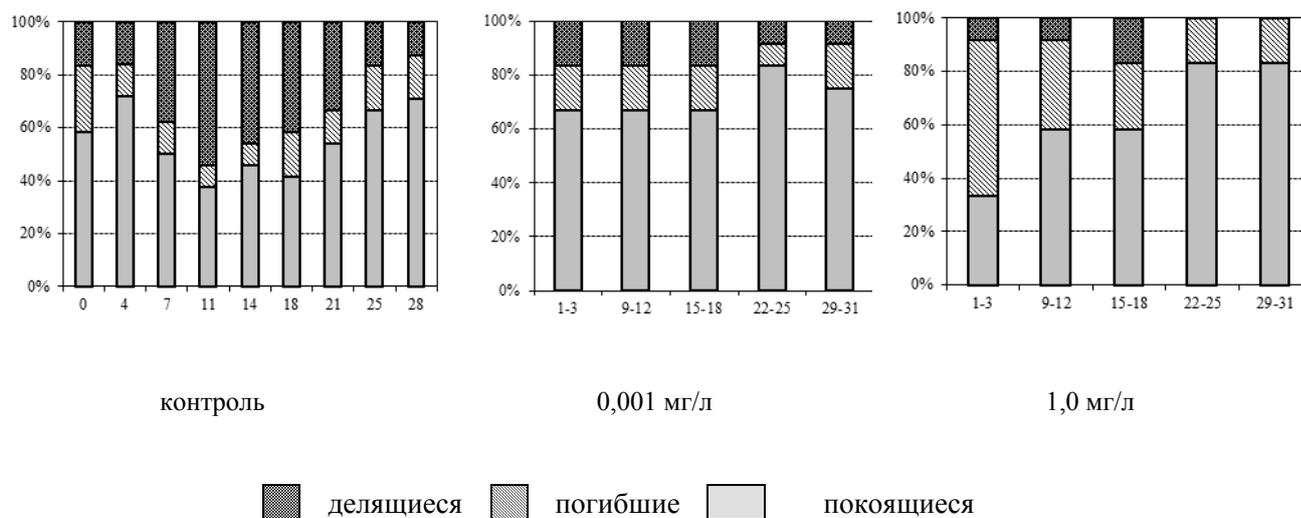


**Рис. 2.** Накопительная плодовитость рачков при действии хлорида калия в расчете на 1 самку [по 9].  
По оси абсцисс – сутки, по оси ординат – число новорожденных.  
1 – контроль; 2 – 0.1 мг/л; 3 – 10 мг/л; 4 – 100 мг/л.  
— Контроль    - - - 0,1 мг/л    ..... 10 мг/л    - . - 100 мг/л

Понятие механизма и общей картины интоксикации традиционно связывается с процессами, проходящими, главным образом, на уровне организма, но по отношению к уровню популяций и сообществ оно применяется редко. Тем не менее, понимание взаимосвязи процессов в системах «надорганизменного» уровня для экотоксикологии часто оказывается даже более важным, чем раскрытие индивидуальных нарушений, происходящих в особях, входящих в сообщество. Влияние некоторого фактора на размножение, например, может оказаться даже более значимым в экологическом отношении, чем гибель особей.

Проиллюстрировать происходящие при этом процессы на примере популяции водорослей можно следующим примером. Методом микрокультур оценивали соотношение нормально делящихся, погибших и покоящихся клеток [11]. Метод основан на наблюдении за судьбой выборок индивидуальных клеток водорослей. Наблюдение позволяет оценить жизнеспособность и жизненную активность этих клеток, что служит основой для заключения о состоянии культуры, из которой они были отобраны.

Оказалось, что в присутствии токсиканта в меньшей концентрации смертность не повышалась, зато повышалась доля клеток, переходящих в покоящееся состояние. Гибель клеток возрастала при большей концентрации, но возрастала и доля покоящихся клеток, которые составляли основную сохранившуюся часть популяции. Как показали последующие исследования, при прекращении токсического воздействия эти покоящиеся клетки способны восстановить популяцию.



**Рис. 3.** Изменение относительной численности делящихся, покоящихся и погибших клеток водоросли в культуре при действии хлорида меди [по 10].

В экосистемах состояние популяций, помимо влияния токсического фактора, определяется сопутствующими факторами среды и взаимодействием с другими экологическими партнерами.

На примере исследований на модельных экосистемах, проведенных нами ранее на протяжении ряда лет, может быть показана такая цепь событий, вызванная действием малых концентраций потенциально токсичных веществ.

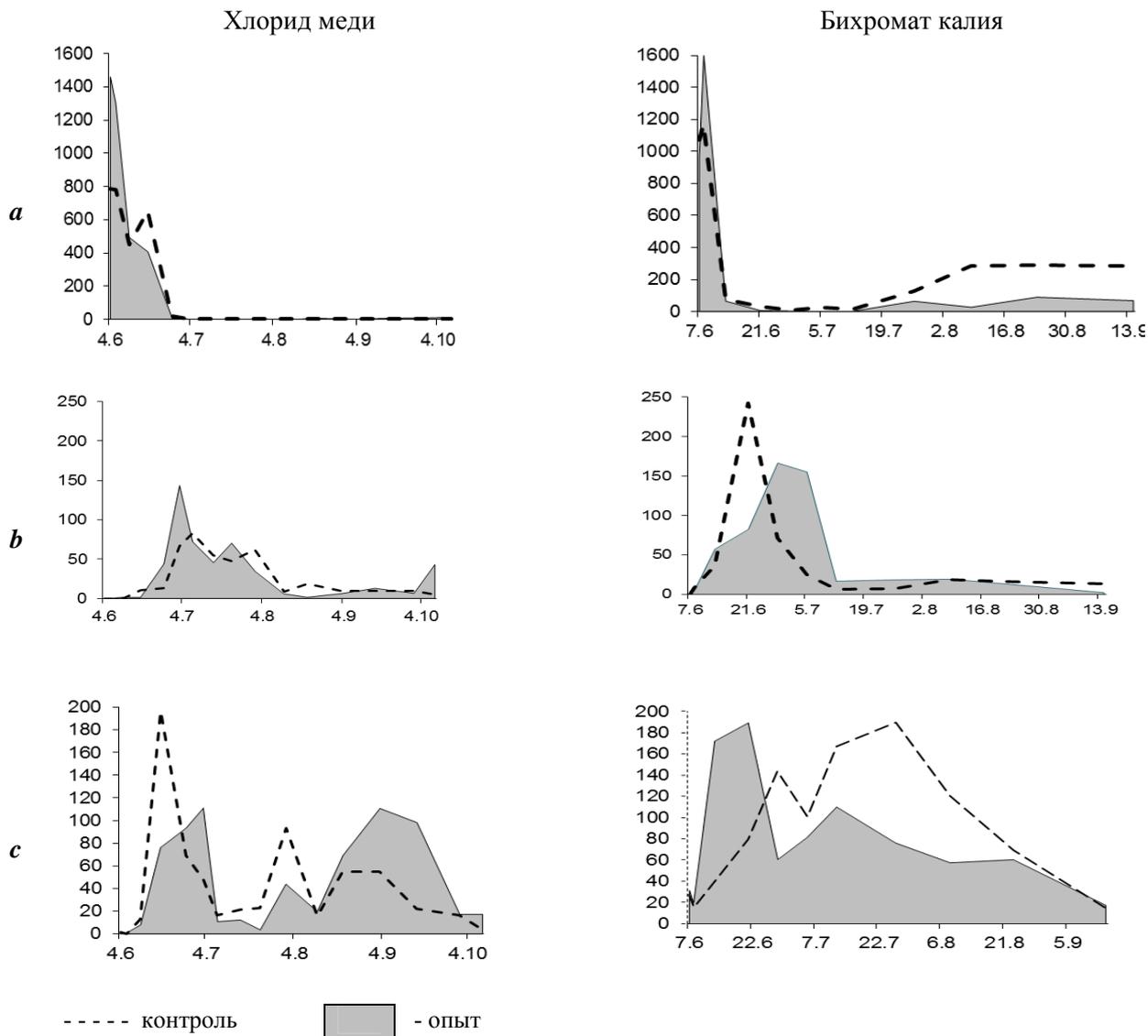
Модельные экосистемы формировались в емкостях, объемом по 2000 л, которые были заполненные речной водой, отобранной из одного и того же пункта р. Москвы вместе с естественным планктоном. Наблюдения обычно проводились на протяжении сезона от мая до октября [12]. В сообществе таких экосистем были представлены все звенья пищевой цепи от «бактерий до рыб», в том числе около 30 видов коловраток, около 10 видов ветвистоусых и 2-4 вида веслоногих. В разные годы абсолютные показатели численности разных групп планктона могли различаться (рис. 4). В каждый сезон вносили одно из веществ - бихромат калия, хлорид меди и др. в различных концентрациях. Поскольку в представляемом сообществе речь идет о концентрациях веществ, сопоставимых с фоновыми, то и в примерах рассмотрены примеры явлений, порожденных воздействием концентраций, не превышающих рыбохозяйственных ПДК.

На протяжении сезона просматривается обычная сукцессия групп организмов. Копеподы во взаимодействии групп планктона выступают в качестве хищников по отношению к коловраткам и молодым кладоцер поэтому, в частности, происходило активное нарастание численности копепод в первый месяц опыта, очевидно, на пищевой базе коловраток. Появление в среде токсикантов приводило к последующей цепи изменений. Пресс токсичности накладывается на естественные экологические взаимоотношения групп, такие как конкуренция и хищничество, формируя общую динамику каждой из групп.

И хлорид меди, и бихромат калия вызывал повышение численности коловраток в первые дни наблюдения, но в последующие сроки медь подавляла появление вторичного подъема численности, вероятно, в связи с некоторым угнетением роста водорослей.

На численность кладоцер присутствие веществ влияло мало, лишь в присутствии бихромата калия в первый месяц наблюдалось смещение пика максимума численности на более поздний период - на 2 недели.

Численность копепод в первый недели стимулировалась хлоридом меди и тормозилась бихроматом калия. Если в первое время наблюдалась стимуляция, то в последующем, как правило численность в опыте оказывалась ниже, чем в контроле. Торможение же роста в последующем сменялось превышением численности по отношению к контролю.



**Рис. 4.** Динамики численности коловраток (*a*), кладоцер (*b*) и копепод (*c*) в модельных экосистемах при действии бихромата калия (0.01 мг/л) и хлорида меди (0.001 мг/л). По оси абсцисс показаны даты, по оси ординат – количество особей на литр.

Таким образом, представленные выше материалы могут служить основой для построения схемы взаимосвязи процессов на некоторых уровнях биологических систем при токсичном загрязнении водной экосистемы (рис. 5).

Общим правилом для всех уровней биологических систем оказывается то, что вторичные механизмы токсического эффекта порождают процессы, направленные на компенсацию и ослабления первичного механизма. В ряду действующих концентраций можно выделить слабые воздействия, способные вызвать некоторые изменения в биосистеме, но не достаточно интенсивные для того, чтобы индуцировать активные адаптивно-компенсаторные реакции. Средние воздействия вызывают более интенсивные изменения в биосистеме, в том числе - и индукцию адаптивных реакций, более или менее компенсирующих деструктивные изменения и даже приводящие к общей стимуляции жизненных процессов. Интенсивные воздействия вызывают такие патологические изменения, которые биологическая система уже не способна компенсировать за счет адаптивных реакций.

Представленные обсуждения иллюстрируют следующие положения.

1. Разнообразные вещества, считающиеся чужеродными загрязнителями окружающей среды, повсеместно присутствуют в природных водах и имеют источники естественного происхождения.
2. Низкие концентрации, сопоставимые с ПДК, способны при длительном воздействии оказывать разнообразные биологические эффекты, в том числе – и стимуляцию жизненных функций.
3. Эффекты, выявленные в лабораторных испытаниях на культурах организмов, в той или иной форме воспроизводятся в экспериментальных экосистемах. Нет оснований игнорировать аналогичное действие веществ в низких концентрациях, находящихся на уровне фоновых, и в реальных природных

экосистемах. В частности, возможно, эвтрофирование за счет стимулирующего действия потенциально токсичных веществ.

4. Изложенные выше соображения обращают внимание на то, что присутствие потенциально токсичных веществ в водной среде должно учитываться при оценке влияния экологических факторов наряду с температурой, светом, концентрацией биогенов и др.



**Рис. 5.** Взаимосвязь изменений, происходящих в биологических системах при воздействии загрязняющих веществ на водные экосистемы [12,13].

#### Список литературы

1. Брагинский Л.П. Некоторые принципы классификации пресноводных экосистем по уровням токсической загрязненности // Гидробиол. журн. 1985. Т. 21. № 6. С. 65-74.
2. Livingstone D.A. Chemical composition of rivers and lakes: Date of geochemistry // U.S. Geol. Survey Profess., 1963, Paper 440 G, p. G1–G64.
3. Гордеев В.В., Лисицын А.П. Средний химический состав взвесей рек Мира и питание океанов речным осадочным материалом // ДАН СССР, 1978, 238, № 1, с. 225–228.
4. Сиренко Л.А. Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. Киев, Наукова думка, 1988, 256 с.
5. Gribble GW. The diversity of naturally produced organohalogens // Chemosphere, 2003 Jul; 52(2). P. 289-297
6. N.J.L. Green et al., Dioxins in Ancient Soil Samples. Organohalogen Cpds. 2000.

7. Silk, P.J., Lonergan, G.C., Arsenault, T.L., Boyle, C.D., Evidence of natural organochlorine formation in peat bogs // *Chemosphere*, 1997, P. 2865-2880.
8. Southam C.M. and Ehrlich J. (). Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture // *Phytopathology* 1943. 33: P. 517—524.
9. Гаузе Г. Ф. Экология и некоторые проблемы происхождения видов : Экология и эволюционная теория. — Л., Наука, 1984, С. 5–108.
10. О. Ф. Филенко, Е. Ф. Исакова, Д. М. Гершкович. Стимуляция жизненных процессов у *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Crustacea, Anomopoda) при действии низких концентраций потенциально токсичных веществ // *Биология внутренних вод*. 2013. № 4. С. 89-93.
11. Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Исследование лабораторной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. методом микрокультур // *Гидробиол. журн.* 2007 а. 42, № 5. С. 80-88.
12. Биологические процессы в загрязненных модельных водоемах. Ред. О.Ф.Филенко – М.: МГУ, 1984. 193 с.
13. Филенко О. Ф., Дмитриева А.Г., Исакова Е.Ф., Ипатова В.И., Прохоцкая В.Ю., Самойлова Т.А., Черномордина А.В. Механизмы реагирования водных организмов на воздействие токсичных веществ // *Антропогенные влияния на водные экосистемы*. Ред. О. Ф. Филенко. - М., КМК, 2005. С.70-93.

**УДК 574.21.08**

## **БИОМАРКЕРЫ В ГИДРОЭКОТОКСИКОЛОГИИ: ПРИНЦИПЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ, ПРАКТИКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Г.М. Чуйко

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Россия, Ярославская обл., п. Борок,  
gchuiko@mail.ru*

*Ключевые слова:* антропогенное загрязнение, биомаркеры, гидроэкоотоксикология

Влияние человека на окружающую среду – неизбежный результат его жизнедеятельности, как одного из элементов биосферы. Преследуя цель создать для своего существования более благоприятные условия жизни, человечество сознательно и целенаправленно изменяет среду своего обитания. По мере развития цивилизации её влияние на природу постоянно усиливается. Человек – прогрессивно развивающийся биологический вид, о чем свидетельствует постоянно продолжающийся рост численности населения на планете. Возрастающие в связи с этим потребности человечества требуют освоения новых территорий, вовлечения в эксплуатацию все новых и новых минерально-энергетических сырьевых и пищевых ресурсов, создания и активного использования новых химических соединений, материалов и технологий, наращивания промышленного и сельскохозяйственного производства. Все это влечёт за собой масштабное поступление в природную среду веществ антропогенного происхождения, отсутствующих в естественных условиях или встречающихся в природе в незначительных, безопасных для живых организмов количествах. Бесконтрольное поступление и накопление этих веществ в природной среде в результате деятельности человека ведёт к её загрязнению и ухудшению качества, что приводит к гибели организмов, деградации сообществ и целых экосистем.

На ранних этапах истории человечества его влияние на природу носило локальный, ограниченный характер и изменения в окружающей среде развивались достаточно медленно, в течение жизни нескольких поколений. В последнее столетие это влияние все больше и больше приобретает глобальные черты, и заметные изменения происходят уже за период жизни одного-двух поколений. Вот лишь некоторые из большого числа происходящих в последние десятилетия событий и процессов, вызванных деятельностью человека и имеющих последствия планетарного масштаба: 1) активно проводившиеся во второй половине XX века полевые испытания ядерного оружия и аварии на атомных электростанциях в Чернобыле и Фукусиме, повлекшие за собой поступление большого количества радиоактивных веществ в окружающую среду; 2) авария на буровой платформе в Мексиканском заливе, приведшая к утечке нефти и масштабному загрязнению ею шельфовой зоны океана; 3) постоянно возрастающий выброс углекислого газа в атмосферу в результате сжигания углеводородов, который вызывает потепление климата; 4) трансграничный атмосферный перенос персистентных антропогенных химических веществ, способствующий их повсеместному распространению и долгосрочному циркулированию в окружающей среде; 5) разрушение озонового слоя в результате выброса в атмосферу фреонов.

Вода играет ключевую роль в существовании жизни на Земле. Она покрывает большую часть поверхности нашей планеты, образуя Мировой океан и водные объекты суши. От качества водной среды зависит судьба не только водных, но во многом и наземных живых организмов. В связи с

антропогенным загрязнением водной среды современное состояние многих водных объектов можно охарактеризовать как неудовлетворительное. Однако ошибочно считать, что в обозримом будущем человечеству удастся полностью исключить свое негативное влияние на окружающую среду в целом, и на водную – в частности. Какие бы совершенные технологии малоотходного производства и способы очистки выбросов и стоков не внедрялись, прямо или косвенно человек своей деятельностью будет воздействовать на воды суши и океанов. Поэтому усилия общества должны быть направлены на то, чтобы оптимизировать его взаимоотношение с окружающей средой и минимизировать негативные последствия воздействия на неё. Это диктует необходимость проведения исследований судьбы загрязняющих веществ в водных экосистемах, их биодоступности, биотрансформации, биоаккумуляции, передачи по трофическим сетям, влияния на организмы и структурно-функциональные характеристики отдельных популяций гидробионтов и водных экосистем в целом, нормирования допустимого уровня содержания этих веществ в водных объектах и прогнозирования последствий антропогенного загрязнения водной среды. На решение данных задач и направлены усилия современной водной экотоксикологии.

Одним из инструментов, позволяющих оценить влияние антропогенного загрязнения и других экзогенных природных факторов на водные организмы и экосистемы, являются *биомаркеры*.

### ИСТОРИЯ ВВЕДЕНИЯ В ПРАКТИКУ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ В ГИДРОЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Идея разработки и использования *биомаркеров* сформировалась в 50-е – 70-е гг. XX столетия по мере осознания того, что регистрация токсичности только по показателю смертности является недостаточной для правильной оценки влияния антропогенного загрязнения и других неблагоприятных факторов окружающей среды на водные организмы и экосистемы. Кроме того, стало очевидным, что определение качества водной среды только посредством химического анализа содержания и состава загрязняющих веществ не может дать ответ на главный вопрос о её пригодности для нормального существования гидробионтов и безопасного использования человеком. Для понимания механизмов действия и выявления влияния токсических веществ на гидробионтов начали использоваться различные физиологические, биохимические, гистологические и морфологические параметры организма. Сами показатели и методы для их определения первоначально были заимствованы, главным образом, из клинической медицины, экологической физиологии и биохимии и ихтиопатологии. В результате было установлено, что многие из этих параметров позволяют оценить состояние организма и обнаружить токсическое воздействие на самых ранних стадиях развития токсического стресса, когда другими методами определить это еще невозможно. Работы в этом направлении были начаты одновременно во многих развитых странах, включая и бывший СССР. У нас в стране необходимость развития этого направления водной экотоксикологии была сформулирована Н.С. Строгановым (МГУ) в конце 60-х гг. прошлого века. На первой Всесоюзной научной конференции по вопросам водной токсикологии (Москва, МГУ, 1968) им были обозначены следующие перспективные задачи: «1) изучение связи токсических веществ с их химической природой (строением) и определение мест (процессов) поражения в организме, с целью прогнозирования на основе этих закономерностей биологических эффектов токсикантов, попадающих в водоем; 2) выявление изменений (пределы колебаний) в организмах нормальных и патологических, установление критериев нормы и патологии; 3) разработка диагностики отравления по морфологическим (патологоанатомическим, гистологическим) и биохимическим, химическим показателям». Эти направления работ получили развитие в исследованиях самого Н.С. Строганова и его школы, а также таких отечественных ученых как Б.А. Флеров и его школа, В.И. Лукьяненко (ИБВВ РАН), А.Я. Маляревская (Институт гидробиологии), Л.П.Рыжков (Петрозаводский ГУ), В.С.Сидоров и его школа, Н.Н. Немова и ее школа (ИБ КарНЦ РАН), О.Н. Лукьянова (ТИНРО-Центр), С.В. Котелевцев (МГУ) и многие другие.

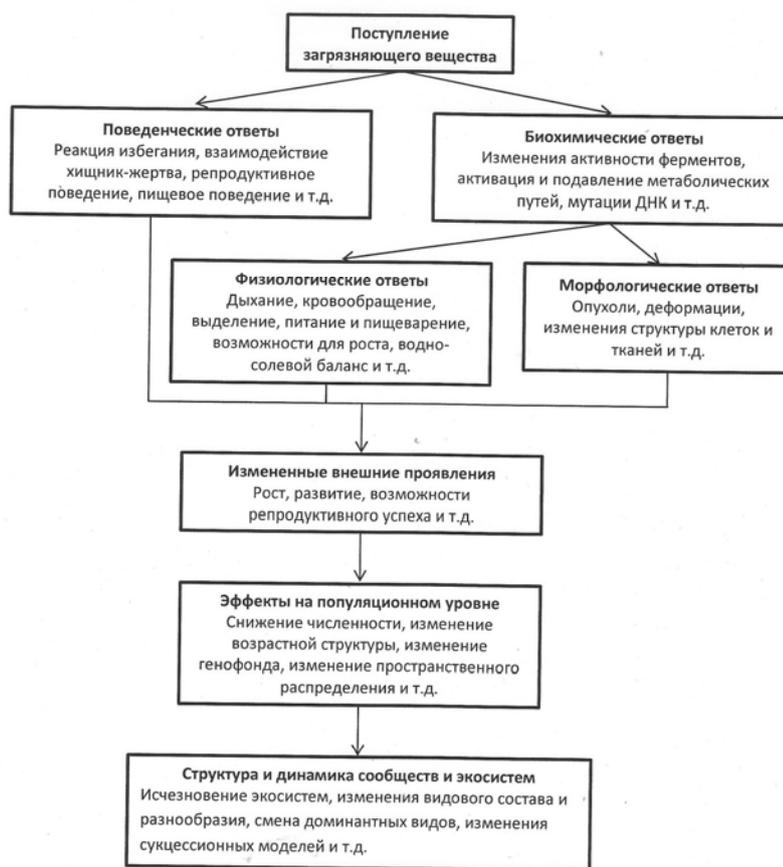
Какие конкретно показатели функционального состояния, и время, когда впервые их начали применять в водной экотоксикологии, установить трудно. Одним из первых примеров *биомаркера* служит такой биохимический показатель как активность фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в мозге, который успешно используется с начала 60-х лет прошлого столетия для установления факта отравления рыб фосфорорганическими (ФОП) и карбаматными пестицидами. В основе применения данного *биомаркера* лежит способность этих групп соединений ингибировать активность фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ).

Формулирование и начало использования термина *биомаркер* и связанных с ним основных понятий в гидроэкотоксикологии относится к середине 80-х годов. Более точно определить, кто, где и когда впервые сформулировал и употребил этот термин, не представляется возможным. Одними из первых официально ввели его в практику Национальные советы по научно-исследовательской работе Канады (National Research Council of Canada, 1985) и США (National Research Council, 1987),

выпустивших соответствующие нормативные документы. В Россию этот термин пришел из-за рубежа в 90-е годы и с тех пор активно используется в экотоксикологии в целом и в водной – в частности. Первоначально среди отечественных исследователей вместо него использовались такие понятия, как «эколого-физиологические реакции», «физиолого-биохимические показатели», «морфофункциональные параметры», «индексы стресса» и др. В развитых странах за рубежом именно с использованием *биомаркеров* проводится существенная доля оценки промышленных загрязнений или оценка степени токсичности тех или иных веществ. Большую роль биомаркеры играют и при проведении экологического мониторинга. У нас в стране биомаркеры пока не получили такого широкого практического применения и используются в основном в научно-исследовательских целях.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЯ «БИОМАРКЕР»

Слово *биомаркер*, сокращенное от *биологический маркер* – термин, обозначающий измеряемый параметр или событие (процесс, явление), происходящее в биологической системе или биологическом образце на суборганизменном и организменном уровне биологической организации (молекула, клетка, ткань, физиологическая система, организм). В гидрэкотоксикологии *биомаркеры* обычно используются как индикаторы состояния здоровья или риска проявления патологии (нарушения функции) гидробионтов, либо как индикаторы воздействия на организм химических загрязняющих веществ или *ксенобиотиков* (соединений, имеющих чужеродное для организма происхождение). Затем результаты, полученные на уровне организма, интерпретируются как отражение более общего состояния организма (выживаемость, рост, размножение) или состояния популяции, сообщества, экосистемы. Взаимосвязь эффектов на разных уровнях биологической организации, вызываемых действием загрязняющих веществ, представлена на схеме (рис.1).



**Рис. 1.** Блок-схема эффектов, которые может вызывать на разных уровнях биологической организации воздействие загрязняющих веществ (по Sheehan, 1984).

В настоящее время в качестве *биомаркеров* применяются показатели, отражающие молекулярно-генетические, биохимические, физиологические и гистологические изменения или отклонения от нормы в организме животных и растений. На блок-схеме (рис.2) показаны последовательность изменений в организме и их возможные последствия для него при

антропогенном воздействии на окружающую среду. Однако некоторые исследователи понимают термин *биомаркер* в более широком смысле и используют его для обозначения изменений на всех биологических уровнях организации: суборганизменном, организменном, популяционном, уровне сообществ и экосистемы.

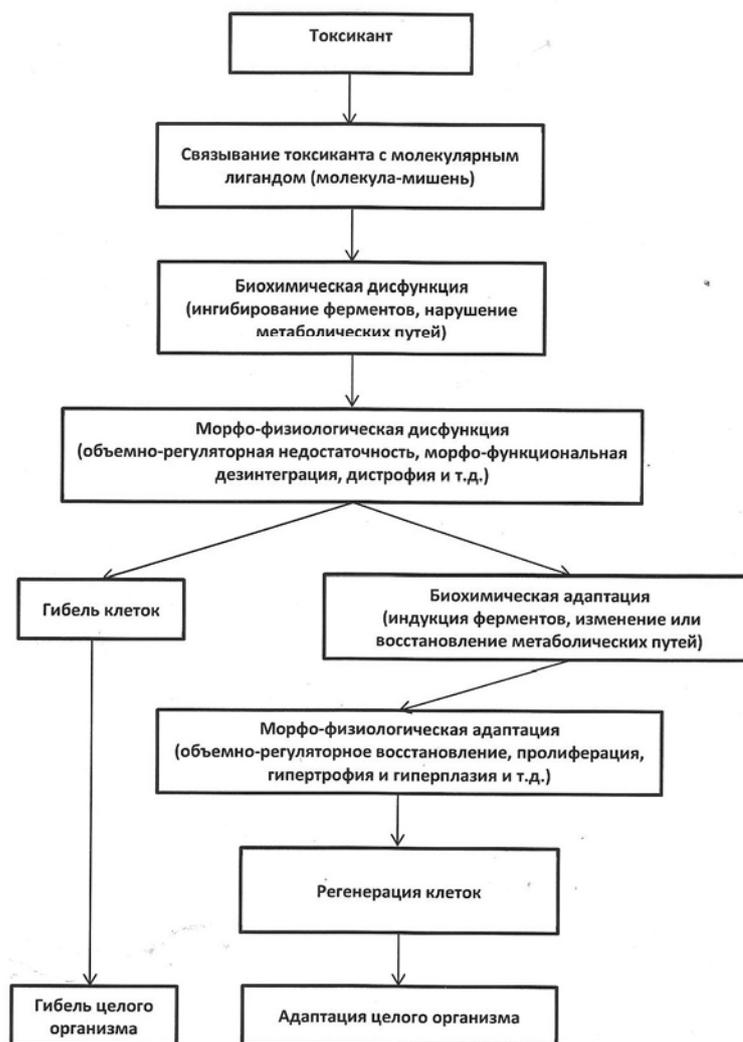


Рис. 2. Блок-схема интегрированного биохимического, морфо-функционального и целостного ответа организма на действие токсиканта (модифицировано по: Hinton and Lauren, 1990).

Но абсолютное большинство ученых-экоотоксикологов придерживается первоначального, более узкого понимания термина *биомаркер*. Для показателей событий, явлений и процессов, происходящих под действием загрязняющих веществ в биологических системах более высокого уровня (популяция, сообщество, экосистема), чаще применяется термин *биоиндикатор*, а применение *биоиндикаторов* с этой целью называется *биоиндикацией*. Используются *биомаркеры* в условиях *in vivo*, *in vitro* и *in situ* как в лабораторных экспериментах, так и в полевых исследованиях. А их использование по аналогии с *биоиндикацией* называется *биомаркированием*.

#### ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ (КРИТЕРИИ), ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К КАНДИДАТАМ В БИОМАРКЕРЫ

В настоящее время в качестве биомаркеров используют следующие параметры организма:

1. изменения на уровне ДНК;
2. функциональные белки, включая ферменты;
3. метаболиты;
4. неспецифические иммунологические, гистопатологические и физиологические ответы.

Однако не каждый показатель, отражающий молекулярно-генетические, биохимические, физиологические и гистологические изменения или отклонения от нормы в организме гидробионтов

может претендовать на роль *биомаркера*. При выборе показателей – потенциальных кандидатов в *биомаркеры* необходимо руководствоваться рядом приведенных ниже важных критериев.

1. Химическая специфичность. Некоторые *биомаркеры* отвечают на действие любого фактора или экспозицию, в то время как другие выявляют специфические химические вещества или их классы. Если *биомаркер* реагирует на действие широкого ряда химических веществ и внешних факторов, он может быть полезным как общий неспецифический индикатор оценки состояния организма или воздействия на него смесей загрязняющих веществ и неблагоприятных факторов. Если индикатор указывает на отдельные химические вещества или их классы, он может использоваться при выполнении экологической экспертизы для идентификации типа воздействия на организм и диагностики причин нарушений функционального состояния животных.

2. Относительная чувствительность. Две концепции положены в основу этого критерия: 1) насколько более чувствителен *биомаркер* по сравнению с такими традиционными показателями токсичности или неблагоприятного воздействия на организм, как смертность, нарушения воспроизводства или роста, и 2) насколько более чувствителен *биомаркер* по сравнению с другими кандидатами в *биомаркеры*. *Биомаркер* должен быть чувствительным к токсическому воздействию, но при этом применяться соответствующим образом. Например, нет необходимости разрабатывать *биомаркеры* для измерения остролетальных токсических концентраций химических соединений. Кроме того, в хронических исследованиях *биомаркеры* должны превосходить по чувствительности такие традиционные общепатологические показатели, как выживаемость, рост и размножение.

3. Биологическая специфичность. Некоторые *биомаркеры* могут быть более применимы для определенных групп организмов в силу особенностей их метаболизма. Например, метаболизм полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) у двустворчатых моллюсков отличается от такового у рыб и млекопитающих.

4. Ясность интерпретации. Вызванные ксенобиотиками изменения на суборганизменном уровне организации не являются биологически надежными, если они полностью компенсируются организмом и не вызывают неблагоприятного воздействия. По этой причине важным аспектом использования биомаркеров является отделение адаптивных (гомеостатических) ответов от токсических эффектов. Определенные специфические изменения в физиолого-биохимическом статусе организма происходят:

- а) после стимуляции природными (экологическими) факторами внешней среды;
- б) под действием нетоксических (т.е. непродолжительных по времени экспозиции или при низких концентрациях) доз химических веществ;
- в) при действии токсических доз.

В первых двух случаях изменения в организме не являются столь серьезными, чтобы вызвать патологические нарушения функций или повреждения клеток и тканей в организме и привести к его болезни или гибели, а носят адаптивный (приспособительный) характер. В последнем случае под действием токсической дозы в организме происходят морфо-функциональные нарушения, не компенсируемые его адаптивными возможностями и приводящие к патологическому состоянию, которое в тяжелых случаях заканчивается гибелью.

5. Латентный период ответа. Время до начала проявления ответа для разных *биомаркеров* может широко варьировать в пределах от мгновенного, например, содержание глюкозы в крови, до нескольких лет, как необходимо для проявления некоторых повреждений, связанных с онкологией. В зависимости от цели конкретного исследования, может требоваться быстрый или медленный ответ и соответствующий *биомаркер*.

6. Устойчивость и обратимость ответа. Продолжительность проявления ответа может значительно варьировать среди *биомаркеров*. Например, повышенный уровень глюкозы в крови рыб после токсического воздействия может сохраняться от нескольких десятков минут до нескольких дней, в то время как стабильное содержание и состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) в биологических тканях может оставаться неизменным в течение нескольких лет после поступления в организм. В зависимости от масштаба временной интеграции, требуемой в мониторинговом исследовании, устойчивость и обратимость ответа может быть важным критерием, который необходимо принимать во внимание.

7. Биологическая изменчивость (вариабельность). Большое значение для любого кандидата в *биомаркеры* имеет диапазон изменчивости данного показателя. Вариабельность любого биологического ответа имеет три основных составляющих: 1) изменчивость процессов внутри организма; 2) изменчивость, связанная с внешними факторами окружающей среды, включая эффекты токсикантов; и 4) методологическая или манипуляционная изменчивость, связанная с процедурой собственно определения. Первая и вторая причины изменчивости обусловлены влиянием нехимических стрессоров на «нормальный» диапазон значений ответа *биомаркеров*. Внутри одного вида это такие факторы как характер питания, генетические особенности, пол, размерно-возрастные характеристики и стадии онтогенеза, функциональное состояние организма, органо-тканевая

специфичность, окружающая температура и другие факторы среды обитания. Третья причина связана с методикой взятия образцов и самой процедурой анализа. Существуют и видовые особенности ответа *биомаркеров*. Учитывая это, следует выбирать виды организмов, у которых используемый показатель в наибольшей степени соответствует критериям, предъявляемым к *биомаркерам*. Возможность учета влияния перечисленных выше факторов на вариабельность *биомаркеров* зависит от развития фундаментальных знаний по этому вопросу.

8. Взаимосвязь с эффектами более высокого уровня биологической организации. *Биомаркеры* более низкого уровня биологической организации (генетические, молекулярные и биохимические ответы) становятся намного больше биологически значимыми, когда может быть ясно прослежена их связь с такими биологическими функциями как выживаемость, рост или размножение. Отсутствие связи не всегда означает, что ее нет. Это может быть результатом малой изученности *биомаркера* или текущего непонимания его вовлеченности в процессы, проходящие на более высоких уровнях биологической организации. Нечеткая выраженность взаимозависимостей не отменяет применимость *биомаркера*, но это может существенно снизить его прогностический потенциал и таким образом ограничивать его практическое использование.

9. Применимость в лабораторных и/или полевых условиях. Некоторые *биомаркеры* могут быть измерены только в лабораторных условиях, т.к. для этого требуется сложное оборудование и участие высококвалифицированного персонала. В то же время, для других имеется оборудование, позволяющее определять их в полевых условиях.

10. Практические ограничения. Когда предполагается активное и массовое применение *биомаркеров* в биомониторинге, важными соображениями являются их *точность, простота и стоимость*. *Точность* зависит от аналитической воспроизводимости метода. *Стоимость* определяется общими финансовыми затратами, необходимыми для проведения работ, а *простота* – легкостью процедуры отбора проб, их подготовки и анализа, а также отсутствием особых требований к квалификации персонала.

11. Степень изученности и практическая полезность биомаркера. Необходимо принимать во внимание является ли надежность, обоснованность и значимость *биомаркера* достаточно установленными, чтобы законодательным образом утвердить его практическое использование.

В табл. 1 обобщены основные критерии и с позиции использования дается сравнительная характеристика некоторых, приведенных ниже (Раздел 7) *биомаркеров*, относящихся к группе функциональных протеинов, включая ферменты.

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛЕВОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ В ГИДРОЭКОТОКСИКОЛОГИИ

Многие *биомаркеры* были разработаны и успешно применялись с целью количественной оценки токсических эффектов в лабораторных условиях и прежде всего в медицине и ветеринарии для человека и животных в диагностических целях. На решение важных экологических проблем, и в частности гидроэкотоксикологических, эти методы направлены не были. Чтобы иметь применение в гидроэкотоксикологии, физиологические и биохимические показатели токсического действия или токсических эффектов должны включать разные группы гидробионтов и быть применимы не только в лабораторных, но и в полевых условиях и отвечать ряду требований. Для этого должно быть решено несколько общих задач:

1. Накопить базовые знания о норме реакции биохимического и физиологического показателя, претендующего на роль *биомаркера*.

Использование *биомаркеров* в гидроэкотоксикологии сильно ограничивается недостатком базовых данных по биохимии и физиологии гидробионтов в «нормальных» физиологических диапазонах (норма реакции). Поэтому, развитие таких знаний для конкретного *биомаркера* наряду с установлением статистической достоверности его определения является существенным для внедрения в практику. Последнее зависит как от вариабельности измеряемого параметра, так и от размера выборки. Рекомендуется определять стандартное отклонение параметра и использовать статистические методы анализа, чтобы установить необходимый размер выборки, достаточный для надежного определения среднего значения параметра.

2. Определить вариабельность (диапазон варьирования) значений *биомаркера* в природных условиях.

**Таблица 1.** Сравнительная характеристика пользовательских свойств биомаркеров, относящихся к группе функциональных протеинов, включая ферменты

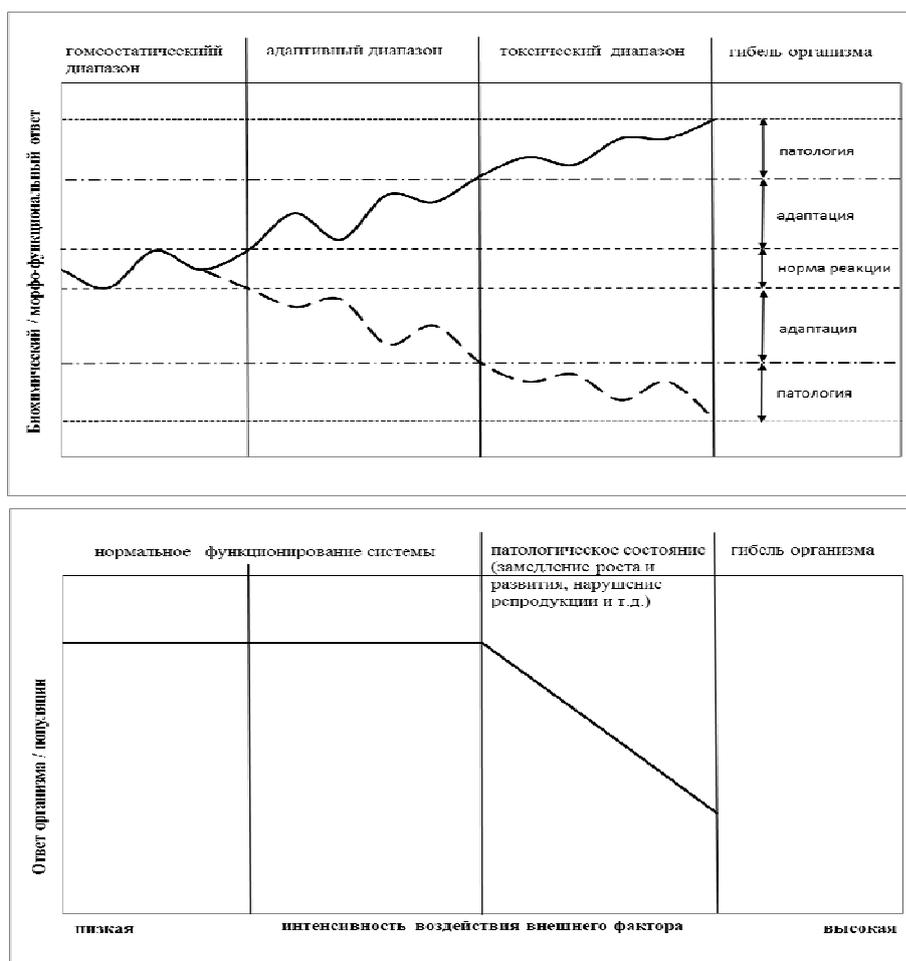
Свойство	Биомаркер					
	Цитохром P450A1 (ЭРОД, АГГ)	Ферменты II фазы БТК	МТ	БТШ	Показатели ОС	АХЭ
Биомаркер воздействия	да	да	да	да	да	да
Биомаркер эффекта	да	?	?	да	да	да
Биологическая специфичность	позвоночные	позвоночные	эукариоты	прокариоты, эукариоты	широкая	позвоночные, беспозвоночные
Химическая специфичность	ПАУ, планарные ХАУ	ПАУ, ПХБ	некоторые металлы	металлы, органические и неорганические соединения	оксиданты, соединения окислительно-восстановительного ряда	ФОС, карбаматы
Чувствительность	высокая	низкая	высокая	высокая	высокая у растений, недостаточно исследовано у животных	высокая
Латентный период ответа	6-24 ч	дни	часы - дни	минуты - часы	широко варьирует	минуты - часы
Надежность ответа	высокая	высокая	высокая	высокая	не установлено	высокая
Связь с эффектами более высокого биологического уровня	есть	есть	есть	есть	есть	есть
Результаты испытания в полевых условиях	положительные	нет данных	положительные	мало данных	Положительные (для тех, что испытаны)	положительные
Стоимость анализа	средняя	средняя	высокая	средняя	низкая/средняя	низкая
Сложность анализа	высокая	высокая	высокая	высокая	высокая	низкая
Необходимость дополнительных исследований	да	да	да	да	да	да

Примечание: БТК – биотрансформация ксенобиотиков, МТ – металлотионеины, БТШ – белки теплового шока, ОС – оксидативный стресс, ХАУ – хлорированные ароматические углеводороды (ПХБ, ПХДД/Ф), ПАУ – полициклические ароматические углеводороды, ЭРОД – этоксирезорифин диэтилаза, АГГ – арилгидрокарбон гидроксилаза, АХЭ - ацетилхолинэстераза. (модифицировано по: Stegeman et al., 1972)

Об основных причинах вариабельности *биомаркеров* было написано выше. Кроме этого, особое значение для гидроэкотоксикологических исследований приобретают и экологические факторы, такие как физико-химический состав водной среды (минеральный состав, рН, содержание растворенного кислорода, содержание органических и биогенных элементов и т.д.), сезонная цикличность биологических и абиотических процессов и климатогеографические особенности мест обитания гидробионтов. В конечном итоге изменчивость измеряемого показателя (*биомаркера*) должна быть понятна и находится внутри допустимых пределов.

3. Разработать *биомаркеры*, которые позволяют различать адаптивные ответы организма от токсических эффектов.

Об основных трудностях и особенностях интерпретации данных, полученных с помощью *биомаркеров*, написано выше. В отличие от млекопитающих и птиц, которые по отношению к основным экологическим факторам являются *регуляторами* в том смысле, что состояние внутренней среды их организма поддерживается на постоянном уровне независимо от изменения состояния внешней среды, гидробионты в своей массе относятся к *конформерам*, т.е. состояние их внутренней среды следует за изменениями внешней среды. Эти различия не позволяют механически использовать данные, полученные на млекопитающих и человеке, и требуют отдельного и тщательного изучения адаптивных реакций и токсических эффектов у гидробионтов. Решение проблемы четкого разделения адаптивных ответов и токсических эффектов у водных организмов позволит проводить правильный выбор *биомаркеров* для выполнения гидроэкотоксикологических исследований и задач. На рис. 3 сравнивается характер ответов гидробионтов на биохимическом/морфо-функциональном и организменном/популяционном уровнях в зависимости от интенсивности действия внешнего фактора, включая и антропогенное загрязнение.



**Рис. 3.** Сравнение биохимических и морфо-функциональных ответов с ответами целого организма и популяции гидробионтов при действии разных по интенсивности факторов внешней среды (модифицировано по: Versteeg et al., 1988).

В гомеостатическом и адаптивных диапазонах воздействия фактора организм или популяция функционирует нормально. При этом биохимические и морфо-функциональные параметры

организма меняются в пределах нормы реакции или его адаптивных возможностей. При более сильных воздействиях, соответствующих токсическому диапазону, когда превышены адаптивные возможности организма или популяции на биохимическом и морфо-функциональном уровнях, в биологической системе развиваются патологические изменения. Еще более сильные воздействия приводят к гибели организма или популяции.

4. Провести оценку *биомаркера* на экологическую значимость в полевых условиях.

Экологическая полезность и информативность многих *биомаркеров* у гидробионтов до сих пор не установлена, т.к. их проверка и всесторонняя оценка в полевых условиях все ещё не выполнена. Поэтому, хотя полевые исследования и более сложны для проведения, чем лабораторные эксперименты, выяснение экологической значимости *биомаркеров* должно быть приоритетным интересом исследователей.

5. Выявить связь между ответом *биомаркера* и важными и надежными экологическими эффектами на уровне популяции, сообщества и экосистемы.

В идеальном случае ответ *биомаркера* должен позволять спрогнозировать эффекты в биологической системе на более высоком уровне биологической организации. Как было отмечено выше, для каждого *биомаркера*, чтобы быть эффективно применимым в полевых условиях, должна быть установлена связь с такими биологически значимыми показателями как выживаемость, рост или размножение и т.п. Значимым может считаться любой эффект, который обуславливает изменения в размере, структуре или состоянии популяции, сообщества или экосистемы. В медицине клинические измерения успешно используются для выявления патологических эффектов у человека, т.к. накоплен большой объем фактических данных о корреляции клинических *биомаркеров* с патологическими процессами. Поскольку для многих гидробионтов такой информации недостаточно или она отсутствует, использование *биомаркеров* для оценки токсического воздействия или эффектов остается пока еще ограниченным. *Биомаркеры* у гидробионтов имеют свои особенности, поскольку для анализа можно брать любые органы и ткани, а не ограничиваться только клиническими прижизненными обследованиями. Однако в последнее время большое внимание в гидроэкотоксикологии уделяется разработке *биомаркеров*, использование которых возможно без умерщвления животных.

6. *Биомаркер* должен быть относительно легко измеряем и позволять проводить его массовое определение у достаточного числа индивидуумов.

Показатели, которые являются дорогостоящими в измерении, затратными по времени и требующими высокой квалификации персонала, проводящего измерение, не могут быть эффективно используемыми и полезными в полевых исследованиях при количественной оценке эффектов в организмах и природных популяциях.

7. Зависимость ответа от дозы и времени воздействия.

*Биомаркер* должен отвечать в дозо- или времязависимой манере на действие токсического фактора таким образом, чтобы величина (амплитуда) воздействия или эффекта могла быть определена.

Следует иметь в виду, что не все из вышеперечисленных критериев должны выполняться для того, чтобы *биомаркер* мог быть полезным и использоваться. Однако эти критерии помогут в выборе *биомаркера*, планировании исследования, анализе и интерпретации данных.

## КЛАССИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ

Хотя отдельные *биомаркеры* трудно поддаются классификации, их можно условно разбить на три большие группы: *биомаркеры воздействия*, *биомаркеры эффекта* и *биомаркеры чувствительности*. Однако четкого разграничения между различными типами *биомаркеров* не существует. Поэтому одни и те же *биомаркеры* могут быть одновременно отнесены к разным группам.

*Биомаркером воздействия* может выступать экзогенное соединение (или его метаболит) внутри организма (биологической системы), продукт взаимодействия между соединением (или метаболитом) и эндогенным компонентом, либо другое событие, связанное с воздействием химического или физического экзогенного фактора. *Биомаркеры воздействия* являются *специфическими* и позволяют выявить факт воздействия конкретного фактора на организм или его присутствия в окружающей среде. Примером *биомаркера* этого типа может быть содержание метаболитов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в желчи, полихлорированных бифенилов (ПХБ) и металлотioneинов в тканях, активность АХЭ в мозге или крови, индукция ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени рыб и др. Оценка *биомаркеров воздействия* должна проводиться с учетом временных особенностей экспозиции и применительно к различным составным частям (компартаментам) организма. Наибольшую прогностическую

ценность имеют те *биомаркеры воздействия*, для которых установлена функциональная или потенциальная корреляция с нарушениями здоровья организма или гидробионтов.

*Биомаркером эффекта* может выступать эндогенный компонент или параметр функциональной способности, либо другой показатель состояния равновесия организма или системы органов, на которые оказано воздействие, признаваемый как морфо-функциональное нарушение или заболевание. Примером *биомаркера* этого типа могут служить показатели состояния окислительного стресса, белки теплового шока (БТШ) или по-другому стресс-белки, активность АХЭ в мозге, содержание глюкозы в крови, индукция ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени и др. *Биомаркеры эффекта*, как правило, являются индикаторами отклонений от нормального состояния организма. Обычно они указывают на изменения функции клеток, тканей, отдельных органов и организма в целом. Эти биомаркеры могут быть *специфическими* и *неспецифическими*. *Специфические биомаркеры* указывают на биологический эффект конкретного типа воздействия. Примером такого *биомаркера* служит активность АХЭ в мозге рыб. В результате ее снижения под действием ФОП и карбаматов, нарушается проведение нервного импульса в холинергических синапсах, и развиваются симптомокомплексы отравления организма нейротрансмитерного типа. *Неспецифические биомаркеры* не указывают на конкретную причину эффекта, но отражают общий, комплексный характер комбинированного воздействия. К такому типу *биомаркеров* относятся набор показателей, указывающий на развитие в клетке состояния *окислительного стресса*: продукты перекисного окисления липидов ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты,) и содержание карбонильных групп в белках, изменение активности ферментов (каталаза (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы, глутатион-S-трансферазы (GST) и др.) и содержания низкомолекулярных компонентов (восстановленный и окисленный глутатион, каротиноиды, витамин С (аскорбат), витамин Е (токоферол) и другие антиоксиданты) системы антиоксидантной защиты (АОЗ) в различных тканях организма.

*Биомаркерами чувствительности* являются показатели, связанные с природными особенностями функционирования организма гидробионтов (стадии онтогенеза, периоды годового цикла и т.д.), которые делают его более восприимчивым к воздействию ксенобиотиков. Примером могут служить биомаркеры, регистрируемые у рыб на ранних стадиях онтогенеза – эмбриональное развитие и личиночная стадия, когда их организм наименее устойчив к токсическому воздействию.

## ЧАСТНЫЕ ПРИМЕРЫ БИОМАРКЕРОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ГИДРОЭКОТОКСИКОЛОГИИ

В настоящее время в качестве кандидатов в *биомаркеры* исследуются многие показатели метаболизма гидробионтов и их морфо-функциональные параметры. Степень их изученности различная. Некоторые *биомаркеры* изучены достаточно хорошо, по ним имеется обширная базовая информация, и они успешно используются в научной и экологической практике, в то время как другие требуют своего дальнейшего изучения. Ниже приведены лишь некоторые примеры *биомаркеров*, применяемых в гидроэкотоксикологических исследованиях.

### 1. Активность холинэстераз

Холинэстеразы (ХЭ) – ферменты, широко распространенные в живой природе от микроорганизмов и простейших одноклеточных организмов до позвоночных, включая человека. Выделяют два основных типа ХЭ: ацетилхолинэстераза (ацетилхолин ацетилгидролаза, АХЭ; К.Ф. 3.1.1.7) и холинэстераза (ацилхолин ацилгидролаза; К.Ф. 3.1.1.8), представленная рядом ферментов. К последнему типу относится наиболее известная и часто встречаемая среди животных бутирилхолинэстераза (БуХЭ). Оба типа эволюционно связаны, но кодируются разными генами и имеют свои специфические черты, на основании которых их различают. АХЭ специализированный фермент и его основная биологическая функция – гидролиз ацетилхолина (АХ), медиатора передачи нервного импульса, а физиологическая роль – участие в нейротрансдукции в холинергических синапсах в центральных и периферических отделах нервной системы. БуХЭ менее специфична в отношении субстратов и ее роль окончательно не ясна, хотя высокая активность фермента в крови и печени высших позвоночных указывает на его функциональную значимость. В основе применения активности ХЭ как *биомаркера* лежит свойство ферментов необратимо или обратимо ингибироваться в дозозависимой манере фосфорорганическими (ФОС) и карбаматными соединениями. Причем после прекращения контакта животных с этими ксенобиотиками активность ХЭ остается пониженной по сравнению с нормальным уровнем в течение периода от нескольких суток до нескольких недель в зависимости от того, обратимое или необратимое ингибирование имело место.

В гидроэкотоксикологии активность ХЭ используется как *специфический биомаркер воздействия* ФОП и карбаматных пестицидов на водных животных. Методология использования этого показателя была заимствована из биомедицинской практики, где он применяется в качестве

диагностического инструмента при отравлении животных и человека ФОС и карбаматами, включая пестициды и нервнопаралитические газы. Ингибирование АХЭ напрямую связано с механизмом токсического действия этих групп ксенобиотиков на организм. Среди гидробионтов наиболее изученной и часто используемой в качестве биомаркера является активность АХЭ мозга и БуХЭ крови и тканей рыб. В отношении этих ферментов имеется обширная базовая информация о нормальном уровне их активности и пределах её биологической вариабельности у широкого ряда морских и пресноводных видов. При этом установлена зависимость от степени ингибирования АХЭ мозга рыб таких биологически важных функций организма как дыхание, плавательная способность, питание, пищевое и социальное поведение, репродуктивная способность. Например, если леща (*Abramis brama* L) помещать в условия, приближенные к естественным, и побуждать их к поиску и добыванию пищи, то снижение до 32 % от нормального уровня активности АХЭ в мозге при действии сублетальных концентраций ФОП приводит к нарушению их пищевого поведения и снижению рациона питания на 35% за счет подавления способности к пищедобыванию. Однако в условиях лабораторного эксперимента при хроническом действии сублетальных концентраций пестицидов и питании *ad libitum* активность АХЭ мозга может быть снижена до 11% нормального уровня и находится в его пределах в течение 60 сут без проявления видимых внешних признаков отравления и даже заметном росте рыб.

## 2. Показатели состояния окислительного стресса в клетке

Характерная особенность метаболизма аэробных организмов, использующих молекулярный кислород для дыхания – образование активных форм кислорода (АФК): супероксид анион-радикала ( $O_2^-$ ), пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильного радикала ( $OH\cdot$ ) и синглетного кислорода ( $^1O_2$ ). В обычных условиях АФК образуются в небольших количествах как промежуточные или побочные продукты нормального метаболизма. АФК являются сильными окислителями и крайне реакционно-способными соединениями, которые взаимодействуют с основными группами биологических молекул: белками, нуклеиновыми кислотами, липидами и углеводами. В результате этого взаимодействия разрушаются функциональные молекулы и субмолекулярные клеточные структуры, что приводит к нарушению метаболизма и физиологических функций организма. Для нейтрализации АФК в ходе эволюции в клетке возникла система антиоксидантной защиты (АОЗ), включающая низкомолекулярные (глутатион, каротиноиды, витамины С, Е, Q и др.) и высокомолекулярные (ферменты каталаза (КАТ), супероксиддисмутаза (СОД), глутатионредуктаза (ГТР), глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионтрансферазы (ГСТ) и др.) компоненты.

При действии на организм различных природных и антропогенных стресс-факторов, включая ксенобиотики, в клетках наблюдается избыточное образование АФК, которое приводит к нарастанию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификация белков и окислительному повреждению ДНК на фоне одновременного снижения эффективности работы системы антиоксидантной защиты (АОЗ). Состояние клетки, характеризующееся комплексом этих симптомов, получило название *окислительного стресса* (ОС). Индикаторами образования АФК и развития состояния ОС в клетке служит накопление продуктов ПОЛ, в частности, малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК), и окислительная модификация белков, выражающаяся в увеличении содержания карбонильных производных аминокислот в белках, а также изменения по сравнению с базовым уровнем содержания низкомолекулярных компонентов и активности ферментов АОЗ. Основные положения теории окислительного стресса были сформулированы в 50-60 гг. XX века.

В гидроэкотоксикологии показатели состояния *окислительного стресса* используются как *неспецифические биомаркеры эффекта*. Они позволяют оценить физиологическое состояние гидробионтов, подвергнутых воздействию отдельных ксенобиотиков и их смесей, как в лабораторных, так и в полевых условиях. У бентосоядных рыб – лещей, выловленных на участках Рыбинского водохранилища вблизи г. Череповец, загрязненных полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ), полихлорированными бифенилами (ПХБ), нефтепродуктами (НП) и тяжелыми металлами (ТМ), отмечен повышенный уровень МДА и пониженная активность КАТ, ГСТ и СОД в печени по сравнению с рыбами из относительно чистых участков. В другом исследовании у камбалы, содержащейся в экспериментальных условиях в аквариумах с донными отложениями, загрязненными ПХБ и ПАУ, состояние *окислительного стресса*, выражающееся в повышении уровня содержания МДА и активности КАТ и СОД, развивалось в печени к 80 сут. К концу эксперимента к 140 суткам физиологическое состояние рыб возвращалось к норме. При сравнении результатов этих двух исследований обращает на себя внимание, что в обоих случаях в условиях повышенной нагрузки ксенобиотиков интенсивность процессов ПОЛ повышалась, а изменения активности антиоксидантных ферментов носили противоположный характер. Однако в этом нет противоречия. В природных условиях

рыбы достаточно долго подвергались антропогенной нагрузке, поэтому их система АОЗ была подавлена, что и выразилось в устойчиво высоком уровне МДА и пониженной активности антиоксидантных ферментов. В экспериментальных условиях продолжительность и сила воздействия были меньше, поэтому организм смог к концу эксперимента адаптироваться и система АОЗ стабилизировала содержание продуктов ПОЛ. Приведенные примеры указывают на то, что при использовании *биомаркеров эффекта* более надежным и информативным показателем является анализ временной динамики, а не величин показателя в статичных точках процесса.

### 3. Белки теплового шока (БТШ) или стресс-белки

Белки теплового шока (БТШ) или стресс-белки – это группа внутриклеточных белков, содержание которых резко возрастает в ответ на воздействие на клетку и организм в целом любых стресс-факторов. Впервые они обнаружены в 1962 г., когда было показано, что в ответ на повышение температуры среды у личинок дрозофилы происходит активация синтеза специфической группы белков. Поэтому изначально они и получили название белков теплового шока (heat shock proteins, Hsp). Позже было установлено, что синтез этих белков индуцируется не только при повышении температуры, но и при многих других неблагоприятных воздействиях, таких как добавление к клеткам органических растворителей, тяжелых металлов, органических ксенобиотиков, сильных оксидантов, аноксии, изменении солености среды и др., а также под влиянием некоторых гормонов и ростовых факторов. В связи с этим их стали называть ещё и стресс-белками. Однако некоторые авторы считают этот термин не совсем удачным, поскольку и в нормальных условиях клетки синтезируют большое количество таких белков. Это обусловлено тем, что БТШ играют важную роль в процессах сворачивания полипептидной цепи вновь синтезированных белков, а также участвуют в процессах репарации или элиминации неправильно свернутых или денатурированных белков.

Согласно современной классификации, в основу которой положены различия в молекулярных массах, выделяют пять основных классов Hsp: Hsp100, 90, 70, 60 и малые Hsp (small Hsp, sHsp). Каждый из этих классов БТШ выполняет характерные функции. Так, белки класса Hsp100 выполняют защитную функцию, предохраняя организм в условиях стресса. Белки семейства Hsp90 образуют сложный комплекс с несколькими вспомогательными белками (т.н. кошаперонами). Такой комплекс взаимодействует с рецепторами стероидных гормонов, обеспечивает эффективное связывание гормона с рецепторами и последующий перенос гормон-рецепторного комплекса в ядро. Помимо этого, белки класса Hsp90 участвуют в направленном переносе нескольких типов протеинкиназ к участкам их функционирования. Белки семейства Hsp70 являются близкими родственниками БТШ с молекулярной массой 100 кДа и взаимодействуют с вновь синтезируемой на рибосомах полипептидной цепью, предотвращают преждевременное неправильное сворачивание незрелой полипептидной цепи и участвуют в транспорте белка к определенным органеллам (митохондриям, эндоплазматическому ретикулуму и т.д.). Белки семейства Hsp60 могут участвовать в фолдинге (образовании вторичной и третичной структуры) сложно устроенных многодоменных белков (таких как актин или тубулин), а также в АТФ-зависимом исправлении ошибок в структуре частично денатурированных белков. К последней группе БТШ относятся Hsp с малыми молекулярными массами (sHsp). Они усиленно экспрессируются при тепловом шоке и увеличивают резистентность клеток к повреждающим факторам. Считается, что малые БТШ выполняют функции молекулярных шаперонов и предотвращают агрегацию частично денатурированных белков в клетке.

Стресс-белки – идеальные кандидаты в *биомаркеры* загрязнения окружающей среды т.к. они являются:

- 1) частью клеточного защитного ответа;
- 2) индуцируются широким рядом разнообразных внешних стресс-факторов;
- 3) высоко консервативны т.к. их структура и функции одинаковы у всех организмов от бактерий до человека.

В гидроэкотоксикологии БТШ используются как *неспецифические биомаркеры эффекта*. Увеличение их содержания по сравнению с базовым или конститутивным уровнем указывает на то, что клетка и организм в целом под действием неблагоприятных условий находятся в состоянии стресса.

В качестве примера можно привести использование БТШ амфипод в качестве *биомаркеров* неблагоприятного воздействия. Установлено, что показатели термоустойчивости, устойчивости к гипоксии и токсикантам у байкальских и палеарктических амфипод взаимосвязаны с конститутивным (базовым) содержанием БТШ. Для наиболее резистентных литоральных видов характерны и наибольшие конститутивные уровни БТШ, у менее резистентных глубоководных видов их уровни ниже. У наиболее резистентных видов также наблюдается способность к более выраженному увеличению количества БТШ в условиях стрессового воздействия. Так при

токсическом стрессе, вызванном сублетальным действием на рачков раствора хлорида кадмия, о защитном предназначении синтеза дополнительного количества БТШ, включая в равной степени Hsp70 и sHsp, свидетельствует характерная зависимость «доза – эффект». При увеличении концентрации хлорида кадмия в растворах, в которых экспонировали рачков, наблюдали увеличение количества синтезируемых БТШ. В пределах использованных концентраций хлорида кадмия у амфипод отмечена прямая зависимость между уровнем индукции синтеза БТШ и концентрацией токсиканта.

#### 4. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков.

Ферменты биотрансформации ксенобиотиков относятся к биохимической системе детоксикации и выведения из организма экзогенных токсичных органических веществ. Кроме того, они участвуют в метаболизме таких гидрофобных органических соединений эндогенного происхождения как желчные пигменты, стероиды, простагландины и др. Эта группа ферментов широко представлена в живой природе от простейших до высокоорганизованных организмов. Механизм биотрансформации экзогенных и эндогенных соединений единый. Его сущность заключается в последовательных, поэтапных биохимических превращениях исходной молекулы, направленных на снижение её гидрофобности и подготовки к выведению из организма. Процесс биотрансформации состоит из двух этапов или фаз, суть которых различна и в которых принимают участие разные группы ферментов. На первом этапе (фаза I, модификация) исходное соединение подвергается одной из следующих реакций: окисления (ксенобиотики), гидролитического расщепления (эферы и пептиды), восстановления (карбонильные группы, азо- и нитросоединения, дегалогенирование), метилирования и десульфирования с участием соответствующих ферментов за счет чего образуются менее гидрофобные метаболиты. Реакции этой фазы осуществляются на гладком эндоплазматическом ретикулуме и наиболее интенсивно протекают в клетках печени (гепатоцитах) или аналогичных органах (гепатопанкреис, пищеварительная железа). На втором этапе (фаза II, конъюгация) происходит дальнейшее понижение гидрофобности в результате связывания образовавшегося на первом этапе метаболита с высокополярным соединением, несущим отрицательный заряд. Эти реакции протекают исключительно с участием трансфераз – глюкуронозил-, глутатион- и сульфотрансфераз, а в качестве конъюгирующих агентов выступают соответственно глюкуроновая кислота, глутатион и фосфоаденозинфосфосульфат (так называемый «активированный сульфат»). Образовавшиеся в результате этих процессов продукты хорошо растворимы в воде и легко выводятся из организма через выделительную систему.

Среди ферментов фазы I наиболее изучены и представляют наибольший интерес, как потенциальные *биомаркеры*, ферменты, участвующие в реакции окисления ксенобиотиков - цитохром P450-зависимые монооксигеназы (или оксидазы смешанных функций) и эпоксид гидролазы. Их открытие и начало изучения относится к 50-60 гг. XX в. Уровень этих ферментов в норме не высок, но при попадании в организм ксенобиотиков происходит индукция их синтеза и возрастание активности. Данные ферменты можно отнести к *специфическим биомаркерам воздействия*. Одна из монооксигеназ, которая сейчас активно изучается у гидробионтов как перспективный кандидат в *биомаркеры* – этоксирезорифин-О-диэтилаза (ЭРОД, КФ 1.14.14.1), относится к подсемейству CYP1A-содержащих оксигеназ (цитохром P450 семейство 1 подсемейство A). Среди загрязняющих веществ антропогенного происхождения, которые вызывают повышение ЭРОД-активности, находятся полихлорированные диоксины и фураны (ПХДД/ПХДФ), полихлорированные бифенилы (ПХБ), полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), хлор- (ХОС) и фосфорорганические (ФОС) соединения, включая пестициды, и некоторые другие ксенобиотики. В ряде случаев повышенная ЭРОД-активность может быть единственным свидетельством воздействия быстро метаболизируемых соединений, присутствие которых методы аналитической химии не в состоянии выявить в тканях. Примерами успешного использования ЭРОД-активности в качестве *биомаркера* служат исследования, выполненные разными группами ученых на леща (*Abramis brama*) из Рыбинского водохранилища (Россия) и р. Эльба (Германия). Показано, что в обоих водных объектах в зонах с повышенным уровнем загрязнения ПХБ и ПАУ активность ЭРОД в печени рыб значительно выше, чем у леща из относительно чистых районов.

Наиболее изученным и часто используемым в качестве *биомаркера* ферментом фазы II является глутатион-S-трансфераза (GST), одновременно входящая и в пул антиоксидантных ферментов. Как было отмечено выше (см. Ферменты антиоксидантной защиты) он тоже может быть классифицирован как *неспецифический биомаркер воздействия*. В приведенном выше примере активность GST в печени леща из Рыбинского водохранилища была увеличена у рыб из зон с относительно низкой антропогенной нагрузкой, по сравнению с особями из загрязненных районов. Вместе с тем, лещ из р. Эльба демонстрировал более сложный ответ: активность GST

возрастала по мере увеличения в рыбе содержания ПХБ, но при наиболее высоком их уровне, сопоставимом с тем, что наблюдались у леща из загрязненных районов Рыбинского водохранилища, активность фермента снижалась.

#### 5. Металлотионеины

Металлотионеины (МТ) представляют собой семейство низкомолекулярных, богатых цистеином, металлсвязывающих белков и олигопептидов. Впервые МТ были обнаружены в 1957 г. в почках лошади. Впоследствии было показано, что МТ широко встречаются среди животных, растений, эукариотических микроорганизмов и некоторых прокариот. В норме в тканях взрослых организмов МТ присутствуют в небольших количествах, однако их синтез индуцируется в ответ на действие широкого ряда ионов металлов, таких как Cd, Zn, Hg, Co, Ni, Bi и Ag. Сульфгидрильные группировки цистеиновых остатков МТ служат в качестве лигандов для образования органо-минеральных комплексов (хелатирования) с металлами и связывания последних. Учитывая имеющуюся научную базовую информацию, полученную на млекопитающих, и доступные методы для определения изменений как в синтезе МТ, так и в составе связанных с ними металлов, это семейство белков и пептидов является потенциальным кандидатом в качестве *специфического биомаркера воздействия* токсичных металлов на гидробионтов. В настоящее время возможность анализа состава и содержания металлов в металлпротеиновом комплексе позволяет оценить степень химической специфичности МТ в отношении вероятного индуктивного агента. Вместе с тем биологическая функция МТ на сегодняшний день далеко не полностью ясна. Кроме того остается малоизученным вопрос о видовых, органо-тканевых, сезонных и других особенностях МТ у гидробионтов. Не удалось пока четко связать изменения в уровне МТ с нарушениями на клеточном или организменном уровне. Все это еще не позволяет активно и широко применять МТ как биомаркеры в гидроэкотоксикологии. Однако отдельные примеры их использования имеются. Так на морских дальневосточных двустворчатых моллюсках – приморском гребешке (*Mizuhopecten yessoensis*), из залива Петра Великого в условиях эксперимента показано, что при хроническом (25-60 сут) экспонировании животных в растворах сублетальных концентраций кадмия (0.5 и 500 мкг/л), у них наблюдалась индукция синтеза и появление новых фракций в общем спектре МТ. Канадскими исследователями установлено, что степень индукции МТ у радужной форели (*Salmo gairdnerii*), обитающей в реках Канады, коррелировала с увеличением концентрации металлов (Zn, Cu, Cd) в воде. Аналогичные результаты были получены другими исследователями на угре (*Anguilla anguilla*), чукучане (*Catostomus commersonii*) и форели при экспозиции рыб к кадмию в лабораторных условиях.

#### 6. Метаболиты полициклических ароматических соединений (ПАУ) в желчи.

Среди ксенобиотиков ПАУ являются одними из наиболее распространенных групп соединений, загрязняющих водные объекты. Они представляют собой органические соединения, для которых характерно наличие в химической структуре трех и более конденсированных бензольных колец. Основными источниками эмиссии техногенных ПАУ в окружающую природную среду, и в частности в водные объекты, являются предприятия энергетического комплекса, автомобильный транспорт, химическая и нефтеперерабатывающая промышленность. В основе практически всех техногенных источников ПАУ лежат термические процессы, связанные со сжиганием и переработкой органического сырья: нефтепродуктов, угля, древесины, мусора, пищи, табака и др. Тип воздействия ПАУ на живые организмы ключевым образом зависит от структуры самого углеводорода и может изменяться в очень широких пределах. Многие ПАУ являются сильными химическими канцерогенами. Такие соединения, как бенз[а]антрацен, бензпирен и овален, обладают ярко выраженными канцерогенными, мутагенными и тератогенными свойствами. В организме животных, включая гидробионтов, ПАУ довольно быстро подвергаются биотрансформации с участием описанных в предыдущем разделе ферментных систем. В результате этого в организме накапливаются различные метаболиты ПАУ с разным числом циклических структур в молекуле. Их содержание и соотношение наиболее удобно измерять в желчи рыб. Наличие метаболитов ПАУ свидетельствует о том, что животное подвергалось экспозиции к этой группе ксенобиотиков. Поэтому данный показатель является *специфическим биомаркером воздействия*. Примером использования этого *биомаркера* служит исследование, проведенное на Рыбинском водохранилище. Было показано, что желчь леща (*Abramis brama*) из загрязненного района, расположенного вблизи коммунально-индустриального комплекса г. Череповец, содержала достоверно выше метаболитов ПАУ, чем у рыб из относительно чистых зон. При этом различия для наименее токсичных ПАУ, содержащих 2-3 кольца (нафталин, антрацен, фенантрен), были минимальными, а для наиболее токсичных, имеющих 4-6 колец (бензпирен, бензантрацен, трифенилен, тетрацен, пентацен, пирен и др.), различия выражены в большей степени.

**Таблица 2.** Потенциальные сферы использования биомаркеров, относящихся к группе функциональных протеинов, включая ферменты

Сфера потенциального применения	Биомаркер					
	Цитохром P450A1 (ЭРОД, АГГ)	Ферменты II фазы БТК	МТ	БТШ	Показатели ОС	АХЭ
Количественная оценка влияния или воздействия	+	?	–	+	+	+
Мониторинг состояния «здоровья» гидробионтов и экосистем	+	+?	?	+	+	+
Выявление слабых, ранних эффектов	++	?	?	++	+	+
Оценка экологического риска	+	?	?	?	+	?
Экологическое нормирование (сигнал для принятия нормативных решений)	+	–	–?	+?	?	+
Выявление воздействия специфических соединений	++	?	+	?	?	++
Токсикологический скрининг	+	+	–	+	-	+
Исследование механизмов токсического действия	+	++	++	++	++	++

Примечание: «+» и «++» указывают на степень полезности применения в данной сфере, «–» указывает на бесполезность применения, «?» указывает на недостаточную изученность вопроса: остальные обозначения как в табл. 1.

В табл. 2 приведены потенциальные сферы применения некоторых перечисленных выше биомаркеров, относящихся к функциональным белкам, включая ферменты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, *биомаркеры* в настоящее время являются важным инструментом в гидроэкоотоксикологии, который используется при изучении антропогенного влияния на водные организмы и экосистемы, помогает понять механизмы этого влияния и оценить его последствия. Разработка новых *биомаркеров* и совершенствование уже имеющихся является одной из важных задач ученых-экологов. Подобно другим инструментам *биомаркеры* имеют свои преимущества и недостатки, которые должны быть учтены при их выборе, применении и интерпретации полученной с их помощью информации. Необходимы дополнительные развернутые исследования нормы реакции базовых уровней всех показателей, используемых в настоящее время и претендуемых на использование в качестве *биомаркеров* у широкого ряда видов гидробионтов.

Наряду с этим, на основе научных знаний требуется более широкое внедрение *биомаркеров* в природоохранную деятельность и сферу практической экологии. Понимание их значимости и активное использование специалистами и руководителями, работающими в сфере промышленной экологии и управления природными ресурсами, поможет им принимать правильные административные решения при прогнозировании последствий влияния на окружающую водную среду хозяйственной деятельности человека и оценки состояния водных ресурсов и экосистем. При этом нужно понимать, что *биомаркеры* не являются альтернативой существующих методов химического контроля содержания загрязняющих веществ в водной среде. Они их удачно дополняют и в комплексе эти методы представляют собой целостную систему мониторинга, позволяющую дать полную количественную и качественную оценку антропогенного загрязнения, выявить эффекты его влияния на биоту и спрогнозировать влияние на экосистему водного объекта.

Заключительным этапом должно быть нормативно-правовое и законодательное подтверждение применения *биомаркеров* в различных областях человеческой деятельности.

## ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты // М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». 2001. 343 с.
- Лукьянова О.Н. Молекулярные биомаркеры. Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 2001. 196 с.
- Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б. Структура и свойства малых белков теплового шока // Успехи биологической химии. 2003. Т.43. С.59-98.
- Флеров Б.А.. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989. 144с.
- Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Холинэстеразы пресноводных костистых рыб. В кн. Чуйко Г.М. (ред) Физиология и токсикология пресноводных животных. Сборник статей. – Рыбинск: Изд-во ОАО «Рыбинский дом печати», 2007. – 340 с. С.100 – 140.
- Adams S.M. (Ed). Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society Symposium 8. Bethesda: AFS, 1990. 191 p.
- Heath A.G. Water pollution and fish physiology. Boca Raton – Ann Arbor – London – Tokyo: Lewis Publishers, 1995. 359 p.
- Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Jr., Bergman H.L. (Eds.). Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. SETAC special publication series. Boca Raton – Ann Arbor – London – Tokyo: Lewis Publishers, 1992. 347 p.
- Malins D.C., Ostrander G.K. (Eds.) Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives. Boca Raton – Ann Arbor – London – Tokyo: Lewis Publishers, 1994. 539 p.

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОХИМИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ НА ДЕЙСТВИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

<i>Аксенов-Грибанов Д.В., Лубяга Ю.А., Бедулина Д.С., Гурков А.Н., Войцеховская И.В., Шатилина Ж.М., Прокозов С.О., Тимофеев М.А.</i> ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТРЕСС-ОТВЕТА И ТЕРМОПРЕФЕРЕНЦИИ У БАЙКАЛЬСКИХ И ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД И ГАСТРОПОД В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ.....	3
<i>Аминов А.И.</i> ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАП НА ГЛИКОЗИДАЗЫ РЫБ И ОБЪЕКТОВ ИХ ПИТАНИЯ .....	6
<i>Беличева Л.А., Лукина Ю.Н.</i> МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖАБЕРНОГО АППАРАТА РЫБ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ (НА ПРИМЕРЕ ВЫГОЗЕРСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА) .....	10
<i>Беляков В.П., Сотников И.В.</i> МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ДЕФОРМАЦИИ ЛИЧИНОК ХИРОНОМИД, КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДОЕМОВ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА ..	13
<i>Васильева О.Б., Назарова М.А., Ильмаст Н.В., Немова Н.Н.</i> ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ТКАНЕЙ ОКУНЯ <i>PERCA FLUVIATILIS</i> LINNAEUS, 1758 ИЗ РАЗНЫХ АКВАТОРИЙ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА.....	17
<i>Васильева О.Б., Назарова М.А., Рипатти П.О., Ильмаст Н.В., Немова Н.Н.</i> ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ РЫБ, ОБИТАЮЩИХ В ВОДОЕМАХ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ.....	19
<i>Верещагина К.П., Прокозов С.О., Кондратьева Е.С., Мадьярова Е.В., Аксенов-Грибанов Д.В.</i> ОСОБЕННОСТИ СТРЕСС-ОТВЕТА БАЙКАЛЬСКОГО ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА АМФИПОД <i>GMELINOIDES FASCIATUS</i> (STEBB., 1899) В УСЛОВИЯХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ И АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ .....	22
<i>Воробьева О.В., Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н., Воробьева Н.Н.</i> ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РАЧКОВ <i>DAPHNIA MAGNA</i> , ПОДВЕРГНУВШИХСЯ ОБЛУЧЕНИЮ КРАСНЫМ НЕКОГЕРЕНТНЫМ СВЕТОМ.....	25
<i>Воронин Л.В.</i> ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ БЕНЗИНОМ И ДИЗЕЛЬНЫМ ТОПЛИВОМ НА РАЗВИТИЕ САПРОЛЕГНИИ .....	27
<i>Гершкович Д.М., Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф.</i> ФАКТОР ИЗМЕНЕНИЯ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ И РЕАКЦИИ ЦЕРИОДАФИЙ НА ХИМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В КУЛЬТУРЕ – СЕЗОННОСТЬ ИЛИ МЕТЕОУСЛОВИЯ? .....	30
<i>Голованова И.Л., Филиппов А.А., Левин Б.А., Болотовский А.А., Урванцева Г.А.</i> ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (Cu, Zn, Pb) НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ КИШЕЧНИКА СИНЦА И БЕЛОГЛАЗКИ .....	33
<i>Гремячих В.А., Комов В.Т.</i> СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ РЕЧНОГО ОКУНЯ <i>PERCA FLUVIATILIS</i> (PERCIFORMES: PERCIDAE) РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА .....	36
<i>Давыдова Н.С., Григорьев Ю.С.</i> РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОДОРОСЛИ ХЛОРЕЛЛА И ХАРАКТЕР ВЛИЯНИЯ НА НИХ ИОНОВ МЕДИ.....	39
<i>Даниленко С.А., Лукьянова О.Н.</i> БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У СЕРРИПЕСА ГРЕНЛАНДСКОГО <i>SERRIPES GROENLANDICUS</i> ИЗ РАЙОНОВ ГИДРОТЕХНИЧЕСКОГО СТРОИТЕЛЬСТВА В ЗАЛИВЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ) .....	43
<i>Дорохова И.И., Кузьминова Н.С., Шпинь Д.О.</i> ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА В ТКАНЯХ ТРЕСКОВЫХ РЫБ КАК МАРКЕР ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ .....	46
<i>Жиденко А.А., Мищенко Т.В., Кривошица В.В.</i> ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ ГЛИФОСАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТОВЫХ ОБЪЕКТОВ БИОМОНИТОРИНГА .....	49
<i>Заботкина Е.А.</i> ОЦЕНКА ЗДОРОВЬЯ ЛЕЩА <i>AVRAMIS VRAMA</i> L. ИЗ РАЗНЫХ ПО УРОВНЮ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПЛЕСОВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА ПО ЦИТО- И ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ СЕЛЕЗЕНКИ .....	52
<i>Колова А.В., Компанцева Е.И.</i> ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ С ТОКСИЧНЫМИ МЕТАЛЛОИДАМИ .....	56
<i>Кузнецова Т.В., Холодкевич С.В., Куракин А.С.</i> <i>IN SITU</i> ИЗМЕРЕНИЯ КАРДИОАКТИВНОСТИ МЕСТНЫХ ВИДОВ МАКРОБЕНТОСНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ В ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ГИДРОБИОНТОВ .....	58
<i>Кузьмина В.В., Грачева Е.Л., Тарлева А.Ф., Тажимуратова У.Ж.</i> ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА АКТИВНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ И ХИМУСА У РЫБ РАЗНЫХ ВИДОВ .....	62

<b>Кукла С.П., Слободскова В.В., Журавель Е.В., Челомин В.П.</b> ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ НА МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ.....	65
<b>Лапирова Т.Б.</b> ДИНАМИКА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЛОВИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ КАДМИЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ .....	69
<b>Лубяга Ю.А., Мадьярова Е.В., Гурков А.Н., Щанова Е.П., Димова М.Д., Хомич А.С., Аксенов-Грибанов Д.В.</b> ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ СТРЕСС-АДАПТАЦИИ И ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ГАСТРОПОД ВИДА <i>LUMNAEA STAGNALIS</i> В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ И НОРМОКСИИ.....	72
<b>Лукьянова О.Н.</b> ИНТЕГРАЛЬНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ИНДЕКС СОСТОЯНИЯ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....	75
<b>Лукьянова О.Н., Цыганков В.Ю., Боярова М.Д., Христофорова Н.К.</b> ТИХООКЕАНСКИЕ ЛОСОСИ КАК "МОРСКАЯ ПОМПА" В ПЕРЕНОСЕ БИОГЕНОВ И ПОЛЛЮТАНТОВ .....	79
<b>Ляврин Б.З., Сеник Ю.И., Бияк В.Я., Хоменчук В.А., Курант В.З.</b> СОДЕРЖАНИЕ НЕПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ ЖАБР НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ МАЛЫХ РЕК ЗАПАДНОГО ПОДОЛЛЬЯ .....	82
<b>Мадьярова Е.В., Лубяга Ю.А., Аксенов-Грибанов Д.В., Люкенбах Т., Тимофеев М.А., Шатилина Ж.М., Верещагина К.П., Димова М.Д., Бедулина Д.С.</b> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 У РАЗНЫХ ВИДОВ ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ И ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД В УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ КАДМИЯ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ .....	86
<b>Макрушин А.В., Семенова А.С., Дубовская О.П., Фефилова Е.Б., Родионова Н.В., Лазарева В.И.</b> ОТЕК РАКОВИНКИ CLADOCERA (CRUSTACEA) .....	90
<b>Марценюк В.М., Сеник Ю.И., Бияк В.Я., Хоменчук В.А., Курант В.З.</b> ОСОБЕННОСТИ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ЩУКИ ( <i>ESOX LUCIUS L.</i> ) ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ КАДМИЯ.....	93
<b>Мехтиев А.А., Мустафаев Н.Дж.</b> УЧАСТИЕ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ПРОЦЕССАХ АДАПТАЦИИ И ДИСАДАПТАЦИИ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ .....	96
<b>Никитин О.В., Латыпова В.З.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПО ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ <i>DAPHNIA MAGNA</i> ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ «ТРАСКТОХ» .....	100
<b>Олькова А.С.</b> МНОГООБРАЗИЕ ТЕСТ-ФУНКЦИЙ <i>DAPHNIA MAGNA</i> : ВОЗМОЖНОСТИ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ .....	105
<b>Палатников Г.М.</b> ТЕРАТОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ОПЛОДОТВОРЕНИЕ И ОПЛОДОТВОРЕННУЮ ИКРУ, ГЕНОТОКСИЧЕСКАЯ И ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ МОЛОДИ РУССКОГО ОСЕТРА НА ПРИСУТСТВИЕ В ВОДЕ ОТРАБОТАННЫХ АВТОПОКРЫШЕК .....	109
<b>Пенькова Г.А., Голованова И.Л.</b> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РТУТИ НА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЕ ГЛИКОЗИДАЗЫ РЫБ И МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ .....	113
<b>Подгорная В.А., Голованова И.Л., Голованов В.К., Чуйко Г.М.</b> ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАПА И ИЗМЕНЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА В МОЗГЕ МОЛОДИ РОТАНА <i>PERCSCOTTUS GLENI</i> .....	116
<b>Рисник Д.В., Бобырев П.А., Булгаков Н.Г., Левич А.П.</b> ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЗНАЧЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИТОПЛАНКТОННЫХ СООБЩЕСТВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА .....	120
<b>Руднева И.И., Кузьминова Н.С., Скуратовская Е.Н., Дорохова И.И., Омельченко С.О.</b> ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИЙ ЧЕРНОМОРСКИХ ХРЯЩЕВЫХ РЫБ К УСЛОВИЯМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ .....	123
<b>Сеник Ю.И., Ляврин Б.З., Бияк В.Я., Хоменчук В.А., Курант В.З.</b> РОЛЬ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ РЫБ К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ .....	127
<b>Сладкова С.В., Холодкевич С.В., Куклина И.С.</b> ВОЗДЕЙСТВИЕ ХЛОРАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РАКОВ <i>ASTACUS LEPTODACTYLUS</i> .....	130
<b>Старосила Е.В., Олейник Г.Н.</b> АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ВОДОЕМОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АНТРОПОПРЕССИИ .....	133
<b>Стецюк А.П., Рылькова О.А., Муханов В.С., Гулин С.Б.</b> ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РТУТИ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРΟΣЛИ .....	136
<b>Таликина М.Г., Крылов В.В.</b> СОЧЕТАННОЕ ВЛИЯНИЕ ГИПОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ОСВЕЩЕННОСТИ НА МИТОЗ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК ПЛОТВЫ ( <i>RUTILUS RUTILUS L.</i> ) ..	141
<b>Терещенко Н.Н., Поповичев В.Н., Стецюк А.П., Гулин С.Б.</b> ЭКВИДОЗИМЕТРИЧЕСКИЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РТУТИ НА МАКРОФИТЫ НА ПРИМЕРЕ ЧЕРНОМОРСКОЙ ВОДОРΟΣЛИ <i>ULVA RIGIDA</i> С. AGARDH .....	143

<i>Ткачева А.В., Смолянский М.С.</i> СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ШАЛФЕЕВ (ЛЕКАРСТВЕННОГО, СУХОСТЕПНОГО И ЭФИОПСКОГО) ДЛЯ РАКООБРАЗНЫХ <i>D. MAGNA</i> .....	148
<i>Томилина И.И., Гремячих В.А., Гребенюк Л.П., Головкина Е.И.</i> ТОКСИЧЕСКОЕ И ТЕРАТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ НА ГИДРОБИОНТОВ РАЗЛИЧНОЙ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ .....	151
<i>Филиппов А.А., Аминов А.И., Голованова И.Л., Крылов В.В., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г.</i> ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕЙСТВИЯ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ НА АКТИВНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ МОЛОДИ ПЛОТВЫ К ДЕЙСТВИЮ МЕДИ И ЦИНКА.....	155
<i>Цыганков В.Ю., Боярова М.Д., Лукьянова О.Н, Христофорова Н.К.</i> УРОВНИ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ПТИЦАХ ВОСТОЧНОЙ И ЮГО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ ОХОТСКОГО МОРЯ .....	159
<i>Шведчиков Г.В., Мовчан Е.А., Кулева Н.В.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОФОБНОГО АДСОРБЕНТА «РУССОРБ» ДЛЯ УДАЛЕНИЯ НЕФТИ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДЫ, ВЛИЯНИЕ НА АДАПТАЦИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ГИДРОБИОНТОВ .....	161
<i>Щербакова Н.И., Зинчук О.А., Строева Е.С.</i> ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАРБОКСАМИДНЫХ ФУНГИЦИДОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ЭМБРИОНАЛЬНОЕ И РАННЕЕ ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ БЫЧКОВЫХ И ОСЕТРОВЫХ РЫБ .....	165
<i>Яковенко Б.В., Мехед О.Б., Искевич Е.В.</i> ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ P-450 И B5 И АКТИВНОСТЬ НАДФ-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КАРПА .....	171

#### ЛЕКЦИИ

---

<i>Соковиков Я.В.</i> ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ИХ РОЛЬ В МОНИТОРИНГЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ .....	174
<i>Филенко О.Ф.</i> ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ВОДНОЙ СРЕДЕ, КАК ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР.....	178
<i>Чуйко Г.М.</i> БИОМАРКЕРЫ В ГИДРОЭКОТОКСИКОЛОГИИ: ПРИНЦИПЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ, ПРАКТИКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.....	186

СОДЕРЖАНИЕ .....	202
------------------	-----

## **Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы**

Материалы V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии,  
посвященной памяти Б.А. Флерова, с приглашением специалистов  
из стран ближнего зарубежья

### **Современные методы исследования состояния поверхностных вод в условиях антропогенной нагрузки**

Материалы школы-семинара для молодых  
ученых, аспирантов и студентов

Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.

ТОМ II

Подписано в печать 07.10.14. Формат 60x90 1/8  
Усл.печ.л. 25. Заказ № 1028. Тираж 300 экз.

Отпечатано в типографии ООО «Филигрань»  
150049, г. Ярославль, ул. Свободы, 91,  
Тел. (485)98-27-05,  
pechataet@bk.ru

