

**Российская Академия Наук
Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина**



**ФИЗИОЛОГИЯ
И
ТОКСИКОЛОГИЯ
ПРЕСНОВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ**



Борис Александрович Флеров (1937-2005гг.)

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
ИМ. И.Д. ПАПАНИНА**



ФИЗИОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ



Сборник биографических материалов и научных работ
лаборатории физиологии и токсикологии пресноводных
животных, посвященный 70-летию основателя и первого
заведующего лабораторией
д.б.н. профессора Бориса Александровича Флерова

РЫБИНСК 2007

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
ИМ. И.Д. ПАПАНИНА**

УДК 574.64(28)(063)

Физиология и токсикология пресноводных животных. Сборник статей. – Рыбинск: Изд-во ОАО «Рыбинский дом печати», 2007. - 340 с.

Сборник научных трудов посвящен 70-летию со дня рождения профессора, доктора биологических наук Б.А. Флерова, одного из основоположников эколого-физиологического направления в отечественной водной токсикологии, основателя и первого заведующего Лабораторией физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. В сборник включены биографические сведения о Б.А. Флерове, очерк о его научно-организационной деятельности, результаты последних исследований и список основных публикаций, а также обобщены основные достижения руководимой им лаборатории за последние 15 лет. Сборник рассчитан на специалистов в области физиологии и биохимии водных животных, водной токсикологии, гидробиологии и экологии.

Редакционная коллегия: Г.М. Чуйко (отв. редактор)
П.А. Гдовский
Д.Ф. Павлов

Книга печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН

ISBN 978-5-88697-155-2

© Институт биологии
внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН,
2007

ПРЕДИСЛОВИЕ

В первой части сборника приводятся биографические сведения и воспоминания о Б. А. Флерове. Открывается сборник поэмой ведущего научного сотрудника ИБВВ РАН Ольги Дмитриевны Жаворонковой, посвященной памяти Бориса Александровича Флерова. Далее следуют воспоминания его первой жены, Галины Ивановны Флеровой. Она описывает годы учебы в МГУ, первые годы жизни в Борке. Кратко повествует о его родителях, потомственных интеллигентах, которые сформировали мировоззрение Б.А. Флерова и привили ему любовь к биологии. В следующей статье Григорий Михайлович Чуйко и Ираида Александровна Скальская знакомят с научно-исследовательской и научно-организационной деятельностью Бориса Александровича Флерова. Далее, его сын, Евгений Борисович Флеров описывает 30 летнее сотрудничество Института биологии внутренних вод и Колумбийского центра изучения окружающей среды, в становлении которого с самых первых дней Б. А. Флеров принимал самое активное участие. Целью этого сотрудничества было проведение совместных исследований, обмен информацией и сравнение данных по оценке влияния загрязнений на водные организмы и экосистемы, а также разработка критериев качества воды, применимых для обеих стран. Борис Александрович всегда стремился сохранить баланс интересов, сделать так, чтобы проводимые исследования отвечали потребностям обеих сторон, дополняли друг друга, были взаимовыгодными. Заканчивается первая часть сборника, статьей Б. А. Флерова об истории создания и научно-исследовательской деятельности лаборатории.

Вторую часть сборника составляют работы, выполненные в лаборатории, которую основал и которой руководил Б.А. Флеров. В статье П.А. Гдовского и соавторов приводятся новые данные о структурно-функциональной организации периферического отдела обонятельной системы пресноводных рыб. Описаны два новых типа клеток в обонятельном

эпителии пресноводных рыб. Первый – микровиллярные лизосом-подобные клетки, обеспечивающие защиту эпителия от ксенобиотиков, второй – хлоридные клетки, которые поддерживают специфическое содержание одновалентных ионов в рецепторном отделе обонятельной слизи. Показана роль вторичных мессенджеров в восприятии одорантов рыбами.

В статье Г.М. Чуйко и В.А. Подгорной даются современные представления о холинэстеразах (ХЭ) – ферментах, играющих ведущую роль в функционировании холинергической системы организмов и широко распространенных в живой природе от микроорганизмов и простейших одноклеточных до позвоночных, включая человека. Приводятся данные исследований по идентификации типов ХЭ, их кинетическим свойствам, распределению в тканях и органах, видовому разнообразию и участию в физиологических процессах у пресноводных костистых рыб. Рассматриваются прикладные аспекты о роли ингибирования ХЭ в отравлении рыб фосфорорганическими и карбаматными соединениями.

Работа Л. Н. Лапкиной в соавторстве с Г. М. Чуйко посвящена исследованию экологически важной группе аннелид – пиявок. На протяжении ряда лет они являлись объектом тщательного изучения, в частности было исследовано токсическое действие на них фосфорорганических пестицидов (ФОП). В остром эксперименте определена сравнительная межвидовая устойчивость 13 видов пиявок к некоторым пестицидам, данной группы. Рассматриваются специфические и неспецифические проявления интоксикации в остром, подостром и хроническом экспериментах. Обсуждается зависимость интегральных показателей чувствительности и устойчивости аннелид к ФОП от чувствительности к ним фермента холинэстеразы (мишень для этих ядов). Анализируется возможная связь устойчивости червей к ФОП с их биолого-экологическими особенностями, местом в филогенетическом ряду, а также возможные последствия попадания ФОП в водоемы для фауны пиявок.

В статье Д. Ф. Павлова содержится обзор данных, полу-

ченных в результате ретроспективного анализа информации об уровнях хлорорганических пестицидов (ХОП) ДДТ и гексахлорциклогексана в воде и донных отложениях основных речных бассейнов бывшего СССР и Российской Федерации. Проанализированы данные многолетнего мониторинга на сети наблюдений (ОГСНК/ГСН) Госкомгидромета, а также результаты исследований специалистов из других организаций. Дана оценка величин выноса ХОП реками страны в моря. В статье также приводятся результаты собственных наблюдений. Приведенные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на, общее снижение уровней ХОП в целом, в ряде регионов (например, в Верхне-Волжском бассейне), эти соединения обнаруживаются до настоящего времени, что диктует необходимость продолжения их мониторинга в воде, донных отложениях и биоте.

В работе И. И. Томилиной и соавторов проведен анализ многолетних данных по изучению влияния антропогенного закисления вод на состояние водных экосистем трех групп водоемов северо-запада Европейской России: озер республики Карелия; Вологодской области (территория Дарвинского государственного заповедника), Новгородской и Псковской областей (территории Рдейского и Полистовского государственных заповедников). Дана оценка эффективности примененных методов биотестирования и биоиндикации для прогнозирования экологических последствий антропогенного закисления водоемов.

В статье И. В. Медведева приводятся данные по изучению влияния ртутьорганических соединений природного происхождения на пищевое поведение и регенерацию у планарий и олигохет. Показано, что торможение восстановительных процессов при воздействии накопленных ртутьорганических соединений имеет у организмов видовую специфичность. Пищевое поведение планарий нарушается только при высоких уровнях ртутьорганических соединений.

В статье И. В. Чаловой описан опыт работы лаборато-

рии физиологии и токсикологии ИБВВ РАН по разработке и апробации современных методов биотестирования воды и донных отложений. На примере семисуточного теста на *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) показана возможность их использования для решения широкого круга не только токсикологических (оценка токсичности индивидуальных химических соединений и их смесей; определение токсичности сточных вод и их влияние на качество воды и донных отложений в водных объектах) но и гидробиологических задач (интеграция результатов лабораторных экспериментов и данных полевых исследований для определения качества среды обитания гидробионтов в водоёмах, подверженных зоогенному влиянию).

Заканчивает раздел экспериментальных работ сборника статья И. А. Скальской в соавторстве с безвременно ушедшими Александром Ивановичем Бакановым и Борис Александровичем Флеровым об экологическом состоянии пресноводных водоемов. В современных экосистемах водохранилищ, озер и малых рек бассейна верхней Волги эволюционно близкие группировки беспозвоночных перифитона и бентоса представлены различными таксонами, сходство наблюдается среди эвритопных и подвижных гидробионтов. Наибольшую чувствительность к разного рода загрязнениям проявляют организмы-обрастатели. При биомониторинге экологического состояния водоемов целесообразно параллельное использование разработанных критериев оценки степени загрязнения воды и грунтов по перифитону и бентосу.

В заключительной части сборника приводится курс лекций, прочитанных Б.А. Флеровым в Международном Университете природы, общества и человека «Дубна» в период 2000-2004 гг. и список основных публикаций Б.А. Флерова.

Г.М. Чуйко, П.А. Гдовский, Д.Ф. Павлов

ПАМЯТИ Б.А. ФЛЁРОВА ПОСВЯЩАЕТСЯ

© 2007 г. О.Д. Жаворонкова

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

Ты был незыблемым, надежным,
Любимым лидером и другом!
Талант, энергией умножен,
Стал ярким маяком в науке!
В лаборатории любимой,
Тобою созданной, хранимой
Твоей отеческой заботой,
Такие сделаны работы,
Что создали Отчизне славу,
В масштабах общемировых!
Гордится институт по праву
Сиянием побед твоих!
Весёлый, простодушный, шумный,
Ученый с мировым размахом,
Руководитель тонкий, умный,
Без компромиссов и без страха,
Ты был одним из тех титанов,
Что институт наш создавали!
И непривычно горько, странно
В беспомощной глухой печали
Понять, кого мы потеряли!
Вдруг осознать - ты нас оставил...
Но часть души твоей хранится
В учениках - светлы их лица,
И рвётся мысль в научный бой,
Воспламенённая тобой!
Как пусто, одиноко стало...
Твой голос, рокотал, бывало,
По институтским коридорам,

Улыбку шуткой вызывая,
Различия в чинах не зная!
В научных и серьёзных спорах
Ты мог быть озорным, весёлым!
Был возраст над тобой не властен,
Ты больше молодых был молод!
В работе ты был смел и страстен!
В тебе энергия бурлила,
Тебе на всё хватало силы!
Как пусто, одиноко стало...
Как мы, привыкнув, ценим мало
Таланта бескорыстный дар...
Как сокрушителен удар,
От нас унёсший целый мир!
Ушел титан, творец, кумир!
Как велика, горька потеря...
И сердце и душа не верят...
Но память остаётся с нами
И станет лишь острее с годами,
Чтобы на жизненной дороге
Помочь преодолеть тревоги,
Усталость, суетность и лень,
Напоминая каждый день,
Что для познания нет предела,
Что в жизни можно много сделать.
Что надо жить светло и смело!

18 января 2005г

НАС ПОЗНАКОМИЛИ ШАХМАТЫ И МУЗЫКА.

© 2007 г. Г.И. Флёрова

152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н

Была у Бориса Флерова небольшая записная книжечка - карманный блокнот. На одном из ее листков сохранилась запись: *«Вчера вечером вышел в холл общежития, за столом сидели двое - студент из Германии, учившийся с нами на биофаке [МГУ им. М.В.Ломоносова], и девушка. Они играли в шахматы. Подобные сцены всегда вызывают у меня улыбку и я, подойдя к ним, начал подшучивать... Потом предложил партию одному и другому (другой), но вскоре мы перебрались в гостиную и играли на пианино...»*

Так, на почве шахматной игры и музыки, мы и познакомились. Сам Борис тогда играл по первому шахматному разряду и мне, любителю-самоучке в шахматном деле, сразу давал преимущество: убирал своего ферзя. Иногда играл перед самым экзаменом или зачетом - у двери, за которой должен был через минуты предстать перед экзаменаторами. Спокойно говорил партнеру: *«Подожди, сейчас «сдам» и доиграем»*. А вокруг волновались, «зубрили», доучивали...

Родился Борис Флеров в маленьком замечательном городе Вышнем Волочке Тверской (тогда ещё Калининской) области. О таком городе, как и о человеке, можно сказать: *«Мал золотник, да дорог»*. Население его и сейчас всего около 54 тысячи жителей. Город расположен вдоль первой в России железной дороги (в прошлом Николаевской), в трехстах километрах от Москвы и в четырехстах от С.-Петербурга. Дорога дала мощный импульс для его развития. Именно из В. Волочка началось пробное железнодорожное движение: сначала в Тверь, затем для солдат Семеновского полка в Петербург и далее – для самого императора. Дачу для Великого князя Владимира Александровича (брата Александра III) здесь создавал тот же самый архитектор К. Тон, который проектировал Храм Христа-

Спасителя в Москве. Позже это строение было передано как Дом творчества для Академии Художеств. Об этих, «репинских» местах шла слава как о божественно прекрасном уголке природы: «*Для пейзажиста, - говорил Илья Ефимович Репин, - здесь земля обетованная. Здесь вся Россия дышит*».

Вышний Волочок пронизан огромным водным пространством: реками, каналами. Здесь много шлюзов и мостов (последних тридцать!). Только протяженность набережных составляет тридцать два километра. Петр I задумал превратить эти места в водный путь, соединяющий Балтийское море с Каспием. Город стоит на водоразделе: некоторые реки (например, Цна и Мста) текут на север, тогда как р. Тверца – на юг. Здесь начинается свой путь и р. Молога, далее впадающая в Рыбинское водохранилище – Волжскую водную систему. Между реками суда тащили волоком (один волок был нижний, другой - верхний волок, отсюда и название Вышний Волочек). Не случайно И.Е. Репин так выразительно и правдиво писал бурлаков. И еще несколько слов к репинским «Бурлакам на Волге» и его словам о России. Со времен викингов, плававших не только на больших судах по морю, но имевших отношение и к торговле и к волоку малых судов между реками, пришло к славянам из Скандинавии слово «Русь» - так называли экипаж малых судов. Помимо всего прочего лодки использовали и для погребения. Ладьи служили гробом для русских дружинников – их ставили на костер и сжигали. Репинских «Бурлаков» очень ценил Ф.М. Достоевский, но не за социальное звучание, а за философский смысл: «*Каждый тащи свою лодку сам!*».

Город, как и семья, формировали Бориса. Он с детства знал и чувствовал природу, впитывал всем существом своим живую красоту среднерусской полосы России. Собирал репродукции репинских картин и картин «передвижников». Сам хорошо рисовал.

В середине XIX века в городе был создан стекольный завод, который сохранился до сих пор, кажется, под названи-

ем «Красный май». Именно здесь изготавливали многослойные детали для красных звезд московского Кремля и канделябры для его залов. С 1896 года в здании бывшего Общего собрания работал свой драматический театр. Не был разрушен и женский монастырь Казанской Божьей матери: в советское время в нем стояла воинская часть, которой командовал будущий маршал А.М. Василевский, очевидно понимавший, что есть что. Подлинная культура Петербурга и Москвы каким-то невидимым образом веяла над этим маленьким городом...

На втором курсе университета мы с Борисом оказались в одной учебной группе, которая уже на третьем распалась по специальностям. Борис попал на кафедру высшей нервной деятельности, я - на физиологию человека и животных. Дружили со второго, совсем по-юному. Первый поцелуй. Музыка. Стихи. Походы в консерваторию. Прослушивание молодого Ван Клиберна. Борис прилично играл на фортепиано. Особенно любил прелюдии С. Рахманинова. Слушал с упоением концерты для фортепиано с оркестром этого нашего, национального гения. Любил и настоящую джазовую музыку.

Бывали и несовпадения. В 1956 году наша летняя Звенигородская студенческая практика внезапно прервалась. Как нередко в те времена, прозвучал комсомольский призыв: помочь уборке урожая на целине. Нас отправляли в товарных вагончиках, на нарах, под открытое небо Джамбульского района Казахстана. Некоторым не разрешили ехать врачи, а Борису - родители. Это их мудрое решение я оценила позже, когда сама стала матерью. Борис был единственным, поздним ребенком в семье, испытавшей все те неприятности из-за своего «происхождения», которые сопровождали советскую действительность.

По матери и по отцу несколько поколений предков Б. Флёрова были священнослужителями. Первых младенцев-«двойняшек» родители похоронили. Вероятно поэтому, рискованного энтузиазма комсомольскихстроек и посылки студентов на целину они не одобряли. Наше возвращение с не-

сколькими сокурсниками, навсегда искалеченными на целине, подтвердили их тревогу и правоту.

Отец, Александр Владимирович Флёров (1897-1965 гг.), после окончания Литовской духовной семинарии (1912-1918 гг.), затем четырех курсов заочного отделения Московского пединститута им. Бубнова (1931-1936 гг.) и Естественного факультета Калининского государственного педагогического института (1939 г.) преподавал латынь и анатомию в Вышневолоцком медицинском училище. Был энциклопедически образован. «Илиаду» Гомера по-гречески мы слышали от него, находящегося в забытии, в последние часы жизни уже в Борке, на нашей Ярославии...

Мама Бориса, Мария Алексеевна Кузьминская (1901-1968 гг.), успешно закончила Тверское епархиальное женское училище (1911-1917 гг.). Сохранился аттестат с отличными оценками почти по всем предметам и памятная Библия на старославянском с дарственной надписью в честь окончания. В 1923 году она заканчивает Тверской пединститут. По истечении ряда лет безупречной педагогической работы ей, как завучу средней школы, замечательному знатоку ботаники, исключительно тактичному педагогу, справедливо присваивают звание заслуженной учительницы РСФСР и награждают орденом Ленина.

Прожили и проработали родители Бориса большую часть своей жизни в Высшем Волочке. Борис, пожалуй, первый из плеяды Флёровых - Кузьминских стал полноправным студентом столичного университета... В то время все еще «навязывали» идеи Т. Лысенко, а Борис уже был знаком с положениями классической генетики...

Хотелось бы несколько слов сказать мне и о своих родителях - Андреевых. Они помогли нам поставить на ноги, родившихся еще в студенческие годы наших сыновей-двойняшек, преподали им первые азы. По профессии - оба тоже педагоги, формировавшие мировоззрение молодежи в середине теперь уже канувшего навсегда, такого трагически-сложного XX века. Мама, Зинаида Федоровна - биолог. Папа,

Иван Афанасьевич – историк, большой знаток и любитель живописи и архитектуры. Оба члены КПСС. Честные, наивные ленинцы. Преподавали в школах и вузах. Отец прошел войну, потом работал в архиве Л.И. Брежнева, когда тот был первым секретарем Запорожского обкома партии. Семья получила хорошую (для разрушенного войной города) квартиру. В ней свободно бегали и дышали наши дети, и чувствовали себя нестесненно стареющие родители Бориса, приезжавшие к нам понынчить любимых внуков

И вот парадокс ковавшего нас века, парадоксы жизни разных семей - двух, казалось бы, различных миров. Мама моя, любившая жизнь и все живое, как никто на моей памяти, на 97-ом году, оставаясь принципиальным членом партии, перед смертью, сказала: *«Еще бы жила и радовалась самой жизни. Жалею лишь об одном - что веру [в Бога] утратила»*. Борис же, имевший предков-священников, росший при критическом взгляде своих родителей на страну Советов и на руководящую роль партии, крещенный в младенчестве, вступает в свое время в ряды КПСС и, в свое время, выходит из ее рядов... Сама я, прожив между двумя «кланами», идейно враждовавшими в советское время, пристально присматривалась и прислушивалась ко всему новому, разному, волновавшему душу, уже в солидные лета приняла крещение в русской православной церкви в далекой Южной Калифорнии... Мир, как оказалось, вовсе не черно-белый. Он слишком многогранен, как и каждый человек с его чувствами и мыслями. Сочетаниям и смещениям событий при скрещении казалось бы всего двух студенческих судеб несть числа...

Сохранились тетради с записями прочитанных Борисом в школьные годы книг. В них - почти вся русская и советская классика, зарубежные детективы и фантастика. Книги о путешествиях, о жизни животных и растений переполняли стенные полки. В одной общей тетради для письменных работ по литературе за 9-й и 10-й классы - все домашние и классные сочинения с хорошими и отличными оценками (Бо-

рис окончил школу с серебряной медалью). В начале каждого сочинения - рукотворный портрет писателя с датами его жизни (по-видимому, инициатива самого ученика, обученного рисунку и всегда стремившегося к созданию зримого образа, как и к фотографии). Везде сквозят мысль, простота, аккуратность... Философские же сочинения его отца, А.В. Флёрова, написанные еще в духовной семинарии, потрясали несравненной глубиной мысли и обширностью знаний (по сравнению с нами, отличниками советских школ).

Таким я узнала Бориса и его окружение в ранней молодости. На пятом курсе, в один из сентябрьских дней у нас родились сразу два замечательных младенца. Мне пришлось прервать учебу, жить с родителями в Запорожье. Борис окунулся в науку. Когда, спустя год, я вернулась в университет, в стенной газете биофака, еще висевшей у входа, прочла удивительно хорошую, к сожалению, не сохранившуюся статью о будущем в науке таких студентов, как Борис Флёров. Сама я тоже стремилась долгие годы устоять на тернистом, каменистом, утомительном (до первого проблеска приоткрывшейся тайны природы!) пути науки.

По распределению мы должны были начинать трудовую деятельность в Сибирском отделении АН СССР. Борис, ожидая моей защиты диплома, задержался в Москве, работал в научных библиотеках, писал обзоры. Нам все предлагали и предлагали ехать в начинавший тогда строиться Новосибирский Академгородок и жить всей семьей в бараках. Но, имея на руках двух маленьких детей, сделать такой выбор мы не отважились и искали возможности вывезти семью в «сколь-ко-нибудь приличные жилищные условия». И – все к лучшему: кто-то подсказал, что имеется возможность путем перевода попасть в Борок! Благословенно это место и его основатели, которых всегда помню живыми и человечными – прежде всего, Ивана Дмитриевича Папанина. К нему напрямую (прямо на улице) обратилась как-то по поводу необходимой для электрофизиологических опытов аппаратуры – тут же дал

распоряжение – помог. Пожаловалась как-то, что снизили зарплату – по сравнению с той, что назначили сразу по окончании университета мне как младшему лаборанту. Взял меня (совсем еще «зеленую» и незнакомую) Иван Дмитриевич под руку и отвел в бухгалтерию Института. Через полчаса зарплата была восстановлена. Сам же И.Д. Папанин около двадцати лет исполнял обязанности директора института, не получая за эту должность заработной платы!

Не покидало меня глубокое сожаление о том, что не состоялось у нас с Борисом научного «тандема». Сожаление о том, что воды и почвы уже тогда сверх меры загрязнялись фенолами, пестицидами, тяжелыми металлами и что нам «спускают» для разработки темы не нормальной физиологии - физиологии жизни, а скорее патологии, острых токсических отравлений и наблюдений за гибелью живого. Мне, как женщине-матери всегда хотелось отдавать силы такому труду, который радовал бы сердце и душу. Не получилось: пришлось заниматься «острыми» электрофизиологическими опытами на обнаженных мозговых центрах и нервах рыб, лягушек...

Борис умел радоваться любому практическому успеху - и в семье, и на работе, и на охоте. Он как бы был с «низким порогом» восприятия (то есть с высокой чувствительностью) ко всем сторонам развивающейся жизни. И все у него получалось как бы само собой. В двадцать один год он, почти неожиданно, становится трогательным отцом. Во втором часу ночи пишет первый и кажется единственный в своей жизни стихок - для наших двухмесячных малышей:

<i>Спите наши детки!</i>	<i>Засыпайте, крошки,</i>
<i>Солнце закатилось,</i>	<i>Только не пицците!</i>
<i>Небо потемнело</i>	<i>Мама уж устала</i>
<i>Все давно уж спят.</i>	<i>Маме нужно спать.</i>

Утром, продолжая то же письмо (20.11.58г.), он просит заглянуть папу в книжные магазины и отыскать недавно вы-

шедшие книги об ионных механизмах нервных процессов, о химии ферментов и др. Пристально следит за периодической иностранной научной литературой. Двумя годами раньше увлекался охотой. Мечтает об автомобиле и охотничьей собаке... Но более всего, как мне помнится, побуждает меня, да и всех близких к любому творчеству и «продвижению» (литературному, в области эксперимента и проч.). Мы, все домашние, стремились освободить его, интеллектуала, от обременительного домашнего труда. С ним было интересно и студенту, и ученому секретарю института, и академику (сохранилась совместная фотография с академиком Л. А. Арцимовичем: беседа на волнах Рыбинского водохранилища)...

Мне всегда думалось, что ращу и отвечаю за детей в основном сама или вместе с бабушками. На деле формирующее влияние на характер сыновей и их будущее оказал Борис. Из-за небольшой разности в возрасте между отцом и детьми они, взрослея, становились товарищами. У них были общие, сугубо мужские интересы: охота, рыбалка, мотоцикл, машины, освоение пространства Земли, книги... Борис одним из первых в институте стал сотрудничать с американскими гидробиологами, экологами (как только пал «железный занавес»). Детей ориентировал на быстрое освоение языков, компьютера. Все у них шло «в ногу со временем». Не всегда поспевая за ними, сама я рвалась к бесконечно высокому, далекому от быта и практически недостижимому, идеальному. А сил не доставало...

Через семнадцать лет совместной семейной жизни мы расстались. Вышли из зала суда после развода рука об руку. Борис купил мне в соседнем магазине новые сапожки, сам помог их выбрать и надеть. Сели в одну машину... Бывшие в зале суда сотрудники высказывались обо всем происходящем как о «розыгрыше». Но, это была реальность.

О научных достижениях Б.А. Флёрова сами за себя скажут его опубликованные труды, рецензии, доклады, работы его учеников, докторантов его лаборатории и т.д. О многом, вероятно, напишут и другие.

Удивительна энергетика Бориса. Спустя почти полвека после нашего знакомства, я и теперь живу, как бы выполняя его жизненные рекомендации. В одной из последних строк его письма, присланного в 2000 г., он, стараясь морально меня поддержать, восклицает: «*Мне бы так писать!*» И я пишу, как советовал Борис, научно-популярные лекции, посвящая материалы его памяти.

Но, главное на Земле - наши любимые дети и внуки, которые помнят и чтят отца и деда.



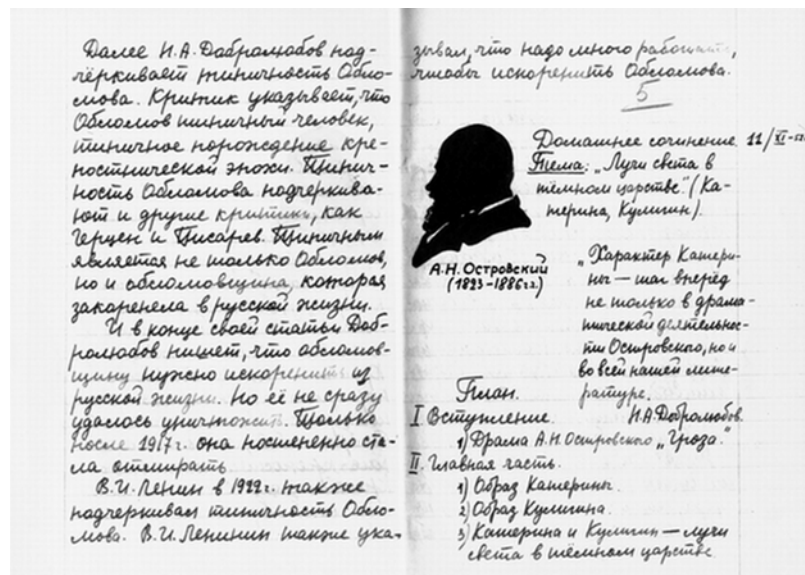
▲ Предки Б.А. Флёрова: дед Владимир – священник Ногородовичской церкви Слонимского уезда Гродненской губернии - (обнимает старшего сына Александра, будущего отца Бориса) с супругой и сыновьями. Фотография начала XX века



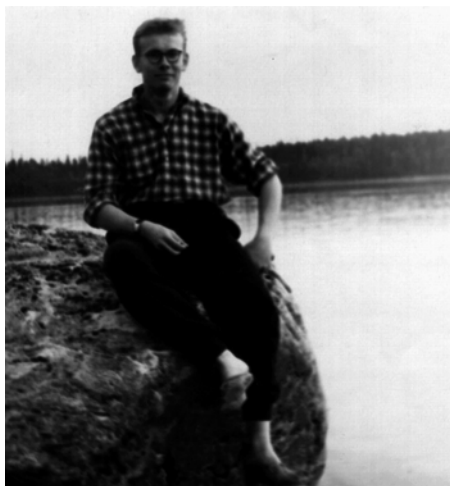
Родители: Мария Алексеевна Кузьминская и Александр Владимирович Флёров. Фотография 1925 г.



Борису два с половиной года (1939г.) ►



Фрагмент тетради ученика 9 класса Б.А. Флорова с классными сочинениями по литературе (1952 г.).



Борис Флоров: летняя практика на Бело-
морской станции МГУ (1957 г.).



Академик Л.А. Арцимович и Б. Флёров
беседуют на катере, бегущему по волнам
(1961 г.).



Борис Флеров с сыновьями –
Володей и Женей (1959г.).



Первая любовь и жена Г.И. Флерова
(Начало 60-х гг.).



Отдых после удачной охоты в кругу
друзей (слева направо): семья Романен-
ко, Ж. Черняев и Б.А. Флеров (1967 г.).
►



▲ Охотничья компания (слева направо): К.А. Баку-
лин, В.И. Романенко, Б.А. Флеров, Ю.А. Ривьер
(1965 г.).

◀ Очередной охотничий трофей (Середина 60-х гг.).





Дочь Б.А. Флерова Софья от второго брака. 2006 г.



Б.А. Флеров с сыновьями Владимиром (слева) и Евгением (справа). Фото 2004 г.

**УЧЕНЫЙ, ГЕНЕРАТОР НАУЧНЫХ ИДЕЙ,
ТАЛАНТЛИВЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ, УЧИТЕЛЬ.**

© 2007г. Г.М. Чуйко, И.А. Скальская

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

Борис Александрович Флеров (1937-2005гг) - один из основоположников сравнительно-физиологического направления в отечественной водной токсикологии, доктор биологических наук, профессор, основатель и первый заведующий лабораторией физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод (ИБВВ) им. И.Д. Папанина РАН.

Борис Александрович родился 2 апреля 1937 года в г. Вышний Волочёк Калининской области. После окончания средней школы в 1954 г. он поступил на биолого-почвенный факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, который успешно окончил в 1959 г. Еще в период учебы в университете Борис Александрович проявил активный интерес и яркие способности к научно-исследовательской работе. Он пришел в биологическую науку неслучайно, под влиянием родителей-биологов, которые с детства привили ему любовь к творческому познанию. Ее он сохранял на протяжении всей своей жизни. Его становление как ученого-исследователя проходило под влиянием работ школы выдающегося физиолога И.П. Павлова: он занимался изучением формирования условных и безусловных рефлексов животных на кафедре высшей нервной деятельности. После окончания университета Борис Александрович продолжил научную деятельность младшим научным сотрудником в фармакологической лаборатории Института экспериментальной биологии и медицины СО АН СССР (г. Новосибирск). Его первые научные работы опубликованы в 1960-62 гг. и посвящены изучению механизмов рефлекторной регуляции патологических состояний организма.

В 1961г. Борис Александрович перешёл на работу в лабо-

раторию физиологии пресноводных животных Института биологии водохранилищ АН СССР (п. Борок), преобразованного впоследствии в Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. С этого момента вся его научная деятельность и жизнь связаны с ИБВВ. Имея глубокие знания в области физиологии и фармакологии, обладая широкой научной эрудицией и навыками экспериментатора, Борис Александрович со свойственной ему энергией и энтузиазмом активно занялся изучением физиологических механизмов влияния промышленных загрязняющих веществ на гидробионтов. В 1966 г. по результатам этих исследований им защищена кандидатская диссертация «Экспериментальное исследование фенольного отравления рыб». Разработки Бориса Александровича положили начало нового для ИБВВ и отечественной науки направления, «водной токсикологии», успешно развиваемого до настоящего времени его многочисленными учениками и последователями.

В 1974 г. Борис Александрович возглавил вновь образованную лабораторию физиологии и паразитологии пресноводных животных, впоследствии преобразованную в лабораторию физиологии и токсикологии водных животных. Здесь ярко раскрылся высокий научно-организационный потенциал Бориса Александровича. Широта научных взглядов, демократичность, открытость характера и простота в общении с людьми, доброжелательность, забота о подчиненных, тонкое чувство юмора и, вместе с тем, высокая принципиальность и требовательность к себе и к окружающим – вот те черты, которые притягивали к нему людей. За короткое время им был создан работоспособный коллектив высококвалифицированных специалистов по вопросам физиологии, иммунологии, гистологии, паразитологии, токсикологии, способный решать разнообразные научные задачи. Борисом Александровичем непосредственно и под его руководством были разработаны основы эколого-физиологического направления в водной токсикологии: установлены закономерности и механизмы действия приоритетных загрязняющих веществ на водные организмы, раз-

вито представление об общих и специфических чертах патологии гидробионтов при действии токсических веществ различной химической природы, сформулировано положение о генотипической адаптации, как основе приспособления водных животных к загрязняющим веществам, разработаны научные основы биотестирования. Основные положения этих работ были обобщены им в докторской диссертации и монографии «Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных», а также 168 научных публикациях, хорошо известных широким кругам отечественных и зарубежных специалистов по водной токсикологии.

Будучи незаурядным исследователем и обладая талантом руководителя, Борис Александрович всячески способствовал научному росту сотрудников и много сил отдавал молодежи. К нему тянулись не только молодые специалисты, но и зрелые научные сотрудники. Он никому не отказывал в помощи, поддержке и советах. В исходном экспериментальном или полевом материала Борис Александрович быстро находил рациональное зерно, видел результат и его достоинство. Он увлекал сотрудников научными идеями и планами и заботился об их реализации, доведении результатов исследований до логического завершения – защите кандидатских или докторских диссертаций. Под его непосредственным руководством защищено 7 кандидатских диссертаций. В руководимой им лаборатории были выполнены, подготовлены к защите и успешно защищены 11 кандидатских и 9 докторских диссертаций. Три сотрудника лаборатории – доктора биологических наук Б.И. Куперман, В.Р. Микряков и Г.А. Виноградов, организовали и возглавили новые лаборатории, которые успешно работают и в настоящее время. Борис Александрович уделял большое внимание научно-педагогической деятельности. В лаборатории физиологии и токсикологии прошли научную практику около сотни студентов из различных высших учебных заведений. Он подготовил и успешно читал курс лекций «Биологические последствия загрязнения» в Ярославском государственном университете и Уни-

верситете природы, человека и общества (г. Дубна).

Борис Александрович пользовался заслуженным уважением среди сотрудников ИБВВ, отечественных и зарубежных коллег. Он был членом комиссии по водной токсикологии при Совете по проблемам гидробиологии, ихтиологии и использованию биологических ресурсов, Комиссии по поведению водных беспозвоночных, входил в состав редколлегии академического журнала "Биология внутренних вод". Под его редакцией вышло из печати 7 сборников научных трудов. Он постоянно избирался в Ученый Совет Института. В период с 1994 по 2003 г. Борис Александрович возглавлял специализированный Совет ИБВВ РАН по защите кандидатских диссертаций. С 1974 г. он активный участник и один из организаторов программы международного научного сотрудничества в рамках межправительственного советско-американского, а впоследствии российско-американского, соглашения в области охраны окружающей среды. С 1990 г. и до последних дней Борис Александрович руководил одним из проектов этого сотрудничества «Влияние загрязняющих веществ на водные организмы и экосистемы. Разработка критериев качества воды». Его большая заслуга в том, что сотрудничество успешно развивалось в течение 30 лет и продолжается до сих пор.

Научные взгляды Бориса Александровича никогда не совпадали с позициями амбициозных конформистов-лежучих, с которыми ему порой приходилось сталкиваться. Высоко интеллигентный человек он старался избегать конфликтов, которые ему порой навязывали, но при этом всегда проявлял высокий уровень профессионализма, честность и принципиальность при решении научных проблем. Ему были чужды разного рода фальсификации, необъективность.

В середине 80-х годов с началом распада СССР в стране сложилось небрежительное отношение к науке со стороны государства и его чиновничьего аппарата. Резко сократилось централизованное государственное финансирование научных учреждений, закрывались научные лаборатории и целые ин-

ституты, научные сотрудники вынуждены были менять род своей основной деятельности или уезжать за границу. Для проведения исследований требовались дорогостоящие реактивы, современные приборы и оборудование, а денег на их приобретение не хватало даже при наличии грантов.

Борис Александрович тяжело переживал сложившуюся ситуацию, но при этом активно прилагал усилия, чтобы найти дополнительные средства для продолжения ведущихся в лаборатории исследований. В связи с этим он ориентирует коллектив лаборатории на решение прикладных экологических задач, связанных с эколого-токсикологической оценкой состояния водных объектов и влияния на них сточных вод промышленных предприятий. Для этих целей под его руководством и непосредственным участием адаптирован для России разработанный в США метод биотестирования острой и хронической токсичности питьевых, грунтовых, поверхностных и сточных вод с использованием церидафний. На сегодняшний день это единственный метод биотестирования, который прошел стандартизацию в США и России и используется в лабораториях, отвечающих за государственный и производственный экотоксикологический контроль, призванный обеспечить соблюдение нормативов качества в водных объектах, в которые попадают очищенные сточные воды¹. Одновременно он инициирует в лаборатории работы по разработке методов биотестирования для оценки токсичности донных отложений. В настоящее время эти разработки внедрены в практику. Это – первый в РФ норматив допустимого содержания загрязняющих веществ (на примере нефти) в грунтах пресноводных водоемов².

В 1987-1988 гг. Борис Александрович возглавил работы по изучению экологических последствий аварии на Черепо-

¹Методическое руководство по биотестированию воды. РД 118-02-90". М., 1990. 71с.

²Временное методическое руководство по нормированию уровней содержания химических веществ в ДО поверхностных водных объектов [на примере нефти]» РЭФИА НИА-Природа, М., 2002.

вещком металлургическом комбинате, которая нанесла катастрофический урон флоре и фауне некоторых волжских водохранилищ. Результаты исследований представлены в сборнике «Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища», ответственным редактором которого был Борис Александрович. У него сосредоточились материалы, потрясающие своей глубиной разрушения естественной среды обитания водных организмов. «Причесывать» или сглаживать результаты этой аварии было не в характере Бориса Александровича. Он знал, что отрицательные последствия аварийных сбросов комбината еще долго будут сказываться на экологическом состоянии водохранилищ. Эти выводы в полной мере подтвердились при дальнейших комплексных гидробиологических исследованиях. О сильном загрязнении Волги сегодня пишут и его бывшие оппоненты, которые пытались навязать ему ложные, «сладкие грезы» о том, что Волга - очень чистая река.

В период с 1992-1993г. Борис Александрович участвовал в работах по эколого-токсикологической оценке влияния Рыбинского промышленного комплекса на экосистему Рыбинского водохранилища, а в 1994-1995гг. он руководил комплексными исследованиями по оценке экологического состояния р. Волги в пределах Ярославской обл., проводимых совместно с Ярославским областным центром по санэпиднадзору. В ходе этих работ были заложены основы активного использования в природоохранной практики Ярославской области методов биотестирования.

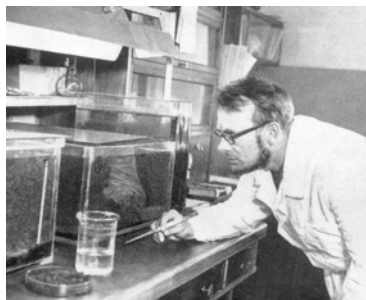
При непосредственном участии Борис Александровича в течение 1992-2004 гг. разрабатывалась и совершенствовалась методика оценки экологического состояния верхневолжских водохранилищ по зооперифитону. В последние годы много внимания он уделял исследованиям перифитона и бентоса с широких экологических позиций, применимости этих группировок беспозвоночных при оценке состояния различных по величине водных объектов, не только водохранилищ, но и ма-

лых рек. Он сотрудничал с известными специалистами по зообентосу А.И. Бакановым, по зооперифитону И.А. Скальской и другими сотрудниками различных лабораторий института. Под руководством Бориса Александровича совместно с сотрудниками ИБВВ РАН и Университета природы, человека и общества (г. Дубна) в 2000 г. проводилась оценка экологического состояния р. Сестра (Московская обл.), в которую поступают различные стоки промышленных предприятий г. Клин. Он проявлял большой интерес к экологическому состоянию другой малой реки Латки (Ярославская обл.), которая одновременно подвергалась загрязнению стоками сыроваренного завода и активному заселению бобрами.

При непосредственном участии Бориса Александровича разработан и выполнен проект «Эволюционные и современные экологические связи пресноводного перифитона и бентоса» (грант РФФИ 02-04-49921; 2002-2004 гг). Здесь в полной мере проявилась широта его эрудиции. Были рассмотрены концептуальные и методические подходы совместного изучения двух важных экологических групп гидробионтов – зооперифитона и зообентоса, выявлены общие и специфические особенности процесса формирования их структуры в водохранилищах.

Борис Александрович был полон научных идей, сил и энергии, имел много планов на будущее. Ему самому воплотить их в жизнь, к сожалению, не было суждено. Но, остались его лаборатория, коллеги, ученики, а значит, идеи его будут жить.

Борис Александрович прожил хотя и не долгую, но яркую, наполненную событиями жизнь, он всегда был на переднем плане науки. Больно оттого, что он ушел. Радостно, что он был в нашей жизни и останется в памяти многих, кто его знал, уважал, любил и ценил.



▲ Б.А. Флеров проводит токсикологический эксперимент. 1972-73 гг.

Б.А. Флеров (второй в первом ряду слева) с сотрудниками лаборатории и исследователем из США В. Турстоном (во втором ряду третий справа). Борок. 1979г. ►



◀ Б.А. Флеров с сотрудниками лаборатории (второй справа во втором ряду) и специалистами из США Т. Хайнсом (второй слева во втором ряду) и Б. Моком (в центре в первом ряду). Борок. 1989г.

Б.А. Флеров (сидит в первом ряду в центре) с сотрудниками института и Ярославского областного центра сан-эпиднадзора во время совместных исследований качества воды р. Волги в пределах Ярославской области на на научно- экспедиционном судне «Академик Топчиев». 1994г. ►





Б.А. Флеров (крайний слева) с сотрудниками лаборатории в своем рабочем кабинете. Борок. 1998г.



Б.А. Флеров (крайний слева) с сотрудниками лаборатории перед лабораторным корпусом. Борок. 2004г.

Б.А. ФЛЕРОВ: ОПЫТ 30-ЛЕТНЕГО РОССИЙСКО-АМЕРИКАНСКОГО НАУЧНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА В ОБЛАСТИ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2007г. Е.Б. Флеров

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

В мае 1972 году, во время встречи на высшем уровне в Москве, между Советским Союзом и Соединенными Штатами Америки был заключен Договор о сотрудничестве в области защиты окружающей среды. Его подписали тогдашний президент США Ричард Никсон и Председатель Президиума Верховного Совета СССР Николай Подгорный. Один из разделов Договора предусматривал объединение усилий советских и американских ученых в сфере предотвращения загрязнения водной среды. Среди других институтов, привлеченных к сотрудничеству в этой области, был Институт биологии внутренних вод АН СССР (ИБВВ), в котором с 1961 г. работал Борис Александрович Флёрв. Американским партнером Института стал Национальный центр по изучению действия загрязняющих веществ на рыб Службы рыбы и диких животных США (в настоящее время - Колумбийский центр изучения окружающей среды Геологической Службы США (CERC)). Сотрудничество между ИБВВ и CERC началось в 1974 г., после утверждения советско-американским Совместным Комитетом проекта 02.02-13 «Влияние загрязняющих веществ на водные организмы и экосистемы: разработка критериев качества воды». Представителем Института на церемонии подписания документа в Москве был Б. А. Флёрв. Цель проекта - проведение совместных исследований, обмен информацией и сравнение данных по оценке влияния загрязнений на водные организмы и экосистемы и разработка критериев качества воды, применимых для обеих

стран. Работа над проектом продолжается по ряду направлений до настоящего времени, включая:

- разработку токсикологических методов оценки загрязнения донных отложений;
- исследования физиологических и морфологических характеристик рыб в зависимости от качества воды;
- поиск репрезентативных видов водных беспозвоночных тест-организмов для оценки токсичности и разработка методов содержания их культур;
- разработку методов иммуноанализа и поиск биохимических маркеров для определения воздействия загрязняющих веществ;
- оценку опасности закисления водоемов и связанного с этим влияния металлов (в частности ртути) на водные организмы;
- разработку биохимических, физиологических и поведенческих методов оценки влияния загрязняющих веществ на водные организмы.

Успешное развитие сотрудничества Института с Колумбийским центром привело к расширению тематики совместных исследований, вовлечению с обеих сторон новых специалистов и, как следствие, к созданию еще одного совместно проекта 02.02-15 «Оценка комплексного антропогенного влияния на экосистемы водохранилищ и рек». Этот проект, направленный на разработку рекомендаций по сохранению и улучшению местообитаний гидробионтов в бассейнах рек Волга, Миссури и Миссисипи, был предложен на встрече представителей СССР и США в октябре 1989 г. в г. Колумбия, штат Миссури и в январе 1990 г. одобрен советско-американским Комитетом (по сотрудничеству в области защиты окружающей среды). На октябрьской встрече в Миссури Институт представляли бывший в то время его директором Н. П. Смирнов (в дальнейшем руководитель утвержденного проекта с российской стороны) и Б. А. Флёров. Основные направления исследований в рамках данного проекта включают:

- оценку и управление продуктивностью ихтиоценозов рек Волга, Миссури и Миссисипи;
- использование новых методов (полупроницаемые мембраны) сбора и последующего анализа загрязняющих веществ;
- определение структуры и функций сообществ зооперифитона и бентосных макробеспозвоночных в больших реках и их притоках;
- оценка и управление продуктивностью водных макрофитов биоценозов рек Волга, Миссури и Миссисипи.

Хорошо понимая важность и необходимость международных научных связей, Борис Александрович Флёров с самого начала принял активное участие в сотрудничестве с американскими коллегами. С момента утверждения проекта 02.02-13, являлся его бессменным руководителем, был инициатором и разработчиком последующего проекта. Обсуждая тематику и планы совместных работ, Борис Александрович всегда стремился сохранить баланс интересов, сделать так, чтобы проводимые исследования отвечали профессиональным интересам обеих сторон, дополняли их, были взаимовыгодными. Вот, что писал Б.А. Флёров в 2004 г. в связи с 30-ти летним юбилеем сотрудничества ИБВВ и CERC: *«На чем основано сотрудничество между Россией и США и что оно дает обеим странам? В России заложены теоретические основы гидробиологии, хорошо развита систематика водных организмов, разработаны критерии токсичности. США опередили нас по развитию экологической химии, химическому анализу загрязняющих веществ. При разработке совместных проектов используется опыт каждой из сторон. Российские специалисты освоили и внедрили в практику новые, хорошо зарекомендовавшие себя в США методы определения загрязняющих веществ, методы биотестирования... Ряд теоретических положений российской гидробиологии, в частности, о высокой чувствительности отдельных стадий онтогенеза гидробионтов к негативным воздействиям, нашли применение в практической дея-*

тельности американских токсикологов. Ими разработана методика определения токсичности на чувствительных стадиях развития рыб. Американские коллеги также используют российский подход к оценке состояния сообществ водных организмов в загрязненных водоемах... Так, в процессе сотрудничества происходит взаимодополнение и взаимообогащение накопленным сторонами опытом...».

Нельзя забывать, что сотрудничество советских и американских ученых началось в годы «холодной войны», и в первое время между партнерами могло возникать чувство настороженности. Его необходимо было преодолеть, создать атмосферу взаимопонимания, доверия и, наконец, дружбы. В этой ситуации большое значение помимо профессиональных имели личностные качества людей, участвующих в программе обмена и совместных исследованиях. Борис Александрович без сомнения обладал такими качествами, которые ему помогали в общении с зарубежными коллегами. Для многих американцев, принимавших участие в сотрудничестве, он был первым русским, которого они встретили в своей жизни. И это первое знакомство часто определяло их представления и дальнейшее отношение к России и ее людям. Достойный представитель своей страны, убежденный и заинтересованный ученый, дипломатичный и высокообразованный человек с хорошим чувством юмора и такта, он, как никто другой, способствовал разрушению негативных стереотипов, устранению психологических барьеров общения и установлению тесных профессиональных и дружеских контактов между русскими и американцами. По настоящему близкие отношения у Бориса Александровича сложились с директором CERC и руководителем 13-го проекта с американской стороны доктором Ричардом Шоттгером, который, без преувеличения, держал сотрудничество с Борком очень близко к своему сердцу. Глубину доверия и стремление поддерживать и развивать контакты с российскими коллегами иллюстрирует такой факт. В ночь с 31 августа на 1 сентября 1983 года над островом Са-

халин ракетой, пущенной советским самолетом-перехватчиком, был сбит южнокорейский пассажирский авиалайнер "Боинг-747", совершавший обычный рейс по маршруту Нью-Йорк - Сеул. Трагедия над Японским морем тотчас вызвала шквал негодования на Западе, страсти на международной арене накалились до предела. Все зарубежные средства массовой информации активно обсуждали происшедшее. Наиболее радикально настроенные из них призывали к походу против СССР и отмщению. В те мгновения весь мир приблизился к краю катастрофы. Именно в эти дни делегация американских специалистов во главе с Р. Шоттгером направляется в Борок. Государственный Департамент США настоятельно рекомендует прервать все официальные поездки в СССР, но директор Колумбийского центра, берет на себя ответственность и, совершает запланированный визит. Как впоследствии объяснил мотивы своего решения Р. Шоттгер, оно было принято благодаря уже сложившимся к тому времени взаимопониманию сторон, а также дружеским и доверительным отношениям между участвующими в сотрудничестве людьми.

И Борис Флёров и Ричард Шоттгер хорошо понимали, что успех программы обмена между Борком и Колумбией и в целом всего сотрудничества лежит не только в чисто научной сфере, но и во многом определяется личными отношениями между людьми. Поэтому, крайне внимательно и серьезно относились они к подбору кадров, стремясь привлечь к сотрудничеству достойных людей. С обеих сторон это, как правило, всегда были не только высокопрофессиональные и заинтересованные специалисты, но и умные, доброжелательные, понимающие часто не простую ситуацию люди. Именно благодаря им сотрудничество смогло пережить годы «холодной войны», распада СССР, труднейший период начала и середины 90-х. Были, конечно, случаи, как с американской, так и с российской стороны, когда происходили «нестыковки», и люди, в силу разных причин, не проявляли обоюдной заинтересованности в продолжении контактов, но они были крайне

редки. Не только совместная научная работа укрепляла связи между ИБВВ и CERC, но и взаимные культурные программы, как традиционная компонента визитов российских и американских ученых. *«Мы всегда организуем знакомство наших американских коллег с культурными и историческими ценностями Москвы, Санкт-Петербурга, Ярославля, местными достопримечательностями, особенностями российского быта, включая охоту, русскую баню и встречи в семейном кругу. Во время ответных визитов наших специалистов в США американцы отвечают нам тем же...»*, - рассказывал в одном из интервью Б. А. Флёров.

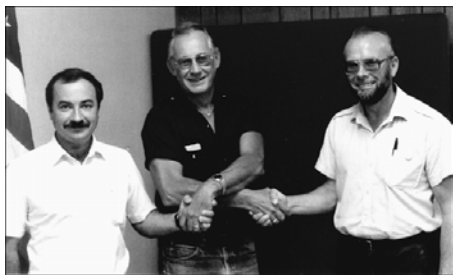
Вот уже более 30 лет успешно развивается сотрудничество Института биологии внутренних вод и Колумбийского центра изучения окружающей среды. За эти годы десятки сотрудников ИБВВ и CERC приняли участие в программе обмена, обогащая свой профессиональный опыт и объединяя усилия в решении проблем водной экологии и охраны окружающей среды. Научные результаты представлены в многочисленных совместных статьях, трудах симпозиумов и конференций, отчетах о результатах работ, выполненных в рамках совместных грантов. Но, наверно, не менее важным результатом сотрудничества стали близкие, дружеские отношения между его участниками, гарантирующие продолжение и развитие установившихся научных и культурных связей, которыми так дорожил доктор биологических наук, профессор, Борис Александрович Флёров.



Первые годы советско-американского сотрудничества. Б.А. Флеров (в центре) и В.И. Козловская (вторая слева) с Р. Шоттгером (крайний слева) и другими американскими коллегами во время визита в Колумбийский центр изучения окружающей среды, США (1979г.).



Б.А. Флеров (стоит слева) во время подписания Р. Шоттгером (сидит слева) и Н.В. Буториным (сидит справа) ежегодного отчета и протокола о сотрудничестве между ИБВВ АН СССР и Колумбийской лабораторией США во время Советско-американского симпозиума. Борок (1984г.).



Б.А. Флеров (справа) и В.Т. Комов (слева) во время их визита к Р. Шоттгеру (в центре) в Колумбийскую лабораторию (Миссури, США). 1986 г

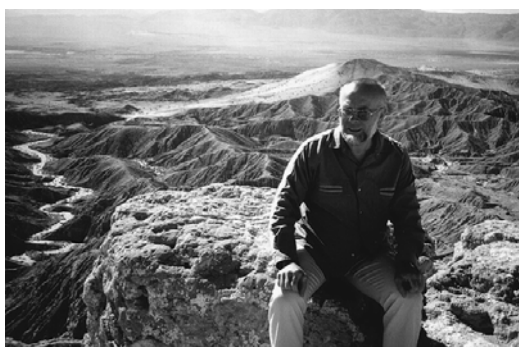


Б.А. Флеров проводит эксперимент по изучению влияния токсикантов на поведение рыб. Колумбийская лаборатория (Миссури, США). 1986г.



▲ Б.А. Флеров и В. Адамкус беседуют во время перерыва 17-го заседания Смешанной советско-американской рабочей группы 02.02-10 по охране речных бассейнов, озер и эстуариев, Траверс Сити, США. 1991г.

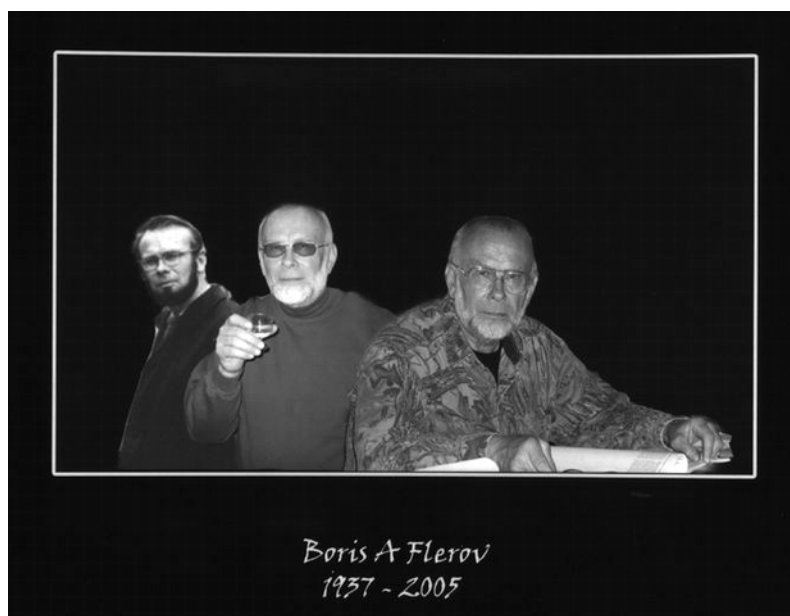
◀ Б.А. Флеров (справа) с администратором 5-го региона Агентства по охране окружающей среды США В. Адамкусом (слева), ныне президентом Литвы. Нью-Йорк, США, 1991г



◀Б. А. Флеров в горах штата Юта во время научного визита в США. Октябрь 1997г



Обсуждение результатов сотрудничества во время одного из последних визитов Б.А. Флерова в Колумбийский центр изучения окружающей среды, Колумбия, Миссури, США). 2002 г.



Фотоколлаж в память о Б.А. Флере, выполненный его друзьями и коллегами из Колумбийского центра изучения окружающей среды (CERC), Колумбия, Миссури, США. 2005г.

ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ И ОСНОВНЫЕ ИТОГИ НАУЧ- НОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИИ ФИЗИОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ ЗА 30 ЛЕТ (1973-2003гг.)¹

© 2007г. **Б.А. Флеров**

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

В Институте биологии внутренних вод РАН в период 1964-1969 гг. существовала лаборатория «физиологии пресноводных животных», ее возглавлял короткое время Б.В. Краюхин, а затем – Г.Д. Гончаров. В 1970-1972 гг. в АН СССР происходило «так называемое» усовершенствование структуры академических Институты, заключающееся в банальном сокращении и слиянии лабораторий. В это время лаборатория физиологии была расформирована, одна часть ее сотрудников вошла в состав лаборатории ихтиологии, а другая (токсикологическая группа) присоединилась к лаборатории физиологии низших организмов.

В декабре 1973 г. создали лабораторию «физиологии и паразитологии пресноводных водных животных» путем соединения токсикологической группы с частью сотрудников-физиологов, иммунологов и паразитологов. Возглавил ее - Б.А. Флеров. В лаборатории развивались работы по сенсорной физиологии - исследовалась структурно-функциональная организация обоняния у рыб (П.А. Гдовский, Н.Н. Ружинская), ионной регуляции у водных животных (Г.А. Виноградов, В.Т. Комов и др.), водной токсикологии (Б.А. Флеров, В.И. Козловская и др.), иммунологии рыб (В.Р. Микряков, Л.В. Балабанова и др.) и паразитологии (Н.А. Изюмова, Б.И. Куперман). В начале 70-х годов прошли первые защиты кандидатских диссертаций (В.А. Алексеев, 1972, В.Е. Матей,

¹ материалы подготовлены к 30-летию лаборатории, авторский текст сохранен с незначительными изменениями, материалы автором незакончены.

1973), а в период 1979-1989 гг. стали докторами биологических наук Б.А. Флеров (1983), В.Р. Микряков (1984), Г.А. Виноградов (1987). В.Е. Матей (1989) и кандидатами биологических наук 7 сотрудников лаборатории (Л.В. Балабанова, 1979; Л.Н. Лапкина, 1983; П.А. Гдовский, 1984; Н.Ф. Силкин, 1984; В.Т. Комов, 1985; Г.М. Чуйко, 1987; Н.И. Силкина, 1987).

В 1989 г. из состава лаборатории отделились группа сотрудников, на основе которой сформировалась лаборатория экспериментальной экологии (зав. – Г.А. Виноградов) и группа иммунологов во главе с В.Р. Микряковым. С этого времени и по сегодняшний день лаборатория стала называться «лабораторией физиологией и токсикологией водных животных».

За последующие 15 лет в лаборатории получены принципиально новые результаты по нейрофизиологическим основам обонятельной системы рыб. Так, П.А. Гдовским установлено, что обонятельная луковица (первый обонятельный центр у рыб) имеет собственную холинэргическую систему, а в обонятельном эпителии обнаружены специальные клетки, осуществляющие защитные функции (соавтор - Н.Н. Ружинская). Этими же сотрудниками разработан способ определения функционального развития обонятельной и зрительной систем у пресноводных рыб по удельной активности АХЭ и предложен коэффициент сенсорной специализации.

В.И. Козловская и Г.М. Чуйко методами электрофореза и субстратно-ингибиторного анализа установили, что плазма крови плотвы и синца в отличие от карпа, леща и окуня содержит не только ацетилхолинэстеразу (АХЭ), но и высокоактивную бутирилхолинэстеразу (БуХЭ). Эти результаты впервые были опубликованы в 1979 г. Ранее считалось, что у рыб в плазме крови присутствует только типичная АХЭ, а БуХЭ появляется лишь у черепах. Продолжение исследований холинэстераз показало, что БуХЭ присутствует в плазме у большинства видов карповых рыб бассейна р. Волги. Г.М. Чуйко [2004] обобщил исследования по холинэстеразам (ХЭ) пресноводных костистых рыб в своей докторской диссертации. Им впервые

описаны каталитические свойства и распределение в различных органах ХЭ, показаны сходства и различия АХЭ и БуХЭ рыб от таковых у млекопитающих, определен диапазон варьирования активности АХЭ и БуХЭ у пресноводных рыб. Установлено также, что у карповых рыб удельная активность БуХЭ преобладает в общей активности ХЭ и ее уровень коррелирует с таковым активности АХЭ мозга.

В.А. Непомнящих в период 1983-1995 гг. изучал инстинктивное поведение у водных животных и одновременно занимался математическим моделированием поведения, основанным на оригинальных экспериментальных исследованиях. В итоге он обосновал положение, что в основе поведения лежат фундаментальные свойства, присущие нелинейным динамическим системам (в том числе и небиологическим) и предложил математические модели поискового поведения. Эти работы выявили, что целостные поведенческие реакции являются наиболее адекватным показателями повреждающего действия загрязняющих веществ по сравнению с отдельными, частными сторонами проявления поведения. В.А. Непомнящих разработал также новый метод индивидуально-ориентированного моделирования в экологии, заключающийся в том, что механизм управления каждой особи в популяции имитируется как нелинейная динамическая система.

Большой объем занимали токсикологические исследования. В результате сравнительного анализа устойчивости пресноводных животных к токсическим веществам обнаружена примерно одинаковая устойчивость пресноводных беспозвоночных и рыб к хлорорганическим пестицидам (ХОП). К фосфорорганическим пестицидам (ФОС) наиболее чувствительны и наименее устойчивы беспозвоночные, среди них - ветвистоусые ракообразные [Флеров, 1989]. Впервые исследована сравнительная устойчивость 23 видов аннелид (пиявок и олигохет) к фосфорорганическим соединениям, а также к фенолу, медному купоросу, ХОП (полихлорпинену) и показана ее связь с местом червей в филогенетическом ряду и с их

экологической пластичностью. [Лапкина, Архипова, 2000]. Выявлены и уточнены физиолого-биохимические механизмы действия упомянутых приоритетных веществ, а именно - фенол действует как разобщитель окислительного фосфорилирования, угнетает активный транспорт натрия и нарушает передачу импульсов в мионевральном синапсе рыб. Хлорорганические соединения (ПХП, гексахлоран) обладают ярко выраженным центральным действием, но они не оказывают влияния на активный транспорт ионов у рыб. ПХП в отличие от гексахлорана нарушает адгезионные свойства мембран клеток жаберного эпителия и вызывает утечку из организма ионов натрия [Флеров, 1989]. Основа действия ФОС - ингибирование ацетилхолинэстеразы в мозговой ткани и мышцах. Проанализированы механизмы межвидовых различий в устойчивости рыб к действию ФОС, которые связаны с проникновением, чувствительностью ферментов-мишеней, процессами детоксикации и выведения токсикантов [Чуйко, 1986].

Более 30-летний опыт сотрудничества с одним из известных токсикологических центров США - Колумбийским центром экологических исследований позволил применять в токсикологических исследованиях разработанные американцами проточные системы (дилютеры), поддерживающие на постоянном уровне задаваемые концентрации испытуемых веществ именно в проточных условиях. На их основе в ИБВВ РАН созданы надежные отечественные дилютеры, позволяющие дозировать подачу химических веществ гидростатическим способом без использования электроэнергии [Виноградов, 1995, 1998]. Использование дилютеров очень важно, поскольку в непроточных условиях происходит связывание, выпадение, разложение тестируемых веществ, накопление продуктов жизнедеятельности тест-объектов, что вносит ошибки в результаты токсикологических исследований.

В.Т. Комовым [1999] впервые для Северо-Запада РФ показана антропогенная природа закисления водоемов. До этого не было ясным, существует ли в России антропогенное

закисление. Установлено, что малые озера этого региона с $\text{pH}=5$ или ниже - неотъемлемый элемент природно-ландшафтных комплексов. Определены масштабы закисления поверхностных вод и определены районы повышенного риска. Установлены размеры превышения критической нагрузки окислов серы на экосистемы озер, показаны масштабы закисления поверхностных вод и дана количественная оценка способности водосборного бассейна справляться с этим загрязнением. Для российских озер показана важная роль атмосферных выпадений ртути. Установлено, что именно закисление - основной фактор, определяющий кумуляцию ртути в рыбе, которая происходит как за счет повышенного содержания метилированной ртути в воде, так и за счет изменения трофической структуры экосистемы, а именно, благодаря возрастанию роли планктонного гетеротрофного звена. Эвтрофирование ограничивает этот процесс [Степанова, Комов, 2002]. Выявлены отличия кислотных водоемов РФ от таковых Скандинавии и Северной Америки: низкое содержание растворенного в воде алюминия и, как правило, высокая концентрация растворенного органического вещества формируют менее жесткие условия для гидробионтов [Комов, 1999].

Д.Ф. Павловым совместно с Гидрохимическим институтом Росгидромета проанализированы уровни накопления ХОП в основных речных бассейнах РФ [Zhulidov et al., 1998]. Оказалось, что до настоящего времени ХОП обнаруживаются не только в ДО и биоте, но и в воде многих рек. Неожиданно высокие уровни ХОП и уровни выноса этих пестицидов в Мировой океан зарегистрированы в бассейне р. Оби, что связано с применением ХОП для борьбы с гнусом в районе культурного оленеводства. Динамика их концентраций соответствует динамике ХОП в США и Канаде только с запаздыванием на 10 лет.

Лаборатория - один из основных разработчиков в Институте теоретических основ и современных методов биотестирования воды и ДО. Акцент делался в первую очередь на разработку поведенческих методов биотестирования. Впервые

на медицинской пиявке показано, что патологическое поведение (симптомокомплекс отравления) может служить средством идентификации отдельных групп токсикантов, в частности фенольных соединений, а также ФОС и ХОС [Лапкина, Флеров, 1980]. Дальнейшие исследования показали, что молодь медицинской пиявки является удобным, альтернативным тест-объектом обнаружения загрязняющих веществ раздражающего действия. Кроме того, она может быстро и эффективно обнаруживать в различных средах (воде, донных отложениях, почве, воздухе, вытяжках из растений и животных) боевые отравляющие вещества, основу которых составляют ФОС, соединения мышьяка и ртути [Лапкина, Флеров, 2001].

В 90 годах XX столетия лабораторией совместно с Ярославским санитарно-эпидемиологической службой оценивалось санитарно-гигиеническое и эколого-токсикологическое состояние природной воды и донных отложений (ДО) Верхней Волги. В воде этого региона (особенно в районе крупных городов) наблюдалось повышенное содержание нефтепродуктов, фенольных соединений, превышение нормативов по ХПК, на 50% станций обнаружена хроническая токсичность. Содержание тяжелых металлов, пестицидов, СПАВ не превышало санитарно-гигиенические нормативы. В 1996 г в этом регионе зарегистрировано снижение уровня фенола, вплоть до его следовых количеств [Флеров, Королева, 1999.]

В 1990 г в леще Рыбинского водохранилища (ст. устье р. Согожи) нами впервые обнаружено повышенное содержание полихлорированных бифенилов (ПХБ) – более 1.2 мг /кг живого веса, а также установлено, что форма ПХБ близка к стандарту Aroclor 1254. С этого момента началось исследования судьбы этого опасного токсиканта и его отрицательного влияния на экосистему Рыбинского водохранилища сначала в рамках лаборатории физиологии и токсикологии водных животных, затем в других лабораториях Института. Так, был выявлен основной источник загрязнения ПХБ. Им оказался Череповецкий промышленный комплекс. Определены пути

попадания ПХБ в Рыбинское водохранилище, их пространственное распределение и уровни накопления в основных компонентах экосистемы - воде, ДО и биоте, а также степень деградации этих персистентных соединений под воздействием биотических и абиотических факторов [Козловская, Герман, 1997; Герман, Козловская, 1999, 2001]. Составлен прогноз длительного влияния ПХБ на функционирование водоема: при существующих уровнях содержания ПХБ в ДО водохранилища (0.04-7.12 мг/кг сухой массы) их отрицательное влияние будет сохраняться на протяжении не менее 30 лет [Герман, Законнов, 2003].

Впервые в РФ для оценки потенциальной опасности загрязненных ДО использован триадный подход, включающий определение содержания загрязняющих веществ, токсичности и состояния бентосных сообществ. Выявлено, что среди верхневолжских водохранилищ неблагоприятным состоянием характеризуются ДО Ивановского - 44% станции, Горьковского - 33%, Рыбинского - 21%. Наилучшее состояние отмечено в Угличском водохранилище [Томилина, 2000; Флеров и др., 2000; Баканов и др., 2000]. Загрязнение грунтов носит локальный характер. Зоны высокой токсичности расположены вблизи крупных городов и промышленных центров. Так, наибольшей токсичностью обладали ДО Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища, находящегося под техногенным влиянием Череповецкого металлургического комбината. Совместно с другими научными организациями разработано и внедрено в практику «Временное методическое руководство по нормированию уровней содержания химических веществ в ДО поверхностных водных объектов (на примере нефти)» [РЭФИА НИА-Природа, М., 2002]. Это – первый в РФ норматив допустимого содержания нефти в грунтах пресноводных водоемов.

**СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ОТДЕЛА ОБОНЯТЕЛЬНОЙ
СИСТЕМЫ РЫБ.**

© 2007г. П.А. Гдовский, Н.Н. Ружинская, С.А. Мензиков
*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н*

ВВЕДЕНИЕ

Химические стимулы, в отличие от стимулов других модальностей, передающих физический сигнал, являются намного более трудными для опознавания сенсорной системой, так как не имеют четкой размерности. Зрительные и слуховые сигналы так же, как тактильные стимулы, могут точно характеризоваться физическими размерностями: амплитудой, направлением и, в двух первых случаях, частотой, длиной волны (электромагнитной или механической). У химического стимула существует амплитуда сигнала, т.е. химическая концентрация, но, в отличие от зрения (например, цвет, оттенок) или слуха (например, высота тона, звука), нет сигнального качества, молекулы каждого индивидуальны. Большой диапазон качественных характеристик (размерность) и непредсказуемость химического окружающего мира делают его трудным для восприятия и анализа. Однако присутствующие запахи, а это, главным образом, сложные смеси нескольких десятков, даже сотен компонентов в естественной среде животные могут признавать и различать в удивительно широком диапазоне качеств и интенсивностей с помощью обонятельной системы (ОС). Решение такой сложной задачи обонятельная система выполняет за счет экстенсивного количественного молекулярного и клеточного расширения и многоэтапных селективных фильтров и усилителей от рецепторного нейрона до высших отделов ЦНС. Лишь на кодирование рецепторных белков ОС из генома отведено 2% генов, что

сравнимо только с такой жизненно важной системой организма, как иммунная система [1].

Принципиально схема построения ОС у всех животных, независимо от их положения в филогенетических рядах, одинаковая. Однако животные, которые эволюционно далеко отстоят друг от друга, но обитают в одной среде, имеют более схожее построение ОС, чем животные более близкие филогенетически, но обитающие в разных средах.

Обонятельная система костистых рыб в структурном отношении значительно уступает ОС млекопитающих, но в функциональном отношении сравнима с ними, а по некоторым параметрам превосходит их. Рыбы, обитая в среде с ограниченной зрительной информацией, за длительную эволюционную историю приспособили химические сигналы для управления всеми формами поведения. Однако структурная организация ОС рыб уступает наземным животным, которые успешно используют и зрение и обоняние.

1. ЗАЩИТА ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ РЫБ ОТ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.

1.1. Биохимические и структурные основы защиты обонятельного эпителия (обзор литературы).

У обонятельного эпителия две взаимоисключающие проблемы: как сделать наиболее доступным рецепторный отдел для желательных молекул (одорантов) и защитить себя от токсических веществ, в том числе, от избытка одоранта. Решение последней проблемы наиболее естественно для организма. Это – детоксикация ксенобиотиков посредством ферментативных процессов, как и в печени, снижение концентрации нежелательных веществ до не повреждающих уровней. В рецепторном отделе млекопитающих детоксикация ксенобиотиков и одорантов осуществляется ферментами биотрансформации так же, как в печени. Три класса таких ферментов (цитохром Р-450 оксигеназа, UDP-глюкуронозилтрансфераза (UGT) и глутатион S-трансфераза (GST)), идентифицированы в обонятельном эпителии млекопитающих

[2,3]. Цитохром Р-450 оксигеназа принадлежит к так называемым ферментам фазы I преобразования, и катализирует реакции гидроксилирования. Продукты этих реакций становятся субстратами для ферментов фазы II преобразования, которые включают UGT и GST. По этой схеме могут разрушаться и некоторые одоранты, во всяком случае, половые феромоны насекомых и млекопитающих. На основе данных о типах одорантов, которые могут изменяться этими ферментами, и их присутствии в обонятельной ткани, сделан вывод о том, что ферменты биотрансформации катализируют преобразование одорантов и феромонов и выступают как средства завершения обонятельного сигнала [3, 4].

Иммуногистологическое исследование распределения ферментов биотрансформации в обонятельном эпителии млекопитающих показало, что их источником являются боуменовы железы и опорные клетки [4]. Однако задолго до этой работы предполагалось, что опорные клетки ОЭ несут не только структурную, скрепляющую функцию, но и участвуют в перирецепторных процессах. При стимуляции обонятельной выстилки одорантами было обнаружено, что в опорных клетках происходят гистохимические изменения и наблюдается вакуолизация [5]. В 1971 г. на ультраструктурном уровне В.Д. Mulvaney [6] первым описал микровиллярные опорные клетки (МОК) с лизосомоподобными тельцами (ЛПТ) в ОЭ кролика. Им было выдвинуто предположение, что лизосомальные ферменты в ЛПТ этих клеток разрушают одоранты, а накопление побочных продуктов приводит к увеличению электронной плотности ЛПТ. Вскоре экспериментально было показано, что только МОК участвуют в детоксикации чужеродных химических соединений [7]. В дальнейшем на ультраструктурном и цито-иммунологическом уровне было подтверждено, что основная роль в процессах биотрансформации и детоксикации в обонятельной выстилке млекопитающих принадлежит МОК [8]. Исследований на эту тему очень мало. Скорее всего, это связано с тем, что в обонятельной выстилке

находится малое количество МОК, менее 1% [8]. Недавно подобные клетки описаны в норме у норных млекопитающих, и повышенное количество этих специфических клеток, как считают авторы, связано с их образом жизни [9, 10]. У землероек (*Blarina brevicauda* и *Blarina carolinensis*) опорные клетки, названные светлыми МОК, по своей ультраструктуре схожи с МОК, появляющимися в ОЭ крыс при ингаляции животных токсическими веществами. Цитоплазма светлых МОК имеет очень бледную окраску при световой микроскопии и показывает низкую электронную плотность по сравнению с обычными темными опорными клетками. Светлые МОК имеют выпуклую апикальную поверхность, и в них наблюдается недостаток больших количеств гладкого эндоплазматического ретикулума, типичного для апикальной цитоплазмы темных ОК [10]. У броненосца (*Dasypus hybridus*) в МОК присутствуют плотные вакуоли, мультивезикулярные тельца и лизосомо-подобные тельца, вероятно связанные с эндоцитозной системой [9].

У рыб целенаправленный поиск в обонятельном эпителии специализированных клеток, участвующих в детоксикации, не проводился. Такое исследование представляет интерес не только в морфологическом аспекте, но также и эволюционном. Убедительно показано, что у млекопитающих и насекомых ведущий фермент биотрансформации – глутатион S-трансфераза (КФ 2.5.1.18, GST) – локализуется только в опорных клетках [11]. У рыб же он экспрессируется лишь в рецепторных клетках [12]. Из этих данных следует, что у рыб морфологическая организация выполнена несколько иначе, чем у млекопитающих и насекомых, или у рыб в опорных клетках присутствует иная форма GST.

Организация защиты обонятельного эпителия от воздействия окружающей среды имеет еще один аспект, свойственный только обитателям пресных вод. Это – кислотность воды. Вопрос о способности рыб выживать в низких значениях pH и возможности адаптироваться к этому фактору внешней среды

возник в середине прошлого столетия, в связи с интенсивным антропогенным закислением водоемов. [13]. Основной токсический эффект кислотного стресса (КС) выражается в нарушении способности жабр выполнять свою функцию ионо- и газообмена. КС вызывает значительные ультраструктурные повреждения жабр, заключающиеся в гиперплазии эпителиальных клеток, в некрозе хлоридных клеток, набухании и слиянии ламелл [14]. В толерантном диапазоне pH потребление кислорода рыбами не отличалось от контроля [15]. Лимитирующей системой оставалась только осморегуляторная система жабр, позволяющая виду адаптироваться к той или иной величине pH среды.

Большинство видов рыб живет в воде с pH от 8 до 6. Отдельные виды живут в экстремально крайних значениях кислотности воды. В кислых малых озерах северо запада России с pH воды меньше 5 обитает только окунь [13]. Карповая рыба угай (*Tribolodon hakonensis*) живет в озерах Японии с pH 3.5 [16]. В щелочных (pH 9.4) озерах Тибета обитает гимноципрус пржевальского (*Gymnocypris przewalskii*), а африканском озере Magadi (pH 10) – тилапия (*Oreochromis alcalicus grahami*) [17]. Недавно описан большой географический регион (темные воды Амазонии) с исключительными физико-химическими особенностями, необычными относительно для пресноводных вод в других частях света. Два наиболее значимых параметра – низкое значение pH и низкая минерализация. В реке Рио Негра, например, уровни pH колеблются около 4.5–6.0, а в ограниченных затопленных областях леса (Igaraps) pH 3. Несмотря на такие чрезвычайно неблагоприятные особенности для водных организмов, эти воды заселены богатой ихтиофауной. Рыб в реке Рио Негро оказалось больше чем 1000 видов [18]. Среди этих рыб близко родственные виды из семейства панцирниковых сомов могут жить постоянно в темных кислых водах. Например, *Corydoras adolfoi* – типичный обитатель темных вод затопленных лесов среднего течения Рио Нигро с pH 3.5. А *C. schwartzi* может мигриро-

вать из нейтральных вод в кислые [19]. Стратегия адаптации у этих видов рыб различная. Управление толерантностью ионрегулирующей системы жабр у мигрирующих видов Ca^{2+} -зависимое и направлено на снижение диффузионной ионной потери через плотные межклеточные контакты без усиления активного поглощения ионов [19]. Адаптивные стратегии, вовлеченные в кислотную устойчивость, у рыб, постоянно живущих в воде с низким значением pH, еще окончательно не выяснены. Физиологическое регулирование, которое позволяет рыбам населять слабо минерализованные воды с низким значением pH, заключается в их способности поддерживать ионное равновесие усилением транспорта, и ограничением проницаемости жаберного эпителия [19]. Ключевым фактором для выживания вида в кислотной воде остается снижение проницаемости, скорее, чем усиление скорости ионного поглощения. Однако управление снижением проницаемости у рыб, постоянно живущих в кислой среде, осуществляется не Ca^{2+} -зависимым способом, а каким-то другим, предположительно с использованием гуминовых кислот [20].

При адаптации тилапии (*Oreochromis alcalicus grahami*) к щелочной среде выделение азотистых продуктов катаболизма происходит исключительно в виде мочевины, и эта рыба имеет ферменты цикла орнитин – мочевины в печени, как у млекопитающих [17]. Это один из уникальных случаев, когда у вида для выполнения физиологической функции используется ферментативная система, отсутствующая во всей своей филогенетической линии, но являющаяся основной в параллельной.

Как ведет себя обонятельная система при кислотном стрессе не известно. Показано лишь, что закисление воды, омывающей ОВ форели (*Salmo gairdneri* и *S. trutta*), до pH 5 ингибирует ответ на аминокислоты [21].

1. 2. Роль опорных клеток в защите обонятельного эпителия тилапии.

В обонятельном эпителии тилапии опорные клетки расположены по соседству с рецепторными клетками. Они пред-

ставлены двумя формами, которые различаются некоторыми особенностями ультраструктуры и осмиофильностью матрикса Рис. 1, Б; 2, А–В).

Апикальная поверхность темных клеток характеризуется наличием жгутиков или мерцательных ресничек, а апикальная мембрана светлых – образует многочисленные фестончато-видные выпячивания и микровиллеподобные выросты. Как темные, так и светлые клетки содержат обычный набор органелл – гранулярную и агранулярную эндоплазматическую сеть, многочисленные митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи и не обнаруживают признаков секретообразования. Их цитоплазма пронизана актиновыми филаментами опоясывающих и тонофиламентами точечных десмосом, которые скрепляют все элементы эпителия в единый пласт. Помимо этого цитоплазма светлых МОК включает в свой состав различные лизосомоподобные органеллы. Среди них наиболее многочисленны лизосомоподобные микротельца размером 0.2–0.4 мкм, имеющие однослойную мембрану и в разной степени заполненные пластинчатыми структурами и мелкими осмиофильными зернами. Встречаются отдельные мультивезикулярные тельца, а также окаймленные пузырьки. "Щетинистая" оболочка прозрачных пузырьков выглядит относительно пушистой, а оболочка электронноплотных – имеет более жесткую "щетинку", сходную с "корзинками" окаймленных пузырьков в синаптических элементах нервной ткани. И те, и другие обычно располагаются вблизи базолатеральных мембран.

По данным сканирующей электронной микроскопии месячная экспозиция рыб в воде, содержащей ДДВФ, не отражается на структуре индифферентного эпителия, однако приводит к некоторым изменениям на поверхности сенсорного (Рис.1, В, Г). Здесь появляются многочисленные округлые образования, выступающие над уровнем эпителия. Их размер составляет в диаметре 2–3 мкм, что значительно меньше диаметра секреторных гранул и в 2–3 раза превышает размеры обонятельных булав жгутиковых рецепторных клеток.

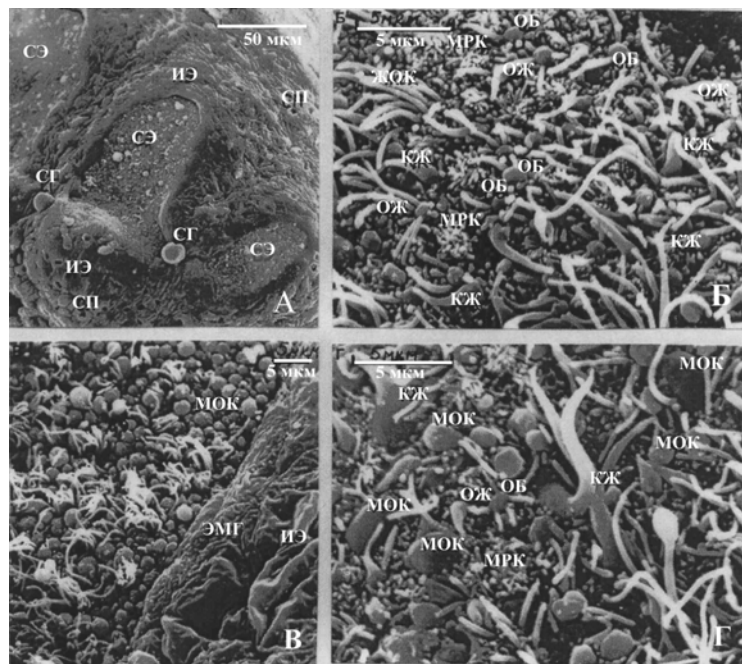


Рис.1. Влияние ДДВФ на ультраструктуру поверхности обонятельного эпителия теляпии.

А – общий вид обонятельного лепестка в норме; Б – область сенсорного эпителия в норме;

В, Г – сенсорный эпителий через 0.5 и 1 мес. воздействия ДДВФ.

Обозначения: СЭ – сенсорный эпителий, ИЭ – индифферентный эпителий, СП – секреторная пора, СГ – секреторная гранула, ОБ – обонятельная булава, ОЖ – обонятельный жгут, КЖ – комплексный жгут, МРК – микровиллярная рецепторная клетка, МОК – микровиллярная опорная клетка, ЖРК – жгутиковая рецепторная клетка, ЖОК – жгутиковая опорная клетка, ЭМГ – эпителиальная клетка с микрогребнями.

Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что эти образования являются результатом гипертрофии светлых микровиллярных опорных клеток и представляют собой выпячивания апикальных участков цитоплазмы. Их матрикс содержит большое количество рибосом, расширенные цистерны агранулярного эндоплазматического

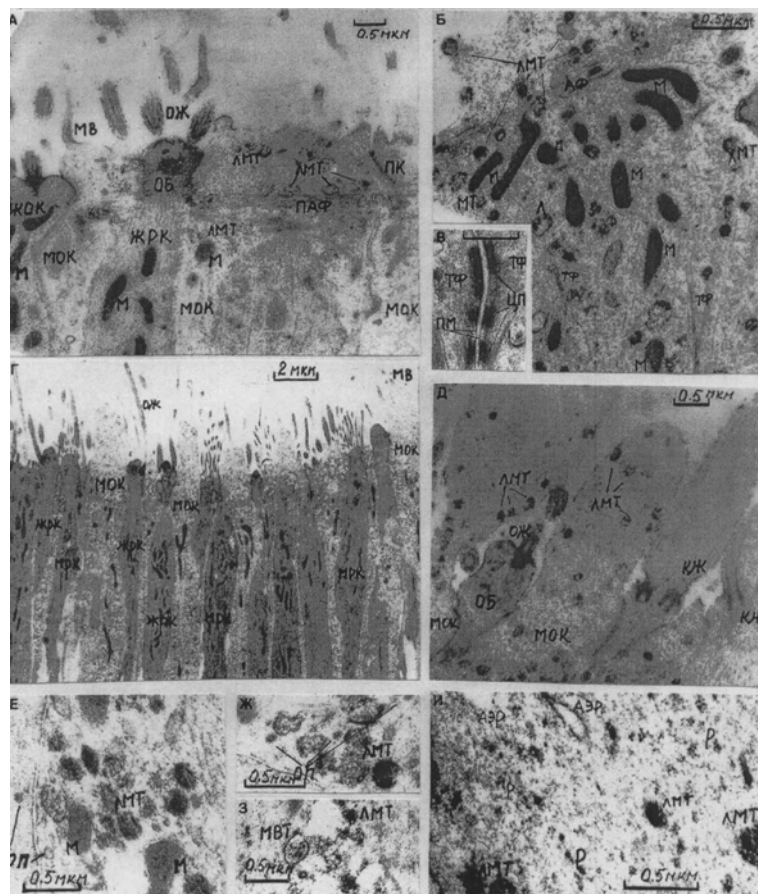


Рис. 2. Влияние ДДВФ на ультраструктуру клеток обонятельной выстилки теляпии.

А – СЭ в норме; Б – МОК в норме; В – точечная десмосома; Г – СЭ через 0.5 мес. воздействия ДДВФ; Д – апикальная часть МОК через 0.5 мес. Воздействия ДДВФ; Е, Ж, З – лизосомоподобные органеллы в цитоплазме МОК через 1 мес. воздействия ДДВФ, И – ультраструктура апикальной части МОК через 1 мес. воздействия ДДВФ.

М – митохондрия, МВ – микровилла, ПК – плотный контакт, ЛМТ – лизосомоподобное микротельце, АФ – актиновые филаменты, ТФ – тонофиламенты, ЦП – цитоплазматическая пластинка, ПМ – плазматическая мембрана, МВТ – мультивезикулярное тельце, ОП – окаймленный пузырек, Л – лизосома, АЭР – агранулярный эндоплазматический ретикулум. Остальные обозначения, как на рис. 1.

ретикулума и лизосомоподобные осмиофильные микротельца (Рис.2, Г–И). Количество последних заметно возрастает и в основном объеме этих клеток. По сравнению с нормой значительно чаще встречаются мультивезикулярные тельца и окаймленные пузырьки. Такая картина сохраняется в течение всего срока воздействия ДДВФ. Никаких изменений в структуре рецепторных элементов и в опорных клетках жгутикового типа не обнаружено.

Наши данные также позволяют считать, что и в эпителии телятии опорные клетки микровиллярного типа выполняют аналогичную функцию. Во-первых, они содержат лизосомоподобные микротельца, имеющие сходные ультраструктурные характеристики с микротельцами (пероксисомами) гепатоцитов и гранулами полиморфноядерных лейкоцитов, которые, как известно, осуществляют расщепление чужеродных веществ и участвуют в бактерицидных реакциях [22]. Во-вторых, их численность так же, как и количество мультивезикулярных телец, выполняющих подобную функцию, возрастает в присутствии ДДВФ. И, наконец, гипертрофия микровиллярных опорных клеток при токсическом воздействии представляет собой структурное проявление адаптивного усиления их активности в условиях повышенной функциональной нагрузки. Относительно высокое содержание окаймленных пузырьков в этот период свидетельствует об интенсивном, опосредованном рецепторами эндоцитозе, что предполагает участие различных сигнальных веществ (гормонов, липопротеидов) в формировании этой реакции [23].

Согласно результатам цитологических исследований, основная роль в процессах биотрансформации и детоксикации в ОЭ млекопитающих принадлежит микровиллярным опорным клеткам [7, 8, 24]. Основным ферментом второй фазы детоксикации вредных веществ является GST, которая составляет большое семейство, состоящее из 9 классов. Основными считаются альфа, мю, пи и тета классы. В обонятельном эпителии млекопитающих экспрессируются альфа и мю

классы и только в несенсорных клетках [25], а в ОЭ рыб – найден один пи класс и только в сенсорных клетках [12]. Как сейчас установлено, в тканях рыб экспрессируются только пи и тета классы GST. Тета класс наиболее близок к анцестральному предшественнику, и на этот класс у рыб ложится основная нагрузка по детоксикации [26].

Таким образом, на клеточном уровне эпителий рыб и млекопитающих защищен однотипно от воздействия вредных веществ, на молекулярном уровне – различия, возможно, наблюдаются только по экспрессии субклассов детоксицирующих ферментов, что, скорее всего, связано с положением рыб в эволюционном ряду.

1.3. Роль секреторных клеток.

Нами были проведены исследования поведения обонятельной системы при длительном пребывании карпа в воде с низким значением рН в течение 10 суток [27]. Трехчасовое пребывание рыб в закисленной воде привело к снижению величины ответов на стимуляцию одорантами на 30–55%, в зависимости от класса одоранта (рис. 3). Максимальное снижение чувствительности приходилось на первые сутки, после чего происходит постепенное восстановление обонятельного восприятия. Карпы, как и другие рыбы, адаптируются к низкому значению рН в течение 7–10 суток – к этому сроку величина обонятельных реакций на стимуляцию одорантами восстанавливается до нормы (рис. 3).

Потеря обонятельной чувствительности сопровождалась снижением рН слизи обонятельного эпителия с 7.25 до 6.85, а восстановление – возвращением этих параметров к норме. Электронно-микроскопические исследования показали, что у рыб, живущих в нейтральной воде, по всей поверхности обонятельного эпителия отчетливо видны секреторные поры, различающиеся формой и размерами, и все структуры апикальной поверхности ОЭ.

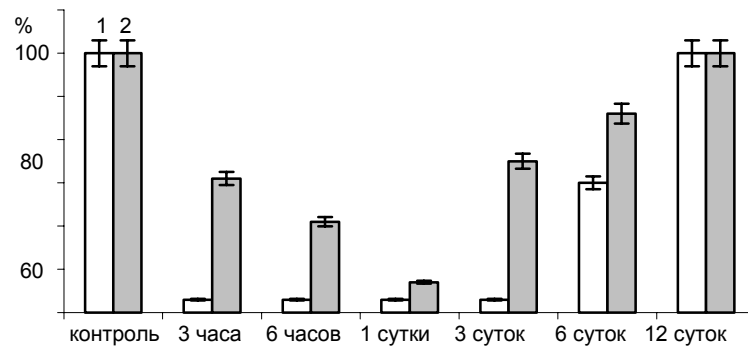


Рис. 3. Влияние закисления воды (pH 4.5) на обонятельную чувствительность карпа.

По оси ординат – величина импульсных реакций в обонятельном тракте, % от контроля; по оси абсцисс – время пребывания рыб в закисленной воде. 1 – стимуляция выстилки 1 mM раствором d, l-серином, 2 – запахом собственного вида.

После 3-часового пребывания рыб в воде с pH 4.5 поверхность ОЭ начинает существенно отличаться от контроля – рельефный рисунок, отражающий топографию жгутиковых и микровиллярных клеток не просматривается, так как весь ОЭ покрыт слизью. В зонах рецепторного и нерецепторного эпителия просматриваются отдельные, довольно крупные гранулы секрета (диаметр – 2–3 мкм), количество которых в 10 раз превышает норму (контроль – 5–6 гранул на 100 мкм²). Содержимое гранул, растекаясь по поверхности эпителия, скрывает апикальные части клеток обонятельной выстилки. Структурных повреждений апикальных отделов рецепторных клеток не обнаружено. Однако наблюдается выпячивание апикальной поверхности эпителиальных клеток. Такое, скорее всего, происходит из-за того, что в зоне нерецепторного эпителия секреторной функцией обладают преимущественно бокаловидные клетки (БК) [28, 29], поэтому выпячивание эпителиальных клеток, по всей вероятности, связано с увеличением объема бокаловидных секреторных клеток, тела которых расположены под слоем эпителиальных клеток. В дальнейшем

выделение слизи уменьшается. На 3 сутки скопления слизи встречаются реже, и только на 7 сутки с начала воздействия поверхность ОЭ принимает первоначальный вид (рис. 4, 5). Итак, в ответ на снижение рН среды все элементы обонятельной выстилки карпа, обладающие секреторной функцией, повышают уровень активности. По всей вероятности, в этот период слизь имеет специфические физико-химические свойства, поскольку не исчезает во время фиксации препаратов, тогда как у рыб, живущих в нейтральной воде, при таком же способе обработки материала она встречается редко и в малых количествах. Ионный состав слизи также претерпевает значительные изменения в ответ на снижение рН среды (рис. 6).

Обращает на себя внимание то, что одновременно с интенсивной секрецией слизи увеличивается концентрация калия, в то время как содержание натрия и хлора уменьшается.

Однако в дальнейшем, когда функция обоняния начинает возвращаться к норме и прекращается патологическое слизеотделение, снижение концентрации всех элементов в слизи становится пропорциональным. Это связано, скорее всего, с тем, что в состав слизи входят мукополисахариды, содержащие связанный калий [29], а ионные формы исследуемых элементов поступают с помощью специализированных ион-транспортирующих клеток, так называемых хлоридных клеток [30, 31].

Известно так же, что в жаберном эпителии эти клетки на первых этапах акклимации к низким значениям рН снижают свою функциональную активность [32]. Кисотно-щелочное равновесие во многих тканях, в том числе и в обонятельном эпителии млекопитающих, поддерживается карбоангидразой (КА) [33], а метаболизм слизи в ОВ амфибий и млекопитающих контролируется вегетативной холинергической нервной системой [34]. Активность КА в обонятельной выстилке у рыб, находящихся 1 сутки в воде с рН 4.5, возрастает почти в 3 раза.

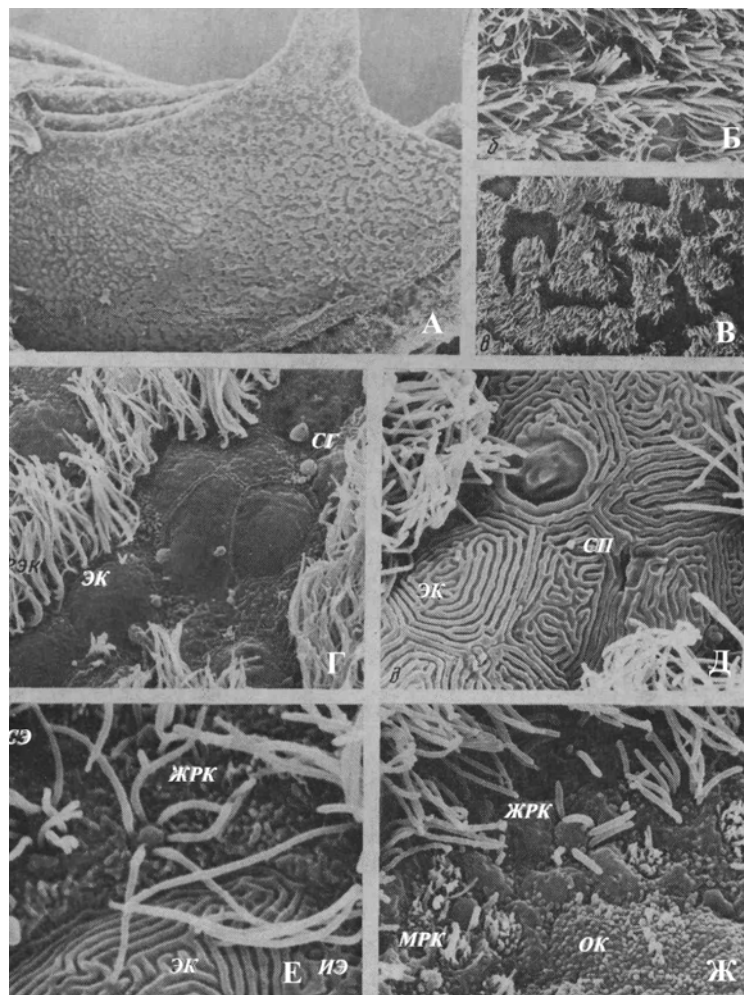


Рис. 4. Структура поверхности обонятельной выстилки карпа в норме.

а – лепесток обонятельной розетки (ЛОР; ув. 70X); б – ИЭ в центре ЛОР (1500X); в – ИЭ в вентро-латеральной части ЛОР (450X); г – эпителиальные клетки с гладкой апикальной мембраной (ЭК) и ресничками (РЖ) (2000X); д – ЭМГ (4500X); е – граница между СЭ и ИЭ, булавки ЖРК (7000X); ж – СЭ, булавки ЖРК и МРК (4500X). ОК – опорная клетка. Остальные обозначения, как на рис. 1

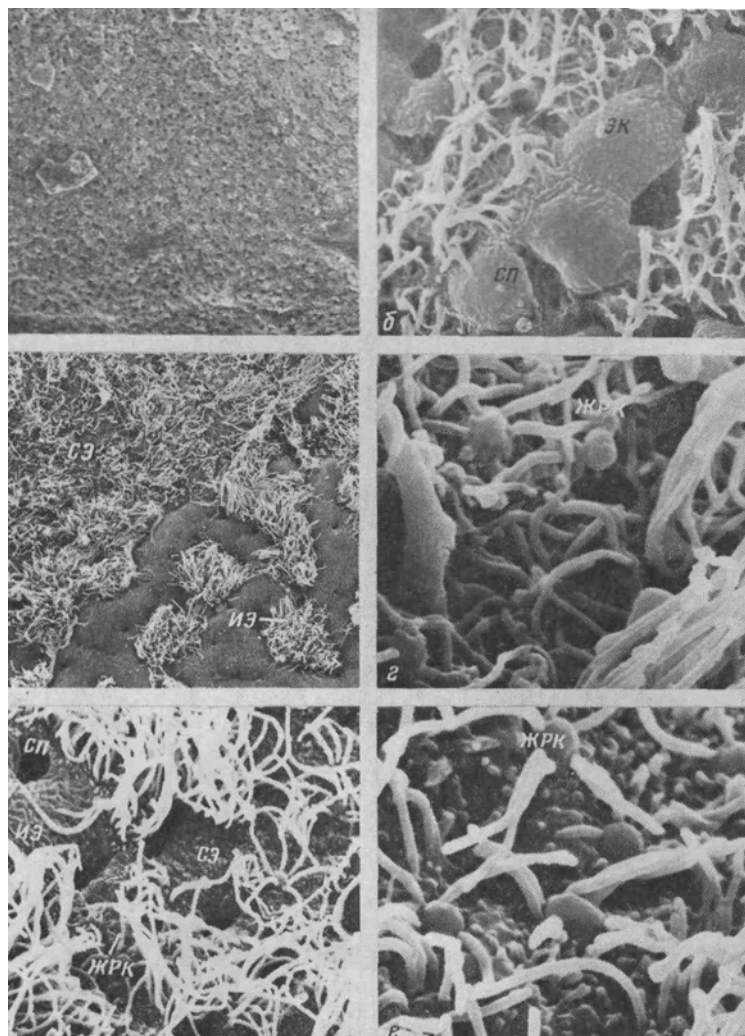


Рис. 5. Структура поверхности обонятельной выстилки карпа при продолжительном воздействии закисления.
а – поверхность лепестка, 6 ч. с начала воздействия (ув. 150X);
б – ИЭ, 6 ч. с начала воздействия (2000X); в – граница между СЭ и ИЭ, 1 сут. воздействия (700X); г – СЭ, 1сут. воздействия (7000X); д – граница между СЭ и ИЭ, 3 сут. воздействия (3000X); е – СЭ, 7 сут. воздействия. Обозначения, как на рис.1 и 4.

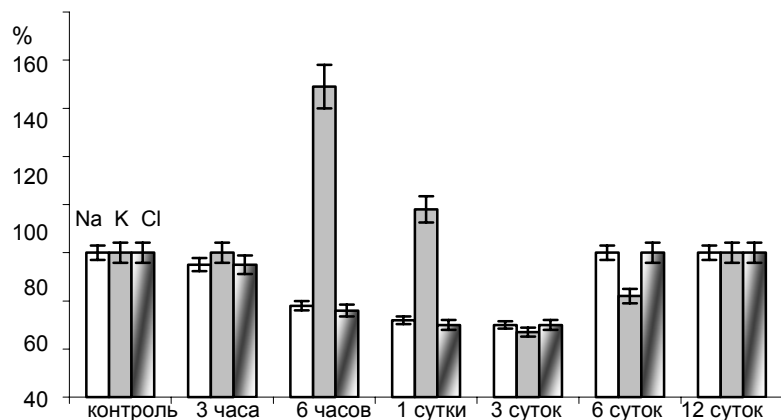


Рис. 6. Влияние закисления воды (рН 4.5) на содержание натрия, калия и ионов хлора в слизи обонятельной выстилки. По оси ординат – концентрация, % от контроля; по оси абсцисс – время пребывания рыб в закисленной воде.

Уровень активности КА управляется, по всей видимости, парасимпатической системой, так как при блокировании мускариновых рецепторов атропином КА не активируется в от на изменение кислотности среды (табл. 1).

Таблица 1
Влияние атропина и кислой среды на активность карбоангидразы в обонятельной выстилке карпа.

Условия опыта	Активность карбоангидразы, усл. единицы.
Контроль	2.6±0.7
рН 4.5, 1 сутки	7.4±0.9*
Атропин 0.1 мг/ кг	2.0±0.8
Атропин 0.1мг/кг + рН 4.5 1 сутки	1.9±1.0

* – достоверно отличается от контроля при $P < 0.05$

Таким образом, адаптация ОЭ карпа к повышенной кислотности происходит за счет формирования слизи с новыми кислотно-основными свойствами, скорее всего с повышенной буферной емкостью. В этом процессе первостепенную роль играют малые секреторные клетки и бокаловидные клетки.

Известно, что у млекопитающих деятельность БК регулируется парасимпатической системой [35]. На стрессорные воздействия БК не только усиливают свою секреторную активность, но изменяют химический состав слизи [36]. Таким образом, как у млекопитающих, так и у рыб бокаловидные клетки контролируются некоторыми регуляторными факторами секреторной системы и играют важную роль в назальном физиологическом механизме.

2. ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСДУКЦИИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО СИГНАЛА У РЫБ.

2.1. Ионный состав слизи обонятельного эпителия амфибий и млекопитающих (обзор литературы).

Преобразование химического стимула в электрический сигнал начинается в апикальной части обонятельного рецепторного нейрона (ОРН), на мембране жгутиков или микровилл, которые окружены слизью. Слизь, покрывающая поверхность обонятельного эпителия, несмотря на непрерывное движение жгутиков опорных клеток, является не гомогенным гелем, а высоко структурированной субстанцией, состоящей из отдельных компартментов. Слизь обонятельного эпителия не только выполняет защитную функцию, но и активно участвует в перирецептивных процессах. Поэтому А.А. Бронштейн (1977) вполне обоснованно ввел термин "обонятельная слизь" [29]. На световом уровне в слизи выделяли два слоя [37]. Использование более тонкого электронномикроскопического метода позволило выделить три слоя [38]. Первый слой – нижний, электронно–прозрачный и, возможно, более жидкий, покрывающий булавки, проксимальную часть жгутиков и микровиллы. Второй – содержит осмиофильные гранулы и включает дистальную часть обонятельных жгутиков. И, на-

конец, третий – внешний, образует тонкую (300–800 Å), но плотную поверхностную пленку, состоящую из фиброзного вещества. У водных животных вязкость слоев противоположная. Жидкими и подвижными будут внешние слои слизи, внутренние слои могут уплотняться из-за резорбции воды опорными клетками [39].

Толщина слоя слизи (фиксированные и обезвоженные препараты для электронной микроскопии) у водных животных значительно толще (протей – 50 мкм), чем у воздуходышащих животных – 4–6 мкм [38, 40]. Проведенные ультраструктурные исследования слизи на специально подготовленных препаратах для электронной микроскопии показали, что основную массу слизи составляет мелкозернистая и хлопьевидная субстанция, в которую включены гранулы двух типов. Шаровидные гранулы с диаметром ~1 мкм заполнены гомогенным матриксом умеренной электронной плотности и по своей форме и структуре напоминают секреторные гранулы в клетках боуменовых желез. Вторые – светлые, несколько меньших размеров (диаметр 0.3–0.8 мкм) имеют неправильную форму и включают большое число сферических кристаллов высокой электронной плотности с диаметром 400–8000 Å [41].

Для адекватных процессов электрогенеза слизь, окружающая апикальную часть ОРН, должна иметь постоянный и определенный ионный состав. Ионный состав слизи в ОЭ определен только у амфибий и млекопитающих. Ионное соотношение и содержание натрия и калия в неионизированном состоянии у исследованных животных было однотипным, но отличалось от плазмы крови и межнейронального пространства в мозге. Самое существенное отличие – это повышенная концентрация калия как свободных ионов K^+ , так и связанных. Такая ситуация с калием отмечена в рецепторном отделе других сенсорных систем. Это, в первую очередь, связано с тем, чтобы облегчить возбуждение рецепторной клетки и снизить соотношение шум/сигнал [42].

Источник поступления ионов в слизь и поддержание их гомеостаза в слизи еще окончательно не выяснено. На основе ультраструктурного распределения натрия и калия в обонятельной выстилке лягушки, предполагается, что эти элементы поступают в рецепторный отдел ОЭ в составе секрета Боуменовых желез и секретируются опорными клетками, особенно калий [29]. Дальнейшие электрофизиологические исследования показали, что минеральные вещества поступают на поверхность ОЭ пассивно, с секретом слизи, а их гомеостаз поддерживается активным электрогенным трансэпителиальным (ТЭ) транспортом [43]. Морфологическая основа и молекулярный механизм, обеспечивающие ионный гомеостаз в слизи обонятельного эпителия, скорее всего, должны быть схожими с транспортными процессами в других эпителиях. Морфологический и молекулярный принципы организации ионных транспортных механизмов весьма подобны в различных исследованных эпителиях, таких как жабры рыб, кожа амфибий и дыхательный эпителий млекопитающих. Наблюдаются лишь только особенности, характерные для вида или обусловленные адаптацией к окружающей среде [44].

Для трансэпителиального транспорта электролитов требуется, по крайней мере, два типа клеток: специализированные эпителиальные клетки (ЭК) и клетки особого морфологического типа, так называемые хлоридные клетки (ХК), обогащенные митохондриями (MR-клетки). Каждый тип клеток обладает специфическими молекулярными транспортерами и каналами. Основной ТЭ транспорт натрия осуществляют эпителиальными клетками (ЭК), которые ведут себя как функциональный синцитий. Сопутствующее движение ионов хлора через эпителий в этих клетках пассивное и подчиняется электрохимическому градиенту. За транспорт хлорида ответственны MR-клетки. В эпителии на долю ХК приходится незначительная часть [45]. На апикальной поверхности ЭК локализуется амилорид чувствительный эпителиальный натриевый канал (ENaC), а на базолатеральной мембране NaK-

АТФаза. В ХК на апикальной мембране экспрессируется цистифиброзный трансмембранный регулятор (CFTR), который является Cl-каналом, а на базолатеральной мембране Na-K-2Cl котранспортер [46].

В эпителии кожи амфибий MR-клетки составляют неоднородную популяцию. С помощью фармакологического анализа было выделено несколько типов ХК. ЭК кожи лягушки (*Rana pipiens*) содержат 11мМ натрия. Оуабаин чувствительные места находятся на базолатеральной стороне, а амилорид чувствительные – на апикальной поверхности клетки. Нанесение оуабаина (2 мкМ) увеличивает содержание внутриклеточного натрия в 5 раз, а аппликация амилорида уменьшает его в 2 раза. При одновременном приложении этих веществ, отменяется эффект оуабаина. По отношению к этим веществам выделяют три типа ХК. Оуабаин и амилорид чувствительные ХК, только оуабаин чувствительные и не чувствительные к этим веществам. В первой группе, после применения оуабаина, наблюдалось увеличение содержания натрия, которое было даже большее, чем в ЭК. Число оуабаин-амилорид чувствительных ХК мало. Маловероятно, что этот подтип ХК способствует значительному ТЭ транспорту натрия [47].

Регулирование концентрации электролитов в жидкости, окружающей рецепторный отдел, есть функция, которую обонятельный эпителий разделяет с транспортирующими эпителиальными клетками других органов и тканей амфибий и млекопитающих.

Функциональные исследования показали, что в обонятельном эпителии амфибий и млекопитающих присутствует амилорид ингибируемое поглощение натрия и цАМФ-зависимая и фуросемид ингибируемая секреция Cl⁻ [43, 48]. В обонятельном эпителии птиц и млекопитающих наблюдается высокий уровень NaK-АТФаза, которая поддерживает ионный баланс обонятельной слизи через трансэпителиальное поглощение Na⁺ [49]. NaK-АТФазой, локализуемая на базолатеральной мембране, совместно с амилоридчувствительным эпители-

альным натриевым каналом составляет последовательный путь для активного потока натрия в слизь [50]. Кроме того, в ОЭ саламандры описаны опорные клетки, которые по своей морфологии могут быть отнесены к ионтранспортирующим. Эти клетки содержат много митохондрий, базальная мембрана имеет складки, которые окутывают кровеносные сосуды [51].

Внутриклеточная регистрация электрической активности в опорных клетках амфибий показала, что у них изменяются биофизические свойства плазматической мембраны через 1 секунду после возбуждения рецепторных клеток запахом. Опорные клетки обладают значительной K^+ проводимостью и, вероятно, регулируют концентрацию внеклеточных ионов калия [52]. Предполагается, что этот контроль мог бы быть важен в регулировании максимальной чувствительности обонятельных нейронов для обнаружения одоранта [82, 107]. По пассивным электрическим свойствам мембраны этих клеток походят на глиальные клетки мозга и других сенсорных органов. Одной из характерных черт глиальных клеток – селективность мембраны для K^+ и низкая проницаемость для Na^+ и Cl^- [53]. В сетчатке клетки Мюллера глиальные, астроцит-подобные клетки, кроме того, экспрессируют потенциал воротные ионные каналы, рецепторы нейромедиатора и различные системы поглощения переносчиков. Эти свойства позволяют клеткам Мюллера управлять активностью нейронов сетчатки, регулируя внеклеточную концентрацию нейроактивных веществ и K^+ . Потенциал управляемые Na^+ каналы в этих клетках активируются функционирующими смежными нейронами и, как полагают, этим путем глиальные клетки Мюллера могли бы получать информацию об активности соседних нейронов [54]. Подобные свойства характерны, наверное, и для ненейрональных клеток всех сенсорных органов. Недавно, в одном из хемосенсорных органов мыши, вомеро-назальном органе, обнаружены опорные клетки с уникальными электрофизиологическими свойствами. Они имеют потенциал воротные K^+ и Na^+ каналы. Кроме того, их мембрана имеет необыч-

ное соотношение ионных проницаемостей $PK : PNa : PCl = 1 : 0.23 : 1.4$, которое показывает, что она проницаема не только для K^+ , но также Na^+ и Cl^- . Эти отношения проницаемости весьма специфические для опорных клеток ВНО [55].

Несмотря на большие достижения в молекулярно-генетических исследованиях обонятельного эпителия, идентификация морфологического типа клеток, осуществляющих ТЭ транспорт ионов в нем, до сих пор еще не проведена. Это, отчасти, объясняется тем, что отсутствуют надежные молекулярные маркеры клеточных типов. Однако убедительно показано, что в обонятельном эпителии амфибий и млекопитающих имеются все основные молекулярные составляющие для ТЭ транспорта ионов, который направлен от внешней стороны внутрь организма. Ионный состав слизи обонятельного эпителия амфибий и млекопитающих отличается от содержания ионов в плазме крови этих животных в основном по ионизированному калию, особенно в связанной форме (табл. 2). Разнообразными методами установлено, что популяция опорных клеток функционально не однородная. Во всяком случае, можно выделить морфологический и функциональный тип клеток, осуществляющий защиту эпителия от ксенобиотиков и излишка одорантов, а также опорные клетки, которые активно участвуют в перирецепторных процессах. Эти клетки способствуют регуляции химического состава межклеточной жидкости. Во-первых, они локально стабилизируют ионный состав среды, окружающей апикальный отдел ОРН, что, в свою очередь, может затронуть возбудимость сенсорных нейронов. Во-вторых, могут депонировать биологически-активные вещества, которые модулируют активность ОРН.

В отношении роли опорных клеток в перирецепторных процессах у рыб практически ничего не известно. Ионный состав обонятельной слизи пресноводных рыб, судя по нескольким работам, регулируется активными процессами, осуществляемыми, по всей видимости, хлоридными клетками. У осетра из морской воды, концентрация натрия и калия в

обонятельной слизи в десятки раз выше, чем из пресной воды [64]. В обонятельном эпителии форели и сома описана морфология клеток, структура которых схожа с хлоридными клетками из жабр рыб [29, 65].

Таблица 2.

Концентрация натрия, калия, кальция и ионов хлора в назальной слизи амфибий и млекопитающих.

Вид	Метод	Калий	Кальций	Натрий	Хлорид	Автор
<i>Rana temporaria</i>	1; Г	70±7	НО	105±10	НО	117
<i>Rana pipiens</i>	1; Г	10.6±2	5.3±0.8	53±4.1	НО	57
Жаба	2; Г	11±5	0.32±0.2	85±16	93±9	58
<i>R. ridibunda</i>	2; ОБ	14±1.3	1.3±0.1	101±12	97±11	59
<i>R. temporaria</i>	2; ОБ	15±3	НО	НО	НО	59
<i>Rana</i>	2; СЖ	3.7±0.5	НО	НО	НО	60
<i>R. ridibunda</i>	2; СЖ	6.9±1.1	2.3±0.2	178±3	67±4.3	59
<i>R. temporaria</i>	2; СЖ	7.9±0.7	1.5±0.2	142±10	87±8	59
Морская свинка	1; Г	77±7	НО	76±6	НО	56
<i>Rattus norvegicus</i>	2; Г	88±8	НО	НО	НО	59
<i>Rattus norvegicus</i>	2; ОБ	67±8	1.9±0.3	122±7	117±5	59
<i>Mus musculus</i>	2; Г	57±4	0.6±0.1	55±2	119±7	59
<i>Homo sapiens</i>	2; Н	30	НО	110	125	51
<i>Homo sapiens</i>	2; ВД	15	НО	80–85	75–80	61
<i>Mus musculus</i>	3; Н	16.6±4	НО	107±4	120±6	62
<i>Rattus norvegicus</i>	4; ОБ	69±10	НО	55±12	55±11	63

1 – метод фотометрии в пламени; 2 – ионселективные электроды; 3 – in vivo микродиализ; 4 – рентгеноструктурный микроанализ. Г – препарат головы; ОБ – препарат обонятельной выстилки, НО – не определялись.

В жаберном эпителии рыб находятся два основных типа клеток – покровные эпителиальные (ПЭ) или «респираторные» клетки и хлоридные или «митохондриями обогащенные» клетки. Хлоридные клетки (ХК) выделяются среди других клеток по своей характерной морфологии – большим количеством митохондрий и обширной ретикулярной сетью. Ответы двух типов клеток на манипуляцию внешней концентрации Cl^- были довольно похожи. Это говорит о том, что ХК, вероятно, являются структурой поглощения хлорида.

Следующее доказательство этого – следствие экспозиции форели к ингибитору карбоангидразы, ацетазоламиду (КА). Иммуоцитохимическим методом показано, что КА присутствует в ПЭ и ХК, но местоположение КА в двух типах клеток различно, что может отражать функциональные различия. В хлоридных клетках КА больше всего в апикальной области цитоплазмы, где расположена везикулотубулярная система [66]. Карбоангидраза, как думают, вовлечена в ионное регулирование, обеспечивая ионами бикарбоната от гидратации CO_2 для 1:1 обмена с внешними ионами хлора [67]. Карбоангидраза ПЭ клеток, однако, локализуется, прежде всего, на внешней поверхности клеток [66] и, как думают, выполняет, прежде всего дыхательную функцию: гидратирует выделяемый CO_2 , давая возможность дальнейшему выделению CO_2 . Карбоангидраза ПЭ клеток, скорее всего, не вовлечена в ионный транспорт, поскольку ионные концентрации в этих клетках не изменяются при воздействии 0.5 мМ ацетазоламида. В то время как такое же воздействие приводит к существенному уменьшению концентрации хлора и калия в ХК [68]. Поглощение же натрия у пресноводных рыб более тесно связано с ПЭ клетками, чем с ХК [69]. Внутриклеточные концентрации одновалентных ионов в ПЭ и ХК значительно отличаются от других клеток организма. Внутриклеточные концентрации натрия, хлорида, и калия при нормальных условиях в ПЭ клетках жабр форели (*Salmo trutta*) составили 66 мМ, 51 мМ и 88 мМ соответственно. Концентрации этих элементов при идентичных условиях в ХК отличалась не значительно, за исключением ионов хлора, концентрация которых была более низкой – 40 мМ [68].

2.2. Ионный состав слизи обонятельного эпителия пресноводных рыб.

Количество ионов натрия и хлора в обонятельной слизи у наземных позвоночных животных сопоставимо с таковым в плазме крови, а ионов калия – в несколько раз больше. Считается, что ионы в слизь поступают пассивно с секретирующейся слизью, а гомеостаз поддерживается активной абсорбцией с

помощью натрий-калиевого насоса [58]. Полученные нами результаты об изменении концентрации натрия и калия в обонятельной выстилке карпа при адаптации рыб к повышенной кислотности воды не укладывались в эту схему (рис. 6).

Исследование трансэпителиального потенциала (ТЭП) обонятельной выстилки карпа и использование селективных ингибиторов транспорта ионов показало, что снижение ТЭП катионов делает поверхность эпителия более отрицательной, а анионов – более положительной. Таким образом, в обонятельном эпителии пресноводных рыб активный транспорт ионов направлен из организма в слизь.

В слизи ОЭ у исследованных нами рыб только содержание ионов хлора сопоставимо с его концентрацией в обонятельной слизи млекопитающих и наземных амфибий (табл. 2, 3) [31, 56, 59, 62]. Концентрация неионизированного калия в слизи ОЭ позвоночных в десятки раз превышает содержание этого элемента в межклеточном пространстве нейронов мозга и даже в ионной форме – почти на порядок. Это характерно для жидкой среды, окружающей рецепторные клетки всех модальностей, и обусловлено особенностью трансдукции сигнала (уменьшить соотношение шум/сигнал) [42].

Таблица 3.

Концентрация натрия, калия и ионов хлора в слизи обонятельной выстилки рыб.

Объект исследования	n	Натрий, мМ	Калий, мМ	Cl ⁻ , мМ
Карась	10	26±2.5	47±2	101±6
Карп	10	35±4.0	47±3	81±5.5
Щука	5	43±3.0	46±4	121±6
Вода из аквариума	-	2	0.1	1

Таким образом, у пресноводных рыб между слизью обонятельного эпителия и водой возникает концентрационный градиент, определяющий непрерывную утечку ионов из сли-

зи. Очевидно, что потеря ионов может восполняться как за счет секреции слизи, так и за счет пассивной диффузии. Вопрос об участии системы активного транспорта ионов в поддержании ионного гомеостаза слизи у пресноводных рыб представляется более проблематичным, что послужило поводом для поиска в ОЭ структур, осуществляющих этот транспорт. Наиболее вероятно, что в создании определенной ионной среды на поверхности обонятельного эпителия могли бы принимать участие хлоридные клетки. Эти клетки известны как специализированные структурные элементы жаберного эпителия рыб, которые осуществляют активный транспорт ионов между внутренней и внешней средой для поддержания ионного и осмотического гомеостаза. У морских рыб они экскретируют Na^+ и Cl^- наружу, а у пресноводных – абсорбируют их из внешней среды. В раннем эмбриональном развитии хлоридные клетки найдены в эпителии, покрывающем тело личинки и желточный мешок [70], а у взрослой форели в ОЭ [65]. Однако до настоящего времени не появилось никаких новых сведений о хлоридных клетках обонятельного эпителия. По-прежнему не известно, насколько широко распространено это явление среди пресноводных рыб. Для выяснения этого вопроса и проведено электронно-микроскопическое исследование строения обонятельной выстилки у представителей 7 видов из 5 отрядов костных рыб: сибирском осетре, стерляди, стальноголового лосося, карпе, карасе, окуне и мозамбикской тилапии [71]. В обонятельном эпителии у всех семи исследованных видов рыб обнаружены клетки, подобные хлоридным. Они встречаются по одиночке как в области индифферентного, так и сенсорного эпителия (рис. 7, а–е). Однако пограничные участки этих областей, особенно у окуня и лосося, отличаются групповым распределением клеток и соответственно более высокой их плотностью. Наружная поверхность таких клеток имеет весьма характерный вид благодаря своей округлой или треугольной форме, а также коротким микровиллеподобным выростам апикальной мембраны.

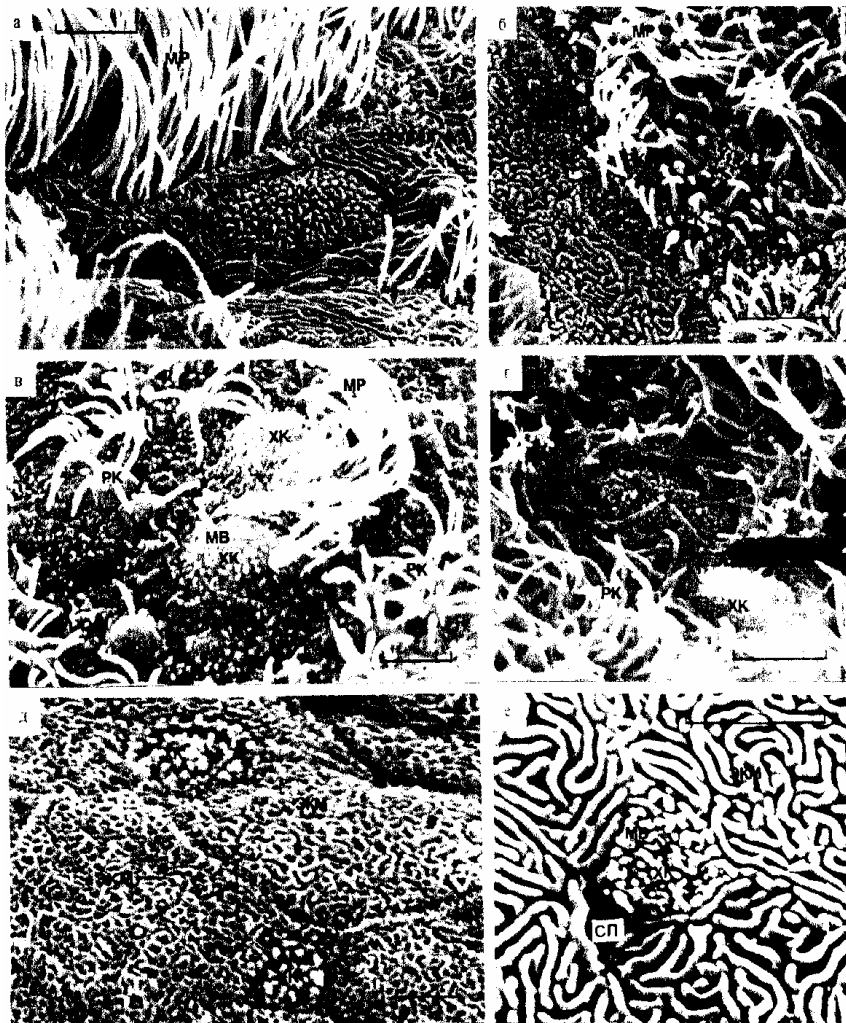


Рис 7. Ультраструктура поверхности хлоридных клеток обонятельного эпителия пресноводных рыб. Масштаб: 50 мкм.
а – окунь; б, е – лосось; в – тиляпия; г – карась; д – осетр. ХК – хлоридная клетка, РК – рецепторная клетка, ЭКМ – эпителиальная клетка с микрогребнями, АЯ – апикальная ямка, Мв – микровилли, СП – секреторная пора, МР – мерцательные реснички.

Иногда наружная клеточная мембрана образует небольшие углубления – апикальные ямки (рис. 8, г, д). В основном же она плоская или даже слегка выпуклая (рис. 7, а–в). У большинства видов рыб наблюдали только зрелые – "светлые" клетки с пониженной осмиофильностью цитоплазмы (рис. 2, а,б). В эпителии тилапии кроме них присутствуют и "темные", т.е. молодые, созревающие клетки. Для исследуемого типа клеток характерно, что слой цитоплазмы, примыкающий к апикальной мембране, имеет более высокую осмиофильность по сравнению с остальной частью матрикса (рис. 8, в). Цитоплазма этой зоны богата микрофиламентами, содержит микровезикулы и тубулы, т.е. отдельные сегменты тубулярного ретикулума. Для нее характерно наличие многочисленных лизосом и окаймленных пузырьков. Наружная поверхность апикальной мембраны покрыта гликокаликсом. Светлое сферическое ядро с равномерно распределенным хроматином расположено в базальной части клетки. Перинуклеарная зона содержит митохондрии, цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума и свободные рибосомы, одиночные или собранные в розетки. В эту зону также проникают ответвления тубулярного ретикулума. Остальная часть цитоплазмы, которая занимает весь основной объем клетки, буквально насыщена митохондриями и пронизана сетью тубулярного ретикулума (рис. 8, г–е). Крупные митохондрии с хорошо развитыми пластинчатыми кристами ориентированы преимущественно в базо-апикальном направлении. Мембранная сеть тубулярного ретикулума образована разветвлением тубул, длина которых несколько варьирует у различных видов. Для лососевых, осетровых и карповых характерны короткие тубулы и соответственно – более разветвленный тубулярный ретикулум. Их тубулярная сеть выглядит более плотной, мелкоячеистой. У окуневых – более длинные тубулы, сеть менее разветвлена и имеет широкие нерегулярные ячейки. Диаметр тубул у разных видов колеблется в пределах от 0.03 до 0.06 мкм.

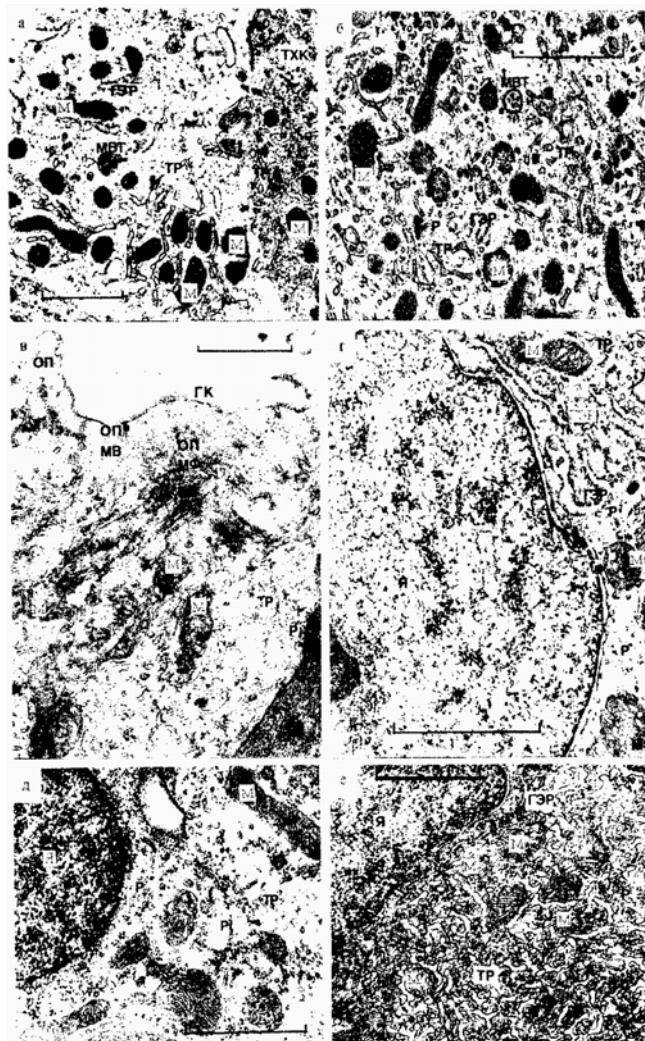


Рис. 8. Ультраструктура хлоридных клеток обонятельного эпителия пресноводных рыб.

а, в – тилапия; б – окунь; г – карась; д – лосось; е – севрюга. М – митохондрия, ТР – тубулярный ретикулум, Гк – гликокаликс, Мф – микрофламенты, МВ – микровезикулы, МвТ – микровезикулярное тельце, ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум, ОП – окаймленный пузырек, Р – рибосомы, Я – ядро, ТХК – темная хлоридная клетка. Масштаб: 1 мкм.

Внутритубулярное пространство связано с межклеточным, а тубулярная мембрана является продолжением плазматической базолатеральной мембраны, за счет чего происходит многократное увеличение площади ее поверхности. Тубулы ретикулума плотно окружают многочисленные митохондрии – тубулярные и наружные митохондриальные мембраны разделяются тончайшим слоем цитоплазмы. Межтубулярное пространство содержит одиночные и собранные в розетки рибосомы (рис. 8, а–е).

Специфика ультратонкой организации обнаруженных нами клеток заключается в обилии митохондрий, наличии интенсивно развитой тубулярной системы и своеобразной форме апикальной поверхности. Все это позволяет идентифицировать исследуемые клетки как хлоридные.

Для проверки нашего предположения о том, что хлоридные клетки в ОЭ пресноводных рыб функционируют по экскреторному типу, нами проведены опыты с ингибитором минерального обмена морских рыб, тиоцианатом натрия. Чувствительность различных ионных потоков к действию тиоцианата оказалась примерно такой же, как и в жаберном эпителии морских рыб – в наибольшей мере подавляется выведение ионов хлора (табл. 4).

Таблица 4.

Содержание натрия, калия и ионов хлора в плазме и влияние тиоцианата (5 мМ, 2 суток) на их концентрацию в обонятельной слизи карпа.

Условия эксперимента	Концентрация			Соотношение Na : K : Cl
	натрий	калий	ионы хлора	
Плазма	123±7.0	5.1±0.3	95±0.8	1 : 0.04 : 0.77
Слизь, контроль	26±2.5	47±2	101±6	1 : 1.8 : 3.9
Слизь, опыт	14±1.5	16±1	19±1	1 : 1.1 : 1.4

Это позволяет считать, что хлоридные клетки в обонятельном эпителии пресноводных рыб функционируют по экскреторному типу. Однако по сравнению с жабрами морских рыб, интенсивность ионного обмена в обонятельном эпителии

должна быть существенно ниже, т.к. здесь активный транспорт ионов направлен против более низких концентрационных градиентов. Вероятно, с этими двумя обстоятельствами связаны и некоторые особенности ультраструктуры хлоридных клеток из обонятельного эпителия пресноводных рыб. При обилии митохондрий и высоком уровне разветвленности тубулярного ретикулула, они практически лишены апикальных ямок, которые весьма характерны для хлоридных клеток жаберного эпителия морских рыб. Их тубуло-везикулярная зона, как и в жаберных хлоридных клетках морских рыб, тоже содержит окаймленные пузырьки, однако количество их сравнительно невелико. Очевидно, что у пресноводных рыб хлоридные клетки обонятельного органа не участвуют в поддержании общего ионного гомеостаза, т.к., в противоположность клеткам жаберного эпителия, функционируют по экскреторному типу.

Таким образом, в рецепторном отделе обонятельной слизи пресноводных рыб только концентрация ионов хлора совпадает с содержанием его в межклеточном пространстве нервной ткани. К настоящему времени накоплено много экспериментальных данных, показывающих, что ведущими ионами в электрогенезе рецепторного потенциала у наземных животных (у которых концентрация Na^+ в слизи ОЭ, как в плазме) являются кальций и хлор. Ионы кальция выступают как третичный мессенджер, а ионы хлора несут несколько функций управления состоянием возбудимости ОРН в зависимости от степени поляризации его мембраны и внутриклеточной концентрации хлора. У пресноводных рыб эти процессы совершенно не изучены.

3. ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСДУКЦИИ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБОНЯТЕЛЬНОГО СИГНАЛА У РЫБ. 3.1. Принципиальная схема обонятельной трансдукции с участием цАМФ и ИЗФ.

На основании способности стимулировать активность АЦ запахи были разделены на две группы: стимулирующие АЦ – цАМФ-зависимые и не изменяющие активность АЦ – цАМФ-независимые. В первую подгруппу вошли одоранты,

воспринимаемые человеком как фруктовый, цветочный, мятный и травяной запахи. Во вторую подгруппу – одоранты с неприятным запахом (гнилостный и резкие запахи сильных растворителей). В последствии было установлено, что одоранты из второй группы (изовалериановая кислота, триэтиламин и пиразин) вызывают образование инозитол-1,4,5-трифосфата (ИЗФ). Оба этих вторичных мессенджера являются необходимыми для генерации рецепторного потенциала [72].

В случае ИЗФ-зависимого пути, связывание одоранта с рецепторным белком, сопряженными с G_o и G_q белками, приводит к активации фосфолипазы C. ФЛС расщепляет мембранный фосфолипид (фосфатидилинозитол) на диацилглицерол (ДАГ) и растворимый в воде ИЗФ. ИЗФ непосредственно открывает селективный Ca^{2+} канал и неселективный катионный канал, через который преимущественно входят в рецепторный нейрон Na^+ и Ca^{2+} . Также предполагается, что увеличение ионов кальция в ОРН могло бы инициировать K^+ канал, активируемый Ca^{2+} . Активация первых двух каналов приводит к деполяризации ОРН, а последнего канала – гиперполяризации ОРН (Рис. 9) [73].

Более детально изучен цАМФ-зависимый ответ на одорант в рецепторном нейроне [74]. Увеличение концентрации цАМФ, выявляемое в обонятельных нейронах некоторыми одорантами, непосредственно вызывает открытие неселективных катионных каналов. Начальный электрический ответ ОРН – смесь двух токов, переносимых ионами натрия и кальция, входящими через цАМФ управляемые каналы (Рис. 9). Эти каналы, главным образом, локализуются в мембранах обонятельных жгутиков, хотя также найдены с высокой плотностью на мембране булавки дендрита и в меньшей степени на соме ОРН млекопитающих [75].

Отведение рецепторных токов, вызванных цАМФ-зависимым одорантом (цитралва) и/или ИЗФ-зависимым (лирал) от одного ОРН, с использованием метода кросс-адаптации позволило установить, что индивидуальный ОРН имеет более

одного типа рецепторов, и что обонятельная трансдукция разнокачественных запахов осуществляется различными вторичными мессенджерами, цАМФ и ИЗФ одновременно [76].

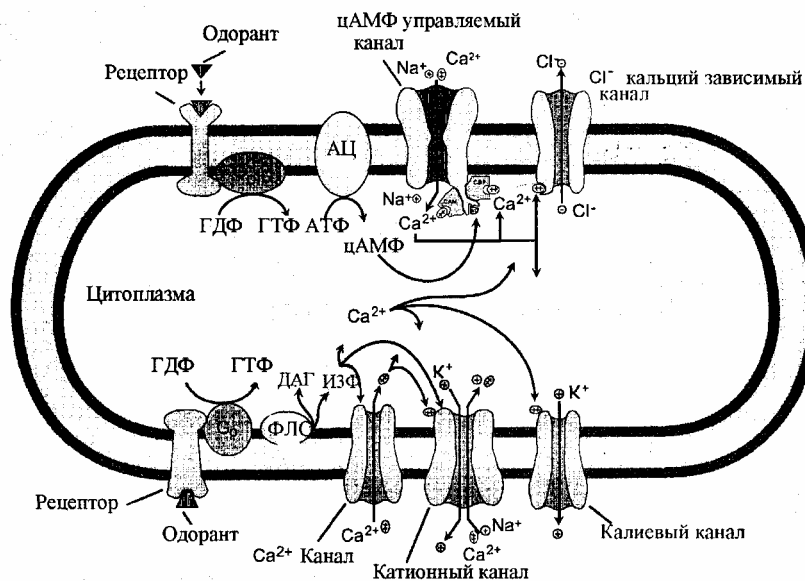


Рис. 9. Принципиальная схема обонятельной трансдукции с участием цАМФ и ИЗФ [74].

На верхней части показан цАМФ-зависимый путь: связывание некоторых одорантов с обонятельными рецепторами активирует G-белок сопряженное образование внутриклеточного цАМФ. Последующее повышение концентрации цАМФ непосредственно вызывает открытие цАМФ управляемых каналов, которые открывают доступ кальция в клетку. Увеличение внутриклеточного $[Ca^{2+}]_i$ вызывает открытие Ca^{2+} -активируемых Cl^- каналов. На нижней части показан ИЗФ-зависимый путь: некоторые одоранты стимулируют G-белок сопряженное образование ИЗФ. Увеличение внутриклеточного ИЗФ вызывает открытие Ca^{2+} проводимости и неселективной катионной проводимости. Приток Ca^{2+} вызывает увеличение внутриклеточных ионов кальция, которые также открывают неселективную катионную проводимость и могут также активировать Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы, по [72, 74, 75].

Значение ИЗФ чувствительных каналов в обонятельной трансдукции жгутиковых ОРН значительно меньше, чем цАМФ чувствительных. Во-первых, их значительно меньше в одном и том же ОРН: 85 “ИЗФ” каналов/мкм² и 1000 “цАМФ” каналов/мкм² [76]. Во-вторых, мыши-мутанты с делецией генов *Gαolf* и цАМФ управляемого канала, не отвечают на очень широкий круг одорантов [77].

Важным добавлением к схеме электрогенеза рецепторного потенциала было открытие Ca^{2+} активируемых Cl^- каналов. Эти каналы экспрессируются в мембране жгутиков и активируются, когда концентрация Ca^{2+} в жгутиках повышается до микромолярных уровней [78]. Ca^{2+} активируемые Cl^- каналы могут проводить существенный ток через жгутиковую мембрану [79]. В зависимости от мембранного потенциала и концентрации хлора в слизи и полости жгутика величина и направление этого тока различны. Если Ca^{2+} -вызванный хлорный ток направлен внутрь (ионы хлора выходят из полости жгутиков в слизь), объединенная активация циклонуклеотид управляемых каналов и Ca^{2+} активируемых Cl^- каналов приводит к явному нелинейному усилению рецепторного тока. Кроме того, относительно низкая кальциевая чувствительность Cl^- каналов ($K_{1/2} = 5$ мкМ) может устанавливать порог возбуждения и, таким образом, улучшать отношение шум/сигнал рецепторного нейрона [80]. Определение у крыс *in situ* концентрации ионов хлора в ОРН и слизи показало, что Cl^- может участвовать в процессах возбуждения ОРН. Концентрации Cl^- в булавке дендрита составляет 69 мМ, в обонятельной слизи – 55 мМ. В этом случае вычисленный равновесный потенциал для Cl^- составил $+6 \pm 12$ мВ. Это указывает на то, что Ca^{2+} активируемые Cl^- каналы в обонятельных жгутиках способны проводить входящий ток, который обуславливается движением Cl^- в слизь [80]. В настоящее время считают, что деполяризационный хлорный ток вносит существенный вклад в развитие рецепторного потенциала обонятельных нейронов тетрапод [81]. Роль хлорной проводимости в трансдукции обонятельного сигнала в ОРН

в трансдукции обонятельного сигнала в ОРН рыб только начинает исследоваться. Показана вероятность существования этих каналов в ОРН форели (*Oncorhynchus mykiss*) [82].

О первичных механизмах трансдукции обонятельного сигнала у рыб известно значительно меньше, чем в обонятельном органе тетрапод. В обонятельном эпителии рыб присутствуют молекулярные компоненты обоих путей. Рецепторы рыб, родственные вомероназальным рецепторам тетрапод, и сопряженные с ними G белки из семейства Gq экспрессируются только в микровиллярных рецепторных клетках, а обонятельные рецепторы класса I и Gαolf – в жгутиковых ОРН. И только в рецепторных крипт-клетках эти функциональные молекулы различных трансдукционных путей коэкспрессируются вместе [83]. У канального сомика клонирована ДНК, кодирующая ЦН-чувствительный канал. Этот канал одинаково хорошо активируется цАМФ и цГМФ [84], что было подтверждено электрофизиологическим методом. ЭК₅₀ для цАМФ и цГМФ статистически не различались и составили 1.3±0.6 мкМ и 0.9±0.3 мкМ соответственно [85]. Однако интенсивность гистохимической реакции на АЦ и ГЦ в клетках обонятельного эпителия хариуса (*Thymallus arcticus baicalensis*) различна. Продукт реакции на АЦ и ГЦ в основном локализуется в апикальных отделах эпителия. Зернистый осадок располагается в плазматической мембране обонятельных жгутиков, в цитоплазме булавки как жгутиковых, так и микровиллярных рецепторных клеток [86].

Методом молекулярной генетики, биохимическим и цитохимическим методами установлено, что у рыб в обонятельном эпителии присутствуют ферменты обмена ИЗФ [87, 88]. В мембране обонятельных жгутиков канального сомика идентифицирован белок с молекулярным размером 107000 кД, специфически связывающий И-1,4,5-Ф, но не И-1,4-Ф или И-1,3,4-Ф. Предполагается, что он может быть связан с инозитол управляемым катионным каналом [89]. Методом *in situ* гибридизации найдено, что в маленькой субпопуляции ОРН

канального сомика экспрессируется фосфолипаза C, гомологичная фосфолипазе C крысы и быка [90].

3.2. Роль аминокислот в коммуникации рыб.

К настоящему времени для рыб установлено четыре основных класса запахов, обнаруживаемых их обонятельным органом и имеющих биологическое значение для вида: половые стероиды, простагландины, желчные кислоты и аминокислоты [91]. Это – нелетучие вещества, которые люди не ощущают. В своей работе мы использовали в качестве одорантов аминокислоты.

Свободные аминокислоты (АК) так же, как и минеральные вещества – обязательная составляющая природных вод. В естественных водоемах они присутствуют в концентрации 10 нМ – 1 мкМ и являются эффективными хемосенсорными стимулами для всех водных животных [92]. Для рыб сигнальным источником свободных АК могут быть различные организмы – водоросли, беспозвоночные и сами рыбы. Личинки рыб уже на ранних этапах онтогенеза, до начала питания, проявляют защитные реакции избегания АК [93]. В зрелом возрасте АК инициируют многие формы поведения: пищевое [94], половое [95] и возвращение на место нереста [96]. На многих видах рыб электрофизиологическими методами показано, что обонятельная система воспринимает все аминокислоты в той или иной степени. Пороговая чувствительность для различных аминокислот составляет 1–100 нМ [97]. В электрофизиологических экспериментах в качестве стандарта, обычно, берется L-серин [98].

3.3. Хлор-зависимые процессы в рецепторном отделе обонятельного эпителия.

Рецепторный потенциал оказался весьма чувствительным к селективному ингибитору хлорных каналов – 4-этилбифенилфосфату. Это вещество вызывало снижение ЭОГ начиная с концентрации 5 мкМ, а уменьшение амплитуды потенциала на 50% соответствует концентрации 10 мкМ. Был

также протестирован фуросемид, известный как ингибитор котранспорта $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. Фуросемид в концентрации 100 мкМ при перфузии обонятельной выстилки карпа оказывал влияние на восстановительные процессы в ОРН в большей степени, чем на возникновение рецепторного потенциала (табл. 5). В этой таблице приведена динамика изменения амплитуды ЭОГ на кондиционирующий и тестирующий стимулы при воздействии фуросемида. Перфузия выстилки в течение 5 минут вызывает одинаковое снижение амплитуды ответов на оба стимула. Однако дальнейшая перфузия приводит к резкому снижению величины ЭОГ на повторный стимул [99]. Чувствительность рецепторного потенциала к блокатору хлорных каналов и негативное влияние ингибитора транспорта хлора на восстановительные процессы в рецепторной клетке позволили сделать предположение, что ионы хлора могут активно поглощаться рецепторным нейроном.

Таблица 5.
Влияние фуросемида на амплитуду ЭОГ карпа, вызванную L-серинем (100 мкМ).

Условия эксперимента	Длительность воздействия, мин.	Амплитуда ЭОГ, мВ (n=4)		%**
		1 стимул	2 стимул через 15 с.	
Контроль	0	3.6±0.2	3.2±0.2	11
Фуросемид 20мкМ	5	2.8±0.2	2.5±0.2	11
	10	2.6±0.2	2.1±0.2*	19
	15	2.1±0.1	1.4±0.1*	33
	15	2.9±0.2	2.3±0.2*	21
Отмывка	15	2.9±0.2	2.3±0.2*	21
	40	3.6±0.2	3.6±0.2	11

* достоверно отличается от первого стимула при $P < 0.05$.

** процент уменьшения тестирующего стимула по отношению к кондиционирующему.

При исследовании АТФазной активности фракции плазматических мембран обонятельной выстилки карпа нами была выявлена Cl-активируемая MgАТФаза. Эта активность была чувствительна к фуросемиду ($K_i = 160$ мкМ) и бициклофосфату ($K_i = 30$ мкМ) [30, 99, 100, 101]. Ретроградная дегенерация рецепторных клеток в обонятельной выстилке форели приводила к исчезновению этой активности [102]. Исследование транспорта ^{36}Cl в везикулах плазматических мембран, полученных из обонятельной выстилки карпа, показало, что этот процесс АТФ-зависимый и ингибировался СИТС фуросемидом (рис. 10) [103]. Фуросемид ингибирует АТФ-зависимое поглощение ^{36}Cl , ЭОГ на повторный стимул и Cl-активируемую АТФазную активность в близких концентрациях. Для этих показателей константа ингибирования (I_{50}) составила 120 мкМ, 110 мкМ и 160 мкМ соответственно.

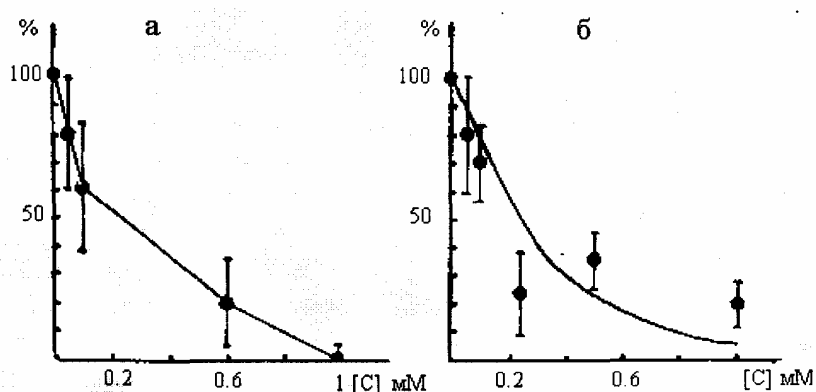


Рис. 10. Ингибирование СИТС (а) и фуросемидом (б) на поглощение ^{36}Cl .

Итак, из полученных результатов можно предположить, что в невозбужденном состоянии в обонятельный нейрон активно нагнетаются ионы хлора против электрохимического градиента, и их равновесный потенциал становится более

положительным по отношению к мембранному потенциалу ОРН. В ответ на действие одоранта через систему внутриклеточных посредников возрастает проницаемость апикальной мембраны ОРН для ионов хлора, которые по электрическому градиенту выходят из клетки. Вследствие этого возникает входящий ток, что приводит к деполяризации апикальной части дендрита и возбуждению ОРН.

Как показали исследования последних лет, обонятельный рецепторный потенциал тетрапод поддерживается в значительной мере за счет выхода из клетки ионов хлора (входящий ток) [81]. Высокая внутриклеточная концентрация Cl^- в рецепторном нейроне крысы поддерживается $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ котранспортером. Торможение его активности селективным ингибитором буметамидом (аналог фуросемида) приводит к исчезновению Cl^- тока [104]. Таким образом, полученные нами данные показывают, что у рыб и млекопитающих высокая концентрация ионов хлора в ОРН поддерживается однотипными молекулярными механизмами.

Однако у пресноводных рыб слизь обонятельного эпителия испытывает недостаток ионов натрия и калия, и Cl^- ток становится ведущим в генерации рецепторного потенциала.

5.4. Роль вторичных мессенджеров в восприятие аминокислотного обонятельного сигнала

Фосфолипаза C. ЭОГ, вызываемая L-серином в широком диапазоне концентраций (0.01–1мМ), оказалась чувствительна к ингибитору фосфолипазы C, аминогликозидному антибиотику неомицину, который в концентрации 0.1мМ, препятствует возникновению рецепторного потенциала на L-серин в исследуемых концентрациях. Очень высокую чувствительность рецепторный потенциал, вызванный L-серином, проявил к блокатору инозитол-зависимых кальциевых каналов – рутениевому красному. Его пороговая концентрация составляет около 0.01мкМ. При концентрации 1мкМ – рецепторный потенциал полностью блокируется. Эти данные показывают, что для возникновения рецепторного потенциала в

ответ на АК стимуляцию в первую очередь требуются активация фосфолипазы С и вхождение ионов кальция в рецепторную клетку через инозитол-зависимые каналы [105].

цАМФ. Динамика синтеза и распада цАМФ определяет амплитуду и длительность рецепторного потенциала. Если цАМФ участвует в процессе трансдукции, то фармакологические вещества, тормозящие распад цАМФ, должны увеличивать длительность рецепторного потенциала. При перфузии выстилки карпа 0,2 мМ раствором 3-изобутил-1-метилксантина (ИБМК) были получены неожиданные результаты. Форма ЭОГ, вызванная низкими концентрациями L-серина (до 0.1мМ), изменяется только по амплитуде – происходит ее снижение (рис.11 Б, а).

При более высоких концентрациях (от 0.1мМ до 1мМ) наблюдается как снижение амплитуды, так и увеличение длительности ответа. Причем, длительность увеличивается не по всему заднему фронту ЭОГ, а только в низкоамплитудной ниспадающей ее части (рис. 11 Б, б, в) [104].

Таким образом, при воздействии ИБМК ЭОГ, вызванная высокой концентрацией L-серина, приобретает двухкомпонентную форму. Начальная, основная часть ЭОГ состоит из быстрого высокоамплитудного, а вторая – из медленного низкоамплитудного компонентов. Подобный эффект вызывают и ионы марганца (1мМ), которые, как известно, направленно стимулируют каталитическую единицу аденилатциклазы. Амилорид и 1-цис-дилтиазем (блокаторы циклонуклеотид управляемых каналов) в концентрациях 0.1мМ не оказывают влияния на амплитуду ЭОГ, вызванную низкими концентрациями L-серина. Однако эти вещества снимают вызванную ИБМК пролонгацию ЭОГ на высокие концентрации одоранта. Таким образом, активация аденилатциклазы в рецепторной клетке осуществляется не рецептор-Golf-белок-зависимым способом, а как-то иначе. Известно, что аденилатциклаза может активироваться диацилглицеролом, метаболитом фосфоинозитольного обмена, независимо от рецептор-G-

белка. Это вещество активирует протеинкиназу С, которая, в свою очередь, стимулирует аденилатциклазу. Протеинкиназа С может также активироваться ионами кальция, вошедшими через инозитол-зависимые каналы [106].

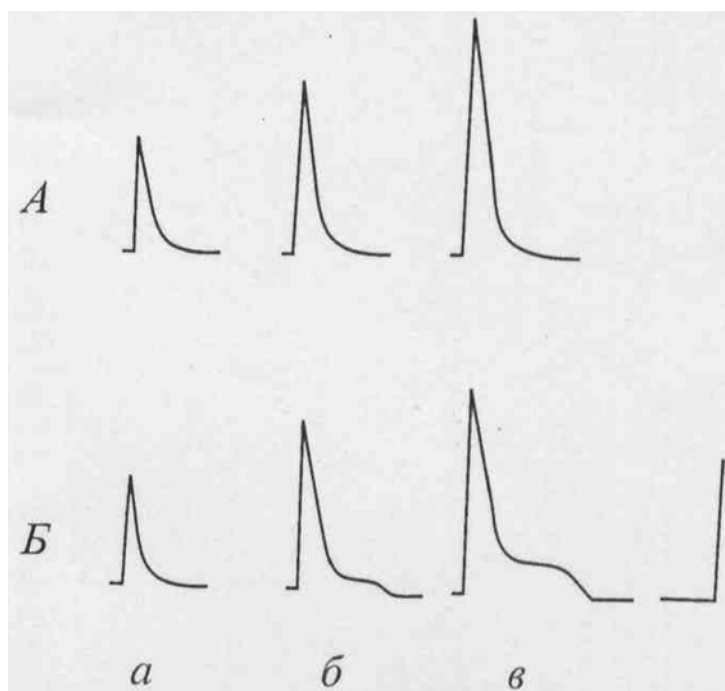


Рис. 11. Влияние 3-изобутил-1-метилксантина (ИМБК) на ЭОГ, вызванную различными концентрациями L-серина. А – норма. Б – перфузия ИМБК (0.2 мМ). а – L-серина, 0.01 мМ; б – L-серина, 0.1 мМ; в – L-серина, 1 мМ. «негативность» направлена вверх. Калибровка: по вертикали 1 мВ, по горизонтали 5 с.

С целью проверки возможности участия протеинкиназы С в генерации рецепторного потенциала мы воспользовались ингибитором этого модулятора – тамоксифеном. Это вещество в концентрации 0.1 мМ так же, как и блокаторы циклонук-

леотид-зависимых каналов, снимает пролонгацию ЭОГ, вызванную ИБМК.

В некоторых случаях (приблизительно у 10% исследованных рыб) в ответ на кратковременную стимуляцию L-серинном или цАМФ регистрируется ЭОГ двухфазной формы: быстрая негативная волна переходит в более медленный и низкоамплитудный позитивный потенциал (рис.12, а).

Рутениевый красный (1мкМ) и неомицин (100мкМ) ингибируют негативную часть ЭОГ, не затрагивая позитивную (рис.12, А, б, в). Эффект же амилорида (100мкМ) противоположен – он полностью подавляет позитивную волну ЭОГ (рис.12, Б, в). СИТС (100мкМ), блокатор Са-активируемых хлорных каналов, значительно снижает негативную и увеличивает позитивную части ЭОГ (рис. 12, В, б, в). Другой канальный блокатор – 4-аминопиридин, который ингибирует Са-зависимый калиевый ток, уменьшает амплитуду ЭОГ в целом (рис.12, В, б, в). Все эти вещества действуют обратимо (рис.12, г) [105].

Известно, что клеточные мембраны малопроницаемы для цАМФ и, кроме того, есть сведения об экстраклеточных рецепторах цАМФ. В связи с этим, чтобы установить причастность цАМФ к внутриклеточным процессам, мы провели серию опытов с продолжительной стимуляцией. Оказалось, что, если в условиях кратковременной стимуляции выстилки серин и цАМФ вызывают сходные ЭОГ, то при стимуляции в течение 15 секунд форма ЭОГ на эти вещества существенно различается. L-серин вызывает негативный потенциал, который на фоне продолжающейся стимуляции быстро снижается до некоторой величины, оставаясь по-прежнему негативным вплоть до прекращения подачи стимула (рис.13, А, а) [105]. Эта типичная форма ЭОГ на длительный стимул отражает адаптивные свойства ОРК и описана другими авторами [218]. Продолжительная стимуляция выстилки цАМФ также вызывает деполяризацию, которая, в отличие от ЭОГ на L-серин, быстро переходит в позитивность (рис.13, А, б).

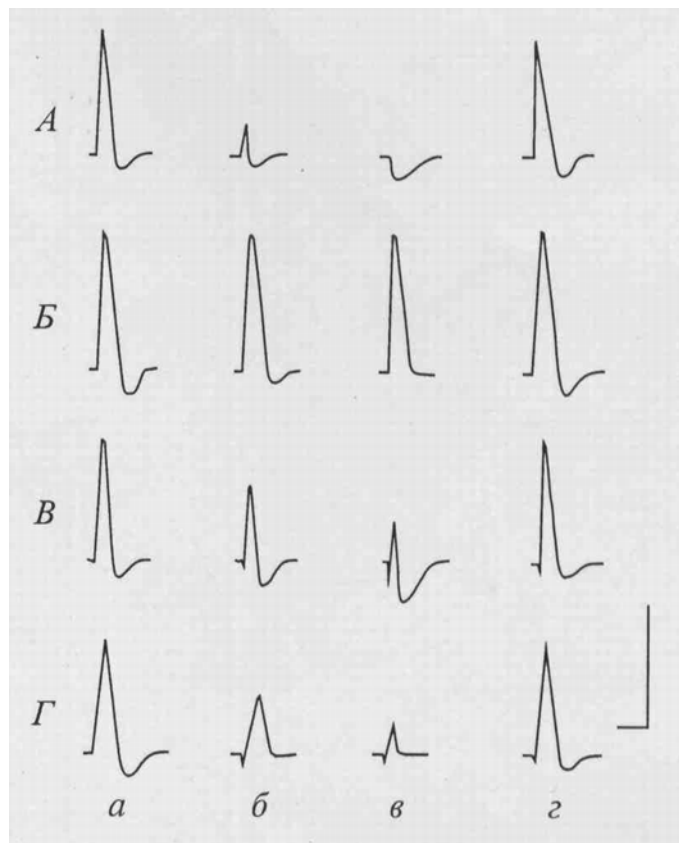


Рис. 12. Влияние различных блокаторов ионных каналов на ЭОГ, вызванную L-серином (1мМ), у карпа.

А – рутениевый красный (1 мкМ), Б – амилорид (0.1 мМ), В – СИТС (0.1 мМ), Г – 4-аминопиридин (0.1 мМ); а – норма; б – перфузия, 2 мин; в – перфузия, 10 мин; г – отмывка, 20 мин. «Негативность» направлена вверх. Калибровка: по вертикали 3 мВ, по горизонтали 5 с.

Возвращение к базовому уровню после прекращения подачи стимула происходит медленнее, чем в первом случае. Рутениевый красный (1мкМ) и неомицин (100мкМ) полностью снимают негативную волну, не затрагивая позитивный компонент ЭОГ, вызванной цАМФ (рис.13, Б, б).

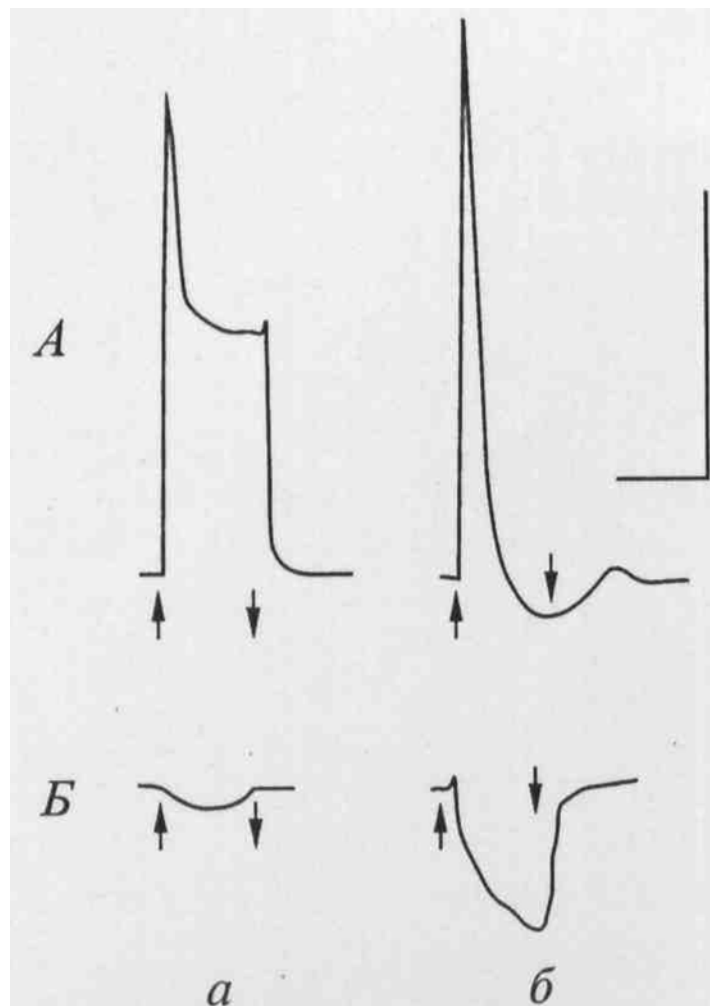


Рис. 13. Влияние рутениевого красного на ЭОГ, вызванную L-серином (1мМ) и цАМФ (1мМ).

А – норма, Б – рутениевый красный (1мкМ); а – L-серин, б – цАМФ. Начало стимуляции обозначено стрелкой, направленной вверх, а прекращение стимуляции – стрелкой, направленной вниз. «Негативность» направлена вверх. Калибровка: по вертикали 3 мв, по горизонтали 15 с.

При действии этих веществ на ЭОГ, вызванную L-серинем (1мМ), негативная волна исчезает и появляется слабая позитивность (рис.13, Б, а).

Таким образом, показанная нами многотипность трансдукции аминокислотного сигнала находит отражение в неоднородности ОРН по биохимическим и электрофизиологическим характеристикам. Вполне вероятно, что такое разнообразие механизмов трансдукции может иметь важный биологический смысл, так как не исключено, что один и тот же одорант в различных концентрациях может обладать различным сигнальным значением. У пресноводных рыб фундаментальные черты обонятельной трансдукции схожи с таковыми у других позвоночных животных. Однако в хлорной проводимости имеется ряд особенностей, которые, по всей видимости, связаны с водной средой обитания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе приведены экспериментально полученные характеристики функциональной и структурной организации периферического отдела обонятельной системы рыб и сопоставлены с литературными данными по другим филогенетически близким и далеким группам животных.

Установлено, что у рыб осуществление защиты обонятельного эпителия от неблагоприятных химических факторов окружающей среды сравнимо с таковым у млекопитающих. Показано, что у рыб в ОЭ, также как и у млекопитающих, присутствуют специализированные микровиллярные клетки, активизирующиеся при воздействии токсических веществ. Активное участие в защите ОЭ принимают секреторные клетки эпителия, которые не только усиливают секрецию, но и изменяют химический состав секретируемой ими слизи. Регуляция выделения слизи и ее химический состав находятся под контролем вегетативной нервной системы. Результаты наших экспериментов показывают, что у рыб защита ОЭ сравнима с таковой у млекопитающих. Однако на тетраподах

эта проблема исследована шире. Показано, что выделение слизи контролируется как адренергической, так и холинергической системами, причем последняя управляет выделением слизи несколькими субтипами холинорецепторов, на которые ложится разная функциональная нагрузка. На основе анализа данных, имеющихся в литературе, показано также, что животные, ведущие различный образ жизни, имеют различное оснащение ОЭ специализированными микровиллярными клетками.

При исследовании ионного состава обонятельной слизи пресноводных рыб установлено, что концентрация ионов хлора в ней соответствует концентрации их в плазме, а натрия – значительно меньше, чем в плазме. Установлено, что поток электролитов направлен из организма в слизь, транспорт их осуществляют специализированные клетки, так называемые хлоридные клетки или как сейчас принято – “mitochondria-rich cell”.

Показанное нами соотношение натрия и хлора в обонятельной слизи – скорее всего характерная особенность для всех обитателей пресных вод, у которых ОЭ контактирует с водой. В связи со столь необычным ионным окружением электрогенного участка рецепторного нейрона ведущим ионом в возникновении рецепторного потенциала становится хлор. У наземных же животных ионы хлора, хоть и играют важную роль в электрогенезе рецепторного потенциала, но выполняют только модулирующую роль, облегчая процессы возбуждения и восстановления.

Исследование роли вторичных мессенджеров в восприятии одорантов показало, что общий принцип трансдукции у рыб схож со всеми другими изученными животными. Однако при оценке восприятия L-серина в широком диапазоне концентрации установлено, что внутриклеточный путь трансдукции этой АК зависит от ее концентрации. Этот механизм регуляции трансдукции может объяснить различные формы поведения рыб при восприятии одной и той же аминокислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Mombaerts P. How smell develops // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. P. 1192–1198.
- [2] Lazard D., Tal N., Rubenstein M., Khen M., Lancet D., Zupko K. Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 7433–7440.
- [3] Ben-Arie N., Khen M., Lancet D. Glutathione S-transferase in rat olfactory epithelium: Purification, molecular properties and odorant biotransformation // *Biochem. J.* 1993. V. 292. P. 379–384.
- [4] Lazard D., Zupko K., Poria Y., Nef P., Lazarovtis S.H., Khen M., Lancet D. Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase // *Nature.* 1991. V. 349. P. 790–793.
- [5] Бронштейн А.А. Опыт гистохимического изучения обонятельной выстилки позвоночных животных при воздействии на нее пахучими веществами // *ДАН СССР.* 1962. Т. 145. № 3. С. 661–664.
- [6] Mulvaney B.D. Chemography of lysosome-like structures in olfactory epithelium // *J. Cell. Biol.* 1971. V. 51. P. 568–575.
- [7] Бонашевская Т. И. о барьерной функции опорных клеток рецепторного отдела обонятельного анализатора // *Цитология.* 1975. Т. 17. С. 1351–1356.
- [8] Miller M.L., Andringa A., Evans J.E., Hastings L. Microvillar cells of olfactory epithelium: morphology and regeneration following exposure to toxic compounds // *Brain Res.* 1995. V. 669. P. 1–9.
- [9] Ferrari C.C., Carmanchahi P.D., Aldana Marcos H.J., Affanni J.M. Ultrastructural characterisation of the olfactory mucosa of the armadillo *Dasybus hybridus* (Dasypodidae, Xenarthra) // *J Anat.* 2000. V. 196. (Pt. 2). P. 269–278.
- [10] Byrum L.J., Carson K.A., Rose R.K. Olfactory mucosa ultrastructure in the short-tailed shrews, *Blarina brevicauda* and *Blarina carolinensis* // *Eur. J. Morphol.* 2001. V. 39. P. 285–294.
- [11] Banger K.K., Foster J R., Lock E.A., Reed C.J. Immunohistochemical localization of six glutathione S-transferases within the nasal cavity of the rat // *Arch. Toxicol.* 1994. V. 69. P. 91–98.
- [12] Kudo H., Ueda H., Mochida K., Adachi S., Hara A., Nagasawa H., Doi Y., Fujimoto S., Yamauchi K. Salmonid Olfactory System-Specific Protein (N24) Exhibits Glutathione S-Transferase Class Pi-Like Structure // *J. Neurochem.* 1999. V. 72. P. 1344–1352.
- [13] Комов В.Т. Природное и антропогенное закисление малых озер Северо-Запада России: причины, последствия, прогноз // Автореф. док. дисс. С.–П. 1999. 50с.

- [14] Матей Е.В. Слизистые клетки жаберного эпителия молоди семги в норме и при закислении среды // Цитология. 1988. Т. 30. С. 402–406.
- [15] Виноградов Г.А., Гдовский П.А., Матей Е.В. Закисление водоемов и его влияние на метаболизм у пресноводных животных // Физиол. Паразитол. Пресн. Животных. Л.: Наука. 1979. С. 3–16.
- [16] Kaneko T., Hasegawa S., Uchida K., Ogasawara T., Oyagi A., Hirano T. Acid tolerance of Japanese dace (a cyprinid teleost) in Lake Osorezan, a remarkable acid lake // Zool. Sci. 1999. V. 16. P. 871–877.
- [17] Randall D.J., Wood C.M., Perry S.F., Bergman H., Maloiy G.M., Mommensen T.P., Wright P.A. Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment // Nature. 1989. V. 337. P. 165–166.
- [18] Val A.L., Almeida-Val V. Fishes of the Amazon and Their Environment // Berlin: Springer-Verlag. 1995.
- [19] Matsuo A.Y., Val A.L. Low pH and calcium effects on net Na⁺ and K⁺ fluxes in two catfish species from the Amazon River (Corydoras: Callichthyidae) // Braz. J. Med. Biol. Res. 2002. V. 35. P. 361–367.
- [20] Gonzalez R.J., Wood C.M., Wilson R.W., Patrick M.L., Val A.L., Bergman H.L., Narahara A. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon // Physiological Zool. 1998b. V. 71. P. 15–22.
- [21] Klapat D.A., Brown S.B., Hara T.J. The effect of low pH and aluminum on the olfactory organ of rainbow trout, *Salmo gairdneri* // Environment. Biol. Fish. 1988. V.22. P. 69–71.
- [22] Кагава Ясуо. Биомембраны // М.: Высшая школа. 1985. 303с.
- [23] Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. О защитной функции микровиллярных опорных клеток обонятельной выстилки тилапии *Oreochromis mossambicus* Peters, 1852 // Биол. внутр. вод. 2000. № 4. С.127–132.
- [24] Ferrari C.C., Aldana Marcos H.J., Carmanchahi P.D., Affanni J.M. Olfactory mucosa of the South American armadillo *Chaetophractus villosus*: an ultrastructural study // Anat Rec. 1998. V. 252. P.25–39.
- [25] Rama-Krishna N.S., Getchell T.V., Getchell M.L. Differential expression of alpha, mu, and pi classes of glutathione S-transferases in chemosensory mucosae of rats during development // Cell Tissue Res. 1994. V. 275. P. 435–450.
- [26] Henson K.L., Gallagher E.P. Glutathione S-Transferase Expression in Pollution-Associated Hepatic Lesions of Brown Bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the Cuyahoga River, Cleveland, Ohio // Toxicol. Sci. 2004. V. 80. P. 26–33.
- [27] Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. Влияние закисления среды на обонятельную систему карпа *Cyprinus carpio* // Вопр. ихтиол. 1988. Т. 28. N. 2. С. 259–302.

- [28] Попова Н.И. Сравнительная морфология обонятельного обонятельного эпителия некоторых пресноводных рыб // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1971. №10. Вып. 2. С. 123–130.
- [29] Бронштейн А.А. Обонятельные рецепторы позвоночных // Л.: Наука. 1977. 159с.
- [30] Гдовский П.А., Мензиков С.А., Ружинская Н.Н. Транспорт ионов в обонятельном эпителии пресноводных костистых рыб // X Всесоюз. Совещ. По эвол. физиол. Памяти Л.А. Орбели. Л. 1990. С. 55.
- [31] Гдовский П.А., Мензиков С.А., Ружинская Н.Н. Ионный состав слизи обонятельного эпителия пресноводных костистых рыб // Ж. эвол. биохим. и физиол. 1991. Т.27. N. 1. С. 13–18.
- [32] Hirose S., Kaneko T., Naito N., Takei Y. Molecular biology of major components of chloride cells // Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 2003. V.136B. P.593–620.
- [33] Okamura H., Sugai N., Ohtani I. Identification of nasal cells with carbonic anhydrase activity // Brain Res. 1996. V. 728. P. 263–266.
- [34] Getchell M.L., Getchell T.V. Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa // Microsc. Res. Tech. 1992. V. 23. P. 11–27.
- [35] Kanno H., Horikawa Y., Hodges R.R., Zoukhri D., Shatos M.A., Rios J.D., Dartt D.A. Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2003. V. 284. P. C988–C998.
- [36] Tachibana M., Senuma H., Ebara T., Kumamoto K. Stress increases the secretory product of rat nasal mucosa goblet cells // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1991. V. 73. P. 153–158.
- [37] Попова Н.И. Гистохимия полисахаридов обонятельной выстилки *Rana esculenta* в нормальных и экспериментальных условиях. Автореф. канд. дисс. Новосибирск. 1968. 16с.
- [38] Drenckhahn D. Untersuchungen an Regio olfactoria und Nervus olfactorius der Silbermöwe (*Larus argentatus*) // Z. Zellforsch. 1970. Bd. 106. S. 119–142.
- [39] Bannister L.H. Possible function of mucus at gustatory and olfactory surface // Transduction mechanisms in chemoreception. London. 1974. P. 39–48.
- [40] Graziadei P.P.C., Graziadei G.A. Olfactory epithelium of *Necturus maculosus* and *Ambystoma tigrinum* // J. Neurocytol. 1976. V. 5. P. 11–32.
- [41] Бронштейн А.А., Леонтьев В.Г., Пяткина Г.А. О содержании ионов в обонятельной слизи и роли ионов в движение обонятельных жгутиков // Механизмы работы рецепторных элементов органов чувств. Л.: Наука. 1973. С. 98–103.

- [42] Грибакин Ф.Г. Сенсорные рецепторы: эволюция ионного окружения рецепторной мембраны // Ж.. эвол. биохим. и физиол. 1990. Т. 26. С. 547–580.
- [43] Persaud K.C., Heck G.L., DeSimone S.K., Getchell T.V., DeSimone J.A. Ion transport across the frog olfactory mucosa: the action of cyclic nucleotides on the basal and odorant-stimulated states // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 944. P. 49–62.
- [44] Grubb B.R., Boucher R.C. Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis // Physiol. Rev. 1999. V. 79. Suppl. P. S193–S214.
- [45] Nagel W., Somieski P., Katz U. Selective inhibition of Cl conductance in toad skin by blockers of Cl channels and transporters // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2001. V. 281. P. C1223–C1232.
- [46] Dehaye J.P., Nagy A., Premkumar A., Turner R.J. Identification of a Functionally Important Conformation-sensitive Region of the Secretory Na⁺-K⁺-2Cl Cotransporter (NKCC1) // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 11811–11817.
- [47] Rick R. Intracellular ion concentrations in the isolated frog skin epithelium: evidence for different types of mitochondria-rich cells // J. Membr. Biol. 1992. V. 127. P. 227–236.
- [48] Knowles M.R., Carson J.L., Collier A.M., Gatzky J.T., Boucher R.C. Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo // Am. Rev. Respir. Dis. 1981. V. 124. P. 484–490.
- [49] Kern R.C., Kerr T.R., Getchell T.V. (1991) Ultrastructural localization of Na⁺-K⁺-ATPase in rodent olfactory epithelium // Brain. Res. 1991. V. 546. P. 8–17.
- [50] Rochelle L.G., Li D.C., Ye H., Lee E., Talbot C.R., Boucher R.C. Distribution of ion transport mRNAs throughout murine nose and lung // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2000. V. 279. P. L14–L24.
- [51] Zielinski B.S., Getchell M.L., Getchell T.V. Ultrastructural characteristics of sustentacular cells in control and odorant-treated olfactory mucosae of the salamander // Anat. Rec. 1988. V. 221. P. 769–779.
- [52] Trotier D., MacLeod P. Intracellular recordings from salamander olfactory supporting cells // Brain Res. 1986. V. 374(2). P. 205–211.
- [53] Sugihara I., Furukawa T. Inwardly rectifying currents in hair cells and supporting cells in the goldfish sacculus // J. Physiol. (Lond). 1996. V. 495. P. 665–679.
- [54] Newman E., Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina // Trends Neurosci. 1996. V. 19. P. 307–312.
- [55] Ghiaroni V., Fieni F., Tirindelli R., Pietra P., Bigiani A. Ion Conductances in Supporting Cells Isolated From the Mouse Vomeronasal Organ // J. Neurophysiol. 2002. V. 89. P. 118–127.

- [56] Бронштейн А.А., Леонтьев В.Г. О содержании натрия и калия в слизи обонятельной выстилки позвоночных // Ж. эвол. биохим. и физиол. 1972. Т.8. С. 580–585.
- [57] Joshi H., Getchell M.L., Zielinski B., Getchell T.V. Spectrophotometric determination of cation concentrations in olfactory mucus // *Neurosci. Lett.* 1987. V. 82. P. 321–326.
- [58] Chiu D., Nakamura T., Gold G.H. Ionic composition of toad olfactory mucus measured with ion selective microelectrodes // *Chem. Senses.* 1988. V. 13. P. 677–678.
- [59] Минор А.А., Быков К.А., Дмитриев А.В., Скачков С.Н. Измерение концентрации ионов калия, кальция, натрия и хлора в обонятельной слизи с помощью ионселективных микроэлектродов // *Сенс. системы.* 1990. Т. 4. С. 220–227.
- [60] Khayari A., Math F., Trotier D. Odorant-evoked potassium changes in the frog olfactory epithelium // *Brain Res.* 1991. V. 539(1). P. 1–5.
- [61] Knowles M.R., Robinson J.M., Wood R.E., Pue C.A., Mentz W.M., Wager G.C., Gatzky G.C., Boucher R. C. Ion Composition of Airway Surface Liquid of Patients with Cystic Fibrosis as Compared with Normal and Disease-control Subjects // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. P. 2588–2595.
- [62] Grubb B.R., Chadburn J.L., Boucher R.C. In vivo microdialysis for determination of nasal liquid ion composition // *A.J.P Cell Physiol.* 2002. V. 282. P. 1423–C1431.
- [63] Reuter D., Zierold K., Schroder W.H., Fring S. A Depolarizing Chloride Current Contributes to Chemo-electrical Transduction in Olfactory Sensory Neurons in Situ // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 6623–6630.
- [64] Винников А.Я. Эволюция рецепторов. Наука. Л. 1979. 140 с.
- [65] Bertmar G. Ultrastructure of the olfactory mucosa in the homing Baltic sea trout *Salmo trutta* // *Marine Biol.* 1973. V. 19. P. 74–88.
- [66] Rahim S.M., Delaunoy J.P., Laurent P. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in teleostean fish erythrocytes and gill epithelia // *Histochemistry.* 1988. V. 89. P. 451–459.
- [67] Henry R.P., Smatresk N.J., Cameron J.N. The distribution of branchial carbonic anhydrase and the effects of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibitors in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) // *J. Exp. Biol.* 1988. V. 134. P. 201–218.
- [68] Morgan I.J., Potts W., Oates K. Intracellular ion concentrations in branchial epithelial cells of brown trout (*Salmo trutta* L.) determined by X-ray microanalysis // *J. Exp. Biol.* 1994. V. 194. P. 139–151.
- [69] Goss G.G., Perry, S.F., Wood, C.M., Laurent P. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish // *J. exp. Zool.* 1992b. V. 263. P. 143–159.

- [70] Kaneko T., Shiraishi K., Katoh F., Hasegawa S., Hiroi J. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation // *Fish. Sci.* 2002. V. 68. P. 1–9.
- [71] Ружинская Н.Н., Гдовский П.А., Девицина Г.В. Хлоридные клетки – составной компонент обонятельного эпителия рыб // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2001. Т. 33(1). С. 69–73.
- [72] Restrepo D., Teeter J.H., Schild D. Second messenger signaling in olfactory transduction // *J. Neurobiol.* 1996. V. 30. P. 37–48.
- [73] Gold G.H. Controversial issues in vertebrate olfactory transduction // *Annu. Rev. Physiol.* 1999. V. 61. P. 857–871.
- [74] Kaur R., Zhu X.O., Moorhouse A.J., Barry P.H. IP₃-Gated Channels and their Occurrence Relative to CNG Channels in the Soma and Dendritic Knob of Rat Olfactory Receptor Neurons // *J. Membr. Biol.* 2001. V. 181. P. 91–105.
- [75] Balasubramanian S., Lynch J.W., Barry P.H. The permeation of organic cations through cAMP-gated channels in mammalian olfactory receptor neurons // *J. Membrane Biol.* 1995. V. 146. P. 177–191.
- [76] Kashiwayanagi M. Dialysis of inositol 1,4,5-trisphosphate induces inward currents and Ca²⁺ uptake in frog olfactory receptor cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 225. P. 666–671.
- [77] Belluscio L., Gold G.H., Nemes A., Axel R.H. Mice deficient in G(olf) are anosmic // *Neuron.* 1998. V. 20. P. 69–81.
- [78] Hallani M., Lynch J.W., Barry P.H. Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons // *J. Membr. Biol.* 1998. V. 161. P. 163–171.
- [79] Kleene S.J., Gesteland R.C., Bryant S.H. An electrophysiological survey of frog olfactory cilia // *J. Exp. Biol.* 1994. V. 195. p.307–328.
- [80] Reuter D., Zierold K., Schroder W.H., Fring S. A Depolarizing Chloride Current Contributes to Chemoelectrical Transduction in Olfactory Sensory Neurons in Situ // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 6623–6630.
- [81] Kaneko H., Putzier I., Frings S., Kaupp B., Gensch T. Chloride Accumulation in Mammalian Olfactory Sensory Neurons // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. 7931–7938.
- [82] Sato K., Suzuki N. The contribution of a Ca²⁺-activated Cl[–] conductance to amino-acid induced inward current responses of ciliated olfactory neurons of the rainbow trout // *J. Exp. Biol.* 2000. V. 203. P. 253–262.
- [83] Hansen A., Rolén S.H., Anderson K., Morita Y., Caprio J., Finger T.E. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 9328–9339.
- [84] Goulding E.H., Ngai J., Kramer R.H., Colicos S., Axel R., Siegelbaum S.A., Chess A. Molecular Cloning and Single-Channel Properties of the Cyclic Nucleotide-Gate Channel from Catfish Olfactory Neurons // *Neuron.* 1992. V. 6. P. 45–58.

- [85] Kolesnikov S.S., Kosolapov A.V. Cyclic nucleotide-activated channels in carp olfactory receptor cells // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. V. 1150(1). P. 63–72.
- [86] Пяткина Г.А., Дмитриева Т.М. Цитохимическое выявление аденилатциклазы в обонятельной выстилке хариуса *Thymallus arcticus* baicalensis: Влияние промышленных стоков // *Ж. эвол. биох. и физиол.* 1990. Т. 26. С. 242–245.
- [87] Пяткина Г.А. Локализация фосфатазы, ответственной за гидролиз инозитол-1,4,5-трифосфата в обонятельной выстилке костистых рыб // *Ж. эвол. биох. и физиол.* 1999. Т. 35. С. 303–310.
- [88] Abogadie F.C., Bruch R.C., Farbman A.I. G-protein subunits expressed in catfish olfactory receptor neurons // *Chem. Senses*. 1995. V. 20. P. 199–206.
- [89] Kalinowski D.L., Aldinger S.B., Boyle A.G., Huque T., Marecek J.F., Prestwich G.D., Restrepo D. Characterization of a novel 1,4,5-triphosphate receptor in isolated olfactory cilia // *Biochem. J.* 1992. V. 281. P. 449–456.
- [90] Abogadie F.C., Bruch R.C., Wurzbarger R., Margolis F.L., Farbman A.I. Molecular cloning of a phosphoinositide-specific phospholipase C from catfish olfactory rosettes // *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 1995a. V. 31. P. 10–16.
- [91] Hara T.J. Olfaction and gestation in fish: an overview // *Acta Physiol. Scand.* 1994. V.152. 207–217.
- [92] Мантейфель Ю.Б. Экстерохеморецепция рыб, амфибий и амфибиотных рептилий в связи со специфичности водной среды // *Проб. хим. коммун. животных*. 1991. М. Наука. С212–222.
- [93] Бондаренко В.Ф. Сигнальное значение аминокислот в пищевом поведении карпа. Автореф. Канд. Дисс. 1982. М. 15С.
- [94] Павлов Д.С., Касумян А.О. Сенсорные основы пищевого поведения рыб // *Вопр. Ихтиологии*. 1990. Т. 30. С. 720–732.
- [95] Kawabata K. Sexual behavior induced by amino acid Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jap. Soc. Fish.). 1992. V. 58. P.839–844.
- [96] Shoji T., Ueda H., Ohgami T., Sakamoto T., Katsuragi Y., Yamauchi K., Kurihara K. Amino Acids Dissolved in Stream Water as Possible Home Stream Odorants for Masu Salmon // *Chem. Senses*. 2000. V. 25. P. 533–540.
- [97] Hara T.J. Mechanism of olfaction // *Fish Chemoreception*. London: Chapman and Hall. 1992. P. 150–170.
- [98] Hara T.J. Structure-activity relationships of amino acids as olfactory stimuli // *Chemoreception in Fishes*. Amsterdam: Elsevier. 1982. P. 135–157.
- [99] Гдовский П.А., Мензиков С.А., Ружинская Н.Н. Роль ионов хлора и Cl-активируемой Mg-АТФазы в электрогенезе обонятельного рецеп-

- торного потенциала у пресноводных рыб // Сенс. Системы. 1992. Т. 6(3). С. 92–95.
- [100] Мензиков С.А., Гдовский П.А. Влияние фurosемида на Mg-АТРазу из обонятельной выстилки карпа // Биохимия. 1990. Т.55. С. 970–973.
- [101] Мензиков С.А., Гдовский П.А., Мензикова О.В. Mg-АТР – регулятор активности Cl-АТРаз в обонятельном эпителии рыб // Биохимия. 1995. Т. 61. С. 555–559.
- [102] Гдовский П.А., Мензиков С.А. Свойства Mg-АТРазы обонятельной выстилки рыб и амфибий // Ж. эвол. биохим. и физиол. 1994. Т.30. N. 5. С. 656–661.
- [103] Мензиков С.А., Гдовский П.П., Глебов Р.Н., Ребров И.Г. АТР-зависимый транспорт хлора в обонятельной выстилке карпа // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 995–998.
- [104] Reisert J., Lai J., Yau K.W., Bradley J. Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons // Neuron. 2005. V. 45. P. 553–561.
- [105] Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. Циклонуклеотид-звисимый путь обонятельной трансдукции аминокислотного сигнала у карпа *Cyprinus carpio* // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2001. Т. 37. N. 2. С. 114–117.
- [106] Winberg S., Bjerselius R., Baatrup E., Doving K.B. The effect of Cu(II) on the electro-olfactogram (EOG) of the atlantic salmon (*Salmo salar* L) in artificial freshwater of varying inorganic carbon concentrations // Ecotoxicol. Environm. Safety. 1992. V.24. P.167–178.

ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРЕСНОВОДНЫХ КОСТИСТЫХ РЫБ

© 2007г. Г.М. Чуйко, В.А. Подгорная

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

ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы (ХЭ) – ферменты, широко распространенные в живой природе от микроорганизмов и простейших одноклеточных организмов до позвоночных, включая человека. Выделяют два основных типа ХЭз: ацетилхолинэстераза (ацетилхолин ацетилгидролаза, АХЭ; К.Ф. 3.1.1.7) и холинэстераза (ацилхолин ацилгидролаза; К.Ф. 3.1.1.8), представленная рядом ферментов [1]. 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 физиологическая функция - гидролиз ацетилхолина (АХ), медиатора передачи нервного импульса. БуХЭ менее специфична в отношении субстратов и ее роль окончательно не ясна, хотя заметная активность фермента в крови и печени высших позвоночных указывает на его высокую функциональную значимость. Типичными считаются АХЭ мозга и эритроцитов человека, лошади, быка и обезьяны и БуХЭ сыворотки крови лошади. При изучении ХЭ других животных их сравнивают по свойствам и классифицируют относительно этих типов [2, 3].

Кинетические свойства ХЭз определяются конформационной структурой их активного центра (АЦ) и составляющих его аминокислотных остатков. По современным представлениям каталитическая единица ХЭ представляет собой мономерный глобулярный белок, который у АХЭ и БуХЭ имеет

53%-ную идентичность и 73%-ное сходство аминокислотной последовательности. На настоящий момент наиболее полно изучена и принята за эталонную АХЭ электрического ската (*Torpedo californica*). Её первичная структура состоит из 526 аминокислотных остатков, вторичная и третичная формируют т.н. «спиралевидную упаковку» α/β -гидролаз, содержащую 14 α -спиралей и 12 β -слоев, упакованных таким образом, что молекула имеет форму глобулы размером около 60 Å. В середине глобулы на дне узкого «ущелья» в 20 Å расположен каталитический АЦ. Он состоит из двух функционально важных и пространственно разделенных участков: эстеразного, осуществляющего гидролиз эфирной связи субстрата, и холинсвязывающего, который ориентирует молекулы субстрата относительно активного центра фермента. Эстеразный участок включает каталитическую триаду – остатки аминокислот серина, гистидина и глутамата, которые взаимодействуют с ацильной частью молекулы субстрата и фосфорорганических (ФОИ) и карбаматных ингибиторов, и оксианионную полость, включающую остатки двух цистеинов и одного аланина, атомы азота которых образуют водородные связи с карбонильным кислородом субстрата и фосфонильным кислородом ФОИ. Каталитическая триада - наиболее консервативный элемент АЦ и его аминокислотный состав одинаков у всех типов холинэстераз, независимо от вида животного. Холинсвязывающий пункт обязательно включает в себя остаток триптофана, с индольным кольцом которого взаимодействует аммониевая группировка холиновой части субстрата. Большая роль в формировании и функционировании АЦ принадлежит гидрофобным областям, часто являющимся главным фактором, который определяет различия в свойствах ХЭ разного происхождения и типа. Гидрофобная область, окружающая эстеразный участок и стерически определяющая допустимый размер ацильной группы субстрата и ацилирующих ингибиторов, называется «ацильным карманом». Конфигурация «ацильного кармана» у БуХЭ отличается от АХЭ тем, что по-

звolyет связывать субстраты и ингибиторы с большей ацильной частью. У АХЭ присутствует еще и периферический «анионный» пункт (ПАП), наличие которого обуславливает эффект субстратного торможения при высоких концентрациях субстрата и взаимодействие со специфическими ингибиторами и активаторами АХЭ. У БуХЭ ПАП отсутствует [4]. Проведение специфического субстратно-ингибиторного анализа наряду с исследованиями по направленному мутагенезу ферментного белка позволяет изучать структурно-молекулярные и функциональные особенности ХЭ.

Особенностью ХЭ является их способность взаимодействовать с фосфорорганическими (ФОС) и карбаматными (КС) соединениями, что приводит к необратимому ингибированию их активности. Ингибирование АХЭ нервной системы животных блокирует проведение нервного импульса и вызывает нарушение нормального функционирования организма, приводя в конечном итоге к его гибели [3, 5]. Этот феномен нашел широкое применение в практическом использовании ФОС и КС в качестве пестицидов, боевых отравляющих веществ и лекарственных препаратов [6], а также в использовании ХЭ как биомаркеров действия этих соединений на разные виды животных [7].

Изучение ХЭ рыб ведется уже в течение 60 лет. Тем не менее, к настоящему времени они исследованы недостаточно полно. Больше известно об АХЭ в ЦНС, а о БуХЭ и других ХЭ сведения практически отсутствуют. Имеющиеся данные по разным аспектам строения, идентификации, свойствам и функциям ХЭ в организме рыб носят разрозненный и фрагментарный, а зачастую и противоречивый характер. Как результат – практически полное отсутствие обобщающих работ, особенно в сравнительно-биохимическом плане [3, 8-10].

В лаборатории физиологии и токсикологии водных животных изучение ХЭ пресноводных костистых рыб ведется с 1977г. Начало этим работам положено В.И. Козловской и Г.М. Чуйко [11]. В дальнейшем к ним подключились П.А.

Гдовский, Н.Н. Ружинская [12-17], Д.Ф. Павлов, В.А. Подгорная и др. До конца 80-х годов прошлого столетия усилия лаборатории были направлены, главным образом, на выяснение роли ХЭ в отравлении рыб фосфорорганическими пестицидами (ФОП) и другими загрязняющими веществами (фенол, тяжелые металлы) [18-29]. Лишь отдельные работы касались изучения свойств и идентификации типов ХЭ [11, 30]. Начиная с 90-х г., акцент исследований в лаборатории смещается в сторону идентификации ХЭ, изучения их свойств и участия в физиологических процессах.

Исследовались ХЭ пресноводных костистых рыб (Teleostei), представляющих 19 видов из 5 наиболее распространенных семейств, обитающих в Рыбинском водохранилище и имеющих широкое распространение в водоемах Северо-запада европейской части России.

Цель данной публикации – обобщить результаты этих исследований.

Гидролиз АТХ и БуТХ в тканях рыб

Активность в отношении АТХ, гидролизуемого обоими типами ХЭ, и БуТХ, расщепляемого только БуХЭ, различается как между видами рыб, так и между исследованными органами (Табл. 1). Наибольшей холинэстеразной активностью обладает мозг рыб, где скорость гидролиза АТХ у некоторых видов превышает 2000 мкмоль/г ткани/ч, в то время как гидролиз БуТХ практически отсутствует, не превышая 4% от уровня гидролиза АТХ. У карповых активность АХЭ в мозге достоверно выше, чем у щуковых, окуневых и налимовых. В плазме крови общая холинэстеразная активность несколько ниже, чем в мозге и достигает у представителей п/сем. Leuciscinae (сем. Cyprinidae) 1000 мкмоль/мл/ч при гидролизе БуТХ. Однако у ряда карповых (каarp, карась, линь, чехонь) и всех представителей других изученных семейств гидролиз этого субстрата не обнаруживается.

Таблица 1.

Скорость гидролиза иодидов АТХ и БТХ гомогенатами мозга, печени, селезенки и плазмы крови исследованных видов рыб

Семейство, вид	Мозг	Печень		Селезенка		Плазма	
	АТХ*	АТХ	БТХ	АТХ	БТХ	АТХ	БТХ
1	2	3	4	5	6	7	8
<u>Cyprinidae</u>							
Лещ	1140±62 ^{б,в}	69±7 ^д	16±1 ^г	12±1 ^{д,е}	6±1 ^{д,е,ж}	30±1 ^г	87±3 ^б
		56±8 ^{г,д}	<1			2±0.4 ^ж	<1
Синец	1054±57 ^{б,в}	61±10 ^{г,д}	17±4 ^{в,г}	20±1 ^{в,г}	18±2 ^б	142±17 ^б	1083±85 ^а
Плотва	2011±87 ^а	117±11 ^{б,в,г}	44±7 ^{а,б,в}	25±3 ^{б,в}	16±3 ^{б,в,г}	229±6 ^а	1074±20 ^а
Густера	990±96 ^{б,в}	93±9 ^г	19±2 ^г	28±1 ^б	13±1 ^в	61±7 ^в	483±89 ^б
Язь	1078±130 ^{б,в}	44±3 ^е	25±5 ^{в,г}	15±1 ^{г,д}	9±1 ^{г,д}	37±5 ^{в,г}	237±42 ^б
Уклейка	1156±87 ^{б,в}	24±1 ^з	39±2 ^б	8±1 ^ж	29±1 ^а	289±20 ^а	975±26 ^а
Жерех	1238±47 ^б	190±9 ^а	70±6 ^а	35±1 ^а	6±1 ^е	14±4 ^д	26±7 ^г
Чехонь	877±62 ^{в,г}	163±8 ^{а,б}	9±1 ^д	43±4 ^а	4±1 ^ж	6±1 ^е	<1
Карп	651±54 ^{г,д}	5±1 ^{к,л}	<1	-	-	6±1 ^е	<1
Голец	640±35 ^{г,д}	-	-	-	-	44±3 ^{в,г}	<1
Елец	661±26 ^{г,д}	-	-	-	-	7±1 ^е	<1

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
Карась	704±8 ^д	19±1 ^и	12±1 ^д	13±1 ^д	<1	3±1 ^{ж,з}	<1
Линь	856±9 ^г	21±2 ^{з,и}	15±2 ^{г,д}	10±1 ^{ж,е}	<1	4±1 ^{е,ж}	<1
<u>Esocidae</u>							
Щука	691±38 ^{г,д}	1.3±0.1 ^м	<1	26±2 ^{б,в}	<1	5±1 ^е	<1
<u>Percidae</u>							
Окунь	214±10 ^з	30±3 ^{ж,з}	14±2 ^{г,д}	5±1 ^з	<1	3±1 ^{ж,з}	<1
Судак	414±33 ^е	4±0.5 ^л	2±1 ^е	7±1 ^{ж,з}	1±1 ^ж	1±1 ^з	<1
Берш	296±19 ^ж	8±0.3 ^к	2±1 ^ж	23±1 ^в	2±1 ^ж	2±1 ^{ж,з}	<1
Ерш	256±17 ^{ж,з}	134±10 ^{б,в}	42±2 ^б	9±1 ^{е,ж}	<1	2±1 ^{ж,з}	<1
<u>Lotidae</u>							
Налим	138±15 ^и	52±8 ^{д,е,ж}	34±4 ^{б,в}	7±1 ^ж	3±1 ^з	2±1 ^{ж,з}	<1

Представлены средние значения и их ошибки ($\bar{x} \pm m_x$), данные выражены в мкмоль/ч на 1г ткани или 1мл плазмы; число рыб каждого вида = 15; значения с одинаковыми буквенными индексами внутри колонок при $P=0.05$ достоверно не различаются. * гидролиз БТХ у всех исследованных видов рыб в мозге не превышает 4% от уровня гидролиза АХ

Гидролиз АТХ хотя и выявляется, но по сравнению с БуТХ он идет менее интенсивно. В печени рыб холинэстеразная активность ниже, чем в плазме и не превышает 200 мкмоль/г ткани/ч при использовании АТХ. Гидролиз АТХ и БуТХ сопоставимы по интенсивности, хотя последний гидролизуется медленнее. У карповых холинэстеразная активность в целом выше, чем у представителей других семейств. В селезенке холинэстеразная активность самая низкая из исследованных органов - менее 50 мкмоль/г ткани/ч. Тенденции холинэстеразного гидролиза в печени такие же, как и в печени [31-34].

Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что у всех видов исследованных рыб в тканях присутствует АХЭ, а у карповых из п/сем. ельцовые еще и БуХЭ, содержание которой наиболее высокое в плазме крови. Ранее гидролиз БуТХ был отмечен лишь у морских рыб в мышцах, в то время как у пресноводных видов - только гидролиз АТХ. Считалось, что ткани пресноводных рыб не содержат БуХЭ [3, 8]. Электрофорез в ПААГ сыворотки крови разных видов рыб выявил наличие трех белковых фракций с эстеразной активностью: эст-1, эст-2 и эст-3. Методом субстратно-ингиби-торного анализа эти фракции идентифицированы как карбоксилэстераза (КЭ; КФ 3.1.1.1), БуХЭ и АХЭ, соответственно (рис.1) [11, 23, 30, 34, 35].

Наличие БуХЭ в сыворотке пресноводных костистых рыб описано впервые. Ранее считалось, что в эволюционном ряду позвоночных этот фермент появляется у представителей пресмыкающихся. Вместе с тем показано, что эстеразный спектр у исследованных видов рыб имеет различия. Все из них обнаруживают КЭ и АХЭ, а БуХЭ выявлена лишь у трех представителей сем. Cyprinidae: плотвы, синца и леща, хотя у последнего только 30-40% особей обладают этим типом ХЭ. На основании гетерогенности ХЭ выделено два фенотипа леща: фенотип Б, в сыворотке которого присутствует АХЭ и БуХЭ, и фенотип А, для которого характерно наличие только АХЭ. У карпа (сем. Cyprinidae), окуня (сем. Percidae), щуки (сем. Esocidae) и налима (сем. Lotidae) БуХЭ не обнаружена.

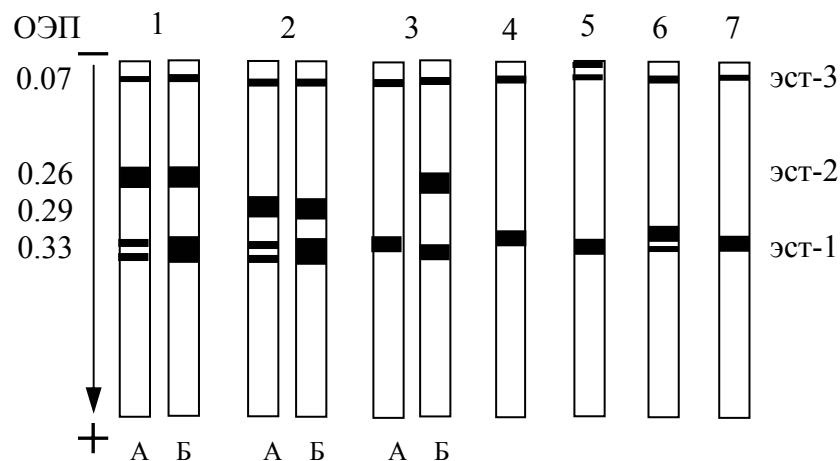


Рис. 1. Схема-электрофореграмма эстераз эфиров карбоновых кислот сыворотки крови синца, плотвы, леща, карпа, окуня, щуки и налима.

ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность белковых фракций; эст-1 (КЭ), эст-2 (БуХЭ) и эст-3 (АХЭ) - зоны эстеразной активности; А и Б – феноотипы; 1 - синец, 2 – плотва, 3 – лещ, 4 – карп, 5 – щука, 6 – окунь, 7- налим

Чувствительность ХЭ рыб к ингибирующему действию ДДВФ *in vitro*.

Оценка чувствительности ХЭ к действию *in vitro* различных ингибиторов, и в первую очередь ФОС, играет важную роль при сравнительной характеристике ферментов различного происхождения и локализации. При идентификации эстераз в сыворотке крови рыб было выявлено, что АХЭ и БуХЭ различаются по чувствительности к ФОС хлорофосу. Однако известно, что хлорофос сам по себе практически не способен ингибировать ХЭ и его антихолинэстеразное действие связано исключительно с продуктом спонтанного гидролиза - ДДВФ [36]. В связи с этим исследована чувствительность АХЭ и БуХЭ мозга и сыворотки рыб к ингибирующему действию ДДВФ (Табл.2) [32-34].

Таблица 2.

Бимолекулярные константы скорости ингибирования k_{II} и значения pI_{50} при действии ДДВФ in vitro на АХЭ мозга и БуХЭ сыворотки пресноводных костистых рыб

<u>Семейство,</u> вид	АХЭ, 10 ³ моль ⁻¹ л мин ⁻¹				БуХЭ, 10 ⁷ моль ⁻¹ л мин ⁻¹	
	Мозг		Сыворотка		Сыворотка	
<u>Coregonidae</u>						
Ряпушка	16 ± 1 ^{a *}	(6.0)	-	-	-	-
<u>Cyprinidae</u>						
Синец	5 ± 1 ^b	(5.4)	-	-	2.0 ± 0.2 ⁱ	(9.1)
Плотва	6. ± 1 ^{b,g.}	(5.5)	-	-	1.1 ± 0.1 ^j	(8.8)
Уклейка	27 ± 5 ^c	(6.2)	-	-	2.5 ± 0.1 ⁱ	(9.2)
Лещ	4 ± 1 ^{b,e}	(5.4)	-	-	1.8 ± 0.3 ^{ij}	(9.0)
Язь	52 ± 7 ^d	(6.5)	-	-	1.0 ± 0.1 ^j	(8.8)
Густера	3 ± 1 ^c	(5.3)	-	-	2.2 ± 0.1 ⁱ	(9.1)
Карп	9 ± 1 ^f	(5.7)	8 ± 1 ^{f,h}	(5.7)	отс	отс
<u>Percidae</u>						
Окунь	6 ± 1 ^g	(5.5)	7 ± 1 ^h	(5.6)	отс	отс
Судак	8 ± 1 ^f	(5.7)	-	-	отс	отс
<u>Esocidae</u>						
Щука	14 ± 1 ^a	(5.9)	18 ± 1 ⁱ	(6.0)	отс	отс

*представлены средние и ошибки средних ($\bar{x} \pm m_x$); число использованных рыб $N=8$; в скобках представлены значения pI_{50} , рассчитанные из уравнения $pI_{50} = \log(0.695/k_2/t)$, где t – время ингибирования, принятое за 40 мин.; во всей таблице значения с одинаковыми буквенными индексами не различаются достоверно ($p < 0.05$, ANOVA, LSD-тест); «-» величина k_{II} не определена; «отс» БуХЭ отсутствует.

Величины бимолекулярных констант скорости ингибирования k_{II} для АХЭ мозга и сыворотки у всех исследованных видов имеют порядок $10^3 \text{ моль}^{-1} \text{ л мин}^{-1}$. При этом большинство значений k_{II} не различаются достоверно или эти различия незначительны. Несколько более высокая чувствительность отмечена для язя, уклейки (сем. Cyprinidae), щуки (сем. Esocidae) и ряпушки (сем. Coregonidae). Величины k_{II} для них варьируют в пределах от 1.4×10^4 до $5.2 \times 10^4 \text{ моль}^{-1}$

варьируют в пределах от 1.4×10^4 до 5.2×10^4 моль⁻¹ л мин⁻¹. Различия между видами, наиболее отстоящими по величине k_{II} друг от друга (язы и густера) были лишь 17-кратными. В сыворотке и мозге чувствительность АХЭ к ДДВФ была одинаковой.

Полученные данные и результаты исследования других авторов свидетельствуют, что АХЭ, локализованная в мозгу и сыворотке (плазме) крови каждого вида, практически идентична по чувствительности к ингибиторам *in vitro*. Межвидовые различия в чувствительности также незначительны.

Чувствительность БуХЭ к ДДВФ была изучена нами на примере рыб из сем. Cyprinidae, у которых этот фермент присутствует в плазме и его активность значительно выше активности АХЭ (Табл.2). Значения k_{II} БуХЭ для ДДВФ у этих видов варьировали в очень узком диапазоне от 1.0×10^7 до 2.5×10^7 моль⁻¹ л мин⁻¹. Из этого следует, что чувствительность БуХЭ сыворотки (плазмы) крови более чем в 1000 раз выше по сравнению с АХЭ мозга и сыворотки крови рыб.

Сравнение чувствительности к ДДВФ холинэстераз рыб и млекопитающих показывает, что АХЭ у этих животных по данному показателю очень близки, в то время как чувствительность БуХЭ рыб на два порядка выше, чем БуХЭ млекопитающих. Так, значения k_{II} для АХЭ из эритроцитов человека, мозга мыши, быка и крысы варьируют от 3.5×10^3 до 4.5×10^3 , а БуХЭ сыворотки лошади равняются 3.9×10^4 моль⁻¹ л мин⁻¹ [36]. Факт высокой чувствительности БуХЭ рыб к ДДВФ использован нами при разработке метода энзиматического определения ФОС в воде [37, 38], а ДДВФ предложен в качестве селективного ингибитора для раздельного определения активности АХЭ и БуХЭ в тканях рыб, где они присутствуют совместно [39].

Таким образом, при изучении ингибирования ХЭ мозга и крови рыб ДДВФ установлено, что чувствительность аналогичных ферментов в этих тканях одинакова. Показано, что АХЭ по чувствительности к этому ингибитору мало отличается от чувствительности АХЭ млекопитающих. В то же время

чувствительность БуХЭ рыб более чем в 1000 раз выше по сравнению с АХЭ и более чем в 100 раз – по сравнению с БуХЭ млекопитающих.

ДДВФ как избирательный ингибитор для отдельного определения активности АХЭ и БуХЭ рыб

Поскольку функциональную значимость разных типов ХЭ неодинакова, часто возникает необходимость отдельного определения их активности. Несмотря на различия между ними, это не всегда легко. Это особенно справедливо при работе с неочищенными ферментами, когда приходится иметь дело со смесью обоих типов ХЭ, присутствующих в биологических тканях одновременно, например в плазме. Высокая чувствительность БуХЭ карповых рыб к ДДВФ предполагает его селективность по отношению к данному ферменту. Было проведено более детальное сравнительное исследование степени ингибирования АХЭ и БуХЭ плотвы в зависимости от концентрации ДДВФ (Рис. 2) [39].

Полученные результаты показывают, что активность АХЭ плотвы угнеталась на 100% при концентрации ДДВФ 5×10^{-4} М (pI 3.6), а при концентрации 10^{-7} М (pI 7.0) - она не отличалась от контроля. При этой же концентрации ингибитора гидролизующая способность БуХЭ составляла 3%, а при концентрации 2.5×10^{-10} М (pI 9.6) инактивации фермента не наблюдалось. Из графиков следует, что диапазоны эффективных концентраций ДДВФ для АХЭ и БуХЭ плотвы не перекрываются и концентрации ингибитора 10^{-6} - 10^{-7} М могут быть рекомендованы для отдельного определения их активности в тканях плотвы. Рассчитанные из графиков «степень ингибирования – концентрация ингибитора» значения pI_{50} ДДВФ и соответствующие им величины k_{II} для АХЭ и БуХЭ равнялись соответственно 4.9 и 8.2, и 2 и 3700×10^3 моль⁻¹ л мин⁻¹, а степень избирательности составила 1850 раз. Значения k_{II} для БуХЭ плотвы оказались чуть выше тех, что показаны в табл.2. Однако выявленные различия не противоречат друг другу и объясняются качественной разницей ингибитора. В

первом случае ДДВФ получен методом активации хлорофоса, а во втором - использован коммерческий препарат. Вместе с тем известно, что антихолинэстеразное действие активированного ДДВФ на порядок выше, чем у синтезированного промышленным методом.

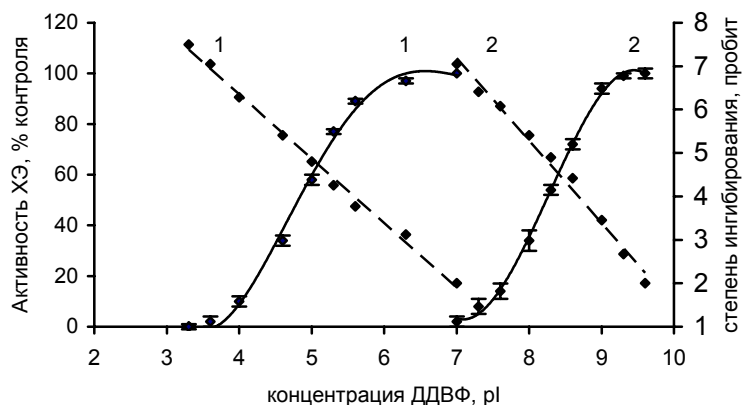


Рис.2. Зависимость степени ингибирования активности АХЭ мозга и БуХЭ сыворотки крови плотвы от концентрации ДДВФ.

1 – АХЭ, 2 – БуХЭ; ——— график «активность-концентрация», — — — — график «степень ингибирования - концентрация», рI – отрицательный десятичный логарифм молярной концентрации ингибитора

Возможная причина – образование при активировании хлорофоса побочного продукта дипропил-2,2-дихлорвинил фосфата, который по антихолинэстеразному действию в 100 раз эффективнее ДДВФ [3].

Поскольку ХЭ плотвы и других исследованных видов рыб по чувствительности к ДДВФ практически не отличаются (табл. 2), можно говорить в целом о селективности этого ингибитора для БуХЭ пресноводных костистых рыб.

Соотношение доли БуХЭ и АХЭ в общей активности ХЭ плазмы крови карповых рыб.

Принимая во внимание высокую селективность ДДВФ для БуХЭ рыб, с его использованием проведено раздельное определение активности АХЭ и БуХЭ в плазме у видов п/сем. Leuciscinae (сем. Cyprinidae), где они присутствуют совместно: лещ синца, плотвы, густеры, язя, уклейки и жереха (Табл.1). Установлено, что доля БуХЭ у этих рыб составляет 83-96% от общей активности ХЭ при использовании в качестве субстрата АТХ (Табл. 3) [31, 34].

Таблица 3.

Соотношение доли активности БуХЭ и АХЭ (%) в общей активности ХЭ плазмы крови некоторых видов карповых рыб.

Вид	БуХЭ	АХЭ
Лещ	86	14
Синец	88	12
Плотва	83	17
Густера	92	8
Язь	95	5
Уклея	96	4
Жерех	83	17

Основные кинетические свойства АХЭ и БуХЭ рыб

У рыб и быка АХЭ гидролизует АТХ, ПрТХ и МеТХ с различной скоростью, но фактически неактивны в отношении БуТХ. Скорость гидролиза субстратов АХЭ мозга всех исследованных видов рыб и быка уменьшалась в ряду АТХ> МеТХ> ПрТХ>> БуТХ (Табл.4) [34, 40].

Соотношение скоростей их гидролиза варьировало между видами незначительно, равняясь в среднем 100:68:20:<1. Для сравнения у быка оно несколько другое: 100:71:49:0. Заметны различия при гидролизе ПрТХ. У рыб увеличение длины ацильной части субстрата при переходе от АТХ к ПрТХ

вызывает примерно в 2 раза более выраженное снижение активности АХЭ, чем у фермента быка. Структурное изменение в тиюхолиновой части субстрата (наличие β -метильной группы в MeTX) снижает активность обеих АХЭ почти одинаково и в меньшей степени, чем при изменении в ацильной: относительные скорости гидролиза MeTX у них различались мало.

Таблица 4.

Соотношение скоростей гидролиза различных тиюхолиновых эфиров АХЭ мозга рыб и эритроцитов быка.

Семейство, вид	АТХ*	ПрТХ	БуТХ	МеТХ
<u>Супринidae</u>				
Лещ	100	22 ± 1.0	0.9 ± 0.2	62 ± 2.3
Синец	100	24 ± 1.1	1.1 ± 0.2	61 ± 1.6
Плотва	100	20 ± 0.6	0.3 ± 0.2	63 ± 2.2
Густера	100	25 ± 2.1	2 ± 0.2	65 ± 2.7
Карп	100	26 ± 1.3	0.2 ± 0.1	66 ± 4.4
Елец	100	-	1 ± 0.6	74 ± 4.5
Карась	100	18 ± 0.6	0.9 ± 0.3	58 ± 0.9
Линь	100	25 ± 0.7	1 ± 0.4	69 ± 2.6
<u>Percidae</u>				
Окунь	100	18 ± 1.5	1.6 ± 0.4	73 ± 1.3
Судак	100	13 ± 1.3	0.6 ± 0.3	67 ± 3.9
Берш	100	11 ± 1.2	0	74 ± 1.5
<u>Lotidae</u>				
Налим	100	-	0	65
Бык	100	49	0.5	71

АТХ - ацетилтихолин, ПрТХ - пропионилтихолин, БуТХ - бутирилтихолин, МеТХ - ацетил- β -метилтихолин; соотношение скоростей гидролиза рассчитано при концентрации субстратов 4.3×10^{-4} М

Полученные результаты предполагают, что активный центр АХЭ мозга рыб по сравнению с АХЭ быка менее при-

способлен конформационно для гидролиза субстрата с более длинной ацильной частью, чем у АТХ. Причина таких различий по современным представлениям может быть в вариабельности аминокислотных остатков, формирующих активный центр холинэстераз [4].

Исследование зависимости скорости гидролиза тиохолиновых субстратов от их концентрации и расчета основных кинетических параметров проведены на АХЭ мозга окуня (АХЭО), судака (АХЭС) и густеры (АХЭГ), а для сравнения - на АХЭ эритроцитов быка (АХЭБ) (Рис.5).

У фермента рыб при всех исследованных субстратах, за исключением БуТХ, скорость гидролиза возрастает с увеличением их концентрации до 2-8мМ, у быка – до 1.6 мМ. Этот диапазон концентраций является оптимальным (табл. 5). Дальнейшее повышение концентрации приводит к снижению активности ферментов, т.е. наблюдается эффект субстратного торможения.

Сравнение величин K_m и в большей степени V_{max}/K_m показывает, что у АХЭ рыб и АХЭ быка практически одинаковое сродство к АТХ. Значения V_{max} также достаточно близки. Однако применить этот показатель для сравнения общей гидролитической способности исследуемых холинэстераз не представляется возможным, т.к. в работе использованы с одной стороны частично очищенная АХЭБ, а с другой – неочищенный препарат из смеси субклеточных фракций мозга АХЭ рыб. Тем не менее, полученные данные с большой долей уверенности позволяют предположить, что после частичной очистки АХЭ рыб величина V_{max} у нее будет существенно выше, чем у АХЭБ. Анализ величин V_{max}/K_m и V_{max} показывает, что АХЭ рыб и АХЭБ неодинаково реагируют на структурные изменения в молекуле субстрата на разных стадиях его гидролиза. Наибольшие различия у них проявляются на сорбционной стадии реакции при изменениях в ацильной части субстрата.

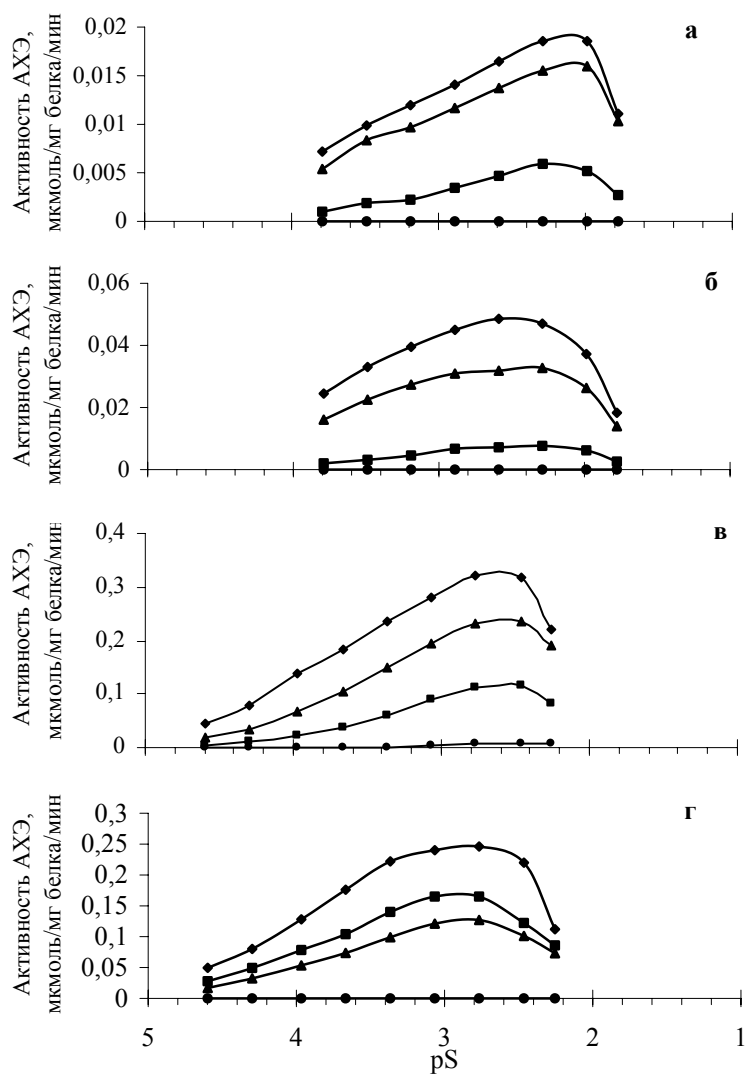


Рис. 5. Зависимость скорости гидролиза тиохолиновых эфиров от их концентрации под действием АХЭ мозга окуня (а), густеры (б), судака (в) и быка (г).
Ацетилтихолин (◆), пропионилтихолин (■), бутирилтихолин (●), ацетил-β-метилтихолин (▲).

Таблица 5

Кинетические характеристики гидролиза тиохолиновых эфиров различной структуры АХЭ мозга густеры, судака и окуня и эритроцитов быка.

Источ- ник АХЭ	Параметр	Субстрат		
		АТХИ	ПрТХИ	МеТХИ
Густера	$(S)_{opt} \times 10^{-3}, M$	2	2	2
	$V_{opt} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	3.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1
	$K_m \times 10^{-4}, M$	1.7 ± 0.1	4.9 ± 0.5	2.7 ± 0.3
	$V_{max} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	3.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1
	$V_{max}/K_m \times 10^{-4}, \text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	22	3	10
Судак	$(S)_{opt} \times 10^{-3}, M$	2,6	5,1	5,1
	$V_{opt} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	0,485	0,076	0,327
	$K_m \times 10^{-4}, M$	1,71	5,44	1,97
	$V_{max} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$			
	$V_{max}/K_m \times 10^{-4}, \text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$			
Окунь	$(S)_{opt} \times 10^{-3}, M$	7.7	6	7.7
	$V_{opt} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	$0,20 \pm 0.01$	$0,06 \pm 0.002$	$0,17 \pm 0.01$
	$K_m \times 10^{-4}, M$	3.7 ± 0.3^a	11.7 ± 1.8^b	4.2 ± 0.2^a
	$V_{max} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	19 ± 1.2^a	6.7 ± 0.2^b	16 ± 0.1^b
	$V_{max}/K_m \times 10^{-4}, \text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	5.1 ± 0.4^a	0.57 ± 0.01^b	3.8 ± 0.3^b
Бык	$(S)_{opt} \times 10^{-3}, M$	1.6	1.6	1.6
	$V_{opt} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	2.4 ± 0.1	1.3 ± 0.01	1.7 ± 0.1
	$K_m \times 10^{-4}, M$	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.01	1.5 ± 0.04
	$V_{max} \times 10^{-7}, \text{моль мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	2.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1
	$V_{max}/K_m \times 10^{-4}, \text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	22	8	13

Как следует из данных таблицы 5, у АХЭГ при переходе от АТХ к ПрТХ сродство к субстрату (V_{max}/K_m) уменьшается в среднем в 8 раз, а у АХЭБ лишь в 3 раза. В тоже время скорость распада фермент-субстратного комплекса (V_{max}) снижается соответственно в 3 и 2 раза. При изменениях в алкильной части молекулы субстрата (АТХ и МеТХ) АХЭГ и АХЭБ ведут себя почти одинаково: сродство к субстрату уменьшается в 1.4 раза, а скорость распада фермент-субстратного комплекса – примерно в 2 раза.

Таким образом, полученные результаты свидетельству-

ют, что АХЭ мозга рыб, наряду с общими чертами, характерными для «типичной» АХЭ быка, имеет свои отличительные особенности, связанные с гидролизом субстратов. АХЭГ является более специализированным ферментом в субстратном отношении, чем «типичная» АХЭБ. Эта специфичность выражена, главным образом, в отношении ацильной части субстрата.

Скорость гидролиза тиохолиновых субстратов БуХЭ сыворотки исследованных видов рыб из сем. Cyprinidae БуХЭБ и БуХЭЛ максимальна в отношении БуТХ и уменьшается в ряду БуТХ > ПрТХ > АТХ > МеТХ. Соотношение скоростей варьирует между видами рыб незначительно, равняясь в среднем 400:210:100:70, соответственно (Табл. 6).

Таблица 6

Соотношение скоростей гидролиза различных тиохолиновых эфиров БуХЭ сыворотки рыб из сем. Cyprinidae и БуХЭЛ.

Вид	АТХ	ПрТХ	БуТХ	МеТХ
Лещ	100	210 ± 10	380 ± 15	83 ± 5
Синец	100	220 ± 13	380 ± 25	60 ± 4
Густера	100	200 ± 10	440 ± 18	65 ± 3
БуХЭЛ	100	180	280	28

Примечание: соотношение скоростей гидролиза (%) рассчитано при концентрации субстратов 4.3×10^{-4} М

Обращает на себя внимание, что при общей тенденции возрастания относительной скорости гидролиза с увеличением ацильной части субстрата от АТХ к БуТХ это возрастание у рыб более выражено, чем у лошади. Кроме того, БуХЭ рыб гидролизует МеТХ с большей относительной скоростью, чем это делает БуХЭЛ: 60-80 и 28%, соответственно. В единст-

венной имеющейся в литературе работе других исследователей, при сравнении БуХЭ сыворотки синца и лошади, выявилась аналогичная закономерность, хотя для обоих ферментов значения относительных скоростей гидролиза субстратов были несколько ниже [41]. Там же показано, что при использовании холиновых аналогов субстратов различия между двумя БуХЭ становятся еще более выраженными.

Полученные результаты, так же как и в случае с АХЭ рыб и АХЭБ, предполагают различия в структуре активного центра БуХЭ рыб и БуХЭЛ. Для сравнения зависимости скорости гидролиза тиохолиновых субстратов от их концентрации и расчета основных кинетических параметров использованы БуХЭ сыворотки густеры (БуХЭГ) и лошади (БуХЭЛ). У обоих ферментов со всеми исследованными субстратами с увеличением их концентрации возрастают скорости гидролиза и эффект субстратного торможения отсутствует (рис.6).

Кинетические характеристика гидролиза, рассчитанные из приведенных графиков, обобщены в табл. 7. Полученные данные показывают, что у БуХЭГ значения K_m со всеми исследованными субстратами различаются незначительно, но демонстрируют достоверное уменьшение при увеличении в субстрате длины ацильной части в ряду от АТХ к БуТХ. Увеличение объема ацильной части субстрата (от АТХ к МеТХ) наоборот приводит к возрастанию K_m . Близкая величина K_m с АТХ (4.3×10^{-4} М) получена другими исследователями для БуХЭ сыворотки крови синца, однако с ПрТХ и БуТХ эти величины несколько меньше (0.6×10^{-4} и 0.2×10^{-4} М, соответственно), чем полученные нами для густеры [41]. Значения K_m для БуХЭГ со всеми исследованными субстратами примерно в 2-3 раза ниже, чем для БуХЭЛ, данные по которой хорошо согласуются с результатами других исследователей [41, 42].

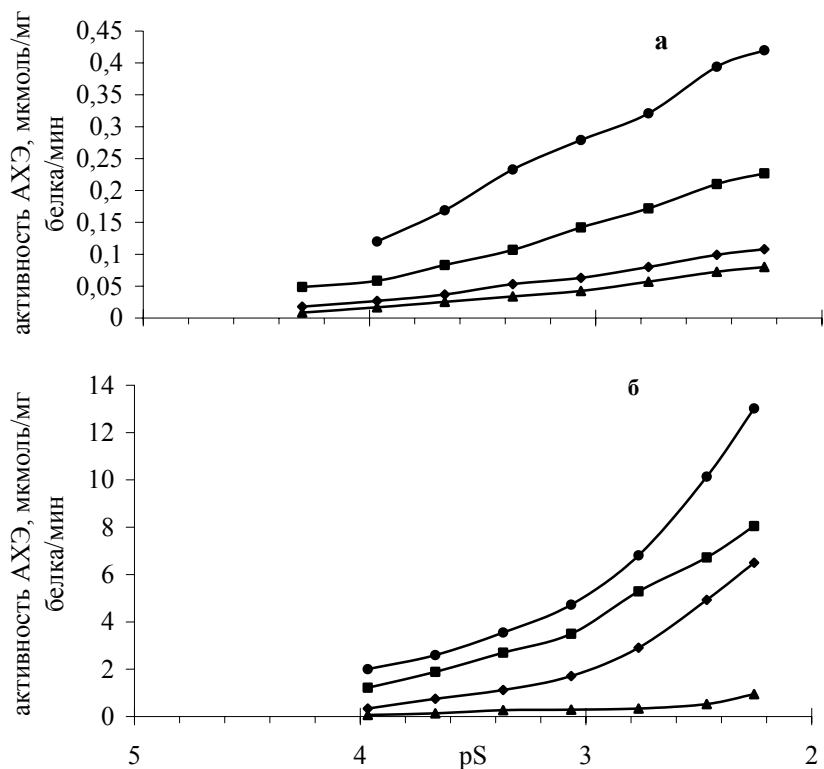


Рис. 6. Зависимость скорости гидролиза тиохолиновых эфиров от их концентрации под действием БуХЭ сыворотки крови густеры (а) и лошади (б).

Ацетилтиохолин (◆), пропионилтиохолин (■), бутирилтиохолин (●), ацетил-β-метилтиохолин (▲).

Прямое сравнение между БуХЭГ и БуХЭЛ по остальным характеристикам не имеет смысла, т.к. степень очистки этих ферментов различна. Однако относительное сравнение сродства к разным субстратам (V_{max}/K_m) показывает, что наибольшие различия между этими ХЭ существуют в отношении MeTX.

Таблица 7

Кинетические характеристики гидролиза иодидов тиохолиновых эфиров различной структуры для БУХЭ сыворотки крови густеры и лошади

Источник фермента	Параметр	Субстрат			
		АТХ	ПрТХ	БуТХ	МеТХ
Густера	$K_m \times 10^{-4}$, М	3.9±0.1	3.7±0.1	3.2±0.1	4.3±0.2
	$V_{max} \times 10^{-8}$, моль мг ⁻¹ мин ⁻¹	1.0±0.1	2.2±0.1	4.0±0.1	0.7±0.01
	$V_{max}/K_m \times 10^{-4}$, мг ⁻¹ мин ⁻¹	2.6	5.8	12.6	1.7
Лошадь	$K_m \times 10^{-4}$, М	7.8±0.1	7.2 ±0.1	6.5±0.1	12.1±0.1
	$V_{max} \times 10^{-8}$, моль мг ⁻¹ мин ⁻¹	39±0.1	72±0.1	92±0.1	9±0.1
	$V_{max}/K_m \times 10^{-4}$, мг ⁻¹ мин ⁻¹	50	100	140	7

Так у БУХЭГ изменение структуры субстрата от АТХ к МеТХ приводит к уменьшению сродства лишь в 1.5 раза, в то время как у БУХЭЛ это уменьшение достигает 7 раз. Это хорошо согласуется с данными по субстратной специфичности (табл. 6) и позволяет заключить, что фермент густеры по сравнению с ферментом лошади менее восприимчив к изменению в алкильной части субстрата, а изменения в ацильной части приводят к одинаковым изменениям сродства обеих ХЭ.

Таким образом, АХЭ и БУХЭ исследованных рыб наряду с общими свойствами, характерным для типичных ХЭ, имеют и отличительные особенности. Для АХЭ это более высокая относительная скорость гидролиза и повышенное сродство к ПрТХ, для БУХЭ – к МеТХ. Последнее указывает на необходимость более осторожной трактовки результатов, получаемых при использовании МеТХ для идентификации АХЭ рыб и выявления ее локализации при гистохимическом определении.

Активность АХЭ и БУХЭ в мозге и плазме пресноводных костистых рыб: межвидовые и межсемейственные различия.

Активность ХЭ и их состав может значительно варьировать не только у животных, относящихся к разным филогенетическим группам, но и у близкородственных организмов [43, 44].

Исследование на рыбах показало, что имеются значительные качественные межвидовые различия спектра ХЭ в тканях (Рис.1) и количественные различия в способности гидролизовать АТХ и БуТХ (Табл. 1). Эти результаты предполагают возможность существования различий в холинергическом статусе среди пресноводных костистых рыб и требуют более детального исследования проблемы. Использование селективного ингибитора БуХЭ позволило отдельно определить уровень нормальный активности АХЭ и БуХЭ в мозге и плазме рыб и исследовать степень межвидовых и межсемейственных различий [31, 33].

Результаты исследования показывают, что активность АХЭ мозга рыб варьирует как среди видов, так и семейств (Табл. 8). Максимальные, 15 кратные, различия выявлены между представителем сем. *Lotidae* (налим) и *Cyprinidae* (плотва). Различия среди представителей семейств были достоверны ($p < 0.05$) и активности АХЭ в среднем уменьшались в ряду: *Cyprinidae* > *Esocidae* > *Percidae* > *Lotidae*. Вариабельность активности АХЭ внутри семейств были меньше и не превышали 3 раз среди представителей сем. *Cyprinidae* (плотва и карп) и 2 раз среди *Percidae* (судак и окунь). Среди большинства исследованных карповых рыб активность АХЭ не различалась достоверно ($p > 0.05$). У карася и карпа она была чуть ниже, чем у остальных представителей семейства и была такой же, как у щуки (*Esocidae*). На биохимическом уровне эти различия могут быть связаны с активностью каталитического центра (число оборотов a_{cat}) и/или с содержанием ХЭ в организме.

Ранее было показано, что a_{cat} АХЭ мозга и эритроцитов даже в таких эволюционно отдаленных группах как насекомые, круглоротые, амфибии, птицы и млекопитающие варьирует в незначительных пределах $0.8-6.2 \times 10^5 \text{ мин}^{-1}$. [3, 45, 46]. У карпа a_{cat} АХЭ мозга равен $3.3 \times 10^5 \text{ мин}^{-1}$ [47]. Эти данные позволяют предположить, что различия в активности каталитического центра АХЭ не являются ведущим фактором, определяющим межвидовые и межсемейственные различия в ее удельной активности в мозге.

Таблица 8.

Активность АХЭ в мозге и плазме (мкмоль АТХИ/г ткани или мл плазмы/ч) и БуХЭ в плазме (мкмоль БТХИ/мл плазмы/ч) разных видов пресноводных костистых рыб

Семейство, вид	Мозг	Плазма	
	АХЭ	АХЭ	БуХЭ
<u>Cyprinidae</u>			
Плотва	2011 ± 87 ^a	18.6 ± 0.7 ^a	1048 ± 124 ^a
Уклейка	1156 ± 86 ^{б,в}	11.6 ± 0.8 ^{б,д}	975 ± 26 ^a
Лещ	1140 ± 62 ^{б,в}	4.2 ± 0.2 ^в	87 ± 13 ^б
Язь	1078 ± 130 ^{б,в}	1.9 ± 0.2 ^г	237 ± 42 ^в
Синец	1054 ± 57 ^{б,в}	17.0 ± 2.1 ^{а,б}	1083 ± 85 ^a
Густера	990 ± 96 ^{б,в}	4.9 ± 0.5 ^{в,е}	483 ± 86 ^в
Жерех	1238 ± 47 ^б	2.4 ± 0.6 ^{г,ж}	26 ± 7 ^г
Чехонь	877 ± 62 ^в	5.8 ± 0.7 ^{в,е}	н/о
Карась	704 ± 8 ^г	10.6 ± 0.5 ^д	н/о
Карп	651 ± 45 ^г	6.3 ± 0.3 ^е	н/о
<u>Esocidae</u>			
Щука	691 ± 38 ^г	4.9 ± 0.4 ^{в,е}	н/о
<u>Percidae</u>			
Судак	414 ± 33 ^д	1.2 ± 0.1 ^ж	н/о
Берш	296 ± 19 ^е	2.2 ± 0.4 ^{г,ж}	н/о
Ерш	256 ± 17 ^{е,ж}	1.6 ± 0.1 ^{г,ж}	н/о
Окунь	214 ± 10 ^ж	2.8 ± 0.5 ^{в,г,ж}	н/о
<u>Lotidae</u>			
Налим	138 ± 15 ^з	1.5 ± 0.2 ^{г,ж}	н/о

Средние значения ± ошибки средних ($\bar{x} \pm m_x$); N=12; средние в одинаковых колонках с одинаковыми буквенными индексами не отличаются достоверно при $p < 0.05$ (ANOVA, LSD-тест); н/о – скорость гидролиза БТХИ ниже предела обнаружения 0.01 мкмоль/мл/ч и не может быть измерена при данных условиях.

Более вероятно, что неодинаковое содержание фермента в нервной ткани разных видов основная причина этого феномена. В пользу последнего свидетельствуют гистохимические и биохимические данные, полученные на нескольких пресноводных и морских видах рыб [48-50].

У всех исследованных видов рыб отмечается положительная достоверная ($p < 0.05$) корреляция между активностью разных типов АХЭ и БуХЭ в мозге и плазме (рис.7). Это позволяет предположить, что существует физиологическая основа этого феномена. Как известно, избыток АХ ингибирует активность АХЭ и активирует БуХЭ [3]. Поэтому, если содержание АХ в ткани по какой-то причине достигает избыточного уровня, то БуХЭ в этот момент гидролизует его более эффективно. Эта посылка лежит в основе одного из предположений о физиологической роли БуХЭ в организме, как «мусорщика» (“scavenger”), удаляющем избыток АХ из организма. В этой связи обращает на себя внимание полученный в нашем исследовании факт скоррелированности уровней активности обоих типов ХЭ в мозге и плазме рыб: только виды с высоким уровнем активности АХЭ в мозгу и плазме (п/сем. ельцовые, сем. карповые) имеют в плазме БуХЭ. Это предполагает, что присутствие БуХЭ в плазме указывает на более высокую интенсивность метаболизма АХ и более высокий холинергический статус организма карповых по сравнению со щукой, налимом и окуневыми.

Изменения активности АХЭ в мозге рыб при остром стрессе, индуцированном введением адреналина.

Выявленные межвидовые и межсемейственные различия в уровнях активности ХЭ в тканях рыб наблюдаются при стабильных условиях окружающей среды. Однако различные стрессорные факторы могут влиять на ферментативную активность. Чтобы выяснить влияние стресса на активность ХЭ рыб и их участие в стресс-ответе, проведено исследование динамики активности АХЭ в мозге окуня при инъекции адреналина (1.5 мг/кг), одного из известных стресс-гормонов (Табл.9) [51].

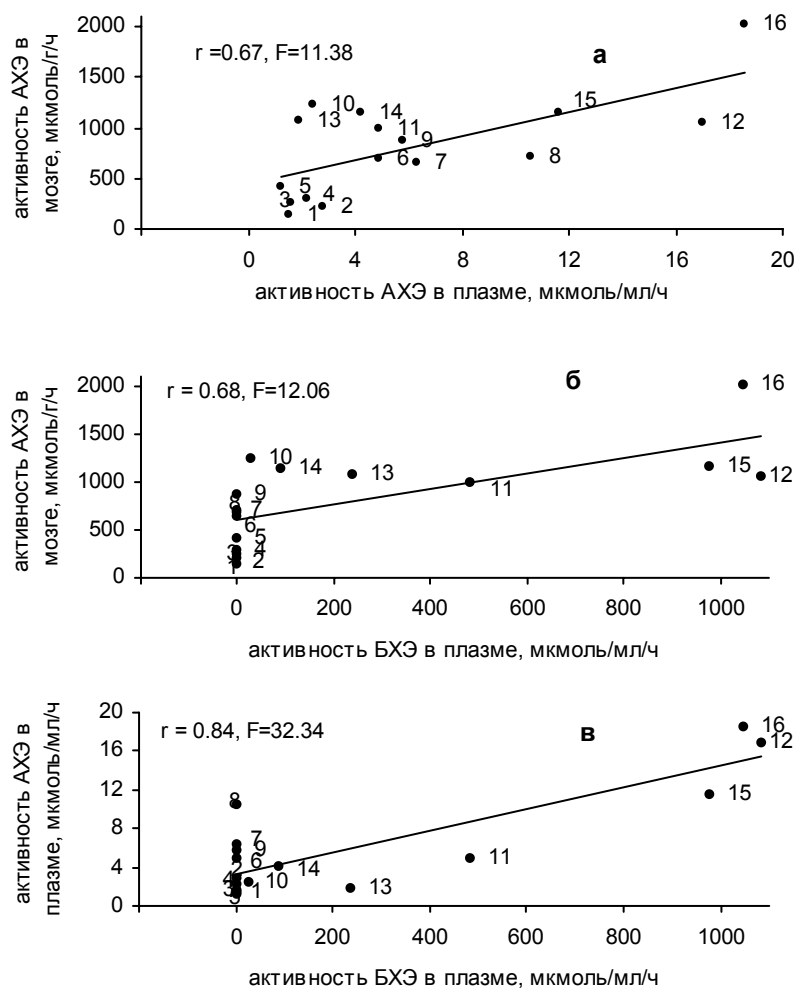


Рис 7. Корреляция между активностью АХЭ в мозге и плазме и БУХЭ в плазме рыб.

r – коэффициент корреляции, F – критерий Фишера, $p < 0.05$. Виды рыб: 1-налим, 2-окунь, 3-ерш, 4-берш, 5-судак, 6-щука, 7-кап, 8-карась, 9-чехонь, 10-жерех, 11-густера, 12-синец, 13-язь, 14-лещ, 15-уклейка, 16-плотва.

Таблица 9.

Динамика активности АХЭ и содержания водорастворимых белков в мозгу, концентрация глюкозы в крови окуня (*Perca fluviatilis* L.) после инъекции адреналина

Время, час	Показатель	Вариант эксперимента		
		Контроль	Р-р Рингера	Адреналин
0.5	АХЭ ^а	433.3±29.8 ^г	423.8±52.1	183.5±27.0*
	Белок ^б	46.6±1.7	44.5±3.0	37.5±4.0
	Глюкоза ^в	43.1±2.9	90.9±8.9*	91.4±7.2*
4	АХЭ	-	327.6±21.7	694.0±16.2*
	Белок	-	31.8±1.2	47.8±0.8
	Глюкоза	-	49.3±5.8	98.6±7.0*
12	АХЭ	-	478.2±18.6	630.0±43.6*
	Белок	-	43.8±3.5	48.0±4.1
	Глюкоза	-	57.5±4.9*	115.7±20.8*
24	АХЭ	382.6±32.1	581.7±19.7*	366.0±53.2
	Белок	39.2±2.0	44.6±1.7*	53.6±2.3*
	Глюкоза	32.2±3.0	33.4±1.9	61.2±8.0*
48	АХЭ	-	412.7±31.8	646.4±42.0*
	Белок	-	35.2±0.6	44.6±1.9
	Глюкоза	-	45.8±6.2	38.3±2.2
72	АХЭ	331.8±34.4	338.8±19.4	680.4±45.6*
	Белок	31.7±2.2	34.9±1.3	44.7±3.7
	Глюкоза	21.3±3.0	32.7±1.0	62.5±5.0*

^а – активность АХЭ, мкмоль АТХИ/г ткани/ч; ^б – содержание водорастворимых белков (ВБ), мг/г ткани; ^в – концентрация глюкозы, мг%; ^г – средняя ± ошибка средней, n=10 рыб/определение; * – достоверно отличается от контроля при p=0.05

Выявленные изменения активности АХЭ носят двухфазный характер: краткосрочное (0.5ч) снижение с последующим продолжительным (72 ч) достоверным увеличением активности АХЭ на 40-60% относительно контроля. Содержание ВБ в течение всего периода наблюдений варьировало в пределах контроля, за исключением 24 ч, когда его уровень был превышен.

О стрессорном характере изменений свидетельствует вы-

раженная гиперкликемия, наблюдавшаяся у рыб уже в первые 30 мин после инъекции и сохраняющаяся в течение всего периода наблюдения. Общая направленность индуцированных адреналином изменений активности АХЭ в мозге окуня сходна с той, что обнаружена у млекопитающих [52].

Влияние адреналина на активность АХЭ может быть как прямым, так и опосредованным. В исследованиях на млекопитающих установлено, что при прямом действии *in vitro* адреналин вызывает снижение активности АХЭ [53], причем эффект зависит от концентрации гормона. Это может служить причиной снижения активности АХЭ в мозгу окуня, которое наблюдается через 30 мин после инъекции адреналина. При опосредованном влиянии адреналина активность АХЭ может повышаться за счет индуктивного синтеза молекул фермента *de novo*, что было продемонстрировано на крысах [52]. Следовательно, наблюдаемое у окуня повышение активности АХЭ в мозгу связано, вероятнее всего, именно с синтезом дополнительного количества фермента *de novo* и механизм этого синтеза, видимо, такой же, как и млекопитающих.

Таким образом, проведенное исследование показало, что адреналин оказывает влияние на активность АХЭ в мозге рыб. Из этого следует, что любой стрессорный фактор, повышающий уровень адреналина, способен приводить к изменениям активности АХЭ в мозгу рыб. Видимо, эти изменения являются одним из элементов вторичного ответа рыб при стрессе.

Сезонная динамика активности АХЭ мозга окуня.

В жизни рыб существенное значение имеют их взаимоотношения со средой обитания, которая характеризуется постоянной изменчивостью. Изменения большинства естественных факторов окружающей среды имеют сезонную цикличность, что особенно ярко проявляется в средних и северных широтах. Приспособление рыб к жизни в условиях циклических изменений среды осуществляется путем синхронизации их биологических ритмов с природными циклами. Считается, что сезонные биологические ритмы обусловлены либо влиянием факторов

окружающей среды, либо эндогенными ритмами (феномен «биологических часов»), а чаще всего независимым совокупным влиянием того и другого. Двумя наиболее значимыми внешними факторами, регулируемыми годовые ритмы, являются температура и фотопериод [54]. Для рыб, как пойкилотермных животных, температура среды обитания - один из наиболее существенных внешних факторов, оказывающих значительное влияние на интенсивность метаболизма и протекание биохимических и физиологических процессов [55, 56]. В связи с этим представляло интерес исследовать сезонную динамику ХЭ в тканях рыб. Было установлено, что активность АХЭ в среднем и промежуточном мозге окуня изменяется в течение года и имеет четко выраженную сезонную периодичность (Рис. 8) [57].

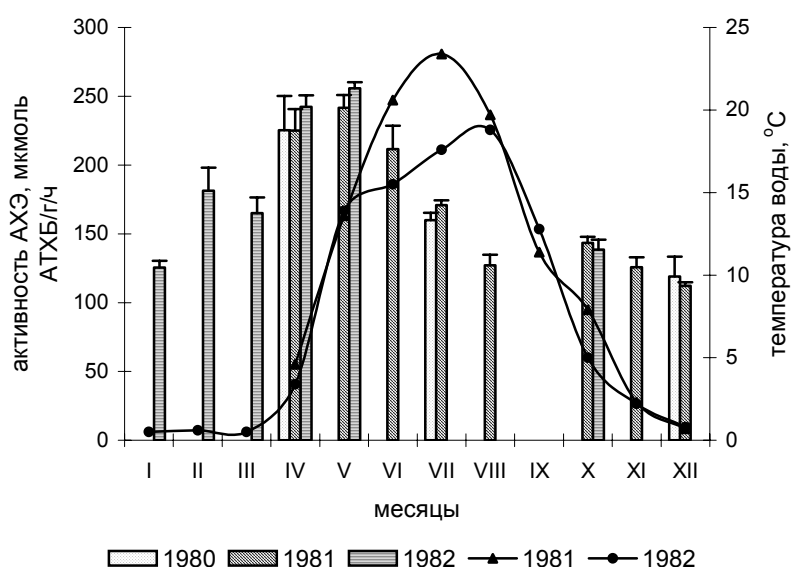


Рис. 8. Сезонные изменения активности АХЭ (столбики) в среднем и промежуточном мозге окуня (*Perca fluviatilis* L) и температуры воды (линия) в месте его обитания в Рыбинском водохранилище в период 1980-1982гг. Столбики – активность АХЭ, линии – температура воды.

Динамика активности АХЭ не зависит от пола, но имеет обратно пропорциональную зависимость от длины тела и веса мозга. В целом, летом она выше, чем зимой и следует сезонным изменениям температуры воды. Положительная корреляция активности АХЭ и температуры воды, полученная при температурой адаптации окуня в лабораторных условиях, подтверждает это заключение. Вместе с тем обращают на себя внимание следующие факты: а) заметное увеличение активности АХЭ начинается в феврале, когда температура воды находится все еще на минимальном годовом уровне; б) наибольшая активность фермента наблюдается в апреле - мае, а максимальные среднемесячные значения температуры воды приходятся на июль-август.

Наиболее вероятно предположить, что изменение фотопериода запускает целый комплекс биохимических и физиологических перестроек в организме рыб, включая и метаболизм АХЭ [58]. Наивысший уровень активности АХЭ в апреле-мае приходится на период нереста рыб. Сходные с окунем результаты получены и для плотвы [59]. Связь изменений активности АХЭ в мозге рыб с нерестом подтверждена экспериментальным путем в лабораторных условиях [60]. Поскольку известно, что нерест - это чрезвычайно стрессирующий период в биологическом цикле рыб [54], то причина увеличения активности АХЭ в мозге вероятнее всего имеет стрессорную природу, что хорошо согласуется с ее участием в стресс-ответе и обсуждается в предыдущем разделе. Сходные сезонные изменения активности АХЭ в мозге и БУХЭ в плазме и печени отмечены нами у плотвы. Таким образом, в основе сезонных изменений активности АХЭ мозга рыб лежат как эндогенные причины, так и факторы окружающей среды.

Роль ингибирования АХЭ мозга ДДВФ в нарушении пищевого поведения рыб.

Известно, что пищевое поведение рыб нарушается при действии сублетальных концентраций ФОС [61]. При этом наиболее обычным типом нарушения является уменьшение количества потребляемой пищи и/или прекращение питания [62]. От-

носительно ФОС известно, что основной мишенью их действия в организме является АХЭ - один из важных компонентов холинергической нервной системы, как в ее центральных, так и периферических отделах [6]. Ингибирование АХЭ ведет к нарушению проведения нервного импульса и этот феномен хорошо известен не только у млекопитающих, но и у рыб [7]. Эти факты позволяют предположить, что основной механизм подавления поведения рыб при сублетальном токсическом действии ФОС на самом деле заключается в блокировании проведения нервного импульса в соответствующих отделах ЦНС, которое может приводить к нарушению холинергической регуляции поведения рыб. Однако значение этих эффектов для токсикогенной патологии поведения рыб до сих пор оставалось неясным.

Наши исследования продемонстрировали, что 96 ч экспозиция рыб к ДДВФ в сублетальной концентрации приводит к достоверному снижению активности АХЭ в их мозге (Табл.10) [63].

Таблица 10.

Влияние экспозиции к ДДВФ (1.87 мг/л, 1/15 ЛК₅₀ за 48 ч) и инъекции ТМБ-4 на активность АХЭ мозга годовиков леща (*Abramis brama* L.).

Период	Контроль	ДДВФ	Активность АХЭ, % от контроля
96 ч экспозиции к ДДВФ	1463 ± 98 [*]	471 ± 19 ^a	32
12 ч реабилитации в чистой воде	-	663 ± 51 ^a	54
12 ч после инъекции раствора Рингера	1221 ± 112	619 ± 39 ^a	51
12 ч после инъекции ТМБ-4	-	1006 ± 83	82

* представлены средние значения активности АХЭ и ошибки средней ($\bar{x} \pm m_x$; мкмоль АТХИ/ г ткани/ ч); N = 10; ^a – различия с контролем достоверны при p=0.01

Изучение пищевого поведения леща показало, что уже спустя 24 ч после начала действия ДДВФ на рыб у них также достоверно снижается количество потребляемого корма (Табл.11).

В результате различных вариантов реабилитационных процедур, включая инъекции фармакологических препаратов, обладающих антидотным действием, активность АХЭ и количество потребляемого корма после прекращения действия токсиканта менялся в различной степени. Ни при замене токсиканта на чистую воду, ни после инъекции раствора Рингера как активность АХЭ, так и пищевое поведение не восстанавливались до нормы в течение всего эксперимента. В противоположность этому рыбы, инъецированные ТМБ-4, за такое же время реабилитации демонстрируют почти полное восстановление активности АХЭ до нормы и одновременно пищевого поведения до контрольного уровня.

Таблица 11.

Количество потребляемого корма при разных вариантах экспозиции годовиков леща (*Abramis brama* L.) к ДДВФ

Вариант эксперимента	Количество хирономид, штук на 3 рыбы в день		
	до экспозиции	96 ч экспозиции	72 ч реабилитации
Контроль	86.8 ± 1.0*	88.0 ± 0.7	89.5 ± 0.3
ДДВФ	85.2 ± 1.3	57.4 ± 1.9 ^a	58.0 ± 2.1 ^a
ДДВФ + атропин	81.3 ± 2.7	66.3 ± 2.5 ^a	88.5 ± 1.2
ДДВФ + ТМБ-4	80.9 ± 2.6	63.3 ± 7.5 ^a	87.5 ± 0.9

* представлены средние значения количества съеденных хирономид и ошибки средней ($\bar{x} \pm m_x$); N = число наблюдений; ^a – различия с контролем достоверны при $p=0.01$

Как известно из исследований на млекопитающих, реактивирующий эффект ТМБ-4 связан со значительным ускорением процесса дефосфорилирования активного центра АХЭ после его фосфорилирования в процессе взаимодействия с ФОС. Однако у млекопитающих этот реактиватор очень слабо проникает через гематоэнцефалический барьер. Поэтому его обычно используют как антидот периферического действия. Как следует из полученных данных, у рыб, в отличие от млекопитающих, ТМБ-4 хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер и оказывает антидотный эффект центрального действия. Восстановление нормального пищевого поведения наблюдается и при инъекции другого антидота, известного как блокатора м-холинорецепторов центрального действия. Полученные результаты наглядно демонстрируют функциональную связь между восстановлением активности АХЭ и нормального функционирования холинергических синапсов в мозге рыб, с одной стороны, и эффективностью их пищевого поведения, с другой.

Роль ХЭ в избирательной устойчивости различных видов рыб к летальному действию ДДВФ *in vivo*.

Известно, что животные, в том числе и рыбы, могут значительно различаться по устойчивости к острому действию ФОС [6, 64]. Для рыб вопрос о причинах селективности остается открытым. Вместе с тем, исходя из данных, полученных на млекопитающих и насекомых, предполагается, что основные возможные причины этого феномена следующие: а) различная чувствительность АХЭ мозга рыб к действию ФОС; б) неодинаковая скорость их поступления в организм у разных видов рыб; в) различия в скорости детоксикации в организме рыб и г) защитная функция БХЭ плазмы. Исследование показало, что различия между окунем и карпом в устойчивости к острому действию ДДВФ достигают около 40 раз: значения $ЛК_{50}$ ДДВФ для карпа и окуня при экспозиции 48 часов равняются 21.9 и 0.59 мг/л, соответственно [34, 64].

Как продемонстрировано выше, по чувствительности к

ингибированию ДДВФ *in vitro* АХЭ мозга рыб, включая окуня и карпа, фактически не различается (табл.2), что указывает на низкую значимость этого фактора в формировании межвидовых различий в их устойчивости к действию токсиканта. Вместе с тем, уровень удельной активности АХЭ в мозге у карпа примерно в 3 раза выше, чем у окуня (табл. 9), что может быть одной из причин более высокой устойчивости карпа к ДДВФ. В пользу этого свидетельствует ранее установленный факт, что более устойчивая к ФОС популяция рыбы гамбузии обладает и более высоким уровнем активности АХЭ в периферическом отделе нервной системы [65]. Кроме того, собственные данные и результаты других исследователей показывают, что в целом, представители сем. *Cyprinidae* обладают большей устойчивостью к токсическому действию ФОС, чем виды из других семейств, включая *Percidae* [24, 66]. Наряду с этим, они имеют и более высокую активность АХЭ в мозге (табл. 1). Можно предположить, что чем выше активность АХЭ, тем требуется большая доза ингибитора, чтобы снизить ее уровень до летального. Однако это не позволяет полностью объяснить существующие между окунем и карпом различия в устойчивости к ДДВФ.

Исследование детоксикационной способности печени у этих видов выявило, что у окуня она в 7 раз ниже, чем у карпа. Причем выявленные различия связаны как с более высокой удельной скоростью ферментативной детоксикации ДДВФ, так и с большей массой печени у карпа.

Кроме того, анализ динамики содержания ДДВФ в крови этих видов в начальный период их контакта с токсикантом свидетельствует и о межвидовых различиях в скорости его поступления в организм рыб: у окуня она примерно в 4 раза выше, чем у карпа.

Учитывая высокий уровень активности БуХЭ в крови карповых рыб (табл.1) и ее высокую чувствительность к ДДВФ (табл. 2) исследована ее защитная роль при остром отравлении рыб ФОС. Поскольку напрямую это измерить не

представлялось возможным, было проведено сравнение острой токсичности ДДВФ для двух фенотипов леща: содержащего в крови БуХЭ и не имеющего ее. Результаты показали, что при экспозиции 48 ч значения $ЛК_{50}$ у двух фенотипов леща достоверно не отличаются, составляя соответственно 133.9 и 135.2 мг/л. Полученные данные позволяют заключить, что, по крайней мере, при остром действии ДДВФ на леща наличие БуХЭ в крови не защищает его от отравления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пресноводных костистых рыб присутствуют ХЭ, которые по субстратной специфичности, чувствительности к ингибиторам и кинетическим свойствам могут быть отнесены к двум основным типам: АХЭ (К.Ф. 3.1.1.7) и БуХЭ (К.Ф. 3.1.1.8.). Однако они имеют свои особенности, отличающие их от типичных ХЭ млекопитающих.

Активность АХЭ обнаружена во всех проанализированных органах и плазме крови у всех исследованных видов рыб, а БуХЭ - только в плазме, печени и селезенке у представителей сем. Cyprinidae. Независимо от вида наибольшая активность АХЭ выявляется в мозге, а БуХЭ - в плазме, где ее доля в общей активности ХЭ составляет 83-95%. Уровень активности БуХЭ в плазме коррелирует с активностью АХЭ в мозге и плазме.

Активность ХЭ у рыб не зависит от пола и циклически изменяется в течение года, следуя сезонным изменениям температуры воды: летом она в 2-3 раза выше, чем зимой. Однако наивысшие ее значения наблюдаются во время нереста, что отражает стрессорный характер и общую направленность изменений метаболизма в этот период.

При остром стрессе, индуцированном инъекцией адреналина, активность АХЭ в мозге рыб изменяется. Выявленные изменения носят двухфазный характер: в первые минуты происходит снижение, а в последующие часы – повышение активности фермента. Повышенный уровень активности АХЭ

сохраняется не менее трех суток после инъекции.

АХЭ в мозге играет роль в формировании пищевого поведения рыб. Снижение ее активности при хроническом действии ФОС на рыб вызывает дискоординацию пищевого поведения и приводит к снижению количества потребляемого корма. Реактивация АХЭ восстанавливает нормальный уровень питания. Снижение активности в процессе экспозиции к токсиканту происходит значительно быстрее (несколько часов), чем ее восстановление до нормы после прекращения контакта с токсикантом.

Чувствительность ХЭ к ФОС и уровень их активности в тканях вносит незначительный вклад в избирательность токсического действия на рыб. Основные причины избирательности - межвидовые различия в скорости проникновения токсиканта в организм рыб и эффективности его детоксикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Номенклатура ферментов. Рекомендации междунар. биохим. союза А.Е. Браунштейн, ред. М.: Мир, 1979.
- [2] Taylor P. The Cholinesterases // J. Biol. Chem. 1991. V.266, N7. P.4025-4028.
- [3] Бресткин А.П., Кузнецова Л.П., Моралев С.Н., Розенгарт Е.В., Эпштейн Л.М. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: ТИНРО-Центр, 1997. 466с.
- [4] Моралев С.Н., Розенгарт Е.В. Современные представления о структуре и каталитических свойствах холинэстераз позвоночных и беспозвоночных// Ж. эвол. биохим. физиол. 1999. Т. 35. №1. С. 3-14.
- [5] Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л.: Медицина, 1964. 382с.
- [6] Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л.: Медицина, 1978.
- [7] Mineau P. (Ed.), Chemicals in Agriculture. Vol. 2. Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Amsterdam – London - New York – Tokyo: Elsevier, 1991. 348p.
- [8] Brestkin A.P., Brick I.L., Grigor'eva G.M. Comparative Pharmacology of Cholinesterases // Intern. Encycl. Pharmacol. Therap. 1973. Sect. 85. V.1. P.241-344.
- [9] Козловская В.И., Мензикова О.В., Чуйко Г.М., Майер Ф.Л. Холинэстеразы водных животных // В кн.: Физиология, биохимия и токси-

- кология пресноводных животных (Флеров Б.А., ред). Л.: Наука, 1990. №57(60). С. 42-66.
- [10] Kozlovskaya V.I., Mayer, F.L., Menzikova, O.V., Chuyko G.M. Cholinesterases of Aquatic Animals // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1993. V.132. P. 117-142.
 - [11] Козловская В.И., Чуйко Г.М. Холинэстеразы сыворотки крови рыб сем. Cyprinidae с различной устойчивостью к хлорофосу // Физиология и паразитология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР, № 38 (41) / Под ред. Н.В. Буторина, Б.А. Флерова. Л.: Наука, 1979. С. 32-41.
 - [12] Ружинская Н.Н., Гдовский П.А., Мензикова О.В. Влияние аносмии и деэфферентации на активность ацетилхолинэстеразы обонятельной луковицы карася // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР. Вып.57(60). Л., 1990. С.79-84.
 - [13] Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. Оценка функционального развития обонятельной и зрительной систем рыб по активности ацетилхолинэстеразы // Вопр. ихтиол. 1990. Т. 30. № 2. С. 305-314.
 - [14] Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. Локализация ацетилхолинэстеразы в обонятельной луковице карпа *Cyprinus carpio* // Ж. эвол. биохим. физиол. 1990а. Т.26. №3. С.323-327.
 - [15] Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. Ацетилхолинэстераза в обонятельной системе рыб // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР. Л., Наука 1990б. №57. С.67-78.
 - [16] Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. Ультраструктурная локализация ацетилхолинэстеразы в обонятельной луковице карпа *Cyprinus carpio* // Ж. эволюц. биохим. и физиол. 1992а. Т.28, N 6. С.715-719.
 - [17] Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. Особенности локализации и возможная роль ацетилхолинэстеразы в обонятельной луковице рыб // Сенсор. системы. 1992б. Т.6, N3. С.26-29.
 - [18] Козловская В.И., Флеров Б.А. Фосфорорганические пестициды и их опасность для водных животных // в кн.: Теоретические вопросы водной токсикологии. Матер. 3-го советско-американского симпозиума. 2-6 июня 1979 г., Борок, СССР. Л.: Наука, 1981. С.77-87.
 - [19] Козловская В.И., Степанова В.М., Чуйко Г.М. Обратимость интоксикации карпа карбофосом // В кн.: Реакция гидробионтов на загрязнение. Ред. Н.С. Строганов. М., Наука, 1983. С.191-198.
 - [20] Козловская В.И., Павлов Д.Ф., Селютин А.П., Жук Л.И. Содержание коллагена позвоночника и активность ацетилхолинэстеразы мозга у плотвы Рыбинского водохранилища // Физиол. аспекты токсикол. гидробионтов. Ярославль, 1989. С.19-30.

- [21] Козловская В.И., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Халько В.В, Винников Ю.Я, Анохин С.В. Влияние загрязняющих веществ на состояние рыбы Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища (БА Флеров, ред.). Рыбинск: ИБВВ РАН, 1990.С.123-143.
- [22] Козловская В.И, Чуйко Г.М. Изменения ацетилхолинэстеразы мозга окуня (*Perca fluviatilis* L.) под воздействием хлорофоса // Гидроб. ж. 1985. Т. 21. № 5. С. 49-53.
- [23] Kozlovskaya V.I. Effects of organophosphorus pesticides on aquatic animals: an assessment of their toxicity // In: Mehrle P.M., Gray R.H., Kendal R.L. (eds). Toxic substances in the aquatic environment: international aspects. Paper from international symposium held in conjunction of the 112th annual meeting of the American Fisheries Society. Bethesda, MD: AFS. 1985. P. 9-22.
- [24] Чуйко Г.М. Биохимические и физиологические механизмы различной устойчивости пресноводных костистых рыб к действию хлорофоса и дихлофоса // Автореф. дисс. к.б.н. Л.. 1987а. 22с.
- [25] Чуйко Г.М. Холинэстераза сыворотки крови леща и его устойчивость хлорофосу // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1987б. №74. С. 55-57.
- [26] Герасимов Ю.В., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М., Козловская В.И. Пищевое поведение и некоторые биохимические параметры в мозге леща при хроническом действии кадмия.// В кн.: Поведение рыб. Нтр. Всесоюз. конф., Москва, 20-24 ноября, 1989. М.: ИЭМЭЖ. 1989. С. 92.
- [27] Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М., Герасимов Ю.В. Содержание белка и активность ацетилхолинэстеразы в мозгу леща при хроническом действии кадмия// Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1990. N89. С.72-77.
- [28] Козловская В.И., Мартемьянов В.И. Активность ацетилхолинэстеразы мозга карпа (*Cyprinus carpio* L.) при острой и хронической интоксикации фенолом // Гидроб. ж. 1991. Т.27, №4. С.75-81.
- [29] Чуйко Г.М., Павлов Д.Ф., Подгорная В.А., Степанова В.М. Изменение активности ацетилхолинэстеразы и содержания водорастворимого белка в мозге мозамбикской тиляпии (*Oreochromis mossambicus* Peters) при хроническом действии кадмия, нафталина и дихлофоса// Биол. внутр. вод. 2001. №3. С. 72-79.
- [30] Чуйко Г.М., Козловская В.И., Степанова В.М. Эстеразы эфиров карбоновых кислот сыворотки крови синца (*Abramis ballerus*), плотвы (*Rutilus rutilus*), леща (*Abramis brama*), окуня (*Perca fluviatilis*)// ВИНТИ, 22.11.83, №6193-83Деп. 1983. 20с.

- [31] Желнин Ю.Ю., Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Активность холинэстераз плазмы крови различных видов пресноводных костистых рыб // Биол. внутр. вод. 1998. №1. С74-79.
- [32] Chuiko G.M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide // Comp. Biochem. Physiol. 2000. V.127C. N. 3. P.233-242.
- [33] Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Zhelnin Y.Y. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Brain and Plasma of Several Freshwater Teleosts: Cross-species and Cross-family Differences// Comp. Biochem. Physiol. 2003. V.135B. N 1. P.55-61.
- [34] Чуйко Г.М. Сравнительно-биохимическое исследование холинэстераз пресноводных костистых рыб бассейна Рыбинского водохранилища // Автореф. дисс. д.б.н. С-П. 2004. 40с.
- [35] Kozlovskaya V.I., Chuiko G.M., Lapkina L.N., Nepomnyashchikh V.A. Resistance of aquatic animals to organophosphorus pesticides and its mechanisms // In Problems of Aquatic Toxicology, Biotesting and Water Quality Management: Proc. of USA-USSR Symposium, Borok, Yaroslavl Oblast, July 30-August 1, 1984. (In: Ryans RC, ed). 1986. Athens, GA. EPA Research Laboratory. P. 37-54.
- [36] Розенгарт В.И., Балашова Е.К., Шерстобитов О.Е., Фрейдлин Т.С. Быстрый метод количественного определения хлорофоса и сравнительные данные о его антихолинэстеразной эффективности // Гигиенич. и биологич. аспекты применения пестицидов в условиях Ср. Азии и Казахстана: Матер. Всесоюзн. симпоз. Душанбе, 1978. С. 241-244.
- [37] Козловская В.И., Чуйко Г.М., Мензикова О.В., Петухова В.А. Способ определения фосфорорганических пестицидов в воде// Автор. свидет. SU №1359741 A1. 1987.
- [38] Козловская В.И., Чуйко ГМ, Мензикова О.В., Подгорная В.А. Энзиматический метод определения в воде фосфорорганических пестицидов и их метаболитов // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1996. №100. С. 65-72.
- [39] Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Лаврикова И.В. Фосфорорганическое соединение 0,0-диметил-0-(2,2-дихлорвинил)фосфат как селективный ингибитор для отдельного определения активности ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы у плотвы *Rutilus rutilus* // Ж. эвол. биохим. физиол. 2002. Т. 38, С. 203-207.
- [40] Чуйко Г.М., Портли Н.М., Подгорная В.А., Бороздинская О.А. Ацетилхолинэстераза мозга окуня (*Perca fluviatilis* L.) из Рыбинского водохранилища // В кн.: Н.Н. Немова (ред) «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск: ИБ КарНЦ РАН, 2005, С. 202-207.

- [41] Жуковский Ю.Г., Куценко С.А., Кузнецова Л.П., Сочилина Е.Е., Дмитриева Е.Н., Фарцейгер Н.Л., Тонкопий В.Д., Коркишко Н.Н., Козловская В.И., Фельд В.Э. Кинетическое исследование холинэстеразной активности сыворотки крови пресноводной костистой рыбы *Abramis ballerus* // Ж. эвол. биохим. и физиол. 1994. Т. 30. №2. С. 177-184.
- [42] Бресткин А.П., Кабачник М.И., Розенгарт Е.В. О субстратной специфичности холинэстераз // ДАН СССР. 1984. Т.274. С.960-965.
- [43] Вержбинская Н.А., Лейбсон Н.Л. Биохимические и цитохимические характеристики системы ацетилхолина в центральной нервной системе позвоночных животных// В кн.: Проблемы нейрехимии. М-Л.: Наука, 1966. С.181-191.
- [44] Westlake G.E., Martin A.D., Stanley P.I., Walker C.H. Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain // Comp.Biochem.Physiol. 1983. V.76C. P.15-24.
- [45] Grigor'eva G.M., Konitcheva N.V. Butyrylcholinesterase in the visual ganglia of the squid *Todarodes sagittatus* L, (Cephalopoda). Isolation, molecular forms, interaction with substrates and inhibitors// Comp. Biochem. Physiol. 1993. V.105C. P.127-140.
- [46] Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N.A., Camp, S., Marchot, P., Berman, H.A. Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition // Toxicol. Let. 1995. V. 82/83. P. 453-458.
- [47] Брик И.Л. Свойства ацетилхолинэстеразы головного мозга карпа // Биохимия. 1969. Т. 34. № 1. С. 90-95.
- [48] Contestabile, A. Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cerebellum of some seawater teleosts // Brain Research. 1975. V.99. P. 425-429.
- [49] Contestabile, A. Acetylcholinesterase concentration in the optic tectum and in the two main cerebellar subdivisions of three freshwater and three marine teleosts // Brain Research. 1978. V.157. P. 182-185.
- [50] Contestabile, A., Zannoni, N. Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cerebellum and optic tectum of four freshwater teleosts // Histochemistry. 1975. V. 45. P. 279-288.
- [51] Pavlov D.F., Chuiko G.M., Shabrova A.G. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.) // Comp. Biochem. Physiol. 1994. V. 108C. N 1. P. 113-115.
- [52] Алексидзе Н.Г., Балавадзе М.В. Об участии аденилатциклазной системы в индуктивном синтезе ацетилхолинэстеразы в головном мозге // Бюлл. Экспер. Биол. 1977. Т. 83. №5. С.545-548.
- [53] Сибуль И.К. О влиянии гормонов на активность ацетилхолинэстеразы в различных отделах центральной нервной системы// В кн.: Проблемы нейрехимии (Палладин А.В., ред). М-Л.: Наука, 1966. С.192-196.

- [54] Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М., Наука, 1972. 367 с.
- [55] Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977, 398с.
- [56] Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука. 1981. 136с.
- [57] Чуйко Г.М., Козловская В.И. Сезонные изменения активности ацетилхолинэстеразы мозга окуня (*Perca fluviatilis* L.) // В кн. Сабурова Г.Е. (ред.) Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ, 1989. С. 27-38.
- [58] Baslow M.H., Nigrelli R.F. The effect of thermal acclimation on brain cholinesterase activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus* // Zoologica. 1964. V.49. N.1. P.41-51.
- [59] Chuiko G.M., Zhelnin Y., Pod'gornaya V.A. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L.): a freshwater fish from Northwest Russia // Comp. Biochem. Physiol. 1997. V. 117C. N 3. P. 251-257
- [60] Pavlov D.F. Brain acetylcholinesterase activity in relation to induced reproductive activity in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Comp. Biochem. Physiol. 1994. V. 109A. N2. P. 231-233.
- [61] Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya V.I. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout // Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1990. V.19. P. 380-385.
- [62] Sandheinrich, M.B., Atchison, G.J. Sublethal copper effects on bluegill, *Lepomis macrochirus*, foraging behaviour // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1990. V.46. P. 1977
- [63] Pavlov DF, Chuiko GM, Gerassimov YV, Tonkopiye VD. Feeding behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide // Comp. Biochem. Physiol. 1992. V. 103C. No 3. P. 563-568
- [64] Chuyko G.M. Various resistance mechanisms of carp (*Cyprinus carpio* L) and perch (*Perca fluviatilis* L) to DDVP, an organophosphorus compound. In: Ryans, R.C., (Ed.). Fate and Effects of Pollutants on Aquatic Organisms and Ecosystems: Proceedings of USA-USSR Symposium, Athens, Georgia, October 9-21, 1987. EPA Research Laboratory, Athens, GA, 1988. P. 78-89.
- [65] Chambers J.E. The relationship of esterase to organophosphorus insecticide tolerance in mosquitofish // Pesticide Biochem. Physiol. 1976. V.6. P. 517-522.
- [66] Frumin G.T., Chuiko G.M., Pavlov D.F., Menzikova O.V. New rapid method to evaluate median effect concentrations of xenobiotics in hydrobionts // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1992. V.49. No 3. P.361-367.

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ
ПИЯВОК НА ДЕЙСТВИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ
ПЕСТИЦИДОВ**

© 2007 г. Л.Н. Лапкина, Г.М. Чуйко

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

ВВЕДЕНИЕ

Пиявки (кл. Hirudinea, тип Annelida) обитают практически во всех пресноводных экосистемах. Они отличаются широким биолого-экологическим разнообразием: среди них имеются кровососы-эктопаразиты, хищные черви; встречаются стено- и эврибионты; водные и амфибионтные виды; организация одних примитивна, у других достигла высокого уровня развития. Пиявки - ценный пищевой объект для водных беспозвоночных (личинок стрекоз, жуков) а также рыб, выхухоли, водоплавающих птиц. Некоторые их виды встречаются в природе в массовом количестве [1].

При этом пиявки в целом известны как одна из наиболее резистентных групп водных животных, сохраняющих жизнеспособность в условиях естественного и антропогенного загрязнения вод, губительного для многих других представителей гидрофауны [2]. Среди них имеются виды, за численностью которых необходим контроль: пиявки рода *Proteoclepsis* факультативно паразитируют в носовой полости, глотке, конъюнктиве глаз водоплавающих птиц; пиявки сем. *Piscicollidae* паразитируют на костистых и хрящевых рыбах, черепахах и ракообразных; медицинская пиявка сосет кровь теплокровных животных и не пренебрегает кровью рыб. Гематофаги служат переносчиками различных кровепаразитов своих хозяев, хищные пиявки также являются источником и причиной инвазий в природе, поскольку участвуют в циклах развития трематод, цестод, нематод.

Среди химических средств борьбы с пиявками особое место занимают фосфорорганические пестициды (ФОП). Реакция пиявок на их токсическое действие изучена недостаточно: экспериментальные данные малочисленны, скудны, касаются лишь некоторых отдельных видов или пиявок в целом. Результаты исследований, предпринятых нами по сравнительной устойчивости гидробионтов и в частности аннелид к ФОП [3-6], дополняют банк данных по биоцидной активности пестицидов для водных животных, в том числе эктопаразитических и хищных видов пиявок. Одновременно они являются отправной точкой для изучения механизмов устойчивости червей к антихолинэстеразным веществам, к коим принадлежат и ФОП.

Известно, что первопричина отравления ФОП – ингибирование в организме животных фермента холинэстеразы (ХЭ), и как одно из его следствий – блокада холинэргических нервно-мышечных синапсов. Механизм действия ФОП изучен у насекомых и теплокровных животных [7], а также у некоторых гидробионтов, в основном рыб и моллюсков [8-10]. Свойства ХЭ пиявок, ее чувствительность к ядам антихолинэстеразного действия (*in vivo* и *in vitro*) оставались практически не исследованными, и потому попали в поле нашего внимания [11,12].

В работе приводятся экспериментальные данные, по специфическим и не специфическим реакциям пиявок на действие антихолинэстеразных веществ, выполненные в разные годы. Инициатором и соавтором многих из них был Борис Александрович Флеров.

Описана клиника отравления пиявок ФОП, выявлен ряд ответных реакций, их пороги и причинно-следственные связи. Обсуждается роль биолого-экологических особенностей червей, места их в филогенетическом ряду на показатели чувствительности и устойчивости пиявок к ФОП.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Внешние проявления отравления пиявок ядами антихолинэстеразного действия.

Внешний токсический эффект состоит из комплекса

симптомов отравления. Часть из них неспецифична для ядов и вида пиявок: изменение активности, усиление дыхательных движений, отрыгивание пищи, дефекация, выделение слизи, гиперемия, кровоизлияния, нарушение водного обмена. Степень их выраженности зависит от характера яда и его концентрации, видовой и индивидуальной чувствительности червей.

Другие симптомы специфичны и до такой степени характерны только для определенной группы токсикантов, что их можно использовать в качестве показательной функции ее идентификации. В частности, такие сугубо специфичные признаки отравления вызывают у пиявок ФОП и другие вещества антихолинэстеразного действия.

В основе характерных симптомов лежат 2 процесса - контрактура различных мышц и их последующее расслабление. Строение кожно-мускульного мешка у пиявок разных видов различно (рис.1), как и морфология мышечных волокон, слоев его образующих [13]. Это отражается в видоспецифичном внешнем проявлении симптомокомплекса у представителей не только различных семейств, но и родов. Так картина интоксикации ФОП у представителей сем плоские (Glossiphoniidae) *Protolepsis tessulata*, *Hemiclepsis marginata*, *Glossiphonia complanata*, *Helobdella stagnalis* выглядит весьма различно [3].

У всех видов симптомы развиваются в строго определенной последовательности, им предшествует латентный период. Продолжительность его различна у разных видов, особей и зависит от пестицида, его концентрации. Она может служить мерилom чувствительности пиявок к определенному токсическому раствору. Чем короче латентный период, тем чувствительнее черви к действию токсиканта. Пиявки проявляют видовые различия по чувствительности, по симптомам отравления и по их обратимости.

Симптомокомплекс отравления антихолинэстеразными ядами представителей 3 семейств пиявок: плоских (Glossiphoniidae), рыбьих (Ichthyobdellidae=Piscicolidae), глоточных (Herpobdellidae=Erpobdellidae) в данной работе не приводится, он описан ранее [3, 4].

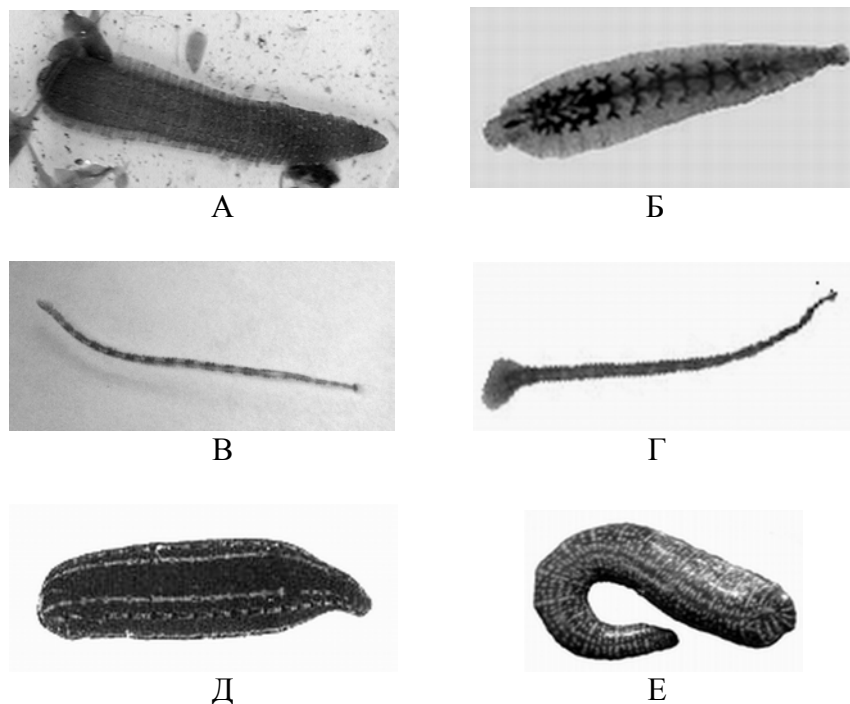


Рис. 1. Представители 4 семейств пиявок.

А - *Protocleipsis tessulata*, Б - *Hemicleipsis marginata* (сем плоские); В - *Caspiobdella fadejewi*, Г - *Piscicola peometra* (сем рыбы); Д - *Hirudo medicinalis* (сем челюстные) и Е - *Egrobella octoculata* (сем глоточные).

Обратимся к медицинской пиявке (*Hirudo medicinalis*) сем. челюстные (Hirudinidae). Картина ее отравления ФОП (армином, ДДВФ, димекроном, параоксоном, фозалоном, фосдрином, фоксимом, хлорофосом), карбаматами (севинном, прозеринном, эзеринном), а также аминостигмином и такрином одинаковая и соответствует описанию, приводимому в табл.1.

Начинается она с изменения характера плавания: синусоидальные движения пиявки сменяются «С»-образными с постепенным закручиванием в спираль каудального конца.

Таблица 1.

Специфичные симптомы отравления и последовательность их проявления у пиявки *Hirudo medicinalis* в растворах антихолинэстеразных веществ.

Описание симптомов, стадия	Фото
Латентный период, симптомы отсутствуют. Стадия 1	
Подгиб задней присоски, неспособность фиксировать ее к субстрату. Стадия 2.	
Все более сильное закручивание каудального конца пиявки вокруг задней присоски. Стадия 3	
Тело в форме улитки; двигательная активность прекращена. Стадия 4.	
Тело в форме «штопора», (контрактура диагонального слоя мышц). Стадия 5.	
Переход из «штопора» в 1-2 см «кубышку», (контрактура продольных мышц). Стадия 6.	
Глотка открывается, начинают работать челюсти, засасывается раствор, масса червя увеличивается до 130-200 %. Стадия 7.	
Выделяется обильно моча, масса пиявки падает до 100% и ниже, расслабляются продольные мышцы, тело удлиняется. Стадия 8.	
Тело распрямлено, достигает своих нормальных размеров 5-7 см. Стадия 9.	
Дорзальные мышцы сокращены более вентральных, тело пиявки дугообразно изогнуто. Стадия 10.	

Далее активные движения червя прекращаются, и следует череда различных патологических поз, не свойственных интактным червям. Качественное проявление симптомокомплекса отравления у пиявок в остром, подостром и хроническом опыте одинаково, но различается по времени возникновения, продолжительности каждого из симптомов и глубине интоксикации.

В остром опыте симптомы протекают за минуты или часы (в зависимости от токсиканта и его концентрации); в подостром - днями; в хроническом эксперименте сохраняются неделями и месяцами в начальном их проявлении (глубокие стадии интоксикации отсутствовали).

У молоди медицинской пиявки в растворе хлорофоса 5 мг/л весь процесс интоксикации до гибели червей длится менее 10 часов; в 0.5 мг/л развивается также почти синхронно - к концу первых суток все особи достигают легкого отравления (табл.1, стадия 2); в растворе 0.05 мг/л (подострый опыт, экспозиция 3 недели) эти же симптомы возникают у разных особей в разное время: через сутки - у наиболее чувствительных, через 3 недели у самых устойчивых.

Различия в скорости нарастания интоксикации сохраняются до конца эксперимента. Выявляется прямая зависимость между продолжительностью латентного периода (чувствительностью) и выживаемостью (устойчивостью), то есть наиболее чувствительные к пестициду особи наименее резистентные (рис. 2).

В подостром, как и в хроническом экспериментах, проявляется гетерогенность популяции пиявок по чувствительности и устойчивости к пестициду, которая в острых опытах нивелируется под влиянием высоких концентраций, тем сильнее, чем токсичнее раствор.

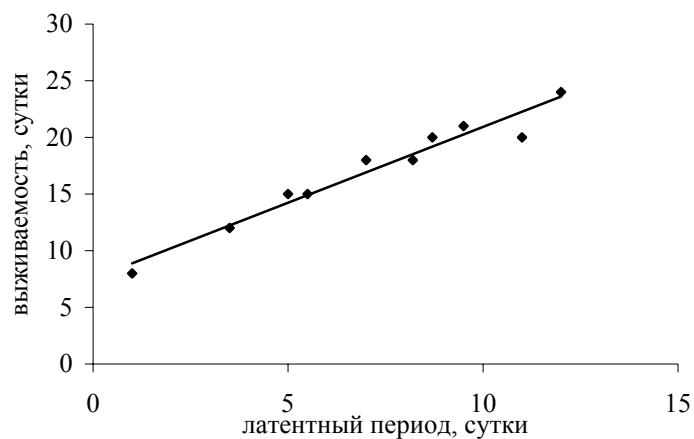


Рис. 2. Зависимость выживаемости молоди медицинской пиявки в растворе хлорофоса 0.05 мг/л от продолжительности латентного периода.

Хищная пиявка *Haemopsis sanguisuga* (сем. челюстные) более устойчива к ФОП, по сравнению с *Hirudo medicinalis*. Это отражается в различной чувствительности червей к ДДВФ - латентный период у *Haemopsis* более продолжительный, и различия тем больше, чем меньше концентрация яда (табл.2).

Таблица 2.
Чувствительность пиявок сем. челюстные к разным концентрациям ДДВФ.

Вид	Эффект, % особей	Концентрация ДДВФ, мг/л			
		2.5	1	0.25	0.1
<i>Hirudo</i>	E ₅₀	0.5 ^a	1	2	12
<i>medicinalis</i>	E ₁₀ -E ₁₀₀	0.4-0.6	0.6-2.5	1-4.3	7-16
<i>Haemopsis</i>	E ₅₀	0.8	3	10	>36
<i>sanguisuga</i>	E ₁₀ -E ₁₀₀	0.7-0.9	1.8-8.3	6-24	>48

^a время латентного периода, часы.

Симптомы отравления большой ложноконской пиявки близки к таковым у медицинской пиявки, но динамика изменения массы тела в летальных растворах ФОП у них различна (рис. 3).

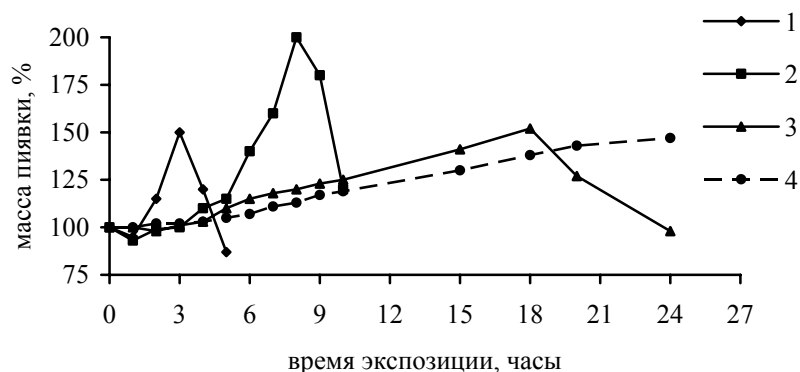


Рис. 3. Изменение массы тела у 2 видов пиявок в растворах хлорофоса.

Hirudo medicinalis: 10 мг/л (1), 5 мг/л (2) и 1 мг/л (3) — сплошные линии; *Haemopsis sanguisuga* — 20 мг/л (4) — пунктирная линия.

Это связано с тем, что на стадии 7 у *Haemopsis sanguisuga* не происходит засасывания воды через глотку, и, соответственно, отсутствует усиленное выведение мочи на стадии 8.

У большинства исследованных видов пиявок тяжелые стадии интоксикации сопровождаются постепенным увеличением массы тела по типу, свойственному большой ложноконской пиявке. Это не является специфичным симптомом для острого отравления ФОП, т.к. аналогичные признаки наблюдаются также при отравлении фенолом и хлорорганическими пестицидами [3, 4]. Однако у медицинской пиявки динамика массы тела показательна для острого отравления антихолинэстеразными веществами (фазность, вызванная заглатыванием раствора, и затем интенсивным его выведением). Она зависит от концентрации раствора, времени экспозиции,

а также от используемого ФОП.

Моча взрослой пиявки может быть легко собрана¹ и проанализирована с помощью тест-объекта нитчатки (особь пиявки, только что вышедшая из кокона), помещенной в нее. Очень быстро тест-объект проявляет весь «классический» набор симптомов отравления, соответствующий антихолинэстеразным веществам (табл. 1), что указывает на их присутствие, в частности ДДВФ, в выделяемой пиявкой субстанции.

У млекопитающих «неизменные ФОС никогда не обнаруживались в моче отравленных животных» [6, стр. 371]. С нею обычно выводится не сам ДДВФ, а нетоксичные продукты его метаболизма [14]. Пиявка же выводит ДДВФ в неизменном виде, что дополнительно подтверждено исследованием ее мочи методом газожидкостной хроматографии (неопубликованные данные, Чуйко, Лапкина).

2. Реакции раздражения на вещества антихолинэстеразного действия.

Подавляющему большинству ФОС не свойственен раздражающий эффект в токсическом сублетальном диапазоне концентраций. Однако, используемые в эксперименте производные тио- и дитиофосфорных кислот (метафос, карбофос, рогор) или их наполнители, обладают такими свойствами, которые модифицируют описанную для антихолинэстеразных веществ картину отравления. Выражается это в большей подвижности пиявок, чередующейся с тревожной поисковой реакцией; на стадии 7 движения челюстей не заметно, заглатывания раствора не происходит, как и выделения мочи в стадии 8. Передняя присоска пиявок отекает, сильно увеличивается в размере, с нее стекает тяж слизи. По-видимому, это и затрудняет поступление воды в глотку.

Для сравнительной оценки раздражающих свойств пес-

¹ Пиявку на стадии 8 извлекают из раствора, промывают в потоке воды, обсушивают фильтровальной бумагой и помещают в конусообразную пробирку. Пиявка остается в его широком конце, а в узкий конец стекает моча, ее объем достигает 0.5-1.5 мл.

тицидов (ФОП и карбаматов) и других химических соединений, использовали тест-реакцию смены статичного состояния динамичным (СССД) у молоди *Hirudo medicinalis* в момент контакта с испытуемым раствором (табл.3) [15].

По этому признаку вещества можно условно разделить на 2 группы. К первой отнесены антисептики, включая тяжелые металлы (ТМ), и ряд других соединений 3-4 класса опасности. Они способны инициировать реакцию СССРД при сублетальных концентрациях на 1-2 порядка ниже LC_{50} и обладают раздражающим действием. Ко второй - большинство пестицидов (1 класс опасности), лишенных таких свойств: порог СССРД для них либо совпадал с 48 ч LC_{50} (метафос, карбофос), либо на порядок (ДДВФ, параоксон) и более (хлорофос) превышал среднелетальную концентрацию. Исключение составил пестицид севин (обратимый ингибитор ХЭ), пиявки оказались весьма чувствительны к его раздражающим свойствам, проявившимся в сублетальном диапазоне. ДДВФ, параоксон, хлорофос, напротив, даже в токсичных и в летальных концентрациях раздражающим эффектом не обладали (табл.3).

Для сравнения, помимо ФОП, приведены пороги реакций раздражения (СССД и избегания), а также биоцидность других веществ из разных химических групп. Реакция СССРД наиболее чувствительный показатель порога раздражающего действия веществ, она случается в первые секунды и минуты контакта с ними. Позже появляются другие реакции, способные указывать на усиление эффекта раздражения во времени, связанные с интенсивностью двигательной активности: ползание сменяется «шаганием», далее плаванием. Последнее, в зависимости от силы раздражения, имеет свои характерные черты - плавание по периметру чашки Петри, «манежное», «восьмерка» на одном месте. Периодически для уменьшения контакта хемочувствительных клеток и 10-ти глаз с растворенным веществом, пиявка фиксирует заднюю присоску и сворачивает в спираль передние сегменты тела (иногда просто подгибает их под брюшко).

Таблица 3

Пороговые величины (мг/л) различных химических веществ, вызывающих реакцию СССД и избегания у 50% особей моллюда пиявки *Hirudo medicinalis*; их токсичность для нее -LC₅₀ (48 ч) [12].

Группа	Вещество	LC ₅₀ , мг/л	Порог реакций	
			СССД	Избегания
Галоиды	Йод	0.5	0.05	0.5
Окислители	Марганцевокислый калий	5.0	0.5	3.0
Кислоты	Салициловая	-	1.0	-
ТМ	Медь ⁺⁺	0.25	0.01	0.05
Спирты	Этиловый	3.0	0.5	3.0
Альдегиды	Формальдегид	-	0.05	
Фенолы	Гидрохинон	-	0.5	1.0
Красители	Бриллиантовый зеленый	0.1	0.05	0.5
Лекарства	Риванол	10.0	0.05	-
СПАВ	Порошок “Лотос”	>150	0.2	1.0
ХОП	Полихлорпинен	1.0	0.5	Нет в LC
ФОП	ДДВФ	0.1	1.0	Нет в LC
	Карбофос	10.0	10.0	-“-
	Метафос	1.0	1.0	-“-
	Параоксон	1.2	10.0	-“-
	Хлорофос	0.45	Нет	-“-
Карбамат	Севин	13.0	0.05	-“-

Позже она покидает раствор (реакция избегания). Эти качественные показатели присутствия в растворе раздра-

жающего фактора возникают под влиянием более сильного или продолжительного химического воздействия по сравнению со стимулом, необходимым для появления пороговой реакции СССД.

Избегание характеризует предел переносимости раздражителя, а длительность сохранения уже в чистой воде симптома подгиба головных сегментов свидетельствует о силе его пролонгированного действия. Используемые пестициды не вызывали у пиявок реакции избегания даже в летальных концентрациях.

При этом подгиб головных сегментов периодически отмечался в метафосе, карбофосе, рогоре, севине (в зависимости от концентрации), предшествуя специфичной антихолинэстеразной симптоматике. Реакция возвращалась в процессе отмычки, чему способствовала восстановленная двигательная активность пиявки, то есть раздражающий эффект, указанных пестицидов обладал пролонгированным действием.

Тот факт, что пороги реакции СССД для большинства ФОП слишком высоки, возникают лишь в летальных концентрациях, а реакция избегания растворов ФОП вообще отсутствует, делает эти пестициды особенно опасными для червей.

3. Изменение уровня активности ХЭ пиявок (*in vivo*) при отравлении ФОП.

В латентном периоде (бессимптомная стадия 1, табл. 1) активность ХЭ в брюшной нервной цепочке (БНЦ) пиявок имеет фазный характер – после незначительного и короткого спада (различия не достоверны) она достоверно возрастает и превышает средний контрольный уровень на 110 -220 % (в разных растворах и у разных особей), и лишь затем неуклонно начинает падать. Снижение ее до критического уровня, вызывает появление первого симптома отравления, возмещающего конец скрытого периода интоксикации.

В растворе хлорофоса 0.05 мг/ л у наиболее чувствительных особей молоди медицинской пиявки симптоматика начинается проявляться в первые сутки экспозиции (табл. 4, см.

скручивание каудальных сегментов), у менее чувствительных она отсутствует и на десятые сутки (продолжается нормальное синусоидальное плавание).

Таблица 4.
Средняя активность (мкмоль ПрТХ /г /час) холинэстеразы в брюшной нервной цепочке молодежи медицинской пиявки на разных стадиях отравления ее хлорофосом [16]

Концентрация, мг/л	Экспозиция сутки	Стадия отравления*				Контроль
		1	3	4	7	
0.05	1	1196	294	122	0	1070
	4	1070	365	113	-	-
	9	-	365	138	0	-
	10	902	-	-	-	911
0.005	60	877	265	-	-	787
0.0005	60	871	-	-	-	787

* стадии отравления, согласно табл. 1

Активность ХЭ (субстрат ПрТХ) в БНЦ взрослых особей *Hirudo medicinalis* при остром 48 час воздействии на них раствора хлорофоса 0.5 мг/л, также снижена в разной мере относительно контроля и зависит от стадии отравления. Активность фермента угнетена приблизительно на 60% у пиявок, сменивших синусоидальное плавание на «С»-образное; упала на 80-90% у тех, чьи каудальные сегменты скрутились в спираль; практически равняется нулю у червей в стадии контрактуры продольных мышц.

В подостром опыте (0.05 мг/л), в не зависимости от того, на какой день возникали подобные симптомы, на 4-ый, у более чувствительных особей, или на 21 день - у менее чувствительных, относительные уровни ХЭ в их БНЦ удерживались на подобающем каждому конкретному симптому уровне (рис.4).

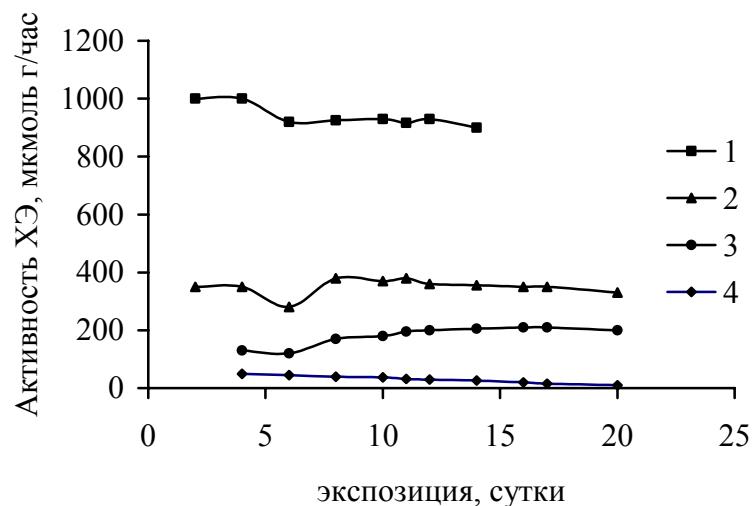


Рис.4. Активность ХЭ (субстрат ПрТХ) в БНЦ взрослой медицинской пиявки на разных стадиях отравления в растворе 0.05 мг/л хлорофоса.

Латентный период (ряд 4); стадия 2 (ряд 3); стадия 4 (ряд 2); стадия 6 (ряд1)

Эта закономерность, справедлива для *Hirudo medicinalis* и в растворах ДДВФ, а также прослежена на пиявке *Haemopsis sanguisuga*. В случае с ДДВФ, как и в опыте с хлорофосом в момент «С»-образного плавания уровень активности фермента ХЭ составлял в БНЦ обоих видов червей около 30-40% от контрольного (со всеми 3 субстратами – АТХ, БТХ, ПрТХ).

У обоих видов в латентном периоде снижается и уровень активности ХЭ в мышечной ткани. Но если в БНЦ он всегда носит фазный характер, то в мышце процесс односторонний – активность ХЭ все время падает и этот процесс опережает таковой в нервной цепочке. Динамика изменений зависит от концентрации яда и временного фактора (на фоне отсутствия симптомов) и приведенные данные справедливы для 3 субстратов (рис. 5).

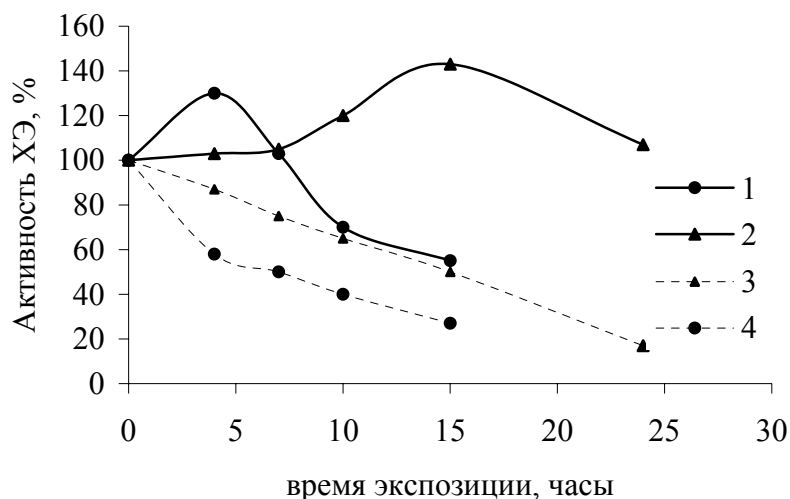


Рис.5. Относительная активность ХЭ пиявки *Haemopsis sanguisuga* в БНЦ (сплошная линия) и мышце (пунктирная) в растворах ДДВФ различной концентрации.

Субстрат - АТХ; концентрация ДДВФ: треугольник – 0.1 мг/л, кружок – 0.3 мг/л

Объяснить фазное изменение активности ХЭ, в частности фазу ее подъема в БНЦ, вопреки действию ингибитора, можно исходя из теории общего адаптационного синдрома Селье. Согласно ей организм в целом и его функции отвечают на действие неблагоприятного фактора последовательно 3 реакциями - тревоги, резистентности, истощения [17]. В стадии резистентности или адаптации, сопротивляемость повреждающему действию повышается (рост активности ХЭ в латентном периоде); когда компенсаторные возможности исчерпываются, организм переходит в 3 стадию - истощения (происходит падение активности ХЭ).

На стадиях проявившейся интоксикации (2-10), относительный уровень активности ХЭ в БНЦ согласуется с симптомами отравления (как и прежде в растворах хлорофоса у меди-

цинской пиявки). В мышце же, углубление симптомов также сопровождается дальнейшим падением активности фермента, но скорость этого процесса уже не опережает такового в БНЦ в отличие от латентного периода. Уровень активности ХЭ в нервной цепочке увязан по-прежнему не с временем нахождения пиявки в токсиканте, а с ее чувствительностью, той стадией отравления, которой она достигла. При одинаковом времени экспозиции, падение активности фермента в БНЦ, всегда ярче выражено у особей с более глубокими внешними проявлениями интоксикации. В мышце это прослеживается менее четко, хотя по мере развития симптомов и в ней прогрессирует снижение уровня активности фермента.

4. Реакции перевозбуждения и блокирования холинорецепторов в организме пиявки.

Обнаруженная закономерность - соответствие проявляемых симптомов определенному уровню активности ХЭ в БНЦ, должна носить универсальный характер для клиники отравления пиявок любым веществом с антихолинэстеразным действием. Ингибирование фермента – начальное звено в цепи других событий, важнейшее из которых - накопление в организме избытка ацетилхолина (АХ), сначала возбуждающего, а затем и блокирующего работу никотин- и мускаринчувствительных холинорецепторов (нХР и мХР) [18]. Т. е., в отличие от м-холиномиметика (м-ХМ) ареколина и н-холиномиметика (н-ХМ) лобелина, прямо и непосредственно взаимодействующих с ХР, ФОП действуют на него опосредованно через АХ, и являясь косвенными ХМ.

Оказалось, что как ареколин, так и лобелин менее токсичны для *Hirudo medicinalis* по сравнению с ДДВФ (для которого 48 час LC_{50} – 0.1 мг/л). Наряду с этим, растворы лобелина, избирательно действующего на нХР, намного превосходили по токсичности растворы ареколина, взаимодействующего преимущественно с мХР. Раствор лобелина 5 мг/л летален для пиявок, а раствор ареколина 50 мг/л не вызывает симптомов отравления (48 час).

Симптоматика отравления пиявок в сублетальных растворах лобелина 0.1-3 мг/л начинается как и в ФОП с замены синусоидального плавания «С»-образным и продолжается в последовательности, свойственной ФОП (табл. 1) до сжатия продольных мышц (стадия 6).² Сходство симптомов отравления вызываемых ДДВФ и лобелином, подтверждает, что в основе их лежит один и тот же процесс - возбуждение и блокирование нХР.

Эти факты, а также неэффективность антагонистов м-холинолитиков (атропина и метацина) при использовании их на пиявках в 3 режимах: предэкспозиции (для профилактики отравления ДДВФ), совместно с ДДВФ (для защиты) и после отравления ДДВФ (для лечения), подтверждает данные об отсутствии в мышцах *Hirudo medicinalis* м-холинорецепторов, полученных ранее *in vitro*[19].²

То есть, опытом *in vivo* показано, что медицинская пиявка, тело которой в основном состоит из кожно-мускульного мешка, проявляет избирательную чувствительность к н-ХМ, и что ДДВФ опосредовано через избыток АХ влияет на н-холинорецептивные структуры червя.

5. Реакция обратимости интоксикации, вызванной антихолинэстеразными ядами.

Процесс обратимости интоксикации, вызванный ФОП, в частности ДДВФ, хлорофосом, у взрослых медицинских пиявок возможен (в 100 % случаев), если они помещены в чистую воду на стадиях отравления, предшествующих контрактуры продольных мышц или в начале таковой. Обратимость проблематична для большей части особей, если эта стадия завершается; она практически невозможна с момента, когда глотка открыта, челюсти работают, масса и объем червя уве-

² В более высоких концентрациях пиявки подгибали головные сегменты, в стадии 5 глотка оставалась закрытой, масса увеличивалась плавно и незначительно, тело было менее упругим, чем в растворах ДДВФ.

личены (стадия 7). Более поздние стадии – абсолютно летальны (острый 48 часовой опыт).

У молоди, по сравнению с взрослыми особями, вероятность обратимости интоксикации выше на любой из стадий. По этой причине параметры ее устойчивости (LC_{50}) в хлорофосе – 0.5 мг/л, выше таковых для взрослых особей – 0.3 мг/л вопреки большей чувствительности молоди к пестициду. Для успешной обратимости важно, чтобы пребывание в глубоких стадиях интоксикации не было слишком продолжительным. Так, в подостром опыте (0.05 мг/л, экспозиция 3 недели), молодые особи, ранее взрослых достигают тяжелой стадии –контрактуры продольных мышц. Из-за длительной экспозиции они уже не отмываются в воде, что ведет в итоге к большему проценту их гибели (50 %) по сравнению со взрослыми червями –15 % (рис.5), у которых симптомы отравления проявились позже.

Можно предположить, что здесь имеет место эффект старения заингибированного фермента, когда распад фермент-ингибиторного комплекса становится невозможным [7].

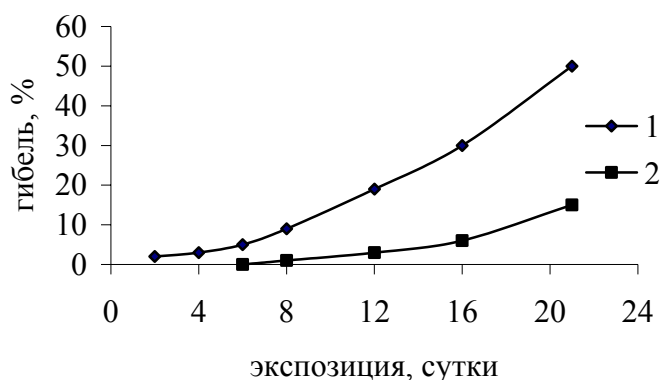


Рис. 6. Динамика гибели пиявок *Hirudo medicinalis* в растворе хлорофоса 0.05 мг/л в процессе экспозиции.

Молодь пиявок- ряд 1; взрослые особи – ряд 2.

Исчезновение внешних симптомов отравления после помещения пиявки в чистую воду идет в последовательности об-

ратной их возникновению. Продолжительность каждой стадии при отмывке тем больше, чем ранее она возникла в токсическом растворе. Когда, в итоге патологическое С-образное плавание заменяется нормальным синусоидальным, подопытная особь визуально становится неотличимой от интактных червей.

Тем не менее, пиявкам требуется еще около 6 недель для восстановления прежнего уровня активности ХЭ. В продолжении всего восстановительного периода чувствительность пиявок к ФОП остается повышенной по сравнению с интактными пиявками. Так при повторном контакте с ФОП, например, с раствором хлорофоса 0.1 мг/л, восстанавливающиеся черви достигают патологического состояния (любых его стадий, в частности «улитки» и «кубышки») быстрее, чем интактные особи (табл.5).

Таблица 5

Среднее время (часы) до возникновения симптомов отравления у 50 % особей *Hirudo medicinalis* в растворе хлорофоса 0.1 мг/л.

Группа пиявок и симптом отравления	Продолжительность восстановительного периода до посадки в раствор, сутки					
	3	7	14	21	37	60
I - улитка	25*	29	27	26	26	25
II - улитка	7	11	11	12	12	25
I - кубышка	83	88	89	90	87	85
II - кубышка	18	57	55	59	59	83
Активность ХЭ в БНЦ пиявок (% к контролю) в период отмывки (II)	45	62	53	58	55	115

* - часы; группа I - интактные особи, группа II - особи в периоде восстановления - отмывки. N= 10

Различия во времени тем больше, чем меньший срок отмывки прошел после нормализации двигательных функций.

Третий и четвертый контакты пиявок (группа II) с тем же тестирующим раствором хлорофоса 0.1 мг/л, после соответствующих 2-ой и 3-ей отмывок и обретения внешнего благополучия, не приводили к заметному по сравнению с 1-ой отмывкой сокращению латентного периода. Кроме того, в тестирующем растворе у них начинали проявляться, ранее отсутствующие признаки мышечной фибрилляции.

Результативность отмывки, зависит от вида пиявок и в значительной мере определяет величину токсикологических параметров. Лучше всего поддаются восстановлению пиявки примитивных видов из сем плоские (*Glossiphoniidae*) – *Proteocleipsis tessulata* и *Hemicleipsis marginata*. Сложный и видоспецифичный симптомокомплекс отравления [4], протекает у них при тех же концентрациях хлорофоса 0.1-0.3 мг/л, что и у чувствительных видов (рыбных пиявок, глоточных и медицинской). Так у *Hemicleipsis marginata* все мышцы расслаблены, длина червя значительно превышает норму, тело скручено в петли, задняя присоска огромна (рис. 7).

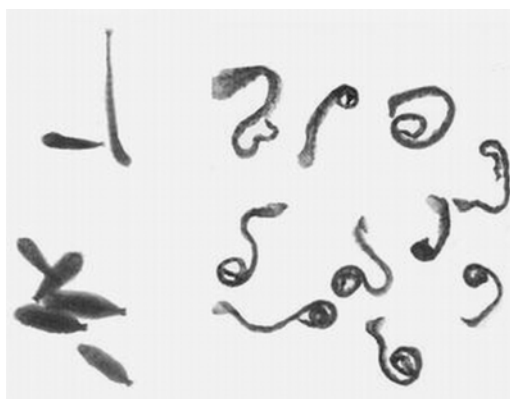


Рис. 7. Внешние симптомы отравления хлорофосом пиявок *Hemicleipsis marginata*.

Слева – контрольные особи, справа - подопытные, достигшие глубоких стадий интоксикации в сублетальном растворе хлорофоса 0.3 мг/л (экспозиция 48 час).

Пиявка не реагирует на прикосновение, активность ХЭ (in vivo) у таких особей угнетена на 95-98 %. Подобное тяжелое состояние и почти полное отсутствие активности фермента регистрируется и у птичьей пиявки *Protocleipsis tessulata*³. Тем не менее, для обоих видов указанные концентрации являются сублетальными. Перенос плоских червей в чистую воду возвращает их к жизни. Процесс отмывки остается эффективным для части особей даже при увеличении концентрации хлорофоса на 3 порядка. Но после перенесенной интоксикации в таких растворах и возврата к нормальной двигательной активности *Hemicleipsis marginata* перестали реагировать на рыб-хозяев, не инвазировали их, подобно контрольным червям.

6. Соотношение реакций чувствительности и устойчивости пиявок к разным ФОП

Сопоставление этих двух интегральных токсикологических показателей у *Hirudo medicinalis* в ряду различных антихолинэстеразных веществ, выявило отсутствие строгой корреляции между ними. Так, время латентного периода в концентрации 0.1 мг/л сефина (карбамат) и 0.1 мг/л ДДВФ (ФОП), соответственно, равны 40 минутам и 6 часам, хотя сефин в 130 раз менее токсичен для пиявок, чем ДДВФ, о чем свидетельствуют показатели устойчивости LC₅₀ мг/л (табл.5). В данной концентрации сефина молодь медицинских пиявок не достигает глубоких стадий отравления даже к концу 48 часовой экспозиции, в то время как в аналогичном растворе ДДВФ у нее последовательно и активно развивается весь симптомокомплекс и концу вторых суток 50% особей гибнет.

В диапазоне концентраций 0.1-0.5 мг/л растворы ДДВФ, параоксона и хлорофоса вызывают у пиявок проявление всех симптомов отравления (табл. 1.). Однако перенос червей в

³ Вероятно, по этой причине в литературе имеются данные, что для Theromyzon (=Protocleipsis) LC₁₀₀ дайлокса (синоним хлорофоса) - равна 0.2 мг/л [20].

воду, после завершения 2 суточной экспозиции в токсиканте, приводит к полной обратимости интоксикации у пиявок, зараженных параоксоном и к частичной или 100 % гибели червей из растворов ДДВФ и хлорофоса (в зависимости от токсиканта и его концентрации). То есть, не во всех случаях (табл.6) более высокая (относительно другого пестицида) чувствительность сопровождается соответственно более низкой устойчивостью к нему.

Таблица 6.

Сопоставление параметров чувствительности молоди *Hirudo medicinalis* (длительность латентного периода у 50% из 10 особей, часы) к различным растворам пестицидов с параметрами устойчивости к ним (LC₅₀ мг/л, 48 час).

Пестицид	Концентрация, мг/л				LC ₅₀ , мг/л
	0.1	0.5	1.0	10	
Севин	0.7	0.3	0.1	<0.05	13.0
Параоксон	3.0	0.5	0.3	<0.1	1.2
ДДВФ	6.0	0.8	0.4	0.1	0.1
Хлорофос	17	4	3	1.0	0.5
Метафос	38	20	2.5	-	1.0
Карбофос	-	-	>48	2.5	11.0

В гомологичных рядах соединений ряды чувствительности и устойчивости пиявок к ним, по-видимому, будут скоррелированы. Отношение между этими интегральными токсикологическими показателями червей зависят от строения антихолинэстеразных веществ. Последнее, в свою очередь, обуславливают разную скорости проникновения веществ через кожные покровы и к местам локализации фермента-мишени,

влияет на характер взаимодействия с ХЭ (обратимый, необратимый); на скорость ингибирования фермента (k_{II}) и старения фермент-ингибиторного комплекса, определяет процессы метаболизма, детоксикации и выведения этих веществ [7].

Севин - обратимый ингибитор ХЭ, ФОП - не обратимые ингибиторы этого фермента. Там, где старение субстрат-ингибиторного комплекса происходит быстрее, процесс отмывки менее эффективен. Хлорофос, ДДВФ – диметилфосфаты; параоксон - диэтилфосфат. Известно, что диэтилфосфаты менее подвержены старению, по сравнению с диметилфосфатами [7]. Возможно, в этом причина более высокой эффективности отмывки медицинской пиявки после ее интоксикации фосфаколом (=параоксоном) по сравнению с ДДВФ. Метафос и карбофос – тио- и дитиофосфаты, токсичность которых, как показано на насекомых в значительной мере зависит от процессов их метаболизма в организме [14].

7. Сравнительная видовая устойчивость пиявок к пестицидам группы ФОП в остром 48 часовом опыте.

Для 13 видов пиявок межвидовой диапазон от максимально переносимой концентрации хлорофоса до абсолютно летальной (LC_{100}) очень широк (0.01-300 мг/л). Среднелетальные показатели (LC_{50}) для разных видов также сильно отличаются друг от друга даже внутри семейств (табл. 7).

Все виды пиявок менее устойчивы к ДДВФ, по сравнению с хлорофосом. Известно, что последний в воде и в организме животных спонтанно (без участия ферментов) превращается в более токсичный ДДВФ путём реакции дегидрохлорирования [14].

Падение устойчивости к ДДВФ относительно хлорофоса проявляется ярче у высокорезистентных видов по сравнению с низкорезистентными внутри каждого из 4 семейств. Так, токсичность ДДВФ для *Haemaphys sanguisuga* оказалась в 12.5 раза выше, чем хлорофоса, а для *Hirudo medicinalis* только в 2.3 раза и т.д., что делает различия в устойчивости этих видов к ДДВФ не столь значительными как в хлорофосе. Ес-

ли коэффициент избирательности ($K_{и}$) хлорофоса для них равен 33, то $K_{и}$ ДДВФ - только 6.1.

Таблица 7.
Сравнительная видовая устойчивость пиявок (LC_{50} 48 час мг/л) к 4 пестицидам группы ФОС.

Семейство, вид	Хло-рофос	ДДВФ	Фосд-рин	Ме-тафос
<u>Glossiphoniidae</u>				
<i>Proclepsis tessulata</i>	120.00	>30	>25<30	-
<i>Hemiclepsis marginata</i>	120.00	>30	55.0	-
<i>Glossiphonia complanata</i>	90.00	24	50.0	-
<i>Glossiphonia heteroclita</i>	>50.00	-	-	-
<i>Helobdella stagnalis</i>	>50.00	28	12.0	-
<u>Piscicolidae</u>				
<i>Caspiobdella fadejewi</i>	0.06	0.04	<0.01	-
<i>Piscicola geometra</i>	0.50	> 0.1	-	-
<u>Hirudinidae</u>				
<i>Haemopsis sanguisuga</i>	10.00	0.8	8.0	-
<i>Hirudo medicinalis</i>	0.30	0.13	1.5	1.0
<u>Erpobdellidae</u>				
<i>Erpobdella octoculata</i>	1.50	0.5	0.5	6.5
<i>Erpobdella testasea</i>	0.40	0.3	1.0	-
<i>E.(E.) nigricollis</i>	0.20	0.1	1.0	4.7
<i>Erpobdella (Dina) lineata</i>	3.5	>0.5	-	-

Коэффициент видовой избирательности ($K_{и}$) хлорофоса -отношение 48 ч LC_{50} наиболее устойчивого вида *Hemiclepsis marginata* к наименее устойчивому - *Caspiobdella fadejewi* равен 2000 (оба вида кровососы рыб); максимальное значение $K_{и}$ ДДВФ не более 1000, если рассматривать отношение устойчивости между этими же представителями 2 семейств.

Чувствительность фермента пиявок разных видов (табл.

8) к ДДВФ в опытах *in vitro* не позволяет объяснить все существующие межвидовые различия в устойчивости червей к этому пестициду, поскольку в целом не обнаружено корреляции между 2 этими показателями. Хорошее соответствие показали лишь рыбы-пиявки. Самое большое число связывания молекул ХЭ (2.3×10^6) за минуту ДДВФ осуществляет с ферментом *Caspiobdella fadejewi*, что соответствует самой низкой устойчивости этого вида к данному пестициду.

Таблица 8.

Значения бимолекулярной константы скорости ингибирования ХЭ у разных видов пиявок (k_{II} моль⁻¹ мин⁻¹)

Вид	АТХ	БТХ	ПрТХ	МеТХ
<i>Glossiphonia complanata</i>	2.3×10^5	2.0×10^5	2.2×10^5	2.3×10^5
<i>Helobdella stagnalis</i>	2.2×10^5	-	1.4×10^5	2.3×10^5
<i>Caspiobdella fadejewi</i>	2.3×10^6	-	2.3×10^6	7.0×10^6
<i>Hirudo medicinalis</i>	6.5×10^4	3.2×10^4	4.5×10^4	-
<i>Haemopis sanguisuga</i>	4.7×10^4	1.1×10^5	5.3×10^4	-
<i>Erpobdella octoculata</i>	2.0×10^5	3.4×10^5	1.8×10^5	-
<i>Erpobdella nigracollis</i>	2.0×10^5	2.3×10^5	-	-
<i>Erpobdella testasea</i>	15×10^5	2.1×10^5	2.5×10^5	-

Для части исследованных видов фосфидин оказался токсичнее ДДВФ и хлорофоса. Межвидовой спектр устойчивости пиявок к нему уже, чем к хлорофосу. Чем токсичнее пестицид, тем меньше его видовая избирательность и тем он

опаснее в экологическом плане.

Таким образом, среди использованных пестицидов хлорофос отличается наибольшей видовой избирательностью.

8. Реакции адаптации пиявок к действию ФОП.

Показана принципиальная возможность формирования у пиявок фенотипической адаптации к действию ДДВФ и хлорофоса, токсикантам антропогенного происхождения. Возможность выработки адаптационного ответа на ФОП продемонстрирована в 3 экспериментах с 2 видами пиявок [21].

Предварительное выдерживание *Hirudo medicinalis* в токсических (1/10 48 час LC_{50} .) но сублетальных концентрациях хлорофоса и ДДВФ, уменьшало впоследствии процент их гибели в тестирующей летальной концентрации хлорофоса по сравнению с интактными особями, не имевшими предварительного контакта с ядом (табл. 9).

Таблица 9.
Влияние 24 часовой предэкспозиции взрослых особей (30 экз.) *Hirudo medicinalis* в сублетальных растворах ФОП на их последующую гибель в тестирующем растворе хлорофоса 0.3 мг/л

ФОП	Концентрация, мг/л	Доля погибших пиявок в тестирующем растворе, %
Хлорофос	0.03	28.6 ± 6.2
ДДВФ	0.01	5.0 ± 0.9
Контроль	0	48.3 ± 4.7

Продолжительность предэкспозиции как и концентрация пестицида в этом периоде имеют свой оптимум, отклонение от которого снижает эффективность преадаптации.

Так 12-часовая предэкспозиция *Haemopsis sanguisuga* в растворе хлорофоса 1/10 от его LC_{50} (48 час), положительно сказалась на выживаемости пиявок в тестирующем растворе этого токсиканта - 15 мг/л. Увеличение времени первичного

воздействия пестицида до 2 и более суток, усугубило состояние червей, повысив процент их гибели (табл.10).

Таблица 10.

Влияние продолжительности предэкспозиции пиявок *Haemaphysalis sanguisuga* в сублетальном растворе хлорофоса 1.5 мг/л на их последующую гибель в тестирующем растворе этого пестицида – 15 мг/л

Предэкспозиция, сутки	Число пиявок, шт.	Доля погибших пиявок в тестирующем растворе(%)	
		Подопытные	Контрольные
0.5	3 x 20	16.3 ± 5.4	73.7 ± 11.1
1	20	65	75
2	20	80	60
4	20	90	55

Адаптация возможна и при длительной предэкспозиции, если концентрация токсиканта достаточно мала – 0.0005 мг/л (табл.11). Более сильный раствор - 0.01 мг/л снижает адаптационный эффект молоди медицинской пиявки.

Таблица 11.

Влияние двухнедельной предэкспозиции молоди пиявок (30 экз.) *Hirudo medicinalis* в сублетальных растворах хлорофоса на ее последующую гибель в тестирующем растворе этого пестицида - 0.5 мг/л

Концентрация в предэкспозиции, мг/л	Гибель пиявок (%) в тестирующем растворе
0.0005	50.0 ± 6.6
0.01	83.3 ± 5.6
Контроль	93.3 ± 5.6

Пагубное действие на *Hirudo medicinalis* в тестирующем растворе хлорофоса 0.3 мг/л оказала предварительная 24 часовая предэкспозиция ее в растворе карбофоса 1.1 мг/л (1/10 48 час LC_{50}), вызвавшая в последствии 100 % гибель червей. Снижение концентрации карбофоса до 0.1 мг/л уменьшило смертность пиявок в тестирующем растворе до 67 % против 48 % в контроле. То есть, карбофос не только не обладает «адаптогенностью», подобно ДДВФ и хлорофосу при таких же условиях (табл. 9), но негативно воздействует на защитные механизмы пиявки и делает более проблематичным их выживание в тестирующем растворе.

Таким образом, адаптация к ФОП может реализоваться в строго определенных условиях, связанных с природой пестицида, силой его воздействия и временем контакта с ним. Естественно, что вероятность создания таких условий в природе невелика.

9. Сравнение параметров летального и сублетального действия хлорофоса у разных видов пиявок

Сопоставление параметров летального и сублетального действия хлорофоса на разные виды пиявок показало, что их связывают определенные соотношения. А именно, чем выше для вида значение LC_{50} 48 час, тем большее разведение этой концентрации необходимо произвести, чтобы получить сублетальный раствор пестицида при одновременном удлинении экспозиции в нем с 48 час до 1 недели (табл. 12).

Для взрослых *Hemiclepsis marginata* при таких условиях сублетальным является раствор хлорофоса 1/1000 от LC_{50} 48 час (около 0.1 мг/л), а для рыбных пиявок *P. geometra* и *C. fadejewi* – 1/10 от их LC_{50} 48 час (0.01 -0.005 мг/л, соответственно). Чем токсичнее пестицид для вида, тем уже спектр сублетальных и летальных концентраций, которые по значениям близки друг другу и грань между ними легко преодолима (пример - рыбы пиявки).

Растворы, в которых содержание хлорофоса снижено еще на 1-1.5 порядка становятся уже не токсичными для чер-

вей даже при удлинении экспозиции до 2 - 4 недель. Уровень трофического и репродуктивного обменов у пиявок в таких условиях повышается относительно контрольной группы.

Таблица 12.

Соотношение числа пиявок с проявлением патологии и погибших при действии растворов хлорофоса с концентрацией 1/10 - 1/10000 от LC₅₀ за 48 час [22].

Вид	LC ₅₀ мг/л	1/10 LC ₅₀	1/100 LC ₅₀	1/1000 LC ₅₀	1/10000 LC ₅₀
<i>Hemiclepsis marginata</i> (взрослые)	120.0	100/60	100/20	100/0	40/0
<i>Hemiclepsis marginata</i> (молодь)	11.0	100/50	100/35	30/0	30/0
<i>Erpobdella octoculata</i> (взрослые)	1.0-1.5	90/35	25/0	5/0	5/0
<i>Erpobdella testasea</i> (взрослые)	0.6	75/15	15/0	0/0	0/0
<i>Hirudo medicinalis</i> (молодь)	0.5	50/5	0/0	0/0	0/0
<i>Piscicola geometra</i> (взрослые)	0.1	30/0	0/0	0/0	0/0
<i>Caspiobdella fadejewi</i> (взрослые)	0.05	20/0	0/0	0/0	0/0

Доля (% от общего числа) пиявок с патологией (числитель) и погибших (знаменатель) при экспозиции 7 сут й в этих растворах; число пиявок в каждой концентрации N = 20-80.

Подобный ответ организма на стрессирующий хронический фактор носит неспецифический адаптивный характер, в так называемом стимулирующем диапазоне токсиканта [23]. Его концентрации также взаимосвязаны с LC_{50} 48 час соотношением ранее описанным: а именно, чем выше для вида абсолютное значение LC_{50} 48 час, тем большее разведение этой концентрации требуется, чтобы получить раствор, способный оказать стимулирующий эффект на физиологические функции пиявок при длительной экспозиции.

Молодь *Hemiclepsis marginata* испытывает повышенную потребность в пище при разведении LC_{50} 48 час более, чем в 2000 раз; *Herpobdella octoculata* – в 1000, но максимум - в 100 раз; *Hirudo medicinalis* – соответственно в 100 и 10 раз; *Piscicola geometra* и *Caspiobdella fadejewi* увеличивают плодовитость, в растворах 1/50 -1/10 от LC_{50} 48 час. Стимулирующий диапазон достаточно узок и может иметь свой максимум, который меняется в процессе развития червей, а также под влиянием каких-либо экзогенных факторов.

Так *Hemiclepsis marginata* (3-суточная молодь), помещенная на месяц в раствор хлорофоса 0.005 мг/ л ($1/10000$ LC_{50} = 11 мг/л за 48час) проявляла повышенную активность кровососания по сравнению с контрольными особями. В обоих случаях использовано потомство от одной родительской особи. Количество потребляемой пиявками крови увеличивалось от кормления к кормлению по мере их роста. При этом суммарные порции крови, высасываемые 10 подопытными пиявками (35, 107, 148, 150 мг) за 1-4 кормление превосходили таковые у контрольной молодежи (23, 77, 106, 114 мг) на 52, 38, 39, 31 %. С ростом пиявок на порядок увеличилась их токсикорезистентность (LC_{50} = 100 мг/л 48час после 4 кормления). На 2-ом месяце жизни и эксперимента подопытные особи *H. marginata* в результате 3-х кратного питания на рыбе, высосали всего на 3% больше крови (1724 мг), чем контрольные особи (1669 мг). То есть, подросшие пиявки практически перестали реагировать на концентрацию хлорофоса 0.005 мг/ л, которая стала для них уже не эффективным стимулом. Аналогично молодые особи *Hirudo medicinalis* из раствора хлорофоса 0.005 мг/л

(1/100 LC₅₀ за 48час) проявили достоверно более высокую активность кровососания, чем пиявки из раствора 0.0005 мг/л (1 / 1000 от LC₅₀ за 48 час), и тем более из контроля [16].

У глоточных пиявок *Herpobdella octoculata* в сублетальных растворах хлорофоса 0.01 и 0.001 мг/л (1/ 100 и 1/ 1000 от LC₅₀ 48 час) наблюдали стимуляцию как трофического, так и репродуктивного обменов, оптимумы их совпадали и приходились на концентрацию 0.01 мг/л (табл. 13).

Таблица 13.

Влияние сублетальных растворов хлорофоса 1/10 - 1/1000 LC₅₀ за 48 час на биологические показатели пиявок при 2-х недельной экспозиции [22].

Вид, число особей	Режим питания	Показатель	Хлорофос, мг/л			
			0	0.001	0.01	0.1
<i>Erpobdella octoculata</i> 20 шт.	5 шт. мотыля/сутки/особь	Съедено личинок	222	285	387	26
		Отложено коконов	24	40	32	0
		Выход мо-лоди	27	64	88	0
	1 шт. мотыля/4 суток / особь	Съедено личинок	60	60	60	20
		Отложено коконов	8	11	10	0
		Выход молоди	5	16	21	0
<i>Piscicola geometra</i> 80 шт.	Кормили 1 раз перед опытом	Отложено коконов	292	281	448	0
<i>Caspiobdella fadejewi</i> 80 шт.	то же	Отложено коконов	779	1331	139	-

Меньшая концентрация хлорофоса (0.001 мг/л) оказалась менее эффективной. Концентрация 0.1 мг/л (1 / 10 от LC₅₀) подавляла пищевую активность и процесс размножения. Увеличение плодовитости *Herpobdella octoculata* в сублетальных растворах хлорофоса, вероятно, не являлось следствием только повышенного потребления корма пиявками в этих условиях, поскольку и при недостатке его стимуляция плодовитости также имела место (табл. 12). Подобное воздействие токсиканта на воспроизводительную функцию проявилось у рыбных пиявок *P. geometra* и *C. fadejewi*, которые в продолжении 2 недель опыта не кормились. Концентрация 0.01 мг/л (1/ 10 от LC₅₀) обладала максимально стимулирующим эффектом на *P. geometra*, по сравнению с меньшей концентрацией - 0.001 мг/л (1 / 100 от LC₅₀). Зато последний раствор был способен стимулировать коконообразование у менее резистентного вида *C. fadejewi* (табл. 13).

Итак, максимальные межвидовые различия (более чем в 2000 раз), обнаруженные по параметрам устойчивости LC₅₀ 48 час (120 и 0.06 мг/л) у плоских и рыбных пиявок к хлорофосу (табл.7), сглаживаются в сублетальном токсичном диапазоне (0.1 – 0.005 мг/л) при недельном воздействии пестицида (не превышают 20 раз) (табл. 12).

Результаты еще менее зависят от видовой принадлежности червей в нетоксичном диапазоне, который, согласно терминологии основоположника водной токсикологии Н.С. Строганова [23], обозначен «стимулирующим» (табл. 13). В нем максимальные различия между эффективными концентрациями для разных видов пиявок различаются не более, чем в 10 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют с определенной долей вероятности прогнозировать реакцию сообщества пиявок на загрязнение природных вод ФОП, если отвлечься от факта, что сегодняшние воды, как и донные отложения, среда

обитания большинства пиявок, из-за глобального антропогенного загрязнения представляют сложную в химическом отношении многокомпонентную систему.

Из использованных пестицидов хлорофос отличается наибольшей видовой избирательностью. Исходя из приведенных параметров его LC_{50} для разных видов, а также учитывая для них значения МПК (максимально переносимые концентрации) [4], прогноз последствий попадания хлорофоса в водоемы представляется следующим образом.

Пиявки не будут покидать токсическую зону: было доказано, что хлорофос даже в летальных концентрациях не оказывает на них раздражающего действия. При наличии его в воде (сотые и десятые доли мг/л), возможна гибель медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. Диапазон от МПК хлорофоса до LC_{100} у нее достаточно узок 0.05-0.6 мг/л. Ее исконный враг, хищная пиявка *Haemopsis sanguisuga*, не пострадает (МПК – 2.5 мг/л). Из 4 конкурентных видов сем. *Erpobdellidae* (=Hirpobdellidae) в первую очередь начнут гибнуть пиявки *Erpobdella* (*Erpobdella*) *nigricollis* (МПК – 0.03 мг/л), затем *Erpobdella* (*E*) *testasea* (МПК – 0.2 мг/л) [4]. Более резистентна *Erpobdella* (*Dina*) *lineata*, она способна выдержать без потерь концентрацию хлорофоса в воде около 1 мг/л, в которой наступает 100 % гибель первых 2 видов и частичная *Erpobdella octoculata*. Виды сем. плоские (*Glossiphoniidae*) не погибнут, поскольку они оказались очень устойчивыми к хлорофосу, в том числе *Proteocleipsis tessulata* – эктопаразит водоплавающих птиц и *Hemicleipsis marginata* – кровосос рыб и амфибий (для них $LC_{100} > 300$ мг/л). В противоположность плоским пиявкам, представители сем. рыбы (*Piscicolidae* = *Ichthyobdellidae*) низкоустойчивы к хлорофосу, особенно вылупившаяся молодь, еще ни разу не кормившаяся (МПК – 0.0003 мг/л для *Caspiobdella fadejewi* и 0.005 мг/л для *Piscicola geometra*) [24]. Однако коконы этих червей в наименьшей мере подвержены действию пестицида и сохраняют жизнеспособность при его концентрации, в несколько раз пре-

вышающую ту, от которой гибнут взрослые особи (100% смертность в 2 мг/л).

Видовые различия по токсикорезистентности к хлорофосу должны способствовать сохранению сообщества пиявок, хотя видовой состав и численность их могут измениться.

Историческими предшественниками пиявок являются олигохеты. Токсикорезистентность самых устойчивых и примитивных из них (среди исследованных видов) а именно - *Proclepsis tessulata* и *Hemiclepsis marginata* близка к максимальной у олигохет [5, 6].

Можно предположить связь токсикорезистентности с активностью червей: плавающие, ищущие добычу пиявки сем. Hirudinidae и Erpobdellidae менее устойчивы, чем ползающие (не способные плавать), подстерегающие своих жертв плоские пиявки Glossiphoniidae.

Не прослеживается связи между способностью пиявок противостоять действию токсиканта и их питанием (кровососы и хищные). Кровью рыб питаются как наиболее устойчивые пиявки *Hemiclepsis marginata*, так и самые низко устойчивые - *Caspiobdella fadejewi*.

Просматривается соответствие токсикорезистентности видов их экологической пластичности. Оксифилы - *Piscicola geometra* и *Caspiobdella fadejewi* (рыбьи пиявки), несмотря на принадлежность вместе с плоскими к более древнему отряду хоботные (Rhynchobdellea), оказались менее устойчивыми, по сравнению с видами более прогрессивного отряда бесхоботные (Arhynchobdellea - сем. Hirudinidae, Erpobdellidae), которые толерантны к недостатку кислорода. Среди 4-х видов сем. Erpobdellidae представитель подрода Dina - *E.(D.) lineata*, обитатель пересыхающих водоемов, сохраняющий жизнеспособность в продолжении нескольких месяцев во влажном грунте без воды [1], устойчивее видов подрода Erpobdella, живущих в постоянных водоемах.

Далее - пиявки-амфибии (сем. Hirudinidae) *Haemopsis sanguisuga* (всегда), и *Hirudo medicinalis* (иногда) резистент-

нее видов сем. Erpobdellidae. Эти наблюдения согласуются с нашими исследованиями, выполненными на других аннелидах [6]: олигохета - амфибия *Enchytraeus albidus* устойчивее к ФОП по сравнению с чисто водными видами сем. Tubificidae.

О связи с экологической пластичностью говорят и другие факты. Наиболее высокой токсикорезистентностью как к исследованным пестицидам ФОП, так и к токсикантам другой природы - ХОП, ТМ, детергенты, фенол - в каждом из семейств кл. Hirudinea обладают одни и те же виды: *Hemiclepsis marginata*, *Glossiphonia complanata* (плоские), *Piscicola geometra* (рыбьи), *Haemopsis sanguisuga* (челюстные), *Erpobdella (D.) lineata* и *E.(E.) octoculata* (глочные). Всем им свойственна более высокая экологическая валентность в сравнении с другими представителями своих семейств [2]. Все они, исключая рыбью пиявку, могут встречаться в водах различной сапробности, у них хорошо развиты механизмы адаптации и общей неспецифической устойчивости.

Специфическую устойчивость к ФОП обычно связывают с чувствительностью ХЭ к этим ядам (мерило последней - величина значения k_{II} - бимолекулярная константа скорости ингибирования). И, хотя в данной работе практически не затрагивались механизмы устойчивости, отметим, что по значению k_{II} устойчивая *Haemopsis sanguisuga* фактически не отличается от слабоустойчивой *Hirudo medicinalis*.

Вероятно, неспецифическая составляющая общей устойчивости организма червей гораздо существеннее по сравнению со специфической, и определяет в значительной мере разницу видовых ответов пиявок на ФОП.

Для неспецифической устойчивости, помимо активной сопротивляемости – резистентности - характерна и пассивная сопротивляемость - выносливость.

Полагаем, что высокая устойчивость плоских пиявок не связана с их резистентностью, то есть с активной составляющей. Об этом свидетельствует короткий латентный период, к концу которого активность ХЭ падает почти на 60 %, а в

дальнейшем практически до 0. Плоские пиявки состояние мнимой смерти могут переносить в продолжении нескольких суток благодаря выносливости и сохраняют при этом способность к обратимости интоксикации при попадании в чистую воду, что делает их наиболее устойчивыми среди пиявок.

Устойчивость *Haemopsis sanguisuga* к ФОП достаточно велика по сравнению с медицинской пиявкой, а также глоточными и рыбьими пиявками, но не за счет пассивной составляющей – выносливости. Эти пиявки ею не отличаются. Достигнув стадии отравления – сжатия продольных мышц, они впоследствии практически не отмываются, как и медицинская пиявка, ими утрачивается способность к обратимости интоксикации. Однако особи *Haemopsis sanguisuga* способны долго сопротивляться нарушению постоянства внутренней среды, о чем говорит длинный латентный период. Активность их ХЭ не только долго остается на высоком уровне, но и спад ее идет медленнее, чем у других видов пиявок. Тем не менее, устойчивость ее к ФОП ниже, чем у плоских пиявок, превосходящих ее по выносливости.

Специфичные симптомы отравления ФОП обусловлены ингибированием фермента ХЭ (что отражают опыты *in vivo* и *in vitro*). Это приводит в свою очередь к избыточному накоплению в организме АХ, который сначала возбуждает, а затем и блокирует никотиночувствительные холинорецепторы (нХР) в мышцах пиявки. Последнее подтверждено использованием лобелина – никотин-холиномиметика, он непосредственно возбуждает нХР и вызывает практически те же симптомы отравления, что и ФОП.

Наглядность и специфичность картины отравления пиявок антихолинэстеразными ядами позволила предложить использовать симптомокомплекс в качестве показательной функции для идентификации этой группы веществ, как в воде, так и в других средах – грунтах, влажной почве и влажном воздухе, а также в некоторых биологических жидкостях [25, 26].

Неспецифичные реакции, возникающие непосредственно в момент контакта с растворами некоторых токсических веществ (реакция СССД, например, с пестицидом севином), отражают присущие им раздражающие свойства. Они также могут быть широко использованы в биотестировании для выявления как раздражающего качества воды, так и вновь синтезированных химических соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Лукин Е.И. Фауна СССР. Пиявки. Л.: Наука, 1976. 484 с.
- [2] Sládeček V., Košel V. Indicator Value of Freshwater Leeches (Hirudinea) with a Key to the Determination of European Species // Acta hydrochim. et hydrobiol. 1984. V. 12. № 5. P. 451-461.
- [3] Лапкина Л.Н. Флеров Б. А. Исследование острого отравления пиявок некоторыми токсическими веществами // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С.50-59.
- [4] Лапкина Л.Н. Пиявки Рыбинского водохранилища и их устойчивость к токсическим веществам // Автореф. Дисс. К.б.н. 1983 Москва. 23 с.
- [5] Лапкина Л.Н., Архипова Н.Р. Устойчивость олигохет сем. Tubificidae к ФОП // Гидроб. ж. 1998.Т.34. № 4. С.56-64.
- [6] Лапкина Л.Н., Архипова Н.Р. Сравнительная устойчивость аннелид к пестицидам // Экология. 2003. № 5. С. 367-371.
- [7] О'Брайн Р. Токсические эфиры кислот фосфора. М.: Мир, 1964. 631 с.
- [8] Козловская В.И., Чуйко Г.М., Лапкина Л.Н., Непомнящих В.А. Устойчивость водных животных к фосфорорганическим пестицидам и ее механизмы // Проблемы водной токсикологии, биотестирования и управления качеством воды. Л.: Наука, 1986. С 49 -63.
- [9] Бресткин А.П., Кузнецова Л.П., Моралев С.Н., Розенгарт Е.В., Эпштейн Л.М. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: ТИНРО-Центр, 1997. 466с.
- [10] Mineau P. (Ed.), Chemicals in Agriculture. Vol. 2. Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Amsterdam – London – New York – Tokyo. Elsevier. 1991. 348p.
- [11] Лапкина Л.Н., Стойкова О.А. Холинэстеразы пиявок // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1986. № 69. С.29-32.
- [12] Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Фрайнд В.В., Куфирина Т.А. Биохимические свойства холинэстеразы плоской пиявки *Glossiphonia complanata* (сем.Glossiphonidae) из Рыбинского водохранилища // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. Сб. матер. IV (XXVII) Международной конференции. Ч.1. Вологда, 2005. С.250-252.

- [13] Тхай Тран Бай. О двигательном аппарате пиявок // Зоологический ж. 1966. Т.LV. Вып. 4. С. 500 – 508.
- [14] Михайлов С.С., Щербак И.Т. Метаболизм фосфорорганических ядов. М.: Медицина, 1983. 112 с
- [15] Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Экспресс-обнаружение в воде веществ, обладающих раздражающими свойствами// Токсикологический вестник. 2001. N 3. 16-21.
- [16] Лапкина Л.Н., Мензикова О.В., Флеров Б. А. Влияние острого и хронического отравления медицинской пиявки хлорофосом на уровень активности холинэстеразы и некоторые биологические показатели// Сб. Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ, 1988 С. 69-76.
- [17] Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 254с.
- [18] Михельсон М. Я., Зеймаль Э.В. // Ацетилхолин. Л. 1979. 279 с.
- [19] Рожкова Е.К. Холинорецепция спинной мышцы пиявки *Hirudo medicinalis*//Физиология и биохимия беспозвоночных. Л.:Наука, 1968. С.160-166.
- [20] Meyer F.P. Potential control for leeches // Prog. Fish. Cultur. 1969. № 31 (3). С. 160-163.
- [21] Томилина И.И., Лапкина Л.Н. Экспериментальное изучение адаптивных возможностей пиявок к хлорофосу // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1986. № 72. С. 36-39.
- [22] Лапкина Л.Н. Сопоставление параметров летального и сублетального действия хлорофоса на пиявок// Бюлл. ИБВВ. 1992. № 94. С.67-73.
- [23] Строганов Н.С. Теоретические аспекты действия пестицидов на водные организмы // Эксперимент. вод. токсикол. Рига: Зинатне, 1973. №5. С.10-36.
- [24] Лапкина Л.Н., Томилина И.И., Флеров Б.А.. Хроническое действие хлорофоса на пиявок *Caspiobdella fadejewi* (Epstein) в разные периоды их онтогенеза // Бюлл. БВВ.1991. № 90. С.28-33.
- [25] Лапкина Л.Н., Флеров Б.А.. Использование пиявок для идентификации пестицидов в воде // Гидроб. ж. 1980. Т. XIV, вып.3. С. 113-119.
- [26] Лапкина Л.Н Кровососущие пиявки – перспективные тест-объекты для биоконтроля разных сред // Матер. Международной научно-практической конференции «Биосферосовместимые и средозащитные технологии при взаимодействии человека с окружающей природой». Пенза, 2001. С.83-86.

**НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ
ОСНОВНЫХ РЕЧНЫХ БАССЕЙНОВ РОССИИ
ХЛОРООРГАНИЧЕСКИМИ ПЕСТИЦИДАМИ ДДТ И
ГЕКСАХЛОЦИОКЛОГЕКСАНОМ**

© 2007г. Д. Ф. Павлов

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

ВВЕДЕНИЕ

Пестициды входят в группу наиболее широко распространенных и потенциально токсичных загрязняющих веществ. Это особенно справедливо по отношению к хлорорганическим пестицидам (ХОП). В бывшем СССР, только в период с 1992 и 1996 годы было разрешено к применению в сельском хозяйстве около 400 различных препаратов, включая многие ХОП, а, например, количество примененных изомеров гексахлорциклогексана - α -ГХЦГ и γ -ГХЦГ составив в 1980 г. 11718 и 2511 кг, выросло к 90-м годам до 17528 и 3756 кг, соответственно. В результате, по этому параметру бывший СССР превысил показатели Китая – многолетнего мирового лидера в области применения средств защиты растений [1; 2].

Из всех этих средств ХОП являются особенно опасными для водной среды [3]. Их действие приводит к острому и хроническому отравлению водных беспозвоночных, рыб, амфибий, водоплавающих и околоводных птиц. Передаваясь по цепям питания, они могут достичь высших трофических звеньев, представляя угрозу здоровью человека [4; 5]. Еще одним опасным свойством ХОП является их высокая устойчивость в окружающей среде [6; 7], благодаря чему они могут сохраняться в компонентах экосистем в течение нескольких десятилетий.

Фактически с момента открытия соответствующих

свойств ДДТ и других ХОП стало ясно, что их применение в сельском хозяйстве может быть серьезной угрозой для природных, особенно, водных экосистем [8-11]. Это связано, прежде всего, с тем, что только 20-65% от всего, использованного в сельскохозяйственных целях количества пестицидов, остается на месте их применения, в то время как все остальное мигрирует в другие компоненты среды [12]). Увы, очевидно, что это было особенно справедливо для сельского хозяйства бывшего СССР. По имеющимся у нас сведениям, полученным в бывшей «Сельхозхимии», до 60% (ХОП), «распределенных» среди хозяйств, никогда не использовались в производстве, а складировались, иногда просто под открытым небом, в полях и оврагах. В течение многих лет, пестициды, из протекающей тары, были одним из основных источников очень сильного загрязнения рек в некоторых сельскохозяйственных регионах. Аналогичная ситуация, по крайней мере, в некоторых районах, наблюдалась и намного позже, после распада СССР и прекращения волонтаристской «химизации» сельского хозяйства [13]. Согласно некоторым оценкам только порядка 0.1% использованных пестицидов служат «запланированным» целям борьбы с вредителями, в то время как 99.9% их влияют на «незапланированные» компоненты экосистемы и становятся загрязняющими веществами (ЗВ) [14]. Такая высокая мобильность пестицидов в окружающей среде способствовала тому, что они стали глобальными ЗВ, а трансграничный перенос этих соединений является обычным явлением и достаточно хорошо описан в литературе [15]. Именно трансграничным переносом ХОП через атмосферу или с речным стоком из мест, где использование или производство ХОП продолжается, а также их высокой устойчивостью объясняется то факт, что эти соединения все еще присутствуют в природе тех стран, где они были давно запрещены, или в отдаленных районах Земли, где никогда не применялись.

Понятно, что эти опасные для окружающей среды свойства ХОП послужили импульсом для организации и проведения исследований токсического действия пестицидов на организмы разного уровня, а также мониторинга уровней их содержания в различных компонентах наземных и водных экосистем. Литература по этим проблемам достаточно обширна и известна специалистам, поэтому мы ее не приводим. Следует отметить, что исследования действия ХОП на различные функции водных беспозвоночных, рыб и других организмов, были весьма интенсивными и в бывшем СССР, достигнув пика в 70-х – начале 80-х годов [16-22]. Однако большая часть опубликованных в то время в открытой печати работ, касалась именно механизмов действия ХОП на гидробионты и его последствий, но не оценки уровней этих пестицидов в природных водах конкретных водоемов. Работы по оценке уровней содержания ХОП в различных компонентах экосистем, во многих случаях публиковались под грифом «Для служебного пользования». Зачастую, попытки преодолеть многочисленные запреты и опубликовать данные в открытой печати приводили к необходимости курьезной (с позиций наших дней) «шифровки», когда каким-либо «реальным» водоемам авторы были вынуждены давать мифические названия [21]. Конечно, это не означает, что работы, в которых оценивались уровни ХОП в водоемах бывшего СССР совсем не публиковались в открытой печати [23-30]. Однако, по нашей оценке, их было намного меньше, чем на западе.

В результате действовавших длительное время запретов, информация об уровнях ХОП, их динамике, соответствии ПДК и проч. зачастую оказывалась малодоступной не только для зарубежных специалистов, но и для большого числа отечественных. Это привело к парадоксальной ситуации: значительная площадь 1/6 части территории планеты (на которой к тому же активно проводилась и рекламировалась вышеупомянутая «химизация») фактически представляла собой *terra incognita* с точки зрения знания реальных уровней

загрязнения опаснейшими соединениями. Соответственно, неясен был вклад страны в глобальное загрязнение пестицидами. Это порождало недоверие со стороны не только специалистов, но и политиков других стран, а также различные спекуляции на эти темы. Например, в одном из наиболее обширных обзоров проблемы загрязнения бывшего СССР ХОП, выполненным Б. Бодо [31] по заказу ЮНЕСКО и ВОЗ, содержится довольно много спорных, недостаточно проверенных и, зачастую завышенных оценок (например, это касается оценки выноса ХОП реками СССР в международные моря). Нам кажется, что это связано в первую очередь с тем, что автор, не имея доступа к систематическим, надежным данным, использовал в работе отрывочные, не всегда проверенные и надежные источники информации.

При этом надо отметить, что в бывшем СССР, а затем в РФ, проводились очень обширные исследования уровней содержания ХОП в природных водах. Начатые в период 1964-1969 г. г. со временем они стали систематическими и обязательными и проводились на очень разветвленной сети станций государственной службы контроля (ОГСНК – Общегосударственная служба наблюдения и контроля до 1991 г. и ГСН – государственная служба наблюдения, после 1991 г.). Проводили их и некоторые другие организации, не относящиеся к системе Госкомитета СССР по гидрометеорологии. К сожалению, согласно ошибочной, на наш взгляд, политике, лаборатории ОГСНК/ГСН проводили мониторинг содержания ХОП и других загрязняющих веществ, практически только в воде, но не в донных отложениях и биоте, которые, как известно и являются основными компонентами экосистем, в которых накапливаются липофильные ХОП – приоритетом считалось качество воды. Но даже данные по уровням пестицидов в воде по большей части оседали в недрах самой организации и публиковались в основном в ведомственных сборниках «ДСП». К тому же, как показал дальнейший анализ, эти данные, в силу ряда причин, не всегда были надежными [32;

33]. Наконец, в начале 90-х годов из-за известных проблем с финансированием, активность наблюдений на сети ГСН и в других учреждениях резко снизилась.

Таким образом, сложилась парадоксальная ситуация: за счет усилий сотен и тысяч специалистов, работавших в системе, был накоплен огромный массив многолетних данных, касающихся уровней ХОП во всех бассейнах бывшего СССР, однако эти данные подвергались только ограниченному анализу в пределах одного ведомства и были недоступны широким кругам ученых и общественности. При этом отдельные «просочившиеся» в открытую печать работы указывали на то, что проблема загрязнения ХОП на территории всей страны в целом и, особенно, в отдельных регионах была достаточно острой.

Для проведения ретроспективной оценки и научного анализа данных по уровням ХОП в водоемах основных речных бассейнов нашей страны, накопленных в результате исследований организаций, работавших на сети ОГСНК/ГСН, а также в иных организациях («независимые специалисты», не работавшие в системе Госкомгидромета), в конце 90-х годов 20 века, была принята специальная программа, частично финансируемая Всемирным банком. Координацию проекта осуществлял Южно-Российский центр подготовки и реализации международных проектов (ЦПРП-Юг). В состав группы входили специалисты из России, Канады и США, работавшие в различных организациях. Целью проекта был критический анализ накопленных в стране данных, касающихся многолетней динамики уровней ХОП в основных гидрографических бассейнах страны, и в частности, вывить наиболее распространенные ХОП, получить общую картину загрязнения, а также оценить вынос ХОП реками страны в окружающие моря. И, наконец, сделать эти сведения доступными для широких кругов общественности. Анализировали в основном данные со середины 80-х до середины 90-х годов прошлого столетия. Нам довелось участвовать в работе группы. Кроме того, с нашим участием был проведен анализ уровней ХОП в донных отложениях и на-

лиме (*Lota lota* L.) из 8 крупнейших рек Сибири. Цель данной публикации – дать обзор полученных сведений, которые были опубликованы главным образом в зарубежных рецензируемых журналах и иных изданиях и потому относительно малодоступны для наших специалистов. В статье приводится информация, касающаяся наиболее распространенных ХОП - ДДТ и его метаболитов, а также изомеров ГХЦГ.

ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ХОП В ВОДОЕМАХ

Для оценки использовали несколько расчетных показателей [34]. Одним из таких показателей со служила частота встречаемости отдельных пестицидов в пробах воды, отобранных во внутренних водоемах разных регионов страны. Оказалось что по данным И ОГСНК/ГСН и специалистов из других организаций наиболее часто в пробах воды обнаруживались γ - и α -ГХЦГ, за которыми, в порядке убывания, следовали ДДТ, β -ГХЦГ, ДДЭ и ДДД (ОГСНК/ГСН) или ДДТ, ДДЭ, ДДД и β - ГХЦГ по данным других ученых.

Различия между проанализированными массивами информации касались и другого показателя: частоты превышения величин ПДК в проанализированных пробах. Так, данные ОГСНК/ГСН выявили, что в 19.2% проб (γ -ГХЦГ) и 17.3% (α -ГХЦГ) содержание пестицидов превышало ПДК. Меньшие частоты превышений ПДК были отмечены для ДДТ (4.3%), β - ГХЦГ (2.8%), ДДЭ (1.3%) и ДДД (0.2%). Другие специалисты отметили, что по этому показателю порядок должен быть иным - γ - ГХЦГ (2.4 %), ДДТ (1%) и α -ГХЦГ (2.0%), а для других ХОП частоты превышения ПДК были ничтожно малыми – от 0.1% до 0.4%

Такие различия могут объясняться действием разных факторов: использованием разных методик, несовпадением времени и места отбора (что может быть особенно существенным фактором именно в такой динамичной среде,

как вода), ошибками при проведении аналитических процедур и проч. [32, 34].

По обеим группам данных в период исследований были достаточно большими значения еще одного показателя: частоты обнаружения ХОП в водоемах разных бассейнов (что указывает на общую широту географического распространения пестицидов). Так, например γ -ГХЦГ был обнаружен в воде 49% внутренних водоемов страны, что указывает на значительное распространение этого соединения на территории страны. В наибольшей степени были загрязнены водоемы, расположенные в зонах интенсивного сельскохозяйственного и промышленного производства, что, естественно, не явилось сюрпризом. Оказалось, что наиболее загрязнен ХОП бассейн р. Урал, где по данным ОГСНК/ГСН, изомеры ГХЦГ были обнаружены 97.4 % стаций отбора проб и примерно в 50% всех проанализированных проб воды. Однако, достаточно высокий уровень загрязнения был зафиксирован и в воде некоторых северных рек, протекающих по иным территориям. Очевидно, это отражает, прежде всего, использования ХОП в других, не связанных с земледелием целях, например - лесном хозяйстве или для защиты от гнуса северных оленей, стада которых были тогда весьма многочисленны.

Максимальные концентрации исследованных ХОП были выявлены специалистами ОГСНК/ГСН: 10.2 мкг/л γ -ГХЦГ и 6.0 мкг/л α -ГХЦГ. Данные специалистов, работавших в других организациях в этом плане расходятся и найденные ими величины максимальных концентраций были ниже – до 0.94 мкг/л (γ -ГХЦГ) и 1.1 мкг/л (α -ГХЦГ) (34). Величины концентраций других ХОП в воде были намного меньше. Чаще всего величины ПДК были превышены в бассейнах рек Урал, Амур, Обь, Пясина, Волга и Печора.

Таким образом, анализ информации выявил, что, несмотря на официальный запрет применения большинства препаратов, содержащих ХОП, в нашей и большинстве граничащих стран (наиболее существенное исключение в этом плане, со-

ставляет, пожалуй, только Китай), в период исследования загрязнение водоемов бывшего СССР и РФ было довольно значительным. Аналогичная степень загрязнения этими пестицидами в других развитых странах Западной Европы и Северной Америки наблюдалась примерно десятилетием раньше.

Вместе с тем, справедливости ради следует указать, что запрет сделал свое дело и данные по многолетней динамике, однозначно указывает, что уровни загрязнения водоемов ХОП в стране постепенно снижались (рис.). Из рисунка видно, что усреднение величин максимальных концентраций γ -ГХЦГ и ДДТ в целом по всем речным бассейнам страны, в период с 1973 по 1996 г. , однозначно указывает на устойчивое снижение уровня загрязненности водоемов этими ХОП [34].

Проведенные нами исследования касались очень больших массивов данных, полученных за достаточно продолжительный период и на огромной территории. Вследствие этого, была получена очень обобщенная картина, не отражающие специфики отдельных участков большей или меньшей площади. Кроме того, на характер распределения пестицидов в среднем и мелком масштабе могут оказывать значительное влияние особенности местности (рельеф, климат, почвы и растительный покров на водосборе бассейна, гидрологический и гидрохимический режим, характер донных отложения, уровень трофии водоемов и проч.) [23, 29]. Сюда же следует добавить и различия в свойствах самих пестицидов – степень их гидрофильности, мобильность в среде, устойчивость к химической и биологической деструкции.

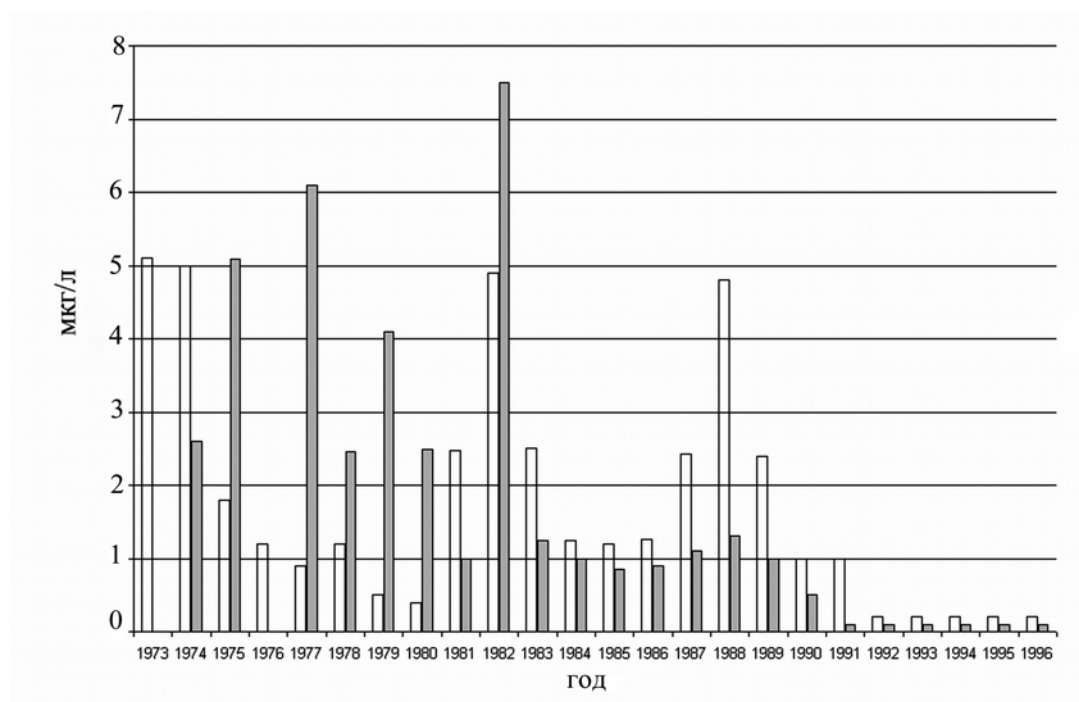


Рисунок. Многолетняя динамика средних концентраций ХОП в водоемах России (обобщенные данные по всем пунктам наблюдений).

ГХЦГ - незаполненные столбцы, ДДТ - заполненные столбцы

Совершенно ясно, что все эти факторы могут способствовать тому, что локальные уровни загрязнения высокостойчивыми пестицидами (например, в районах прилегающих к предприятиям химической промышленности, на которых они производились), могут выпадать из этой в целом оптимистической картины. Например, это относится к сильнозагрязненному притоку Волги р. Чапаевка, на берегах которой находится производящий (или производивший?) пестициды завод в город Чапаевске [36] а также к р. Цивиль, на которой располагался Вурнарскому заводу, производивший ГХЦГ [35]. Кстати, аналогичная ситуация была выявлена нами и в отношении другой группы приоритетных загрязняющих веществ – полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в водоемах Волжского бассейна. Проблема загрязнения этим соединениями, по нашему мнению имеет локальный характер. Однако в ряде мест (например, в районе Череповца, с его сталелитейным и коксохимическим производством, или крупнейшего промышленного центра - Нижнего Новгорода), она может быть очень острой [37-39].

По некоторым данным, загрязнение ряда водоемов ХОП могло иметь место и после указанного периода и официального запрета на применение и производства. Так, основным источником загрязнения даже отдаленных районов может быть трансграничный, в частности атмосферный, перенос из стран, в которых ХОП все еще применяются достаточно активно [23; 40]. Кроме того, известно, что в течение длительного времени после запрета, значительные количества различных пестицидов сохранялись на складах бывшей «Сельхозхимии» и сельскохозяйственных предприятий. В частности, в Ярославской области, на период 1998-1999 г. г. складировалось 305 т подлежащих утилизации ядохимикатов, многие из которых очевидно относятся к ХОП) [13, 41]. Оттуда они могли попадать в водоемы за счет плохих условий хранения, или даже «полулегального» или нелегального применения, как это было в советские времена.

В 2000-2001 гг. нами была проведена оценка уровней ХОП в пробах воды из ряда участков р. Волги в районе городов Ярославля, Костромы, Волгореченска, а также в Костромском расширении [13].

В воде были обнаружены ДДТ и его метаболиты. Концентрации этих соединений были относительно невелики, но все же позволяли проводить их надежное количественное определение. Так, содержание ДДТ находилось в пределах от 0.02 мкг/л до 0.06 мкг/л, ДДД 0.01 – 0.05 мкг/л, ДДЭ 0.01-0.04 мкг/л. Было также выяснено, что более «популярные» в прошлом изомеры ГХЦГ в большинстве проб находятся в воде изученных участков практически только на уровне качественного обнаружения. Работа выявила еще один заслуживающий внимания факт: низкие величины отношения концентраций метаболитов к концентрациям собственно пестицида указывает на то, что ДДТ поступил в воду относительно недавно, а значит, очевидно, имеются современные источники «подпитки» им водоема, точное место и природа которых остались нам неизвестными.

Таким образом, практически через 30 лет после официального запрета производства и применения ХОП они обнаруживаются в воде Волги, т. е. в Европейской части России и отнюдь не на ее юге. Причем, выявлено, что концентрации самого распространенного ранее и более гидрофильного ГХЦГ намного ниже, чем более редкого и липофильного ДДТ. Хотя выявленные концентрации были относительно невелики, они все же выше существующих на сей день (хотя и нереалистичных на наш взгляд, «узаконенных» ПДК). Более того, ХОП были обнаружены именно в воде, а не только в донных отложениях и биоте, что может служить еще одним индикатором наличия постоянной «подпитки» реки этими пестицидами.

Приведенные факты указывают на необходимость продолжения мониторинга ХОП в воде, в водоемах нашей страны, расположенных в разных регионах. Что, кстати, имеет место практически во всех странах Северной Америки и Европы.

ВЫНОС ХОП СО СТОКОМ РЕК РФ

Одной из важных проблем загрязнения среды ХОП является проблема их выноса в международные моря с внутренних территорий стран. Этот вопрос имеет поистине международное значение, позволяя оценить вклад различных государств в загрязнение мирового океана и тот ущерб, которое оно наносит его биологическим ресурсам или их потребительским свойствам с точки зрения человека. В последние годы это приобретает особое значение, поскольку именно использование биологических ресурсов считается одним из перспективных путей решений многих проблем человечества - от проблемы снабжения продовольствием, до создания и производства ценных в медицинском отношении биологически-активных препаратов. В течение длительного времени недостаток соответствующей информации об уровнях ХОП в реках бывшего СССР и РФ приводил или к очевидным переоценкам, или к недооценкам этих величин, что вызывало многочисленные дискуссии, зачастую затрагивавшие не столько ученых, сколько политиков. Так, в упоминавшемся нами обзоре Б. Бодо [31], подготовленном по заказу ЮНЕСКО и Всемирной организации здравоохранения, речной вынос ХОП оценивался на основе заведомо некорректного принципа, использование которого отражало именно недостаток адекватной информации. В качестве этого автор использовал для расчетов средние концентрации ХОП на огромных территориях, лишь формально относящихся к водосборным площадям крупнейших рек России, и отличающихся исключительным разнообразием природных и антропогенных условий. На наш взгляд, и в данных, полученных на основе данных ОГСНК/ГСН имелись существенные недостатки, связанные с недостатками в организации и функционировании системы [32; 33; 35].

Поэтому в ходе реализации международного проекта, о котором говорится во введении, одной из поставленных задач было оценить реальные величины выноса ХОП реками России.

Для этого также использовался подход, основанный на дополнении и сравнении «официальных» данных ОСГНК/ГСН с данными «независимых» специалистом. При этом для расчета собственно величин выброса использовалась простая формула: среднегодовая концентрация ХОП на замыкающем створе умножалась на величину стока реки в этом створе. Кроме того, по мере возможностей при расчетах учитывались и доступные сведения о количестве примененных ХОП не по территориям административных единиц, а пересчитанная на реальную площадь водосбора реки (42; 35). Естественно, в силу ряда причин (укажем хотя бы то, что многие «замыкающие» створы сети гидрографических наблюдений в реалиях нашей страны находятся за несколько сотен километров от места впадения реки в море). Но все же, на наш взгляд, избранный подход способен дать более надежную информацию, чем например, подход Б. Бодо, на результатах которого строились выводы уважаемых международных организаций.

Была проведена обобщенная оценка величин стока ХОП крупнейшими реками страны [35]. Полученные нами данные показали, что величины интенсивности применения ХОП (оцененные путем деления количество использованного пестицида на площадь водосбора) в пределах различных речных бассейнов различались очень значительно. Но поскольку в расчете выноса особое значение приобретает величина стока реки, именно этот фактор во многих случаях имел больший удельный вес. Наибольшая нагрузка ГХЦГ на единицу площади водосбора была выявлена в бассейнах Терека – (2.01 т/км^2) и Волги (1.07 т/км^2) [35]. В бассейнах остальных рек удельные величины применения ХОП были значительно ниже. Однако по абсолютным величинам применения ГХЦГ выделялся бассейн р. Обь, где, например, в 1986 г., было применено 558.2 т ГХЦГ (сумма изомеров) [42]. Надежные данные по применению ДДТ и его метаболитов оказались для нас недоступными и соответствующие расчеты не были проведены.

Что касается собственно стока пестицидов, оказалось, что

по «официальным» данным бассейны морей, в которые впадают реки России можно расположить в следующем порядке: Восточно-Арктический > Западно-Арктический > Тихоокеанский > Балтийский > Каспийский > Азово-Черноморский. А по данным специалистов из других организаций: Восточно-Арктический > Тихоокеанский > Каспийский > Западно-Арктический > Балтийский > Азово-Черноморский.

Вынос изомеров ГХЦГ был наибольшим. Максимальный вынос этих соединений за год (по данным ОГСНК/ГСН) зарегистрирован в р. Обь (в 1991 г. 47 т γ -ГХЦГ, 38.6 т α -ГХЦГ) и в р. Енисей (9.6 и 23.5 т, соответственно) – т. е. реками, имеющими очень значительный годовой сток. По данным «независимых» специалистов, реки Обь и Енисей также выносили наибольшие количества изомеров ГХЦГ. Однако абсолютные величины выноса были меньше: например, в 1991 г.р. Обь транспортировала в Карское море 4.0 и 5.1 т α - и γ -ГХЦГ, соответственно. Для этой же реки в 1988 и 1991 гг. вынос составил 2.6 и 5.2 т для тех же ХОП, соответственно. Для ДДТ максимальные величины выноса по данным ОГСНК/ГСН отмечены в реках Волга (13.3 т в 1989 г.), Нева (2.6 т в 1992 г.), Енисей (2.0 т в 1994 г.) и Обь (1.9 т в 1990 г.). Однако по данным специалистов других организаций максимальные величины выноса ДДТ и ДДЭ зарегистрированы в 1988 и 1990 гг. в р. Енисей (4.3 и 2.1 т, соответственно) и в 1991 и 1989 гг. в р. Обь (3.5 и 2.9 т, соответственно).

Некоторые возможные объяснения причин расхождения результатов расчета на основе «независимых» и «официальных» данных приводились выше и в деталях обсуждены в ряде публикаций [32, 34, 35]. В целом же можно отметить значительное «качественное» сходство оценок – порядки морских бассейнов и рек, выстроенные с учетом обоих использованных нами наборов данных различаются мало. Также, согласно обеим оценкам вклад страны в загрязнение морей был весьма значительным, но в период 1988 – 1996 годов про-

изошло его заметное снижение. В то же время, довольно значительными оказались различия в абсолютных величинах выноса пестицидов – по данным ОГСНК/ГСН он намного выше, чем по «независимым», информация которых также позволяет сделать вывод о более значительном снижении величин стока ХОП. В точных причинах такого расхождения еще предстоит разобраться.

ХОП В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ НЕКОТОРЫХ ВОДОЕМОВ РОССИИ

Анализ содержания ХОП в донных отложениях (ДО) позволяет более надежно выявить степень загрязнения ими водных экосистем. Поэтому публикации об уровнях этих пестицидов в ДО разных типах водоемов многих стран мира очень обширны. Аналогичные исследования проводились и в бывшем СССР. Однако в данном случае они также были зачастую менее доступными и обширными, по сравнению с информацией по уровням ХОП. К тому же, в отличие от многих других стран, в нашей до сих пор не установлены законодательно нормативы предельно допустимого содержания загрязняющих веществ в ДО. Так, в Канаде допустимые уровни содержания в ДО составляют для суммы ДДТ и его метаболитов 1.19 мкг/кг сухой массы, а суммы изомеров ГХЦГ - 0.94 мкг/кг сухой массы. В целом, близки к канадским соответствующие нормативные величины, принятые в Нидерландах. Такие нормативы предельно допустимых уровней содержания ХОП в ДО, «работают» совершенно аналогично ПДК загрязняющих веществ в воде. Известно, что сам подход основанный на использовании «универсальных» для водоемов любых зон, различающихся по целому ряду условий, подвергается справедливой критике. Очевидно, что в случае ДО, использование предельно допустимых уровней содержания загрязняющих веществ для оценки их опасности, не свободен от недостатков. Тем менее, на сегодняшний день это единственный из возможных вариантов. Поэтому нами была проведена попытка оценить экологическую опасность

уровней пестицидов, выявленных в наших исследованиях, с использованием нормативов принятых за рубежом. С этой целью проанализированы уровни ХОП в ДО нижнего течения (64-76° СШ для разных рек) ряда рек Сибири, за период 1988 – 1994 г. [43].

При исследовании уровней ХОП в ДО Печоры, Мезени, Северной Двины, Оби, Енисея, Пясины, Лены и Колымы было выяснено, что концентрации ДДТ оказалась на уровне, или ниже пределов количественного определения во всех изученных реках. ДДД и ДДЭ были обнаружены в концентрации, позволяющей произвести количественное определение только в Северной Двине, Мезени и Печоре. Концентрации этих пестицидов были низки и во всех указанных реках снижались в течение периода исследований от уровня 1988 г. в 4.0 нг/г сухой массы (ДДД) и 3.0-3.5 нг/г сухой массы (ДДЭ), до 0, а точнее до уровня ниже пределов количественного определения (1991-1993 г. г.). Такое соотношение ДДТ (точнее его фактическое отсутствие, при наличии производных) и его метаболитов может служить индикатором относительно давнего попадания соединений этой группы в места отбора проб.

Иная картина была выявлена для изомеров ГХЦГ. Так, α -ГХЦГ был обнаружен в ДО пяти из восьми обследованных рек, причем наибольшие концентрации были найдены в Печоре (2.5 нг/г сухой массы). Концентрация этого пестицида также снизилась к концу периода наблюдений до уровня ниже пределов количественного определения во всех реках, где он был до этого обнаружен. Та же тенденция была отмечена и для γ -ГХЦГ, который был найден во всех реках, за исключением р. Колымы: его содержание в ДО упало за период наблюдений с примерно 3.5 нг/г сухой массы (Северная Двина и Мезень) в 1988 г., до уровня ниже пределов количественного определения во всех реках в 1994 г. Единственным исключением явились ДО, отобранные в крайне северном течении Лены – они были выявлены на низком уровне (порядка 1.2 нг/г сухой массы) и этот уровень сохранился практически не-

изменным до конца периода наблюдений.

Следует отметить, что выявленные концентрации ХОП в ДО рек на севере Сибири оказались в целом выше тех, которые были обнаружены примерно в то же время в реках и озерах Севера Америки и в Норвегии, расположенных примерно на тех же широтах [44; 45]. И вместе с тем, работа показала, что в нижнем течении восьми крупнейших рек Сибири (т. е. в районах Крайнего Севера), уже в 1988 г., содержание было ХОП значительно ниже нормативных уровней, принятых в Канаде и Нидерландах и, очевидно, может считаться «фоновым». При этом ДДТ и его метаболиты практически не были обнаружены. За период исследования произошло снижение уровней изученных ХОП фактически до «аналитического нуля». Однако на наш взгляд это не означает, что вопрос о загрязнении ХОП на севере может быть закрыт. Производство и применение ХОП в мире прекращено не полностью, трансграничный атмосферный перенос доказан (см. выше), и еще не известно каким образом скажутся на переносе и выпадении в северных широтах этих опаснейших загрязняющих веществ изменения атмосферной циркуляции, которые могут произойти в результате глобального потепления. Еще одним подтверждением тезиса о том, что снимать с повестки дня вопрос контроля уровней ХОП в среде рано, могут служить результаты наших анализов уровней ХОП в ДО из ряда водоемов Монголии, проведенное в 2004 г. [46].

Как известно, Монголия – страна с низкой плотностью населения, небольшим количеством промышленных предприятий и малыми площадями, отведенными под развитие интенсивного растениеводства. Иными словами, с известными издержками (например, обусловленными близостью Китая, где земледелие наоборот сверх интенсивно, а ХОП активно применялись в течение длительного времени), мы предполагали, что эта страна может дать представление о фоновых уровнях ХОП. Всего были исследованы пробы ДО, отобранных на 13 станциях, расположенных в основном реч-

ном бассейне Монголии - бассейне р. Селенги и в одном из близких к этому бассейну озер (Орог-Нур). На подавляющем большинстве станций были обнаружены ДДТ и его метаболиты, а также α -ГХЦГ и γ -ГХЦГ. Максимальные выявленные концентрации ДДТ (5.2-5.3 нг/г сухой массы) были отмечены в районах, близких к крупному промышленному комбинату и городу Эрдэнэт, а также в ДО озера Орог на юге района исследований. Минимальные концентрации соответствовали пределу количественного определения. Аналогичной была ситуация с метаболитами ДДТ: их уровни колебались от 4.4 нг/г сухой массы (ДДД, Эрдэнэт) до «аналитического нуля». Наконец, концентрации обоих изомеров ГХЦГ, (максимально 1.2 и 1.4 нг/г сухой массы для α -ГХЦГ и γ -ГХЦГ, соответственно), были наибольшими в ДО озера Орог, а на вторыми по уровням загрязнения были ДО из района Эрдэнэта. На остальных станциях величины концентраций занимали промежуточное положение. В целом, можно констатировать, что выявленные уровни относительно невелики. Однако обращает на себя внимание характерное отношение концентраций ДДТ и его метаболитов, которое может указывать на существование «свежего» источника поступления этого пестицида. Следует отметить, что точки отбора проб, в которых отмечены максимальные уровни пестицидов, находятся в совершенно разных условиях: если район Эрдэнэта - в целом один из наиболее загрязненных в Монголии (о чем говорят результаты наших анализов и других загрязняющих веществ – см. [46]), то озеро Орог расположено в относительно ненаселенной зоне, но на «крайнем» юге района наших исследований. Причины такого явления еще требуют своего изучения.

Результаты этой работы показали, что в Монголии, где земледелие, считающееся основным источником загрязнения ХОП, никогда не было интенсивным и развитым на больших площадях, а производство пестицидов отсутствовало, эти соединения обнаруживаются в водоемах. Это не означает, что

эти пестициды в Монголии не применялись (к сожалению, данные о применении ХОП в этой стране нам не доступны). Однако мы считаем вполне вероятным, что основным источником появления пестицидов в исследованных водоемах, может быть не столько их применение внутри страны, сколько трансграничный перенос из стран, расположенных южнее.

СОДЕРЖАНИЕ ХОП В НЕКОТОРЫХ ВИДАХ РЫБ

Совершенно очевидно, что большой интерес представляет мониторинг уровней ХОП не только в воде и ДО, но и в биоте. В этом плане особый объект - рыбы, многие из которых находятся на вершине трофических пирамид водоемов, а также служат важными промысловыми объектами. Их качество, продукция, потребительские свойства и возможные уровни использования в современных условиях зачастую определяются именно содержанием в тканях рыб различных ксенобиотиков. Кроме того, неотъемлемой частью оценки влияния загрязняющих веществ на состояние отдельных особей и популяций должно стать определение уровней потенциально опасных ксенобиотиков в организме рыб. Наконец, рыбы в ряде случаев являются наиболее удобным и информативным объектом биомониторинга и биоиндикации [23]. Неудивительно поэтому, что этой проблеме посвящена обширная и достаточно хорошо известная специалистам литература. Много работ по данному вопросу вышло в нашей стране, и некоторые из них будут обсуждаться при сравнении с оригинальными данными, приведенными ниже.

С нашим участием был проведен анализ содержания ДДТ и его метаболитов, а также изомеров ГХЦГ в печени и жире (общие липиды) налима (*Lota lota* L.), пробы которых отбирались в те же годы (1988-1994), и в тех же северных участках сибирских рек, в которых анализировались ДО (см. предыдущий раздел) [43]. Более того, точки отбора проб ДО и отлова рыб были, насколько возможно, расположены близко друг от друга.

Оказалось, что в печени и жире налима содержание ХОП

было, значительно выше, чем в ДО, хотя и в данном случае в течение срока исследований уровни пестицидов снижались. Максимальные концентрации ДДТ (рассчитывали сумму ДДТ и его изомеров) были обнаружены в налиме из Печоры в 1988-1990 г: 57-64 нг/г сырого веса в печени, 330 нг/г сырого веса в жире. Но к 1994 г. они упали до 9 нг/г и приблизительно 40 нг/с, в печени и жире, соответственно. В рыбах из Оби и Северной Двины в 1988 г. концентрации суммарного ДДТ составили 34 нг/г и 23 нг/г (в печени), соответственно и примерно 170 нг/г в жире рыб из обеих рек. К 1993-1994 г. они упали до уровней в печени 1 нг/г (Обь) и 3 нг/г (Северная Двина), а в жире – почти до нуля. В других реках, концентрации этого пестицида и его метаболитов были значительно ниже (не более 20 нг/г сырого веса в печени и примерно 100 нг/г в жире). Причем, особенно в случае с содержанием суммы ДДТ в жире, снижение происходило постепенно, иногда приобретая практически линейный характер.

Что касается γ - и α - изомеров ГХЦГ (здесь также рассчитывалась их сумма), в печени рыб из Печоры их концентрации также были наибольшими: 17 нг/г в 1990 г.. Но к 1994 г содержание этих токсикантов снизилось примерно до 5 нг/г в. По содержанию этих ксенобиотиков в жире налима, лидировали две реки – Северная Двина и Печора - 75 нг/г и 65 нг/г, соответственно (различия между ними недостоверны). В целом, уровни суммы изомеров ГХЦГ в налиме из всех рек снижались, так же как уровни ДДТ. Но, в отличие от последних, линейного снижения не наблюдалось, и картина была менее четкой.

Нам известна только одна работа, в которой проанализировано содержание ХОП в налиме из реки РФ – Енисей. В печени концентрация суммы ДДТ составила 195.8 нг/г, а суммы изомеров ГХЦГ 2.6 нг/г сырого веса (de March et., 1998). Проведенный в Канаде анализ содержания тех же пестицидов в печени налима показал, что их уровни были близки к выявленным нами в сибирском налиме (за исключением двух канадских точек, отличавшихся чрезвычайно высокой концентраци-

ей суммы метаболитов ДДТ, доходившей до 1490 нг/г сырого веса) [47]. В печени рыб из других точек уровни составляли в среднем около 100 нг/г (метаболиты ДДТ) и 72-18.8 нг/г сырого веса (изомеры ГХЦГ) [47]. Интересно, что анализ концентраций ХОП в печени налима из канадской р. Макензи, в 1986, 1989 и 1994 г. г. [45], не выявил заметных признаков снижения с годами, отмеченных в нашей работе.

Другие рыбы анализировались чаще. Так, в плотве (*Rutilus rutilus* L.), отловленной в разных участках Рыбинского водохранилища, суммарная концентрация метаболитов ДДТ варьировала между 28 и 3000 нг/г, а γ -ГХЦГ между 5 и 28 нг/г сырого веса [48]. В той же работе приводятся данные о содержании этих ХОП в щуке Рыбинского водохранилища: 0-45 нг/г (сумма метаболитов ДДТ) и 0-18 нг/г сырого веса (γ -ГХЦГ). Т. е. в данном случае, уровни ХОП в хищной щуке оказались ниже, чем в нехищной плотве. В других случаях картина была более ожидаемой – хищники накапливали больше ХОП. Так, в рыбах из более южных районов Украины) уровни суммы изомеров ДДТ колебались у леща (*Abramis brama* L.) от 0.93 до 13.5 мг/кг сырого веса, у карася – от 0.79 до 2.2 мг/кг, а у хищных судака (*Stizostedion lucioperca* L.) и окуня (*Perca fluviatilis* L.) они были существенно выше: 2.5-33.4 мг/кг и 3.7-22.0 мг/кг, соответственно [49]. В тканях печени севанского сига (латинское название не приведено) в 1985 г. суммарное содержание метаболитов и самого ДДТ варьировало от 0.013 до 0.104 мг/кг сырого веса, а суммарное содержание изомеров ГХЦГ – от 0.002 до 0.006 мг/кг [23].

В целом же, приведенные данные показывают, что в налиме, отловленном на севере сибирских рек, уровни ХОП были ниже, чем в других рыбах из более южных районов страны и в период с 1988 по 1994 г наблюдалось их устойчивое падение.

Еще один вывод, который можно сделать на основе приведенных данных состоит в том, что рыбы более активно накапливают ДДТ и его метаболиты, но не изомеры ГХЦГ.

Совершенно очевидно, что это связано с большей липофильностью пестицидов первой группы.

Полученные нами данные об уровнях содержания ХОП в тканях налима привели к вопросу: насколько опасны выявленные уровни пестицидов для потребляющих рыбу людей? На севере страны налим является важным объектом промыслового и любительского лова и потребляется населением в значительных количествах. Причем, как известно, в большинстве мест России особенно ценится именно печень – основное депо пестицидов. В России приняты два официальных документа, определяющих допустимые уровни ДДТ и ГХЦГ в пищевых продуктах, включая рыбу. Согласно одному из них [50] максимальные ежедневные дозы γ -ГХЦГ не должны превышать 10 нг/г, ДДТ – 5 нг/г. Согласно другому документу [51], ежедневная доза потребления изомеров для взрослых не должна быть выше 10 нг/г, для детей – 5 нг/г. В том же документе регламентируются максимально допустимые концентрации ГХЦГ в рыбе: (свежая, замороженная, охлажденная) – 30 нг/г, а в печени рыб и продуктах из нее – 1000 нг/г. Из этого видно, что допустимые нормы намного выше, чем обнаруженные нами в печени налима севера сибирских рек. Для сравнения укажем соответствующие нормативы, утвержденные в США и Канаде. В них указано, что в любой «съедобной части» рыб, предназначенных для потребления людьми, не должно содержаться более 5000 нг/г ДДТ. Опять таки, допустимая величина намного больше, чем выявленная нами в «съедобной части» налима, его печени. Согласно проведенной в США оценке, минимальное безопасное потребление ДДТ должно составлять 500 нг/кг веса человека в день (52). Для человека весом в 70 кг, это эквивалентно потреблению ДДТ в дозе 35000 нг/день. Если исходить из того, что концентрация ДДТ в печени налима составляет 10 нг/г (уровень 1994 г. у наиболее загрязненных рыб из Печоры), масса печени соответствует порядка 5% от массы всей рыбы, а концентрация ДДТ в печени в 10 раз больше, чем во всей рыбе, то оценка

опасности потребления человеком такого веса, 1 кг рыбы в день, дает дневную дозу в 1450 нг/д. Как видно, это значительно ниже указанной дозы в 35000 нг/д, даже при столь невероятно высоком уровне ежедневного потребления этой рыбы. Следовательно, можно сделать вывод, что обнаруженные нами уровни ХОП в налиме из северных частей сибирских рек, фактически не представляют угрозы здоровью нормального человека. Однако нельзя исключать того, что ситуация, в целом, или локально, может ухудшиться в силу каких-либо причин. Поэтому, контроль содержания устойчивых загрязняющих веществ, включая ХОП, в рыбе обязательно следует продолжать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, материалы настоящего обзора, доказывают, что можно констатировать снижение уровней ХОП в водных экосистемах. В то же время, вопрос об их контроле снимать рано и требуется продолжение мониторинга этих пестицидов. При этом, на наш взгляд, нельзя ограничиваться анализом этих соединения только в воде - он должен включать определение уровней пестицидов в ДО и биоте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Jensen J., Adare K. and Shearer R. (Eds) Canadian Arctic Contaminants Assessment Report, Indian and Northern Affairs Canada, Ottawa: INAC, 1997. 460 pp
- [2] Li Y.F. Global HCH usage with 1 x 1 degree longitude/latitude resolution // Environ. Sci. Technol. 1996. V.30. P. 3525-3533.
- [3] Donald, D.B. and Syrgiannis J. Occurrence of pesticides in Prairie Lakes in Saskatchewan in relation to drought and salinity // J. Environ. Quality. 1995. V. 24. P. 266-270
- [4] Giese F., Krueger A. Results of a Mussel Monitoring Program of Organochlorines in Lake Stechlin. (Ergebnisse eines Muschel-Monitoringprogramms fuer chlorierte Kohlenwasserstoffe im Stechlinsee.) // Limnologica. 1995. V. 25. N 3-4. P. 311 – 320.
- [5] Petty J.D., Huckins J.N., Orazio C.E., Lebo J.A., Poulton B.C., Gale R.W., Charbonneau C.S., Kaiser E.M. Determination of Waterborne

- Bioavailable Organochlorine Pesticide Residues in the Lower Missouri River // *Environ. Sci. Technol.* 1995. V. 29. N 10. P. 2561 – 2566
- [6] Cooper C.M.() Persistent Organochlorine and Current Use Insecticide Concentrations in Major Watershed Components of Moon Lake, Mississippi, USA // *Arch. für Hydrobiologie.* 1991. V. 121. N1. P. 103-113.
- [7] Drevenkar V., Fingler S., Froebe Z., Vasilic Z. Persistent Organochlorine Compounds in Water and Soil Environments // *Environ. Manage. Health.* 1996. V.7. N4. P.5-8.
- [8] Solomon M. E. Insect population balance and chemical control of pests. Pest outbreaks induced by spraying // *Chem. Ind.* 1953. V.43. P. 1143-1147.
- [9] Ripper W. E. Effect of pesticides on the balance of arthropod populations // *Ann. Rev. Entomol.* 1956. V.1. P. 403-438.
- [10] Carson R. *Silent Spring.* Boston: Houghton Mifflin, 1962.
- [11] Nicholson H. P., Grzenda A. R., Lauer G. J., Cox W. S., Teasley J. I. Water pollution by insecticides in an agricultural river basin. 1. Occurrence of insecticides in river and treated municipal water // *Limnol. Oceanogr.* 1964. V.9. P. 310-316.
- [12] Waddell T.E., Bower B.T. Agriculture and the Environment: What Do We Really Mean? // *J. Soil Water Conserv.* 1988. V. 43. N3. P. 241 - 242.
- [13] Павлов Д.Ф., Бакин А.Н. Хлорорганические пестициды во внутренних водоемах России: обзор литературы и собственные данные // В кн.: *Актуальные проблемы водной токсикологии.* Борок: ИБВВ РАН, 2004. С. 150-175.
- [14] Young A.L. Minimizing the risk associated with pesticides use. An overview // *Am. Chemical Soc. Symp. Series*, 1987. V. 336. P. 1-11.
- [15] Loganathan B.G., Kannan K. Time Perspectives of Organochlorine in the Global Environment // *Marine Pollution Bulletin.* 1991. V. 22. N12. P. 582-584.
- [16] Брагинский Л. П. Проблема пестицидов в водной токсикологии // В кн.: *Вопросы токсикологии.* М.: Наука, 1970. С. 81-88.
- [17] Брагинский Л. П. Пестициды и жизнь водоемов. Киев: Наукова думка, 1972. 236 с.
- [18] Комаровский Ф.Я., Метелев В.В., Перевозченко И.И., Пищолка Ю.К. ДДТ и его метаболиты в органах и тканях рыб // В кн.: *Формирование и контроль качества поверхностных вод.* 1975. вып. 1. С. 74-79.
- [19] Воронова Л.Д., Попова Г.В., Пушкарь И.Г. Загрязнение водоемов пестицидами // В кн.: *Водная токсикология.* М.: Наука, 1976. С. 48-80.
- [20] Алексеев В. А., Лесников Л. А. Пестициды и их влияние на водные организмы // *Изв. НИИОРХ.* 1977. № 121. С. 8-93.

- [21] Брагинский Л. П., Комаровский Ф. Я., Мережко А. И. Персистентные пестициды в экологии пресных вод. Киев: Наукова думка, 1979. 141 с.
- [22] Комаровский Ф.Я. Закономерности накопления пестицидов в трофических цепях водохранилищ и его токсикологические последствия для рыб. Автореф. дисс. уч. степени доктора биол. наук., М., 1984, 42 с.
- [23] Черняев Ж.А., Стрекозов Б.П. Биомониторинг экотоксикологической ситуации в заповедниках путем выявления хлорорганических пестицидов в тканях рыб // Биологические науки. 1991. № 11. Вып. XI. С. 114-123.
- [24] Роотс О.О., Пейкре Э.А. Салака - биоиндикатор химического загрязнения Балтийского моря хлорорганическими углеводами // В кн.: Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград, 1983. С. 115-117.
- [25] Сахакалян Э.О., Акопян А.Г., Буматян Ю.А. Некоторые вопросы изучения загрязнения вод Севанского бассейна стойкими пестицидами // Тр. СГБС АН АрмССР. 1984. Т. 19. С. 116-119.
- [26] Шипунов Ф.Я., Степанов А.М., Фролов В.А. Загрязнение биосферы в Северном полушарии на фоновом уровне // В кн.: Антропогенные нарушения и природные изменения наземных экосистем. М.: ИЭМЭЖ АН СССР, 1981. С. 7-287.
- [27] Маслова О.В., Шебунина Н.А., Комаровский Ф.Я. Кумуляция и распределение стойких пестицидов в экосистемах Килийского рукава Дуная и Днепровско-Бугского лимана // Гидроб. ж. 1990. Т. 26. № 4. С. 62-66.
- [28] Торяникова Р.В., Карасева Т.А. Содержание и поведение пестицидов в поверхностных водах Узбекистана // Тр. Среднеаз. регион. науч.-исслед. Гидромет. ин-та, 1992. № 142. С. 80-100.
- [29] Коротова Л.Г., Тарасов М.Н., Демченко А.С. Миграция гексахлорциклогексана, метафоса и хлорофоса на водосборах // Гидрохим. матер. 1989. Т. 16. С. 1-165.
- [30] Медовар А.А., Иванова Л.Н., Письменная М.В., Манько Н.А. Вопросы мониторинга пестицидов в водных экосистемах Юга Украины // В кн.: Состояние перспективы развития методологических основ химического и биологического мониторинга поверхностных вод суши. Ростов-на-Дону. 1987. С. 9-10.
- [31] Bodo B. An assessment of environmental and aquatic ecosystem contamination by persistent organochlorine pollutants (POPs) in the Russian Federation. Burlington, Canada: The UNEP and WHO Collaborating Centre for GEMS/Water, 1998. 152 p.

- [32] Zhulidov A.V., Khlobystov V.V., Robarts R.D., Pavlov D.F. Critical analysis of water quality monitoring in the Russian Federation and former Soviet Union // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2000. V. 57. P. 1932-1939.
- [33] Zhulidov A.V., Robarts R.D., Holmes R.M., Peterson B.J., Kamari J., Merilainen J., Headley J.V. Water quality monitoring in the former Soviet Union and the Russian Federation: assessment of analytical methods. Helsinki: Finnish Environment Institute, 2003. 48 p.
- [34] Zhulidov A.V., Headley J.V., Pavlov D.F., Robarts R.D., Korotova L.G., Fadeev V.V., Zhulidova O.V., Volovik Y., Khlobystov V.V. Distribution of organochlorine insecticides in rivers of the Russian Federation // *J. Environ. Qual.* 1998. V. 27. P.1356-1366
- [35] Zhulidov A.V., Headley J.V., Pavlov D.F., Robarts R.D., Korotova L.G., Vinnikov Y.Y., Zhulidova O.V. Riverine fluxes of the persistent organochlorine pesticides hexachlorocyclohexane and DDT in the Russian Federation // *Chemosphere*. 2000. V. 41. P. 829-841.
- [36] Ежегодник качества поверхностных вод Российской Федерации. 1994 г. Обнинск: Федеральная служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Гидрохим. институт, 1996. 581 с.
- [37] Козловская В.И., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Халько В.В, Винников Ю.Я, Анохин С.В. Влияние загрязняющих веществ на состояние рыбы Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища (БА Флеров, ред.). Рыбинск: ИБВВ РАН, 1990.С.123-143.
- [38] Siddal R., Robotham P.W.J., Gill R.A., Pavlov D.F., Chuiko G.M. Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (ПАХ) concentrations in bottom sediments and liver tissue of bream (*Abramis brama*) in Rybinsk reservoir, Russia // *Chemosphere*. 1994. V. 29. P. 1467-1476.
- [39] Павлов Д.Ф. Полициклические ароматические углеводороды // В кн.: Экологические проблемы Верхней Волги. Ярославль: ИБВВ РАН, 2001. С. 248-253.
- [40] Bard S.M. Global transport of anthropogenic contaminants and the consequences for the Arctic marine ecosystem // *Marine Pollution Bull.* 1999. V. 38. P. 356-379.
- [41] Доклад о состоянии окружающей природной среды Ярославской области 1998 г. Ярославль: Государственный комитет по охране окружающей среды Ярославской области, 1999. 135 с.
- [42] Pavlov D.F., Robarts R.D., Korotova L.G., Zhulidov D.A. An assessment of use and river flow associated gross flux into the Arctic seas of the organochlorine insecticide γ -HCH from the Russian Federation // In: *Proceed. of the workshop on persistent organic pollutants (POPs) in the*

- Arctic: Human Health and Environmental Concerns. Rovaniemi, Finland: AMAP, 2000. P. 201-203 p.
- [43] Zhulidov A.V., Robarts R.D., Headley J.V., Liber K., Zhulidov D.A., Zhulidova O.V., Pavlov D.F. Levels of DDT and hexachlorocyclohexane in burbot (*Lota lota* L.) from Russian Arctic rivers // Sci. Total. Environment. 2002. V. 292. N 3. P. 231-246.
 - [44] de March B.G.E., de Wit C.A., Muir D.C.G. Persistent organic pollutants. AMAP assessment report: Arctic pollution issues. Oslo: AMAP, 1998. P. 183-372.
 - [45] Braune B., Muir D., de March B., Gamberg M., Poole K., Currie R., Dodd M., Dushenko W. et al. Spatial and temporal trends of contaminants in Canadian Arctic freshwater and terrestrial ecosystems: a review // Sci. Total. Environ. 1999. V. 230. P. 145-207.
 - [46] Павлов Д.Ф., Томилина И.И., Законнов В.В., Амгаабазар Э.. Оценка токсичности донных отложений рек бассейна реки Селенги на территории Монголии // Водные ресурсы. 2007 (в печати).
 - [47] Muir D.C.G., Grift N.P., Lockhart W.L., Wilkinson P., Billeck B.N., Brunskill G.J. Spatial trends and historical profiles of organochlorine pesticides in Arctic lake sediments // Sci. Total. Env. 1995. V. 160/161. P. 447-457.
 - [48] Майер Ф.Л., Козловская В.И., Флеров Б.А. Определение остаточных количеств пестицидов в рыбах из Рыбинского водохранилища // Гидроб. ж. 1981. Т.18. С.83-87.
 - [49] Маслова О.Н. Сравнительная оценка содержания коллагена у рыб Днепро-Бугского лимана и Килийской части дельты Дуная // Гидроб. ж. 1981. Т. 18. С. 74-90.
 - [50] СанПиН 42-123-5317-91. М., 1991.
 - [51] Гигиенические нормы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (список). М., 1997. 52 с
 - [52] Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta, USA: NHA, 2000.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ
И БИОИНДИКАЦИИ ДЛЯ ЭКОЛОГО-
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА
ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ, ПОДВЕРЖЕННЫХ
АТМОСФЕРНОМУ ЗАГРЯЗНЕНИЮ**

**© 2007г. И.И. Томилина, В.А. Гремячих, Л.П. Гребенюк,
В.Т. Комов**

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

ВВЕДЕНИЕ

Система мониторинга качества вод в России ориентирована на контроль загрязнения важных для народного хозяйства водных объектов, подвергающихся воздействию сточных вод. Значительно более редкая сеть наблюдений включает условно-фоновые объекты, малые озера практически отсутствуют в системе мониторинга. Получаемая информация не дает представления об основных направлениях антропогенных преобразований качества вод под влиянием атмосферного загрязнения [1].

Эколого-токсикологический контроль с использованием методов биотестирования и биогеохимической индикации (в противоположность химико-аналитическому), не выявляя прямых связей регистрируемых эффектов с определенным действующим агентом, позволяет оценивать и прогнозировать отклонения в состоянии биологических систем, вызванные воздействием многофакторной антропогенной нагрузки. Именно поэтому он и представляется перспективным для рекогносцировочной оценки экологического благополучия малых водоемов.

Одной из актуальных проблем современной экологии и геохимии является антропогенное закисление поверхностных вод. Оно оказывает как прямое, так и опосредованное воздействия на биологические системы, вызывая изменения в организмах, сообществах и экосистемах в целом. Известно, что сниже-

ние уровня pH воды и непосредственно связанная с ним олиготрофизация водоемов [2] отрицательно сказываются на таксономическом богатстве флоры [3] и фауны [4] водных экосистем, функциональных и продукционных характеристиках сообществ гидробионтов [3, 5, 6]. Снижение уровня pH воды рек и озер сопровождается также изменением депонирующей способности донных отложений (ДО), скорости и объема миграций тяжелых металлов (ТМ) [7]. При этом происходит увеличение их концентраций в воде, токсического и тератогенного действия на гидробионтов [8], в частности, повышение биодоступности ртути в результате ускорения процессов ее метилирования [2, 9].

Цель работы – оценить возможности методов экологотоксикологического контроля при прогнозировании последствий антропогенного закисления для экологического состояния биоты пресноводных водоемов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В 1991-2006 гг. исследовали качество вод озер северо-запада Европейской России, в большей степени подверженных атмосферному антропогенному закислению и в меньшей – влиянию хозяйственной деятельности человека. При этом использовали методы биотестирования и биоиндикации, апробированные и разработанные в лабораториях физиологии и токсикологии водных животных и биологии и систематики водных организмов ИБВВ РАН.

Влияние антропогенного закисления вод на состояние водных экосистем исследовали на трех группах водоемов (рис.1). К первой относились озера республики Карелия, ко второй – озера Вологодской области, расположенные на территории Дарвинского государственного заповедника. Третья группа озер располагалась в Новгородской и Псковской областях на территории Рдейского и Полистовского государственных заповедников. Отбор проб воды, грунта и бентоса, а также отлов рыбы на этих озерах проводили с разной частотой и периодичностью с 1991 по 2006 годы. Подробнее всего

были изучены озера Дарвинского заповедника, работы на которых проводились ежегодно и ежесезонно с 1991 по 1996 годы, и раз в год в 1998, 2000, 2002 и 2006 годах.

Пробы воды отбирали батометром Рутнера, грунта - дночерпателем Экмана-Борджа с площадью захвата 0.025 м². До начала тестирования пробы хранили в холодильнике при температуре +2 - +4°C не более 14 суток.

В воде озер определяли рН, цветность и концентрацию основных ионов с использованием стандартных методов [8]. В ДО - общее содержание ТМ, органическое вещество (потери от прокаливании при 500-550°C). Количественное определение содержания металлов проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии [10].

В качестве тест-организмов в работе использовали ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* Lillijeborg (для оценки токсичности воды и водной вытяжки грунтов) и личинок комаров *Chironomus riparius* Meigen [11, 12].

Критерием токсичности воды и водной вытяжки донных отложений (ВВДО) служила гибель более 20% особей за 7 дней и достоверное снижение репродуктивных показателей за тот же период [13]. Для приготовления ВВДО 1 объемную часть грунта и 4 части отстаиванной водопроводной воды интенсивно перемешивали в течение 1 часа, отстаивали и центрифугировали в течение 20 минут на центрифуге РС-6 при 2000 об/мин [14].

Основные регистрируемые показатели негативного влияния цельного грунта на представителей бентоса личинок комара *Ch. riparius* - их смертность, изменение линейных размеров после 20-суточной экспозиции [15]. В качестве дополнительного показателя интенсивности загрязнения изучали строение ротового аппарата личинок с целью обнаружения его морфологических изменений. Для этого из головных капсул личинок изготавливали постоянные препараты с использованием жидкости Фора-Берлеза и просматривали под микроскопом (х 400-600) [16].

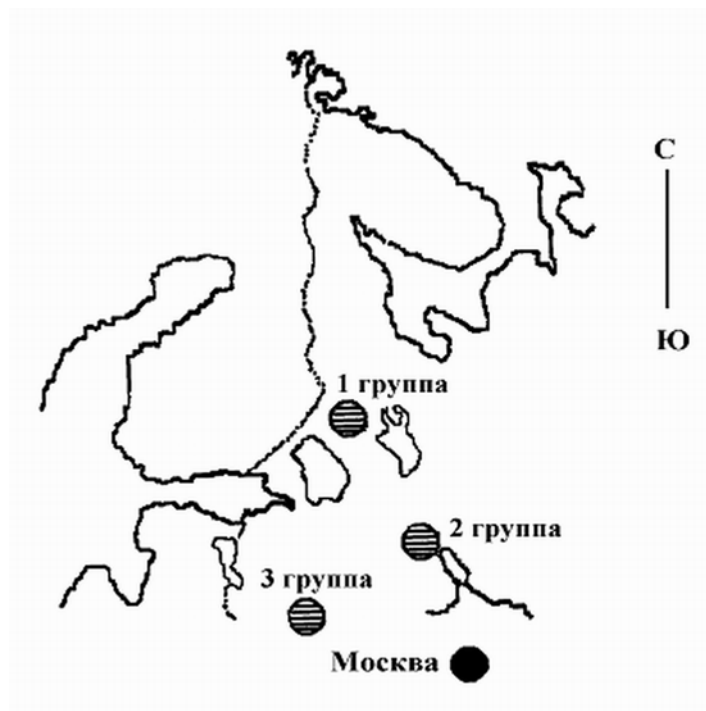


Рис.1. Карта-схема расположения групп озер, подверженных атмосферному антропогенному загрязнению

1 группа - озера Суоярвского и Кондопожского районов республики Карелия, 2 – озера Бабаевского и Череповецкого районов Вологодской области (Дарвинский государственный заповедник), 3 – озера Новгородской и Псковской областей (Рдейский и Полистовский государственный заповедник).

Исследовали три группы структур ротового аппарата личинок *Ch. riparius*: 1) сильно хитинизированные структуры (ментум, мандибулы); 2) комплекс верхней губы (премандибулы, эпифарингс, верхнегубной гребень, вооружение верхней губы – щетинки и хетоиды); 3) антенны [17]. Методика оценки тератогенного действия ДО основана на анализе патоморфологических отклонений в строении головной капсулы личинок и предполагает несколько этапов. Первый – определение относительной численности личинок с деформациями. Водоем счита-

ется благополучным, если доля личинок хирономид с аномалиями составляет от 3-5% [18] до 8% [19]. В популяции *Ch. riparius*, содержащейся длительное время в культуре и используемой для экспериментов, относительная численность таких личинок может достигать 10-14%. Второй – процентное соотношение деформированных частей ротового аппарата, которое показывает сдвиг деформаций в сторону тех или иных структур и выявляет в первом приближении определенный тип загрязнения [20]. И третий – вычисление индекса тяжести антеннальной деформации (ISAD) – количественного показателя, отражающего качественную сторону токсического воздействия на личинок хирономид [18]. Небольшие изменения, внесенные нами в схему подсчета данного индекса, имели целью упростить расчет. Опытным путем установлено, что ISAD культуральных личинок *Ch. riparius* лежит в пределах от 0.25 до 0.55.

Контролем во всех экспериментах служили интактные тест-организмы, содержащиеся в лабораторных условиях. Животных в ходе опытов кормили суспензией кормовых дрожжей.

Для сравнительной оценки содержания ртути в рыбе всех трех регионов было исследовано 560 экземпляров окуней. Средняя масса рыб составила: 20-60 г в озерах Карелии, 15-100 г – в озерах Вологодской, 15-80 г – Псковской и Новгородской областей. Количественное определение содержания металла в рыбе проводили методом холодного пара с использованием резонансной линии 253.7 нм на анализаторе ртути «Юлия-5К» [21].

Данные представляли в виде средних значений и их ошибок ($\bar{x} \pm SE$). Результаты обрабатывали статистически, используя метод дисперсионного анализа (ANOVA) и процедуру LSD-теста при уровне значимости $p=0.05$ [22]. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ STATGRAPHICS Plus 2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные водоемы не испытывали вообще или испытывали минимальное влияние хозяйственной деятельности человека. Поэтому разнообразие химического состава их

вод в значительной степени определялось площадью и особенностями водосборных бассейнов (степень заболоченности, характер почв и т.д.), влияющими на формирование химического состава поверхностного стока [23].

По содержанию двухвалентных и одновалентных катионов, железа, фосфора и сульфатов вода исследованных групп озер различалась незначительно. Так, средние концентрации катионов кальция и магния варьировали в пределах 1.2-4.0 мг/л и 0.3-0.7 мг/л соответственно. Максимальные концентрации катионов натрия не превышали 3, калия – 1.5 мг/л (Табл.1).

Таблица 1

Средние показатели химического состава воды исследованных озер

Показатели	Регион		
	Карелия	Вологодская область	Новгородская и Псковская области
Ca ⁺⁺	<u>2.26</u> 1-4.2	<u>4.04</u> 0.7-11.7	<u>1.2</u> 0.6-1.8
Mg ⁺⁺	<u>0.41</u> 0.1-0.8	<u>0.71</u> 0.2-1.8	<u>0.3</u> 0.14-0.53
Na ⁺	<u>1.0</u> 0.4-1.7	<u>1.2</u> 0.4-2.6	<u>0.84</u> 0.5-2.2
K ⁺	<u>0.61</u> 0.4-1.1	<u>0.66</u> 0.4-1.0	<u>0.46</u> 0.2-1.3
SO ₄ ⁻⁻	<u>5.06</u> 1.3-7.2	<u>6.53</u> 2.2-9.9	-
Fe _{общ}	<u>0.42</u> 0.02-1.13	<u>0.56</u> 0.11-3.51	<u>0.48</u> 0.22-0.83
P _{общ}	<u>0.02</u> 0.006-0.027	<u>0.03</u> 0.011-0.138	<u>0.06</u> 0.04-0.09

Данные представлены в мг/л; над чертой – среднее, под чертой – пределы колебаний; – данные отсутствуют.

Основные гидрохимические показатели, по которым различались исследованные озера - степень закисления и гумификации воды (Табл.2).

Таблица 2

Основные характеристики исследованных озер

Озера	S ₂ , км ²	Глубина, м	рН воды	Цветность, град
1	2	3	4	5
Карелия				
Вендюрское	10	6.0	7.0	23
Голубая Ламба	0.3	4.0	4.6	3
Чучьярви	1.1	10.0	5.1	12
Саргозеро	1.2	5.0	7.9	25
Урус	4.3	3.0	5.9	9
Суоярви	63.4	12.0	5.8	100
Вуонтеленярви	3.9	3.0	4.6	186
Вегарусярви	13.8	5.0	5.1	105
Леукунярви	0.8	-	4.9	-
Кабозеро	1.8	-	5.5	141
Дарвинский государственный заповедник (Вологодская область)				
Мороцкое	64	-	5.8	135
Искрецкое	67	-	5.8	318
Хотавец	1.6	2.0		149
Кривое	0.005	-	5.8	778
Островское	0.2	-	4.7	226
Дорожив	2	-	3.9	30
Темное	0.2	3.0	3.8	48
Дубровское	0.2	1.5	4.0	259
Мотыкино	0.02	4.0	3.8	19
Змеиное	0.01	3.0	4.2	125
Утешково	0.04	4.0	3.6	206
Долгое	0.5	-	4.8	318

1	2	3	4	5
Рдейский и Полистовский заповедники (Новгородская и Псковская области)				
Долгое	0.2	-	4.7	-
Круглое	0.4	-	4.8	-
Межницкое	1.0	-	4.6	126
Русское	4.3	-	5.1	94
Домшинское	0.5	1.8	4.6	265
Корниловское	0.1	1.5	4.4	310
Островистое	0.4	-	4.9	290
Большое Горецкое	0.3	4.5	4.8	114
Малое Горецкое	0.1	5.1	4.6	76
Роговское	1.3	2.1	4.7	219
Глухое	-	-	4.2	-
Березайка	-	-	4.1	-
Глубокое	-	-	5.0	-
Чудское	1.6	2.0	4.9	242
Рдейское	25.8	2.5	4.9	260

Примечание: – данные отсутствуют

Значения pH воды озер Карелии и Дарвинского заповедника варьировали в более широких пределах, чем водоемов Рдейского заповедника: 4,3-7,9 и 4,1-5,7, соответственно. Ацидные озера ($\text{pH} < 5$) составляли 30% исследованных озер Карелии, 66% - Дарвинского и 73% - Рдейского заповедников.

Вода большинства озер Карелии (62.5%) не окрашена или слабо окрашена (цветность до 50°), цветность воды озер Вуонтеленярви, Вегарусярви и Суоярви достигала 110°-180°. Сильно гумифицированных водоемов (цветность > 200°) среди водоемов карельского региона отмечено не было. В 50% озер Дарвинского заповедника вода имела цветность выше 200° (максимально - 778° в оз. Кривом) и лишь в 25% - 20-50°, т.е. была слабо окрашена. Средние значения показателя цветности воды озер Рдейского заповедника, ниже, чем Дарвинско-

го. Однако среди них практически не встречались водоемы с неокрашенной водой, а гумифицированные - составляли 60% общего числа. При биотестировании воды озер Вологодской, Новгородской и Псковской областей отмечено, что смертность рачка *C. affinis* не превышала допустимый методикой 20% уровень (Табл. 3). Достоверных отличий между выживаемостью тест-объекта в воде кислотных и умеренно закисленных и нейтральных озер не наблюдали.

Количество выметанной молоди на 1 самку в течение 7 суток оказалось более чувствительным показателем неблагоприятных условий, чем смертность. Зарегистрированы достоверные отличия между плодовитостью рачков, экспонированных в воде кислотных озер Дарвинского заповедника от таковой в озерах Рдейского заповедника (5.1 ± 1.4 и 9.7 ± 0.9 соответственно). По этому показателю отмечено достоверное отличие кислотных озер Дарвинского заповедника от умеренно закисленных (рН 5.5- 6.0) и озер с уровнем рН воды от 6.5 до 8.0: 5.1 ± 1.4 и 10.7 ± 3.5 соответственно. Была выявлена статистически значимая связь между снижением репродуктивных функций и низкими значениями рН воды ($r=0.46$, $p = 0.0000$).

Данные биотестирования ДО более информативны для оценки токсикологической ситуации в водоеме, поскольку грунты аккумулируют все виды загрязнений, поступающих с поверхностным стоком, атмосферными осадками, техногенными материалами хозяйственной деятельности человека [24].

При биотестировании ВВДО озер трех регионов достоверно более высокая выживаемость цериодафний была отмечена для озер Дарвинского и Рдейского заповедников (Табл. 3), плодовитость - для озер Рдейского заповедника. Репродуктивные показатели рачков, экспонированных на ВВДО озер Дарвинского заповедника были самыми низкими среди всех исследованных водоемов (6.5 ± 1.2 экз/на 1 самку), особенно для группы кислотных озер (4.6 ± 1.5 экз/на 1 самку). Для этой группы озер отмечена статистически значимая связь плодовитости животных с рН воды ($r=0.60$, $p=0.0000$).

Таблица 3

Токсикологические и тератологические показатели воды и донных отложений озер различных регионов северо-запада Европейской России

Показатель	Регион		
	Карелия	Вологодская область	Новгородская и Псковская области
1	2	3	4
Токсичность воды			
Выживаемость <i>C. affinis</i> , %	-	87.1 ± 8.1^a	88.0 ± 3.1^a
Плодовитость <i>C. affinis</i> , кол-во экз. на 1 самку	-	7.5 ± 1.9^a	10.7 ± 0.9^a
Плодовитость <i>C. affinis</i> в кислых озерах, кол-во экз. на 1 самку	-	5.1 ± 1.4^a	9.7 ± 0.9^b
Плодовитость <i>C. affinis</i> в слабых и нейтральных озерах, кол-во экз. на 1 самку	-	10.7 ± 3.5^a	13.6 ± 2.2^a
Токсичность водной вытяжки донных отложений			
Выживаемость <i>C. affinis</i> , %	79.1 ± 6.8^a	97.5 ± 1.8^b	97.5 ± 2.5^b
Плодовитость <i>C. affinis</i> , кол-во экз. на 1 самку	8.2 ± 1.8^{ab}	6.5 ± 1.2^a	12.5 ± 2.3^b

Продолжение табл. 3

1	2	3	4
Плодовитость <i>C. affinis</i> в кислотных озерах, кол-во экз. на 1 самку	4.7 ± 3.4^a	4.6 ± 1.5^a	11.4 ± 3.6^a
Плодовитость <i>C. affinis</i> в слабо-кислых и нейтральных озерах, кол-во экз. на 1 самку	8.5 ± 2.4^a	9.3 ± 1.3^a	14.5 ± 1.9^a
Токсичность цельного грунта			
Длина <i>Ch. riparius</i> , мм	10.3 ± 0.3^b	8.0 ± 0.3^a	8.5 ± 0.3^a
Длина <i>Ch. riparius</i> , мм (грунт из кислотных озера)	-	8.2 ± 0.4^a	8.4 ± 0.2^a
Длина <i>Ch. riparius</i> , мм (грунт из слабокислых и нейтральных озера)	10.3 ± 0.3^b	7.7 ± 0.5^a	9.0 ± 0.9^{ab}
Число личинок с деформациями, %	18.5 ± 5.0^a	32.4 ± 5.5^a	24.2 ± 4.0^a
Число личинок с деформациями, % (грунт из кислотных озера)	-	39.6 ± 7.4^a	27.0 ± 5.6^a
Число личинок с деформациями, % (грунт из слабокислых и нейтральных озера)	18.5 ± 5.0^a	22.8 ± 4.6^a	19.6 ± 5.2^a

^{a, b} – значения с разными буквенными надстрочными индексами достоверно различаются при уровне значимости $p=0.05$ между регионами в каждой строке; – данные отсутствуют.

Ранее было показано, что токсический эффект ВВДО не зависел от гидрохимического состава воды и биогенных элементов в том числе (цветность, содержание общего азота, фосфора, железа, анионов), а определялся содержанием в грунтах таких металлов как Pb, Se, Al, Cu ($r=0.76-0.95$, $p<0.001-0.04$) [25].

При биотестировании ВВДО озер трех регионов достоверно более высокая выживаемость цериодафний была отмечена для озер Дарвинского и Рдейского заповедников (Табл. 3), плодовитость - для озер Рдейского заповедника. Репродуктивные показатели рачков, экспонированных на ВВДО озер Дарвинского заповедника были самыми низкими среди всех исследованных водоемов (6.5 ± 1.2 экз/на 1 самку), особенно для группы кислотных озер (4.6 ± 1.5 экз/на 1 самку). Для этой группы озер отмечена статистически значимая связь плодовитости животных с pH воды ($r=0.60$, $p=0.0000$). Ранее было показано, что токсический эффект ВВДО не зависел от гидрохимического состава воды и биогенных элементов в том числе (цветность, содержание общего азота, фосфора, железа, анионов), а определялся содержанием в грунтах таких металлов как Pb, Se, Al, Cu ($r=0.76-0.95$, $p<0.001-0.04$) [25].

Для оценки межгодовой вариабельности изменения токсичности водной вытяжки ДО наиболее изученного Дарвинского заповедника был проведен анализ данных плодовитости *C. affinis*, как самого чувствительного показателя, за период 1991-1996 гг. Для кислотных озер (Змеиное, Мотыкино, Дубровское) наблюдали снижение токсичности ВВДО, что, вероятно, связано с сокращением выбросов в атмосферу серы в результате снижения промышленного производства. Объем выбросов SO₂ в атмосферу российскими предприятиями на Европейской части страны снизился с 7 млн т в 1980 году до 4 млн т в 1991г. [26]. Уменьшение токсичности водной вытяжки грунта кислотных озер происходило начиная с 1992-1993 гг., параллельно зарегистрированному снижению содержания сульфатов в воде (приблизительно в 2 раза) (Рис. 2).

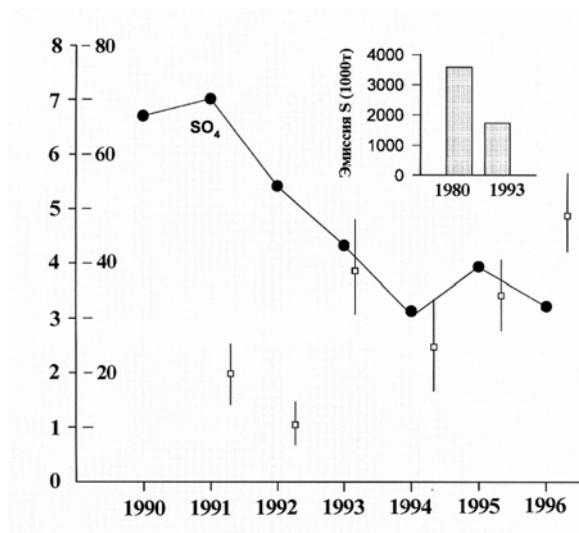


Рис. 2. Эмиссия SO_2 , содержание сульфатов воде озер и токсичность водной вытяжки донных отложений (на примере оз. Змеиное)

По оси абсцисс – годы наблюдений, по оси ординат – правая шкала: выживаемость *Ceriodaphnia affinis*, % от контроля; левая: содержание сульфатов воде, мг/л.

При экспонировании личинок хирономид на грунтах кислотных озер Карелии зарегистрирована 100% гибель животных. Смертность личинок, достоверно превышающая допустимый методикой 20% уровень, была отмечена для кислотных озер Дарвинского (Дубровское, Утешково и Мотыкино) и Рдейского (Островистое и Рдейское) заповедников.

Выявлена статистически значимая зависимость выживаемости животных от pH воды ($r=0.82$, $p<0.05$). Средние размеры тест-организмов при содержании на грунтах исследованных групп водоемов практически не различались, за исключением достоверно низких размеров личинок в умеренно закисленных и нейтральных озерах Дарвинского заповедника (Табл. 3).

Известно, что ТМ в первую очередь воздействуют на антенны личинок хирономид – органы, несущие ряд тонких

хеморецепторов и реагирующие на минимальные неблагоприятные изменения в окружающей среде [17, 27]. Именно поэтому процентное соотношение деформированных структур в большинстве случаев было сдвинуто в сторону антенн. На их долю приходилось от 60 до 80% общего числа деформаций структур ротового аппарата хирономид. Исключение составили выборки из озер Дубровское и Змеиное – 47.4% и 16.7% деформированных антенн, соответственно. При высоком значении ISAD это свидетельствует о том, что уродства антенн достигают значительной степени тяжести.

Среднее число личинок с деформациями по группам исследованных озер достоверно не различалось, так же, как и отдельно по кислотным и умеренно закисленным - нейтральным водоемам (Табл.3). Однако процент особей с деформациями ротового аппарата и индекс ISAD для личинок, экспонированных на грунтах кислотных озер всех трех регионов, были достоверно выше (32.6 ± 4.8 и 1.5 ± 0.2), чем на грунтах нейтральных (20.3 ± 2.6 и 0.8 ± 0.1). Возможно, внутри отдельно взятой группы исследованных озер данных для выявления достоверных различий по указанным показателям было не достаточно.

В каждой из исследуемых групп были выделены водоемы с высокой численностью личинок с деформациями и ISAD. В Дарвинском заповеднике – кислотные озера Дубровское и Змеиное, в Рдейском – Островистое и Роговское. Доля личинок с аномалиями составляла от 40 до 60%, ISAD значительно превышал контрольные значения. Возникновение уродств у гидробионтов при закислении вод может быть связано и с усилением миграционной способности и токсических свойств тяжелых металлов, тем более, если содержание их в воде и ДО превышает установленные ПДК. Известно, что медь обладает сильным тератогенным эффектом и присутствие даже минимальных концентраций ионов металла в среде вызывает сильные деформации антенн и верхнегубного комплекса ротового аппарата личинок хирономид [17]. Превышение ПДК по меди в воде озер Островистое и Роговское в 1.5-2 раза, вероятно, было одной из

причин увеличения количественных и качественных деформаций структур ротового аппарата тест-объекта. Количественные показатели деформаций личинок *Ch. riparius* при биотестировании донных отложений умеренно закисленных и нейтральных озер Карелии от контрольных значений не отличались.

Разнообразные варианты уродств антенн и верхнегубного комплекса личинок *Ch. riparius*, экспонированных на грунтах кислотных озер, приведены на рис.3-8. Изменениям в основном были подвержены II – V членики антенн и ряд расположенных здесь сенсилл (рис. 3, В-Е; рис. 4, А-Ж). Отмечены факты почти полной редукции жгута: антенна была представлена только базальным члеником со структурами неизвестной гомологии на вершине (Рис. 3, Е; рис. 5, Г). Интересные случаи деформаций антенн были обнаружены у личинок, содержащихся на грунтах озер Рдейского заповедника: пятнистое структурирование хитина члеников антенн (Рис. 4, А-В), «наплыв» хитина базального членика на II членик (Рис. 5, А, Б), сильная морщинистость базального членика (Рис.5, В).

Нарушения в строении верхнегубного комплекса носили следующий характер: изменение местоположения щетинок и хетоидов верхней губы, уменьшение их количества, уродливые изменения верхнегубной пластинки (Рис 6Б, В; рис. 7А), деформация и редукция зубцов эпифарингеального гребня (Рис. 6В, рис. 7А-Д), деформация склеритов эпифаринкса (Рис. 6В; рис. 7А).

При экспонировании личинок на грунтах озера Змеино-го (Дарвинский заповедник) нередко встречались случаи аномалий в строении сильнохитинизированных структур, в частности, мандибул: уменьшение числа нижних пигментированных зубцов, уродливые верхние зубцы (Рис. 8Б, Г), редукция щетинок –*pecten mandibularis* (Рис. 8Г).

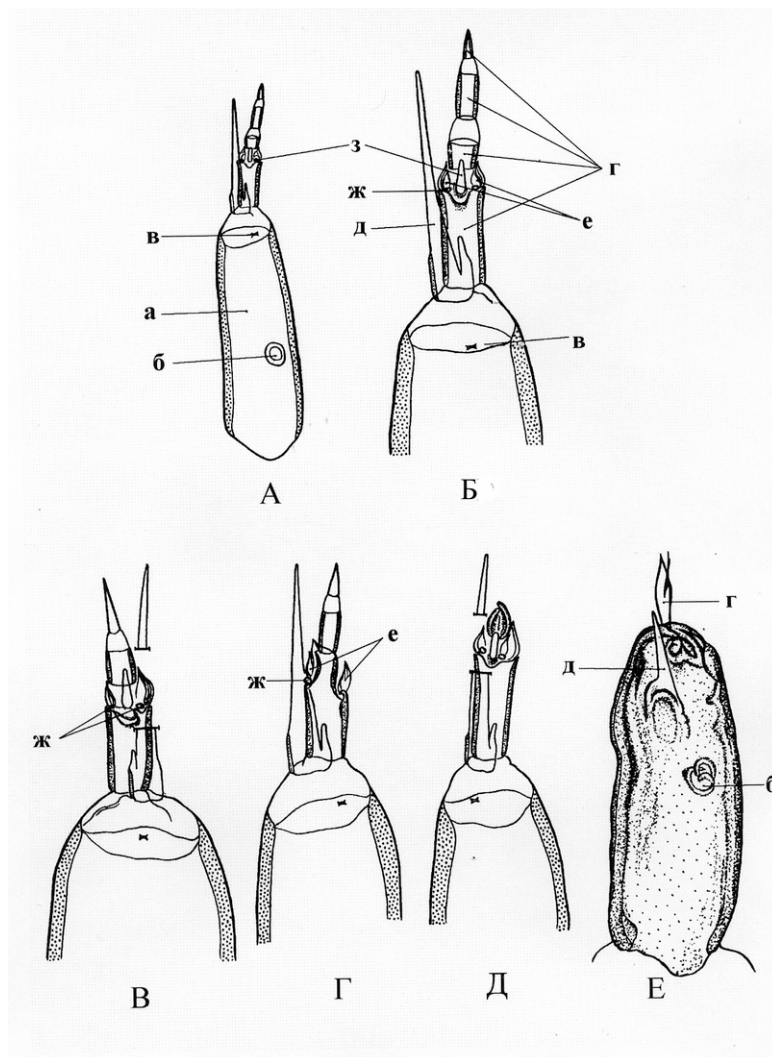


Рис.3. Антенны личинок *Ch. riparius* IV возраста (Дарвинский государственный заповедник).

А, Б – нормальное строение; В–Е – деформированные антенны.

а – базальный (I) членик; б – кольцевой орган (RO); базиконический орган (BS); г – жгут (II – V членики антенны); д – лациния (blade); е – лаутерборновы органы (LO); ж – peg sensilla (PS); з – грифелек, style (St)

А x200, Б – Е x 400.

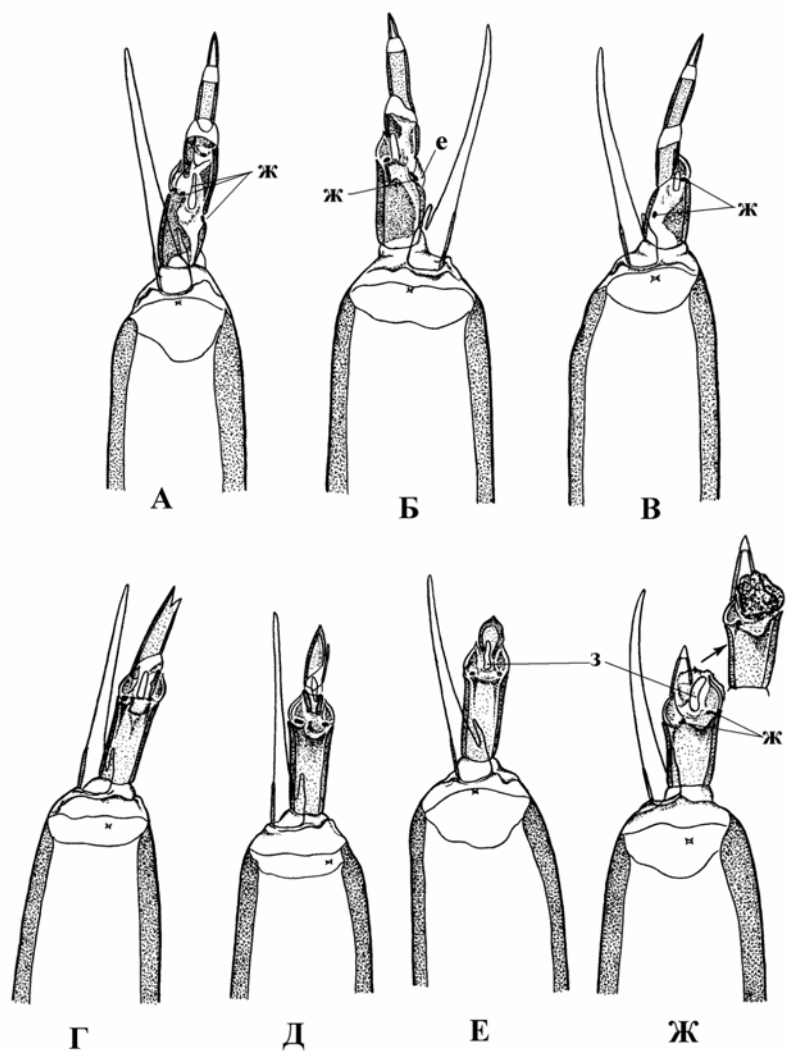


Рис.4. Деформированные антенны личинок *Ch. riparius* IV возраста (Рдейский заповедник), х400

А, В – пятнистое структурирование хитина члеников антенн; Г-Ж – деформации II – V члеников.

Обозначения те же, что на рис. 3.

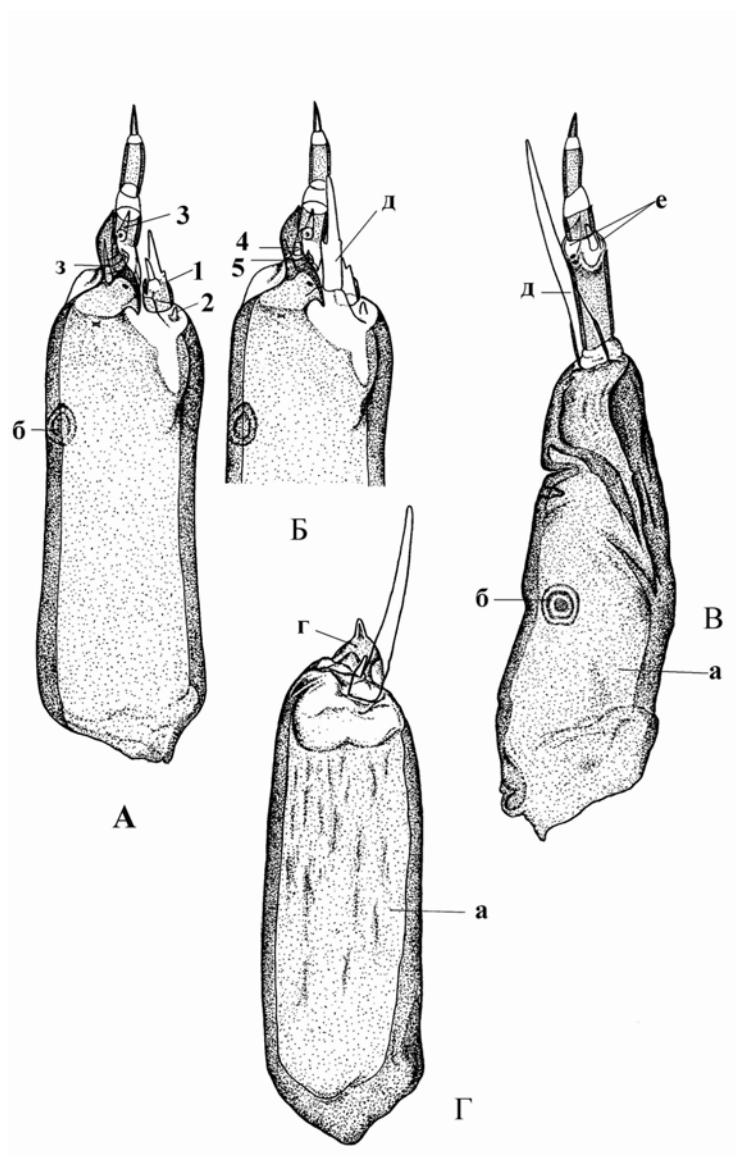


Рис.5. Необычные случаи деформаций антенн личинок *Ch. riparius* IV возраста (Рдейский заповедник), х400.
1-5 – органы неизвестной гомологии
Обозначения те же, что на рис.3.

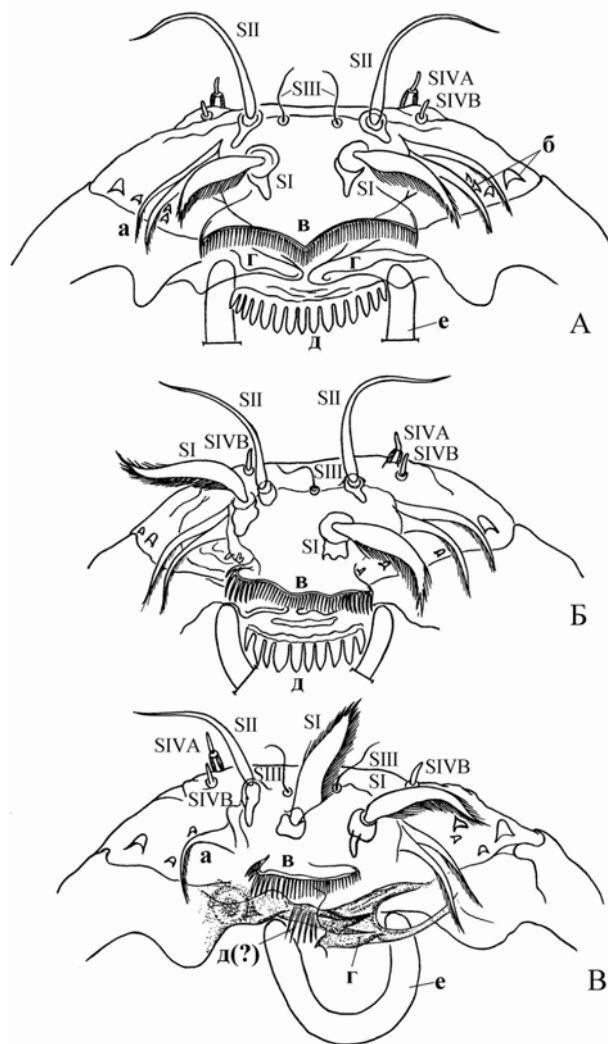


Рис.6. Комплекс верхней губы личинок *Ch. riparius* IV возраста (Дарвинский заповедник), х400.

А – нормальное строение; Б, В – деформации верхнегубного комплекса.
 SI, SII, SIII, SIVA, SIVB – щетинки верхней губы; а – длинные хетоиды; б – короткие хетоиды; в – верхнегубной гребень; г – склериты эпифаринкса; д – эпифарингеальный гребень; е – эпифарингеальное кольцо.

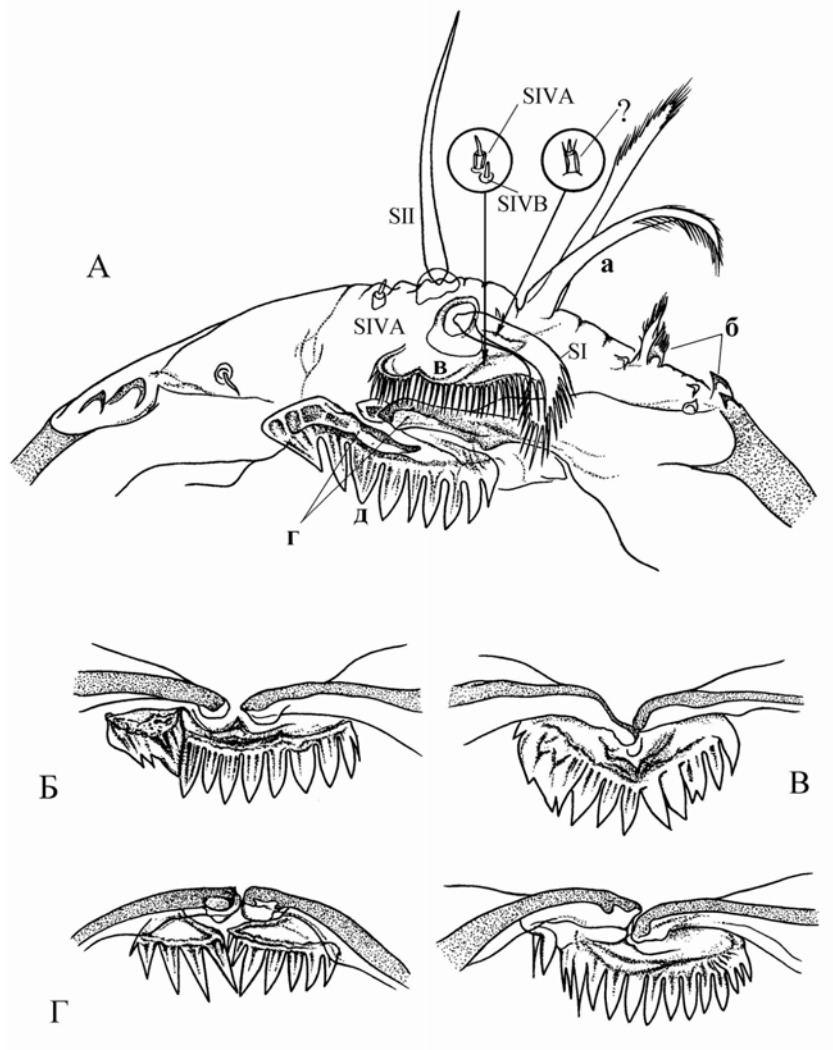


Рис.7. Деформированные верхняя губа (А) и эпифарингеальный гребень (Б-Д) личинок *Ch. riparius* IV возраста (Рдейский заповедник), х400.
Обозначения те же, что на рис.6.

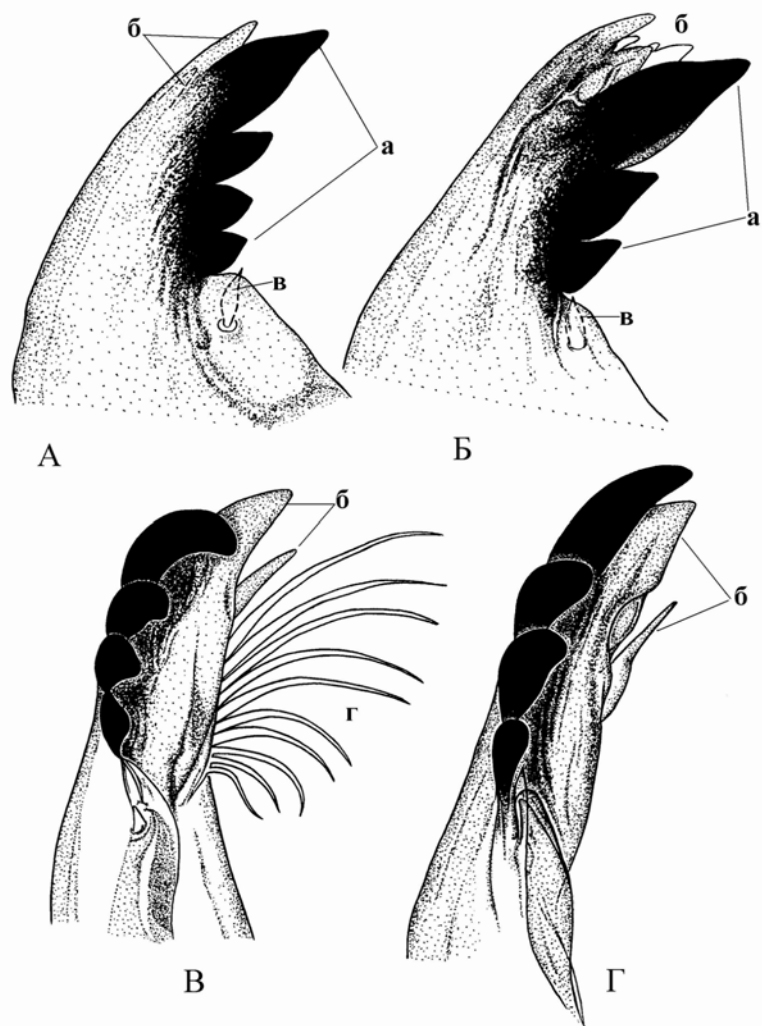


Рис.8. Мандибулы личинок *Ch. riparius* IV возраста (Дарвинский заповедник), х400.

А, В – нормальное строение; Б, Г – деформированные мандибулы.

а – нижние пигментированные зубцы; б – верхние непигментированные зубцы; в – субдентальная щетинка; г – мандибулярный гребешок (pecten mandibularis).

Данные биотестирования в той или иной степени соответствовали результатам биоиндикации водных биоценозов по гидробиологическим показателям. Так, для кислотных водоемов Дарвинского заповедника характерен бедный видовой состав. Доминируют личинки хирономид (48 видов) и олигохеты (17 видов). При анализе изменений в пробе за одну дату наблюдений наибольшее число видов (13 видов) выявлено в озере Хотавец с нейтральными значениями pH, в то время как в кислотных выявляется 7-8 видов [28].

В качестве индикатора антропогенного атмосферного загрязнения используют определение содержания ртути в мышечной ткани окуня. Так как известно, что закисление вод приводит к ускорению накопления ртути в абиотических и биотических компонентах водных экосистем, в том числе и в конечном звене трофической цепи – рыбах [2].

Содержание ртути в мышцах окуня варьировало в широких пределах. Максимальные значения показателя (0.64–1.06 мг/кг сырой массы) отмечены для рыб из озер Вологодской (Темное, Утешково, Мотыкино, Дубровское) и Новгородской областей (Большое Гореецкое, Малое Гореецкое, Межницкое). Минимальные (0.04–0.1 мг/кг сырой массы) – в окуне из озер Вендерское, Саргозеро, Урос и Чучъярви (Карелия), Хотавец (Вологодская обл.) и Домшинское (Новгородская обл.).

Выявленная ранее положительная зависимость накопления ртути в мышечной ткани окуня от размеров или массы рыбы из крупных водоемов (Рыбинское и Шекснинское водохранилища, оз. Кубенское) [29] оказалась статистически значима для выборок из озер Хотавец и Утешково (Вологодская обл.), а также Корниловского и Большого Гореецкого (Новгородская обл.) – $r = 0.61-0.69$, $p < 0.05$. Поскольку масса пойманных в водоемах рыб не превышала 150 г, связь между аккумуляцией металла и размерно-массовыми характеристиками рыб чаще отсутствовала.

Среднее содержание ртути в мышцах рыб, отловленных в озерах Вологодской области, было достоверно выше, чем в

окуне из озер Карелии и Новгородской и Псковской областей (Табл. 4). Самое высокое значение показателя ($0,62 \pm 0,05$ мг Hg на 1 кг сырой массы) также отмечено для окуня из кислотных озер Вологодской области.

Таблица 4

Содержание ртути в мышечной ткани окуня (мг/кг сырой массы) из озер различных регионов северо-запада Европейской России

Показатель	Регионы		
	Карелия	Вологодская область	Новгородская и Псковская области
Общее число исследованных рыб, экз	127	150	283
Число кислотных озер ($pH < 5$)	4	8	11
Среднее содержание Hg в окуне	0.22 ± 0.05^a	0.49 ± 0.07^b	0.33 ± 0.04^a
Среднее содержание Hg в окуне из кислотных озер	0.22 ± 0.05^a	0.62 ± 0.05^b	0.39 ± 0.05^a
Среднее содержание Hg в окуне из слабокислых и нейтральных озер	0.18 ± 0.05^a	0.09 ± 0.01^a	0.16 ± 0.02^a

Значения с разными буквенными надстрочными индексами в каждой строке достоверно различаются при уровне значимости $p = 0.05$

Умеренно закисленные и нейтральные озера регионов по уровню накопления ртути в рыбе не различались. Для Вологодской, Новгородской и Псковской областей отмечено достоверно более высокое содержание металла в окуне из кислотных озер, по сравнению с рыбой из умеренно закислен-

ных и нейтральных водоемов внутри соответствующей группы. Используемые в многолетней работе методы по эколого-токсикологическому мониторингу пресноводных водоемов северо-запада Европейской России дали согласующиеся между собой результаты. Показано, что озера различались по степени закисления и гумификации воды, при этом кислые озера ($\text{pH} < 5$) составляли от 30% (Карелия) до 70% (Дарвинский и Рдейский заповедники) от числа исследованных в каждом регионе. Со снижением pH воды увеличивалась токсичность воды и донных отложений.

Представители планктонных ракообразных *C. affinis* на закисление воды реагировали снижением репродуктивных показателей, бентосных *Ch. riparius* - снижением выживаемости и увеличением числа особей с деформациями структур ротового аппарата.

Отмечено повышенное содержание ртути в мышцах окуня из кислых озер исследованных регионов. Последствия антропогенного закисления по всем трем исследованным группам озер имели одинаковый характер, хотя разную степень выраженности. Сильнее всего негативный эффект закисления проявился в водоемах Дарвинского заповедника, что вероятнее всего связано с относительной близостью Чероповецкого промышленного комплекса.

Обилие и разнообразие водных объектов на территории России практически исключает возможность их полного и комплексного обследования. Таким образом, применение методов биотестирования и биоиндикации представляется перспективным для рекогносцировочной оценки экологического благополучия водоемов, тем более что число подобных исследований в России ограничено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Моисеенко Т.И. Закисление вод: факторы, механизмы и экологические последствия. М.: Наука, 2003. 276 с.
- [2] Комов В.Т., Лазарева В.И. Причины и последствия антропогенного закисления поверхностных вод северного региона на примере срав-

- нительно-лимнологического исследования экосистем озер Дарвинского заповедника // Структура и функционирование экосистем кислых озер. С-Пб.: Наука, 1994. С.3-30.
- [3] Корнева Л.Г. Фитопланктон как показатель кислых условий в небольших кислых озерах // Структура и функционирование экосистем кислых озер. С-Пб.: Наука, 1994. С.65-98.
 - [4] Лазарева В.И. Трансформация сообществ зоопланктона малых озер при закислении // Структура и функционирование экосистем кислых озер. С-Пб.: Наука, 1994. С.150-169.
 - [5] Гремячих В.А., Степанова И.К., Комов В.Т. Распределение ртути в абиотических и биотических компонентах экосистем озер Дарвинского государственного заповедника // Тр. Дарвинского государственного биосферного заповедника. Череповец, 2006. Вып. XVI. С.32-41.
 - [6] Лаптева Н.А., Гаврилова В.А. Микрофлора и микробиологические процессы в кислых озерах Дарвинского заповедника // Структура и функционирование экосистем кислых озер. С-Пб.: Наука, 1994. С.99-115.
 - [7] Gerhardt A. Review of impact of heavy metals on stream invertebrates with special emphasis on acid conditions // Water, Air and Soil Pollution. 1993. V. 66. P. 289-314.
 - [8] Broberg A., Lindgren G. Effects of pH on uptake of copper and tubificid worms (*Oligochaeta*) in two different types of sediments // Lect. Notes Earth Sci. 1987. V.11. P.145-156.
 - [9] Сафронова Т.А. Накопление ртути и других тяжелых металлов водорослями и водными растениями // Поведение ртути и других тяжелых металлов в экосистемах. Новосибирск, 1989. С. 64-100.
 - [10] Гапеева М.В., Гребенюк Л.П., Томилина И.И., Ершов Ю.В. Загрязнение малых рек: комплексный подход к оценке состояния донных отложений реки Сестры Московской области // Экол. хим. 2003. Т. 11. С. 255-263.
 - [11] Методическое руководство по биотестированию. РД-118-02-90. М., 1991. 46 с.
 - [12] Ingersoll C.G., Nelson M.K. Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera) // Aquatic Toxicology and Risk Assessment: V. 13. American Society for Testing and Materials. STP 1096. Philadelphia, 1990. P. 93-109.
 - [13] Mount D.I., Norberg T.J. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test // Environ. Toxicol. Chem. 1984. V. 3. P. 425-434.
 - [14] Томилина И.И., Комов В.Т. Оценка токсичности грунтов озер Дарвинского заповедника // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1996. N 100. С. 62-65.

- [15] Томилина И.И., Михайлова Л.В., Гребенюк Л.П., Рыбина Г.Е., Симанков Ю.Г. Влияние нефтепродуктов на личинок комаров рода *Chironomus* // Биол. внутр. вод. 2003. № 2. С.100-106.
- [16] Шилова А.И. Хирономиды Рыбинского водохранилища. Л.: Наука, 1976. 251 с.
- [17] Гребенюк Л.П., Томилина И.И. Изменение физиологических и морфологических показателей личинок *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) при действии токсических веществ различной природы // Биол. внутр. вод. 2006. №3. С.81-90.
- [18] Warwick W.F. Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: indexing antennal deformities in *Chironomus riparius* Meigen // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1985. V. 42. N 12. P. 1881-1914.
- [19] Wiederholm T. Incidence of deformed chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in Swedish lakes // Hydrobiologia. 1984. V.109. P.243-249.
- [20] Warwick W.F. Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae from the Lac St. Louis and Laprarie Basins of the St. Lawrence River // J. Great Lakes Res. 1990. V.16. P.185-208.
- [21] Manual of methods in aquatic environmental research. Part 9: Analyses of metals and organochlorines in fish. Rome, 1983. 33 p.
- [22] Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. N.Y.: W.H. Freeman&Co., 1995. 887 p.
- [23] Комов В.Т., Степанова И.К. Гидрохимическая характеристика озер Дарвинского заповедника // Структура и функционирование экосистем кислых озер. С-Пб.: Наука, 1994. С.31-43.
- [24] Томилина И.И., Комов В.Т. Донные отложения как объект токсикологических исследований // Биол. внутр. вод. 2002. N 2. С. 20-26.
- [25] Комов В.Т., Томилина И.И. Токсичность донных отложений озер Северо-Запада России: влияние закисления и тяжелых металлов // Биол. внутр. вод. 1999. N 1-3. С. 139-145.
- [26] Европейская экономическая комиссия ООН. Положение в области трансграничного загрязнения воздуха. Женева, 1993. 70 с.
- [27] Гремячих В.А., Гребенюк Л.П., Комов В.Т., Степанова И.К. Накопление ртути и ее тератогенное действие на личинок *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) // Биол. внутр. вод. 2006. № 1. С.99-107.
- [28] Иванов В.К. Макрозообентос озер Дарвинского заповедника, подверженных антропогенной ацидификации // Гидробиологические исследования в заповедниках. М.: Наука, 1996. С. 65-86.
- [29] Степанова И.К., Комов В.Т. Накопление ртути в рыбе из водоемов Вологодской области // Экология. 1997. Т.28. № 4. С. 196-202.

**ВЛИЯНИЕ РТУТЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА
СВОБОДНОЖИВУЩИХ ЧЕРВЕЙ**

© 2007 г. И. В. Медведев

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

ВВЕДЕНИЕ

Тяжелые металлы (ТМ) относятся к группе наиболее распространенных и потенциально опасных загрязняющих веществ. Особое место в их ряду занимает ртуть. В результате антропогенной эмиссии она попадает в окружающую среду в количествах, соизмеримых с участвующими в природном глобальном цикле (около 4000 т) [1, 2].

Антропогенными источниками ртути являются сельское хозяйство, энергетические предприятия и транспорт, горнодобывающая и перерабатывающая промышленность. Наибольшее количество ртути попадает в окружающую среду при сжигании природного ископаемого топлива. В угле ее содержится намного больше, чем в нефти и газе, варьируя от 0.8 до 100 г в тонне [3].

Работы, посвященные изучению токсичности метилртути и других ее органических соединений, проводятся в основном на млекопитающих и птицах, характеризующихся развитой нервной системой. Многие из этих животных находятся на вершине пищевой пирамиды и подвержены действию самых высоких концентраций метилртути [4].

Норка и выдра – млекопитающие, на которых токсический эффект соединений ртути исследуется наиболее активно. Винер и др. [5] изучали поступление метилртути (≥ 1 мг/кг сырого веса) в организм указанных животных с пищей. Неврологическими признаками отравления у этих животных являются вялость, атаксия, паралич конечностей, тремор, судоро-

роги и, в конечном итоге, смерть.

У взрослых птиц, уровни ртути более 15 мг/кг сырого веса в разных тканях, включая головной мозг, приводят к отклонениям в развитии [5].

Изучение влияния метилртути на рыб представляет особый интерес, потому что рыба имеет высокую пищевую ценность для человека и многие виды рыб принадлежат к конечному звену пищевой цепи в водоемах. Достаточно высокие уровни ртути у рыб - порядка 6-20 мг/кг сырой массы, приводящие к гибели, встречаются только в сильнозагрязненных районах, таких как бухта Минамата (Япония) [6].

В лабораторных исследованиях показано негативное влияние метилртути на поведение рыб, развитие гонад, выработку половых гормонов и процесс размножения [7].

Механизм токсического воздействия соединений ртути на холоднокровных животных изучен мало. Основная масса работ посвящена изучению влияния неорганических соединений ртути, менее токсичных по сравнению с ртутьорганическими, на жизнедеятельность беспозвоночных. Метилированные соединения ртути, накопленные в организме рыб, не исчезают после их гибели и снова становятся частью пищевой цепи в водоеме. Влияние ртутьорганических соединений на беспозвоночных, поступающих в их организм с пищей, практически не изучено.

В эволюционном отношении планарии - одна из интереснейших групп примитивных многоклеточных животных. Изучение представителей этой группы имеет значение для решения ряда проблем эволюции низших Metazoa. Черви указанных ниже видов являются широко распространенными, а также легко культивируются в лабораторных условиях, что делает их удобным объектом для токсикологических исследований [8].

Малощетинковые черви (Oligocheta) занимают одно из первых мест по видовому и экологическому разнообразию. Представители этой группы животных благодаря массовому

развитию и доминированию в составе бентоса, как по численности особей, так и по образуемой ими биомассе, играют огромную роль в продуцировании органического вещества в водоемах. *Lumbriculus variegatus* также является удобным объектом для различных экспериментальных, гидробиологических физиологических, морфологических и токсикологических исследований [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения влияния ртутьорганических соединений природного происхождения, поступающих в организм свободноживущих червей, планарий и олигохет в частности, в лабораторных условиях была смоделирована пищевая цепь, состоящая из следующих звеньев: фарш из мышечной ткани рыб – бактерии – личинки хирономид или олигохеты – плоские черви.

Олигохет *Lumbriculus variegatus* содержали в пластиковых емкостях объемом 1 л с кусочками гигроскопичной бумаги в качестве искусственного субстрата в отстоянной водопроводной воде при температуре 23°C [10]. Раз в неделю в емкости с червями добавляли по 1 г фарша, приготовленного из мышечной ткани рыб *Solea solea* (низкое содержание ртути – 0.2 мкг/г сухой массы) и *Anoplopoma fimbria* (высокое содержание – 0.7 мкг/г сухой массы), выловленных в бухте Монтерей (Калифорния, США).

Для выращивания хирономид (*Chironomus riparius* Meigen, 1804) использовали кристаллизаторы емкостью 2 л с отстоянной водопроводной водой. В них помещали по 3-5 кладок. Каждую неделю в кристаллизаторы добавляли по 2 г фарша, полученного из мышечной ткани рыб с высокой концентрацией ртути (0.30-0.50 мкг/г сырой массы) и с низкой (0.02-0.07 мкг/г сырой массы). Рыбу отлавливали в Рыбинском водохранилище. Хирономиды питались бактериями, развивающимися на фарше.

Культивирование олигохет *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837) проводили по стандартной методике [11]. Червей кор-

мили фаршем из рыбы, помещенным в почву с червями на глубину 3-4 см. Планарий содержали в пластиковых пятилитровых емкостях при температуре 19-22°C в затененных условиях. Животных кормили два раза в неделю: *Dugesia tigrina* и *D. lugubris* - личинками лабораторной культуры хирономид, *Polycelis tenuis* – олигохетами *Enchytraeus albidus*.

Влияние соединений ртути оценивали, изучая интенсивность восстановления поврежденных участков тела у планарий и олигохет с высоким и низким содержанием ртутьорганических соединений и восстановление фоторецепторных органов у планарий. Также проводилось изучение пищевого поведения планарий.

Регенерация головного и хвостового участков тела у олигохет.

Животным отсекали головной и хвостовой участки тела (рис. 1). Оставшуюся часть тела, состоящую из 30 сегментов, использовали для экспериментов (по 50 фрагментов в каждой группе с высоким и низким содержанием соединений ртути). Восстановление головных и хвостовых сегментов регистрировали два раза в неделю в течение 41 сут.



Рис. 1. Схема операции у олигохет *Lumbriculus variegatus* [10]
Темный участок - фрагмент тела, который использовали в эксперименте;
светлые участки – отсекаемые.

Варианты надрезов у планарий.

Планариям делали надрезы, наиболее часто применяемые для изучения восстановительных процессов и в токсикологических исследованиях, в частности (рис. 2 а-д).

Перед операциями планарий и олигохет обездвиживали, охлаждая в ванночке со льдом [10, 12].

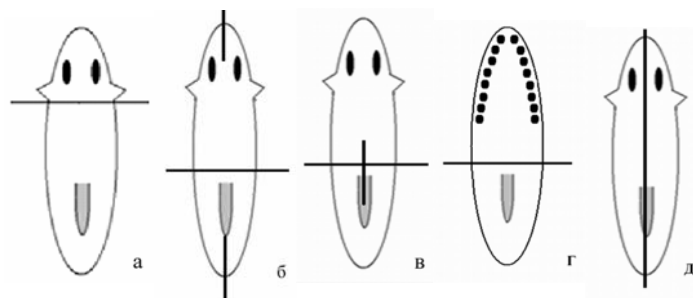


Рис. 2. Схема операций на планариях.

Прямая линия – место разреза; а – поперечное рассечение (декапитация) за аурикулярными выростами на переднем конце тела – для изучения восстановления фоторецепторных органов у *Dugesia tigrina* (половая раса); б, в – небольшие надрезы для выяснения реакции организма на слабое травматическое воздействие; б-г – поперечное рассечение перед глоткой для изучения восстановления фоторецепторных органов у *D. tigrina* (половая раса), *Polycelis tenuis* и *Dugesia lugubris* и формирования бластемы у *Polycelis tenuis* и *Dugesia lugubris*; д – продольный разрез всего тела для изучения формирования бластемы и фоторецепторных органов в процессе латеральной регенерации у *D. tigrina* (бесполой раса).

Восстановление поврежденных участков тела и формирование бластемы у планарий.

У *D. tigrina* (половая раса) регистрировали количество червей с полным восстановлением поврежденных участков после 3, 12 и 24 мес выращивания на ртутьсодержащем корме; у бесполой расы *D. tigrina* (9 и 12 мес), *D. lugubris* (9 мес), *Polycelis tenuis* (6 мес выращивания на корме с низким и высоким содержанием соединений ртути) проводили измерение площади бластемы (скопление однородных неспециализированных клеток на раневой поверхности).

Восстановление фоторецепторных органов у планарий.

У половой расы *Dugesia tigrina* (3, 12 и 24 мес), бесполой расы *D. tigrina* (3 и 9 мес), *D. lugubris* (9 мес) и *Polycelis tenuis* (3, 6 и 9 мес выращивания на ртутьсодержащем корме) подсчитывали количество восстановленных фоторецепторных органов после рассечения животных.

Пищевое поведение планарий.

У половой расы *Dugesia tigrina* (3, 12 и 24 мес), бесполой расы *D. tigrina* (3 и 9 мес) *D. lugubris* (9 мес) и *Polycelis tenuis* (3, 6 и 9 мес выращивания на ртутьсодержащем корме) проводили оценку влияния соединений ртути на пищевое поведение.

Для оценки реакции приближения животных к жертве использовали показатель предпочтения планариями корма с низким или высоким содержанием ртути, выраженный в количестве червей находившихся в контакте с жертвой, для оценки двигательной реакции глотки червей - число планарий, внедривших свою глотку в тело добычи.

Во всех экспериментах с *Dugesia lugubris*, *D. tigrina* (бесполовая раса) и *D. tigrina* (половая раса) на каждый опыт отбирали отдельную серию червей (по 38, 100 и 40 экз. соответственно). В опытах с *Polycelis tenuis* использовали одних и тех же животных после 3, 6 и 9 мес выращивания на ртутьсодержащем корме (по 60 особей).

В экспериментах использовали планарий, как из естественных водоемов, так и культивируемых в лаборатории, поэтому не всегда удавалось синхронизировать начало их выращивания на ртутьсодержащем корме.

Определение ртути и обработка полученных результатов.

Определение содержания общей ртути в планариях, *Enchytraeus albidus*, *Lumbriculus variegatus* и *Chironomus riparius* ввиду их малой массы проводили для каждого вида в интегральных пробах методом атомной абсорбции холодного пара [13]. Сертифицированный биологический материал Dorm-II (мышцы акулы) со стандартным содержанием ртути получен из Канадского института химии окружающей среды.

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами с использованием программы Statgraphics Plus для Windows (версия 2.1). Результаты выражали в виде средних значений и их ошибок ($\bar{x} \pm m_x$). Достоверность различий определяли в соответствии с t -

критерием Стьюдента ($p=0.05$) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление ртути у олигохет и планарий.

У *Lumbriculus variegatus* уровни ртути в организме уже через месяц были сопоставимы с концентрациями металла в рыбном фарше, на котором животных культивировали. У олигохет *Enchytraeus albidus*, обитающих в почве, накопление уровней ртути аналогичных таковым в корме, проходило в те же сроки что и у *Lumbriculus variegatus*, обитающих в водоемах (табл. 1, 2).

Таблица 1.
Концентрации ртути в мышечной ткани рыб, олигохетах и хирономидах.

Объект	Концентрация ртути, мкг/г сырой массы	
	низкая	высокая
Мышечная ткань рыб	0.02-0.07	0.30-0.50
<i>Enchytraeus albidus</i>	0.02-0.05	0.30-0.40
<i>Chironomus riparius</i>	0.02-0.07	0.30-0.40

Приведены пределы содержания ртути.

Таблица 2.
Содержание ртути в мышечной ткани рыб и олигохетах *Lumbriculus variegatus*.

Объект	Концентрация ртути, мкг/г сухой массы	
	низкая	высокая
Мышечная ткань рыб	0.23 ± 0.01^a	0.71 ± 0.01^b
<i>Lumbriculus variegatus</i>	0.32 ± 0.01^a	0.51 ± 0.01^b

Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($x \pm m_x$); величины внутри каждой строки, имеющие разные буквенные надстрочные индексы достоверно различаются при уровне значимости $p=0.05$ (t-Стьюдента).

Процесс накопления соединений ртути у олигохет не зависел от среды обитания [15]. Уровни накопления ртути планариями в экспериментах варьировали в широких пределах (0.08-

15.97 мкг/г сырой массы). Одни виды (*Dugesia tigrina*, половая раса) планарий накапливали высокие уровни ртути после 3 мес. содержания на корме с ее низкими концентрациями, тогда как другие (*D. lugubris*) даже спустя 9 мес. имели концентрации, соизмеримые с таковыми в корме [15].

У использованных в экспериментах планарий отмечено накопление соединений ртути, которое происходило с разной динамикой (табл. 3).

Таблица 3.

Динамика накопления ртути в теле планарий в зависимости от времени содержания в культуре.

Время содержания в культуре, мес	Концентрация ртути, мкг/г сырой массы	
	низкое содержание в корме	высокое содержание в корме
<i>Dugesia tigrina</i> (половая раса)		
3	1.23±0.01 ^a	4.80±0.04 ^б
12	1.01±0.003 ^a	7.71±0.09 ^б
24	0.74±0.01 ^a	10.30±0.06 ^б
<i>Dugesia tigrina</i> (бесполовая раса)		
3	0.08±0.003 ^a	2.95±0.05 ^б
9	-	0.95±0.03 ^б
12	-	0.64±0.004
<i>Dugesia lugubris</i>		
9	0.48±0.003 ^a	0.51±0.01 ^б
<i>Polycelis tenuis</i>		
3	0.85±0.02 ^a	4.59±0.12 ^б
6	3.93±0.07 ^a	15.97±0.24 ^б
9	1.09±0.01 ^a	9.27±0.03 ^б

Примечание, как в табл. 2.

При высоком содержании ртути в корме, ее накопление интенсивнее проходило у половой расы планарий *D. tigrina* и *Polycelis tenuis*, по сравнению с бесполой расой *Dugesia tigrina* и *D. lugubris*. У бесполой расы планарий *D. tigrina* концентрация ртути даже снижалась с течением времени. При низком содержании ртути в корме, ее уровни в организме планарий *D. tigrina* (половая раса) постепенно уменьшались в

течение двух лет, у планарий *Polycelis tenuis* – после 6 мес. выращивания на корме с соединениями ртути было зарегистрировано их увеличение (6 мес.) и в дальнейшем после 9 мес. снижение. Планарии, вероятно, имеют эффективный механизм выведения соединений ртути, но это предположение требует дополнительного исследования.

Регенерация головного и хвостового участков тела у олигохет *Lumbriculus variegatus*.

Восстановление головных сегментов, количество которых у этого вида постоянно (7-8), проходило интенсивнее первые 5 сут. у червей с низким содержанием ртути (рис. 3, а).

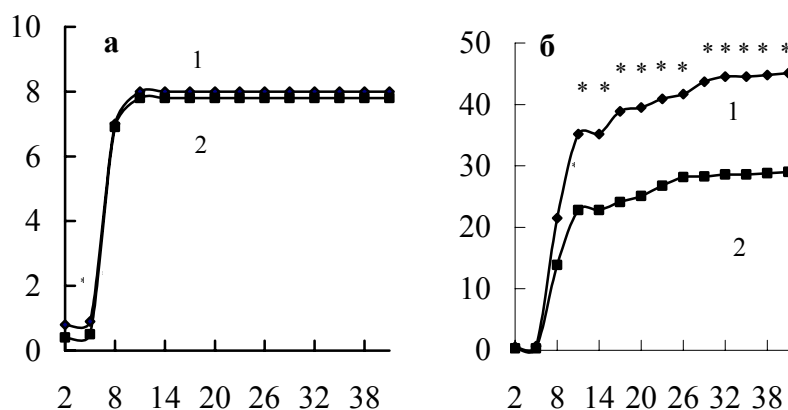


Рис. 3. Формирование головных (а) и хвостовых (б) сегментов у *Lumbriculus variegatus* с низким (1) и высоким (2) содержанием соединений ртути.

По оси абсцисс – время регенерации, сут., по оси ординат – количество сегментов. * различия между вариантами эксперимента статистически достоверны при $p=0.05$ (t -критерий Стьюдента).

Через 11 сут. у червей в обеих экспериментальных группах количество головных сегментов достигло первоначальных значений. Различия в числе восстановленных хвостовых сег-

ментов носили достоверный характер на протяжении всего времени наблюдения (рис. 3 б) [16].

Восстановление поврежденных участков тела и формирование бластемы у планарий.

Высокое содержание соединений ртути (4.80, 7.71 и 10.30 мкг/г сырой массы) в организме планарий *Dugesia tigrina* (половая раса) при экспозиции соответственно 3, 12 и 24 мес не влияло на динамику срастания надрезов [15].

После 12 мес. содержания планарий на корме с разной концентрацией соединений ртути, восстановление поврежденных участков тела на передних фрагментах проходило быстрее, чем на хвостовых фрагментах при любом содержании соединений ртути в червях (рис. 4 а, б).

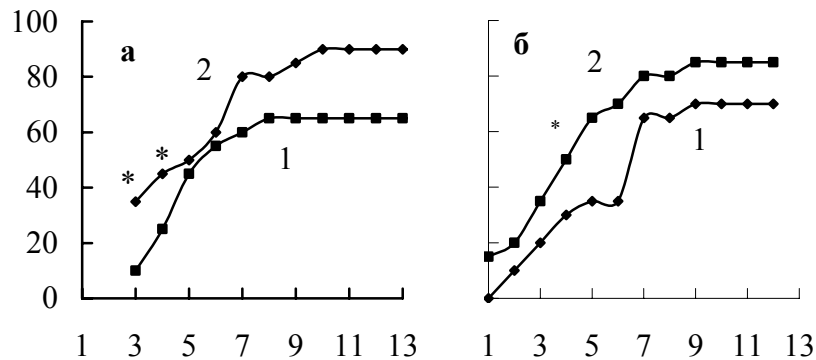


Рис. 4. Интенсивность восстановления поврежденных участков тела у половой расы планарий *Dugesia tigrina* при низком (а) и высоком (б) уровне соединений ртути в теле животных после 12 мес. выращивания на ртутьсодержащем корме.

По оси абсцисс – время регенерации, сут.; по оси ординат – число животных с полным восстановлением области повреждения, %; 1 – хвостовой, 2 – передний участок тела. Остальные обозначения, как на рис 3.

Абсолютный рост вновь образующихся тканей у планарий.

В первые сутки регенерации бластема планарий была

непигментированной. При рассмотрении животных под бинокулярным микроскопом отмечали четкий контраст между старыми пигментированными и вновь образованными не пигментированными клетками тканей регенеранта.

У *D. tigrina* (бесполая раса) после 9 мес. выращивания на корме с разной концентрацией соединений ртути различия в формировании бластемы между животными с высоким и низким содержанием металла обнаруживались только на 8 сут. после препарирования.

После экспозиции червей в течение 12 мес., различия в размерах бластем появлялись также на 8 сут. У животных с высоким содержанием соединений ртути (0.64 мкг/г сырой массы) площадь вновь образующихся тканей увеличивалась быстрее. У планарий бесполой расы после 12 мес. выращивания на корме с высокой концентрацией ртути зарегистрированы одни из самых низких уровней накопления ртути, по сравнению с планариями других видов.

У *D. lugubris* с более высоким содержанием соединений ртути в теле скорость формирования бластемы была ниже. Эффект торможения восстановительных процессов у этой планарии проявлялся даже при относительно невысоком уровне соединений ртути, накопленных за 9 мес.

У *Polycelis tenuis*, при высоком уровне накопления ртути (15.97 мкг/г сырой массы), площадь бластемы увеличивалась значительно медленнее по сравнению с планариями, накопившими меньше ртути (3.93 мкг/г сырой массы). Различия регистрировали уже через 10 сут. после операции, а после 13 сут. они были статистически значимыми.

У всех видов планарий с высоким и низким содержанием соединений ртути, после продольного и поперечного рассечения длительное время наблюдалась фаза мышечного сокращения, которая продолжалась на 1-2 сут. дольше, чем было описано ранее [17]. Задержка начала восстановительных процессов у червей с низким содержанием ртути вероятно связана с тем, что после длительного времени выращивания

на ртутьсодержащем корме (3-24 мес.) планарии накапливали металл в концентрациях, превышающих характерные для популяций в естественной среде обитания [16].

Восстановление фоторецепторных органов у планарий.

При рассечении планарий головной ганглий либо удалялся вместе с передним фрагментом (поперечное рассечение), либо оставалась его часть (продольное). Глазки у планарий начинают восстанавливаться вслед за ганглием, который регенерирует за 5 сут. [18], поскольку каждый фоторецепторный орган турбеллярий соединяется с головным ганглием специальным зрительным нервом [19].

После 3 мес. выращивания на корме с высокими и низкими уровнями содержания ртути у *Dugesia tigrina* (половая раса) глазки появлялись на 5-6 сут., после 12 мес. - на 4-7 сут. и 24 мес. - на 4-6 сут. после препарирования. У планарий с высоким содержанием ртути в организме, формирование глазков после 3, 12 и 24 мес. выращивания на ртутьсодержащем корме началось на 1-2 сут. позже, чем у червей с низким. Минимальные отличия по времени восстановления глазков между группами планарий с высоким и низким содержанием ртути в организме отмечены через 3 мес., а максимальные и статистически достоверные – 12 и 24 мес., когда различия в уровнях накопления ртути были наибольшими [20].

После 3 мес. выращивания планарий *D. tigrina* (бесполовая раса) на корме с разным содержанием соединений ртути глазки появлялись на 6-е сут. после продольного рассечения червей. Статистически достоверную разницу в количестве фоторецепторных органов наблюдали на 7-е сут. после операции. В последующие сроки (9 мес.) эффект торможения формирования фоторецепторных органов наблюдали даже при низком уровне накопления ртути в организме планарий этой расы (рис. 5а, б) [20].

Независимо от способа рассечения планарий *D. tigrina* (продольное или поперечное), начало формирования фоторецепторных органов приходилось на одни и те же сроки.

Различия в количестве глазков у *D. lugubris* с низким и высоким содержанием ртути в организме были достоверными только на 10 сут. после рассечения животных.

Молодые особи *Polycelis tenuis*, вышедшие из кокона, имели 12-14 глазков. Спустя 3 нед. их число увеличилось до 20, через месяц - до 40-70. Перед препарированием у особей с низким содержанием ртути среднее число глазков было равно 49, а с высоким - 51.

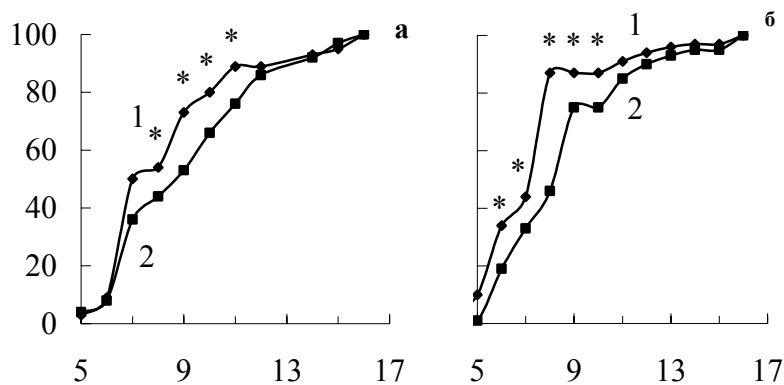


Рис. 5. Регенерация глазков у бесполой расы планарий *Dugesia tigrina* с низкой (1) и высокой (2) концентрацией ртути после 3 (а) и 9 (б) мес. выращивания на ртутьсодержащем корме.

По оси абсцисс - время регенерации, сут.; по оси ординат - число червей с глазками, %. Остальные обозначения, как на рис 3.

У планарии *P. tenuis* с низкой концентрацией ртути в организме после 3 мес. выращивания на ртутьсодержащем корме (0.85 мкг/г сырой массы) глаза появлялись на 4-е сут. после операции, с высокой (4.59 мкг/г сырой массы) - на 7-е сут. У последних, начиная с 10-х и по 17-е сут., количество фоторецепторных органов достоверно ниже по сравнению с животными, накопившими низкие уровни металла. Впоследствии эти различия сохранялись, но были статистически недостоверными [20].

После 6 мес. выращивания на ртутьсодержащем корме у *P. tenuis* восстановление глазков на хвостовых фрагментах червей обеих групп начиналось на 8-9 сут. после операции. В последующие 10 сут. интенсивность восстановления фоторецепторных органов у планарий с низкими концентрациями ртути выше, чем у планарий с высокой концентрацией ртути. Далее (19-27 сут.) количество глазков и скорость регенерации у животных из обеих групп были одинаковы.

Спустя 9 мес. выращивания на ртутьсодержащем корме появление глазков у *P. tenuis* (единичные случаи) наблюдали на 6-8 сут. после операции. Темпы формирования глазков оказались низкими в обеих группах планарий. До 14-х сут. различия между регенерантами с низким и высоким содержанием соединений ртути (1.09 и 9.27 мкг/г сырой массы соответственно) носили достоверный характер. В дальнейшем появление глазков проходило фактически с одинаковой интенсивностью, различия между группами были незначительны [20].

Среди изученных видов планарий с низким содержанием ртути наиболее раннее формирование глазков отмечено у *P. tenuis*, более позднее – у *Dugesia lugubris*. *D. tigrina*, по этому показателю, занимала промежуточное положение. Высокое накопление ртути в организме планарий задерживало восстановление глазков: у *Polycelis tenuis* – в большей степени, у *Dugesia tigrina* и *D. lugubris* – в меньшей.

Пищевое поведение планарий.

При осуществлении комплекса пищевого поведения у планарий двигательная активность глотки является продолжением первоначальной реакции приближения к жертве [21]. Обе эти реакции интегрированы в единый комплекс, координирующийся нервной системой.

Реакция приближения к жертве.

Планарии половой расы *Dugesia tigrina* (12 мес. выращивания на ртутьсодержащем корме) и *P. tenuis* (6 мес.) с низкими концентрациями ртути в организме отдавали предпочтение корму

с низким содержанием ртути (рис. 6 а, б). Черви с высоким содержанием ртути не проявляли предпочтения в выборе корма, а поиск и приближение к жертве осуществляли менее активно [22].

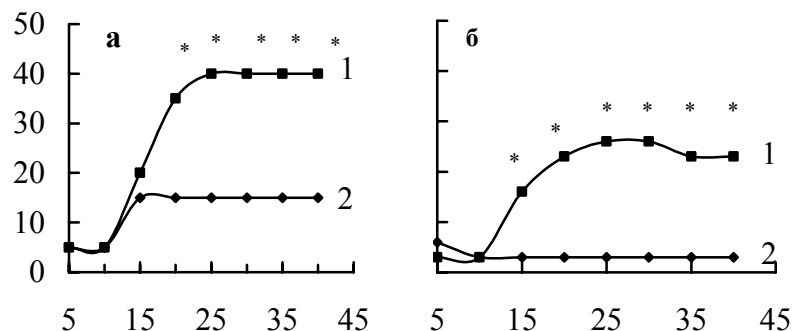


Рис. 6. Избирательность питания планарий *Dugesia tigrina* (а) и *Polycelis tenuis* (б) с низкой концентрацией ртути в организме. По оси абсцисс – время наблюдений, мин; по оси ординат – количество планарий, %. 1 – хирономиды или олигохеты с низким и 2 – с высоким содержанием ртути. Остальные обозначения, как на рис 3.

Двигательная реакция глотки у планарий.

Планарии *Dugesia tigrina* (половая раса) с низкими концентрациями ртути в организме после 3 и 12 мес.. выращивания на ртутьсодержащем корме находили пищевой объект в первые минуты наблюдения (рис. 7а, б). У планарий с высокими концентрациями ртути двигательная реакция глотки была слабо выражена и немного возрастала к концу наблюдений. Различия в двигательной реакции глотки у животных с высоким и низким содержанием ртути были достоверны на протяжении всего периода наблюдений [22]. Накопление планариями ртути в концентрации превышающей 4.6 мкг/г сырой массы, приводило к угнетению как реакции приближения к добыче, так и двигательной реакции глотки.

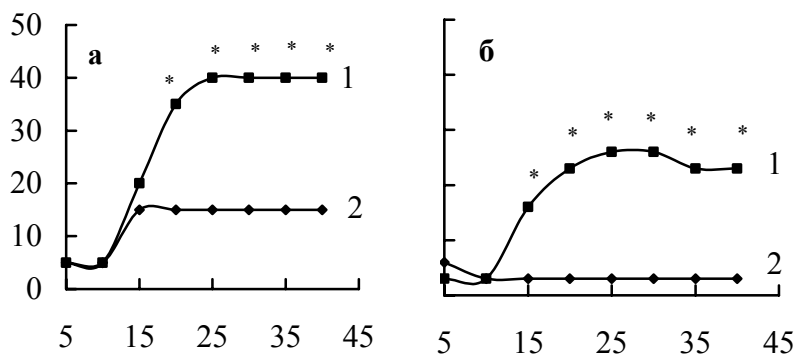


Рис. 7. Количество планарий *Dugesia tigrina* (половая раса), внедривших глотки в тело жертвы после 3 (а) и 12 (б) мес выращивания на хирономидах с разным содержанием соединений ртути. Обозначения, как на рис.6.

Динамика накопления ртути малощетниковыми червями и планариями.

Уровни накопления ртути червями в экспериментах варьировали в широких пределах (0.08-15.97 мкг/г сырой массы) и зависели от содержания металла в корме, сроков экспозиции и видовой принадлежности. У *Enchytraeus albidus*, обитающего в почве, накопление ртути до концентраций, зарегистрированных в корме, проходило в те же сроки (2-4 недели) что и у *Lumbriculus variegates* - характерного представителя фауны беспозвоночных пресных водоемов. То есть аккумуляция металла у олигохет не зависела от среды обитания, и основным определяющим фактором был уровень концентрации ртути в корме.

Принципиально иные закономерности динамики концентрации ртути установлены в опытах с плоскими червями. При одних и тех же сроках выращивания планарии *D. tigrina* (половая и бесполовая расы), *D. lugubris* и *P. tenuis* накапливали разное количество ртути в своем организме. У одних видов высокое содержание металла зарегистрировано через 3 мес. содержания на корме с низкой концентрацией (*D. tigrina*, половая раса), то-

гда как у других накопление ртути незначительно превышало уровни содержания в корме (*D. tigrina*, бесполой расы, *D. lugubris*). Причиной этого могут быть видовые особенности питания и обмена веществ у этих животных. Аналогичные отличия зарегистрированы и в экспериментах, когда в рационе питания животных ртуть была представлена в больших концентрациях (на порядок выше, чем в предыдущих опытах): увеличение концентрации ртути проходило интенсивнее у половой расы планарий *D. tigrina* и *P. tenuis*, по сравнению с бесполой расой *D. tigrina* и *D. lugubris*.

Зарегистрированные в наших экспериментах уровни накопления ртути в теле червей в большинстве случаев соответствуют литературным данным по содержанию этого металла в организме беспозвоночных из водоемов, не имеющих на территории водосборного бассейна локальных источников загрязнения или уровням, накопленным беспозвоночными в экспериментах уровням, не вызывающих функциональных нарушений. Так, содержание ртути в организме представителей класса ракообразных варьирует от 0.07 до 0.3 мг/г сырого веса [23]; у представителей различных отрядов насекомых - от 0.14 до 0.46 мг/кг сухого веса [24]; у моллюсков содержание ртути в организме может достигать 0.42 мг/кг сухого веса [25]. В двухнедельных экспериментах моллюск *Corbicula fluminea* накапливает метилртуть до уровней 8.5 мг/кг [26]. Данных по уровням накопления ртути в организме червей, использованных в наших экспериментах, в литературных источниках не обнаружено.

Тот факт, что в проведенных экспериментах, планарии даже при максимальных уровнях накопления соединений ртути продолжали свою жизнедеятельность (питались, размножались, восстанавливали недостающие фрагменты) в целом свидетельствует о низкой чувствительности этих животных к такому влиянию.

Основной мишенью действия метилированных соединений ртути у птиц и у млекопитающих является центральная

нервная система [27]. Ранее было показано, что чем сложнее организована нервная система у животных, тем сильнее они подвержены токсическому действию таких соединений [28]. Исходя из этого, у исследованных видов животных с низко организованной нервной системой, действие ртутьорганических соединений должно быть минимальным или даже отсутствовать.

Действие накопленных в организме ртутьорганических соединений у птиц проявляется в нарушении поведения и прекращении воспроизводства [5]. Влияние ртути, поступающей в организм планарий с пищей в проведенных нами экспериментах, на репродуктивную активность червей не установлено. Этот показатель оказался наиболее устойчивым к действию ртутьорганических соединений, хотя ранее в отдельных наблюдениях на других беспозвоночных отмечался гонадотоксический эффект высоких концентраций ртути [29].

Ранее было показано, что соли ртути (хлорид, сульфат и нитрат) очень токсичны для бесполой расы планарий *Dugesia tigrina* [30]. Соединения других тяжелых металлов, нейротоксическое действие которых существенно менее выражено или отсутствует вообще (сульфат и хлорид кадмия, нитрат кобальта), были менее токсичны как для целых особей, так и для регенерирующих фрагментов червей. Чувствительность регенерантов при этом, как правило, значительно выше (почти на порядок) при острых воздействиях соединений ртути. В наших экспериментах при хроническом действии соединений ртути у олигохет и у большей части исследованных видов планарий (*D. lugubris* и *P. tenuis*) скорость восстановления недостающих фрагментов тела снижалась с увеличением содержания ртути в организме.

У рыб *Fundulus heteroclitus* исследовано влияние метилртути и хлорида ртути на пищевое поведение. Содержание рыб в среде с метилртутью (0.01 мг/л) в течение одной недели оказывало менее выраженный токсический эффект, по сравнению с серией экспериментов, когда особи содержались в среде с хлоридом ртути при тех же концентрациях [31]. В проведен-

ных нами экспериментах было установлено, что ключевые реакции пищевого поведения планарий (приближение к жертве и двигательная реакция глотки) нарушаются при уровнях ртути в организме червей, превышающих 4.6 мкг/г сырой массы. Нарушение координации этого комплекса реакций нервной системой также указывает на нейротоксический эффект соединений ртути, поступивших в организм планарий с пищей.

Отсутствие негативного эффекта накопленной в организме ртути на воспроизводство планарий не означает отсутствие нейротоксического эффекта в целом. Об этом свидетельствует то, что наиболее чувствительным из исследованных показателей у планарий оказалось восстановление фоторецепторных органов. Каждый фоторецепторный орган у планарий связан специальным зрительным нервом с ганглием и может рассматриваться как часть, продолжение или элемент центральной нервной системы [19]. Задержка в начальных сроках формирования фоторецепторных органов и замедление этого процесса при накоплении ртути в теле всех без исключения исследованных видов могут служить аргументом, подтверждающим универсальность нейротоксического действия ртутьорганических соединений. Более того, даже при незначительном накоплении металла такой негативный эффект регистрировался всегда, в отличие от других изученных показателей (восстановление недостающих частей тела, пищевое поведение).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Сухенко С.А. Ртуть в водохранилищах: новый аспект антропогенного загрязнения биосферы. Новосибирск, 1995. 53 с.
- [2] Mason R.P., Sheu G.R. Role of the ocean in the global mercury cycle // *Glob. Biogeochem. Cycles*. V. 16:093, 10.1029/2001GB001440.
- [3] Габайдуллин А.Г., Ильина Е.М., Рыжов В.В., Хамитова Р. Я. Охрана окружающей среды от ртутного загрязнения. Казань: Магариф, 1999. 95 с.
- [4] Wolfe M.F., Schwarzbach S., Sulaiman, R.A. The effects of mercury on wildlife: a comprehensive review // *Environ Toxicol. Chem.* 1998. V. 17. P. 146–160.
- [5] Wiener J.G., Krabbenhoft D.P., Heinz G.H., Scheuhammer A.M.

- Ecotoxicology of mercury/ In: Handbook of Ecotoxicology (second edition). Hoffman D. J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J. (eds). Boca Raton, FL: Lewis Publishers, CRC Press, 2003. P. 409–463.
- [6] Ellis D. Environments at risk. Case histories of impact assessment. – Berlin; Heidelberg: Springer–Verlag, 1989. 329 p.
 - [7] Webber H.M., Haines T.A. Mercury effects on predator avoidance behavior of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) // Environ. Toxicol. Chem. 2003. V. 22. P. 1556–1561.
 - [8] Порфирьева Н.А., Дыганова Р.Я. Планарии Европейской части СССР. Казань: КазГУ. 1987. 190 с.
 - [9] Попченко В.И., Попченко Т.В. Устойчивость малощетинковых червей к химическим загрязнениям // Известия Самарского научного центра РАН. 1999. № 2. С. 201–203.
 - [10] Drewes C.D. Those Wonderful Worms. Carolina Tips. 1996. V. 59. P. 17–20.
 - [11] Грудцин В.П., Ильина Л.М. Выращивание живых кормов для рыб. М.: ЦНИИТЭИРХ, 1977. 28 с.
 - [12] Шейман И.М., Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий. Влияние нервной системы // Онтогенез. 1995. Т. 26. № 3. С. 231–235.
 - [13] Gill G.A., Fitzgerald W.F. Picomolar mercury measurements in seawater and other materials using stannous chloride reduction and two-stage gold amalgamation with gas phase detection // Marine Chemistry. 1987. V. 20. P. 227–243.
 - [14] Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. The principals and practice of Statistics in biological research. N.Y.: W.H. Freeman. 1995. 887 p.
 - [15] Медведев И.В., Комов В.Т. Воздействие ртутиорганических соединений природного происхождения на регенерацию у двух видов пресноводных планарий *Dugesia tigrina* и *Polycelis tenuis* // Онтогенез. 2005. Т. 36. №1. С. 35–40.
 - [16] Медведев И.В. Влияние ртутиорганических соединений природного происхождения на регенерацию, размножение и пищевое поведение свободноживущих червей (олигохет и планарий): Автореф. канд. дис. Борок. 2006. 17 с.
 - [17] Шейман И.М., Крещенко Н.Д., Седельников З.В., Грозный А.В. Морфогенез у планарий *Dugesia tigrina* // Онтогенез. 2004. Т. 35. С. 285–290.
 - [18] Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. М.: Наука, 1984. 174 с.
 - [19] Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. М.: Высшая школа, 1981. 504 с.
 - [20] Медведев И.В., Гремячих В.А., Желтов С.В., Богданенко О.В., Аксенова И.А. Регенерация фоторецепторных органов у трех видов пресноводных планарий при различных уровнях накопления ртутиорганиче-

- ских соединений природного происхождения // Онтогенез. 2006. Т. 37. №2. С. 136–141.
- [21] Шейман И.М., Зубина Е.В., Крещенко Н.Д. Регуляция пищевого поведения планарии *Dugesia (GIRARDIA) tigrina* // Ж. эвол. биохим. физиол. 2002. Т. 38. № 4. С. 322–325.
 - [22] Medvedev I.V., Komov V.T. Influence of methyl mercury compounds of natural origin on feeding behavior in two species of freshwater planarians // Ecohydrology & Hydrobiology. 2005. V. 5. P. 231–235.
 - [23] Bloom N.S., Watras C.J., Hurley J.P. Impact of acidification on the methyl mercury cycle of remote seepage lakes // Water Air Soil Pollution. 1991. V. 56. P. 477–491.
 - [24] Bjorklund I., Borg H., Johansson K. Mercury in Swedish lakes – its regional distribution and causes // Ambio. 1984. V. 13. P. 118–119.
 - [25] Desy J.C., Archambault J.-F., Pinel-Alloul B., Hubert J., Campbell P.G.C. Relationships between total mercury in sediments and methyl mercury in the freshwater gastropod prosobranch *Bithynia tentaculata* in the St. Lawrence River, Quebec // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2000. V. 57. № 1. P. 164–173.
 - [26] Inza B., Ribeyre F., Boudou A. Dynamics of cadmium and mercury compounds (inorganic mercury or methylmercury): uptake and depuration in *Corbicula fluminea*. Effects of temperature and pH // Aquatic toxicology. 1998. V. 43. P. 273–285.
 - [27] Rodier P.M. Developing brain as a target of toxicity // Environ. Health Perspec. 1995. V. 103. № 6. P. 73–76.
 - [28] Sherlock J.C., Lindsay D. G., Hislop J. et al. Duplication diet study on mercury intake by fish consumers in the United Kingdom // Arch. Environ. Health. 1982. V. 37. № 5. P. 271–278.
 - [29] Sarojini R., Victor B. Toxicity of mercury on the ovaries of the caridean prawn, *Cardina rajadhari* (Bouvier) // Curr. Sci. India. 1985. Vol. 54. N 8. P. 731–742.
 - [30] Pionteck M. Use of a planarian *Dugesia tigrina* Girard in the studies of acute intoxication // Pol. Arch. Hydrobiol. 1999. V. 46. N 1. P. 41–48.
 - [31] Weis J.S., Khan A.A. Effects of Mercury on the Feeding Behavior of the Mummichog, *Fundulus heteroclitus* from a Polluted Habitat // Marine Environmental Research MERSDW. 1990. V. 30. № 4. P. 243–249.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕСТА НА *CERIODAPHNIA AFFINIS* LILLJEBORG В ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2007 г. И.В. Чалова

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

Ухудшение качества окружающей среды вследствие ее загрязнения промышленными, сельскохозяйственными и коммунально-бытовыми отходами, дефицит чистой, биологически полноценной воды – острейшая проблема современности. Вода, приобретающая токсические свойства, угрожает не только жизни гидробионтов, но и здоровью людей [1, 2].

Несмотря на спад промышленного и сельскохозяйственного производства после 1991 г. по данным государственных служб экологического мониторинга, уровень загрязнения поверхностных вод в стране фактически не снизился [3]. При этом число химических соединений, отравляющих водную среду, так велико, что трудно поддается определению. Сложность аналитического контроля заключается и в том, что необходимо идентифицировать вещества в чрезвычайно малых количествах, так как предельно допустимые концентрации основной массы токсикантов составляют 10^{-2} – 10^{-3} мг/дм³.

Химические методы измерения количества загрязняющих веществ в воде позволяют проверить их соответствие установленным нормативам качества воды для конкретного водопользователя (рыбохозяйственного, рекреационного, питьевого и т.д.). Их главный недостаток в неспособности оценить реальный биологический эффект как отдельных загрязняющих веществ, так и их комплексов, продуктов превращения и метаболизма [4]. В условиях, когда в водоемы попадают биологически опасные вещества, возникает потребность в наиболее достоверных методах токсикологического контроля, к ко-

торым относится биотестирование [5]. Оно стало широко применяться в научных и прикладных исследованиях в 80-е годы 20 века. В значительной мере это было связано с надеждами специалистов на то, что биологические методы смогут хотя бы частично заменить химический анализ вод.

Биотестирование является классическим экспериментальным методическим приемом токсикометрии. Оно позволяет оценить биологическую полноценность исследуемой воды: ее пригодность для жизни гидробионтов, обеспечивающих процессы самоочищения в водоеме и биологическое окисление при очистке сточных вод. Результаты биотестирования на токсичность оперативно сигнализируют об опасном воздействии химического загрязнения на жизнедеятельность водных организмов, причем не по отдельным компонентам, а по их смесям, часто неизвестной природы и не выявляемым другими методами анализа [6].

С 1991 г. биотестирование стало обязательным элементом контроля качества поверхностных вод [7]. Его показатели включены в перечень показателей для выявления зон чрезвычайной экологической ситуации на природных водоемах [8, 9].

Лаборатория физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской Академии Наук (ИБВВ РАН) активно участвует в разработке и апробации современных методов биотестирования воды и донных отложений.

В 1984 г. в пос. Борок состоялся Советско-Американский симпозиум, который способствовал расширению работ в этом направлении.¹ В 2002 г. проведена Всероссийская конференция по современным проблемам водной токсикологии с участием специалистов из стран ближнего и дальнего зарубе-

¹ «Проблемы водной токсикологии, биотестирования и управления качеством воды». 4-й Советско-Американский Симпозиум. 30 июля-1 августа 1984 г., Борок.

жья.² В 2005 г. была продолжена работа этой конференции и она приобрела статус международной.³

Сотрудниками лаборатории сделан большой вклад в разработку поведенческих методов биотестирования.

Так, В.А Непомнящий при изучении влияния хлорофоса на этапы пищевого поведения пиявки *Hemiclepsis marginata* (O.F.Müller) [10] и изменения строительного поведения ручейника *Chaetopteryx villosa* (Fabricius) под воздействием метилпаратиона [11] показал, что даже слабые изменения отдельных сторон поведения могут накапливаться и приводить к нарушению целостных поведенческих реакций.

В работах Л.Н. Лапкиной [12] для пиявки *Hirudo medicinalis* (Linnè) выявлен симптомокомплекс отравления в растворах, содержащих фенольные, фосфор- и хлорорганические соединения. Предложен новый тест-объект – молодь медицинской пиявки. Его можно использовать для обнаружения токсикантов раздражающего действия и боевых отравляющих соединений (на основе мышьяка, ртути и фосфорной кислоты) в различных средах: воде, донных отложениях, почве, воздухе, вытяжках из растений и животных [13].

Наряду с чувствительностью одним из главных и привлекательных для широкого круга исследователей качеством биотестов является их экспрессность. Здесь на первый план выходят тест-объекты, короткий жизненный цикл которых позволяет достаточно быстро выявить потенциальную опасность загрязняющих веществ в ряду поколений. Наиболее часто для этого используют планктонных ветвистоусых ракообразных, например *Daphnia magna* Straus.

² Всероссийская конференция с участием специалистов из стран ближнего дальнего и зарубежья «Современные проблемы водной токсикологии» 19-21 ноября 2002 г., Борок.

³ Международная конференция. «Современные проблемы водной токсикологии. Памяти доктора биологических наук, профессора Бориса Александровича Флерова (2.04.1937–18.01.2005)». 20-24 сентября 2005 г., Борок.

В 1984 г. в США Д. Маунтом и Т. Норбергом [14] разработан семидневный тест на цериодафниях (*Ceriodaphnia affinis* Lillijeborg). По сравнению с тестом на дафниях он позволяет за более короткий срок (7 сут. вместо 24-х) дать заключение о наличии хронической токсичности воды. Для использования в практике государственного экологического контроля России тест на цериодафниях был адаптирован в ИБВВ РАН под руководством Б.А. Флерова [15-17]. В настоящее время это единственный метод биотестирования, который прошел стандартизацию в США и России [18, 19]. С его помощью можно определять токсичность питьевых, грунтовых, поверхностных, сточных вод и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов.

Работы с использованием цериодафниевых методов в ИБВВ РАН ведутся по трем основным направлениям:

- 1) оценка токсичности индивидуальных химических соединений и их смесей [20-22];
- 2) изучение токсичности сточных вод [23,24] и их влияние на качество воды и донных отложений в принимающих их водных объектах [25-31];
- 3) интеграция результатов лабораторных токсикологических экспериментов и данных полевых гидробиологических исследований для определения качества среды обитания гидробионтов в водоёмах, подверженных антропогенному и зоогенному влиянию [32-38].

1. Оценка токсичности индивидуальных химических соединений и их смесей.

В литературе накоплен большой фактический материал по влиянию отдельных токсикантов на жизнедеятельность гидробионтов [39-41]. Однако, в реальных экологических условиях водная биота испытывает воздействие комплекса химических веществ, которое может отличаться от простого сложения частных воздействий, как в сторону повышения, так и снижения токсичности смеси [39]. Совместное действие

загрязняющих веществ изучалось в основном на рыбах [39, 41, 42]. Работ на водных беспозвоночных, играющих значительную роль в жизни водоемов, крайне мало [39, 41, 43, 44].

В наших исследованиях в острых и хронических опытах для *Ceriodaphnia affinis* определена токсичность шести приоритетных загрязняющих веществ (сульфата меди, фенола, карбофоса, дизельного топлива, тритона X-100, додецилсульфата натрия) и их парных смесей, а также исследован тип их взаимодействия.

Для оценки токсического действия бинарных смесей на тест-объект был предложен коэффициент нарушения репродукции у цериодафний (K_{HP}), который имеет однонаправленный характер изменений с параметром острой токсичности и рассчитывается по формуле:

$$K_{HP} = 1 - \frac{F_T}{F_K} \quad (1),$$

где: F_T – средняя плодовитость на одну самку в токсичном растворе за 7 сут.; F_K – средняя плодовитость на одну самку в контрольной воде за 7 сут.

В зависимости от степени нарушения репродукции у цериодафний K_{HP} изменяется в диапазоне от 0 (при отсутствии влияния на плодовитость) до 1 (при ее полном угнетении). По коэффициенту нарушенной репродукции у *C. affinis* исследованные вещества располагаются в следующем возрастающем ряду: карбофос – 0.43, тритон X-100 – 0.50, фенол – 0.54, дизельное топливо – 0.57, додецилсульфат натрия – 0.63, медь – 0.90.

Для оценки типа взаимодействия пары токсикантов в краткосрочных и хронических опытах разработан коэффициент силы взаимодействия (K_{CB}), рассчитываемый по формуле:

$$K_{CB} = \frac{2m_{1+2}}{m_1 + m_2} \quad (2),$$

где: m_{1+2} – параметр токсичности (гибель или изменение плодовитости рачков) при одновременном воздействии пар веществ; m_1 и m_2 – параметры токсичности при воздействии каждого вещества в отдельности.

Значение K_{CB} равное 1, соответствует аддитивному эффекту, когда сила токсического влияния парной смеси на тест-организм равна полусумме влияний составляющих ее компонентов. При антагонистическом типе взаимодействия величина K_{CB} принимает значения < 1 , т.е. токсичность смеси ниже суммы токсичностей составляющих ее веществ. И, наоборот, при синергическом эффекте, величина коэффициента > 1 , а токсичность парной смеси выше суммы токсичностей составляющих ее компонентов.

Тип взаимодействия исследованных веществ в бинарных смесях, определенный с использованием предложенных коэффициентов, представлен в табл. 1 [21].

Таблица 1.

Тип взаимодействия веществ в парных смесях в острых и хронических опытах.

Комбинации пар токсикантов	Острые опыты	Хронические опыты
ВВС+Cu	антагонизм	аддитивность
ВВС+фенол	антагонизм	синергизм
ВВС+карбофос	антагонизм	аддитивность
ВВС+ДДСNa	антагонизм	аддитивность
ВВС+TX-100	аддитивность	синергизм
Фенол+Cu	аддитивность	аддитивность
Фенол+карбофос	антагонизм	аддитивность
Фенол+ДДСNa	антагонизм	антагонизм
Фенол+TX-100	синергизм	синергизм
Карбофос+Cu	антагонизм	аддитивность
Карбофос+ДДСNa	синергизм	синергизм
Карбофос+TX-100	аддитивность	аддитивность
Cu+ДДСNa	синергизм	аддитивность
Cu+TX-100	аддитивность	синергизм
ДДСNa+TX-100	синергизм	синергизм

Примечание. ВВС – водная вытяжка солянки, Cu – медь, ДДСNa – додецилсульфат натрия, TX-100 – тритон X-100.

Показано, что в острых опытах чаще отмечалось снижение токсичности смеси по сравнению с контролем (антагонизм) – 47 % случаев, тогда как усиление токсического эффекта (синергизм) и независимое действие компонентов в смеси (аддитивность) наблюдалось с одинаковой частотой – 27%.

В хронических экспериментах преобладал аддитивный тип взаимодействия – 53% исследованных смесей, синергизм отмечен у 40%, а антагонизм лишь у одной пары веществ – 7%. В хронических опытах увеличивается доля случаев синергизма и резко снижается доля случаев антагонизма, что служит свидетельством возрастающей токсичности, следовательно, и потенциальной опасности смесей.

Совпадение типа взаимодействия в смесях в острых и хронических опытах отмечено только у шести из 15-ти исследованных пар токсикантов. Среди них усиление токсичности отмечено у трех пар веществ, сложение – у двух, снижение – у одной пары.

Несовпадение типа взаимодействия веществ в парных смесях в острых и хронических опытах, встречается чаще (60% случаев), чем совпадение (40%). Этот факт не позволяет по результатам острых опытов прогнозировать тип взаимодействия смесей в хронических опытах и тем более в природных условиях.

2. Изучение токсичности сточных вод и их влияние на качество воды и донных отложений в принимающих их водных объектах.

Большой блок в работе лаборатории составляют исследования по определению влияния сточных вод на гидробионтов и изучению качества воды природных водных объектов, загрязняемых стоками промышленных предприятий.

Влияние бытовых сточных вод на биологические показатели цеериодафний рассмотрено в работах Б.А. Флерова, В.А. Гремячих, Ю.Г. Изюмова [23, 24]. В результате проведенного анализа сделан вывод, что, несмотря на отсутствие острого токсического действия воды коллекторного водоема на рачков, в ряду поколений (начиная с третьего) снижалась

их плодовитость, и уменьшались размеры молоди. В экспериментах не удалось получить линию цериодафний, устойчивых к действию неочищенной сточной воды.

По результатам биотестирования с помощью *Ceriodaphnia affinis* выявлена острая токсичность стоков девяти основных промышленных предприятий г. Рыбинска [26]. Лабораторные эксперименты показали, что действующие биологические очистные сооружения города не справлялись с очисткой сточных вод. Это приводило к поступлению в Волгу, вода которой в черте города используется для питьевых и бытовых целей, потенциально опасных токсических веществ.

Определение токсичности сточных вод и отходов промышленных предприятий ведутся сотрудниками лаборатории в составе Аналитического центра ИБВВ РАН, созданном и прошедшем государственную аттестацию в 1998 г.

В течение двух лет (1987–1988 гг.) лаборатория физиологии и токсикологии водных животных принимала участие в реализации программы «Комплексные исследования экологической обстановки на Рыбинском водохранилище в результате аварии на очистных сооружениях г. Череповца в 1987 г.» [45]. В декабре 1986 г. и январе 1987 г. в результате аварийного сброса кислоты и остановки обесфеноловающей установки Череповецкого металлургического комбината вышли из строя система биохимической очистки завода и городские биологические очистные сооружения. Концентрированные сточные воды коксохимического производства стали поступать в водохранилище.

Динамику качества воды различных участков Шекснинского плеса, испытывавшего наибольшую нагрузку последствий аварийного сброса, определяли с помощью цериодафниевых тестов [30]. Лабораторные эксперименты показали, что после вскрытия льда и до середины июля 1987 г. загрязняющие вещества, накопившиеся в водоёме зимой, распространились на значительное расстояние от места сброса и образовали токсичные зоны (рис. 1). К контрольным (вода Волжского плеса) показателям качество воды приблизилось лишь в августе.

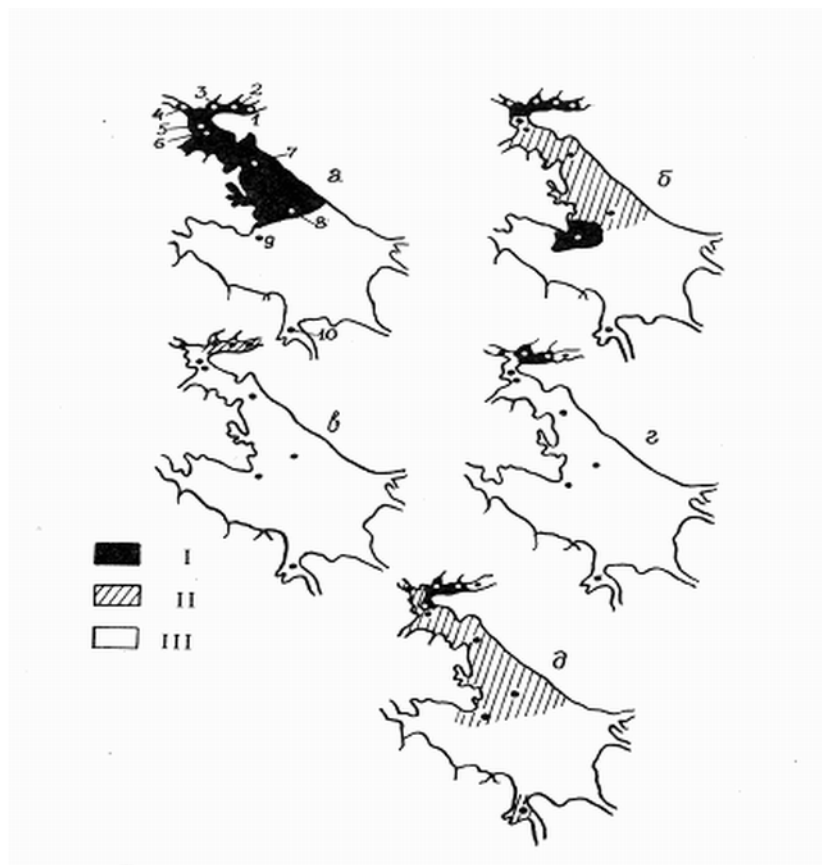


Рис. 1. Токсичность воды Рыбинского водохранилища для *Ceriodaphnia affinis*.

а – пробы отобраны 25 мая и 8 июня 1987 г., б – 19 июня и 20 июля 1987 г., в – 25 августа и 5 октября 1987 г., г – 17 мая 1988 г., д – 25 сентября 1988 г.; I – очень токсичная вода (гибель 50–100% рачков), II – умеренно токсичная (20–50%), III – нетоксичная (0–20%); 1 – д. Кабачино, 2 – р. Ягорба, 3 – р. Кошта, 4 – р. Суда, 5 – о. Каргач, 6 – ст. Любец, 7 – д. Мякса, 8 – ст. Средний Двор, 9 – Центральный мыс, 10 – Волжский плёс.

Однако в конце сентября – октябре 1987 г. токсичность воды исследованных участков вновь увеличилась. Весной следующего года (май 1988 г.) острая токсичность отмечена

лишь в воде р. Ягорба, на остальных станциях качество воды было удовлетворительным. В сентябре оно вновь снизилось, гибель цериодафний в тестируемой воде составляла 20 до 50%. Это свидетельствовало о продолжающемся поступлении неочищенных стоков г. Череповца в водохранилище.

В комплексных работах по определению потенциальной опасности загрязненных донных отложений (ДО) Верхне-Волжских водохранилищ сотрудниками Института использован триадный подход. Он заключается в определении содержания в ДО загрязняющих веществ, состояния бентосных сообществ и токсичности. В этих исследованиях биотестирование водной вытяжки ДО проводили с использованием цериодафний. Наиболее неблагоприятным состоянием отличались ДО Ивановского и Горьковского водохранилищ – 44 и 33% проанализированных проб соответственно. В Рыбинском водохранилище таких проб было меньше – 21% [31].

Семисуточный тест на *Ceriodaphnia affinis* был использован и для определения качества воды озер и рек в зоне влияния Воркутинского промышленного комплекса [46]. К крайне неблагоприятным отнесён район стока с очистных сооружений шахты “Северная” (гибель 100% рачков за 24 ч). Выраженная хроническая токсичность воды отмечена в озерах около пос. Варгашор, у цементного завода и на участке р. Воркута от ст. Седловая до совхоза “Тепличный”. Во всех исследованных пробах воды отмечено достоверное снижение плодовитости рачков по сравнению с контролем. В тестируемых пробах среднее количество молоди на 1 самку составляло 6.8–9.2 экз., в контроле – 13.8. Среднее количество пометов на 1 самку было в 1.4–2 раза меньше, чем в контроле. По результатам биотестирования чистыми, были признаны воды озера в районе пос. Мульда и р. Уса у водозабора. В пробах воды из этих водоёмов количество пометов на 1 самку, совпадало с контрольными значениями, а среднее значение плодовитости (от 11.3 до 12.9 экз.) недостоверно отличалось от контроля.

3. Интеграция результатов лабораторных токсикологических экспериментов и данных полевых гидробиологических исследований для определения качества среды обитания гидробионтов в водоёмах, подверженных антропогенному и зоогенному влиянию.

Проведенный исследователями анализ данных биотестирования и полевых наблюдений за сообществами гидробионтов показал сопоставимость полученных результатов. Это позволяет с уверенностью переносить результаты лабораторных опытов на природные экосистемы [32, 47, 48]. В ряде случаев методы биотестирования существенно дополнить результаты полевых исследований. Примером тому служит изучение реакции планктонных беспозвоночных на жизнедеятельность бобров [49]. Выделенные три типа участков малых рек (незарегулированный участок, зарегулированные человеком и бобрами) различались по структурно-функциональным характеристикам зоопланктона.

При зарегулировании реки бобрами увеличились численность и биомасса ветвистоусых ракообразных (рис. 2 а), их доли в общей численности и биомассе всего комплекса зоопланктеров (рис 2 б), а также продукция. Было сделано предположение, что бобры изменяют условия существования зоопланктона не только в результате возведения плотин и, следовательно, существенного уменьшения скорости течения, но и за счет других аспектов своей жизнедеятельности. Для проверки данных, полученных в ходе полевых исследований, проведены лабораторные эксперименты по влиянию воды с изучаемых участков малых рек на количество потомства *Ceriodaphnia affinis*. Выявлено, что максимальное количество потомства цериодафнии давали в воде из бобрового пруда (рис. 3).

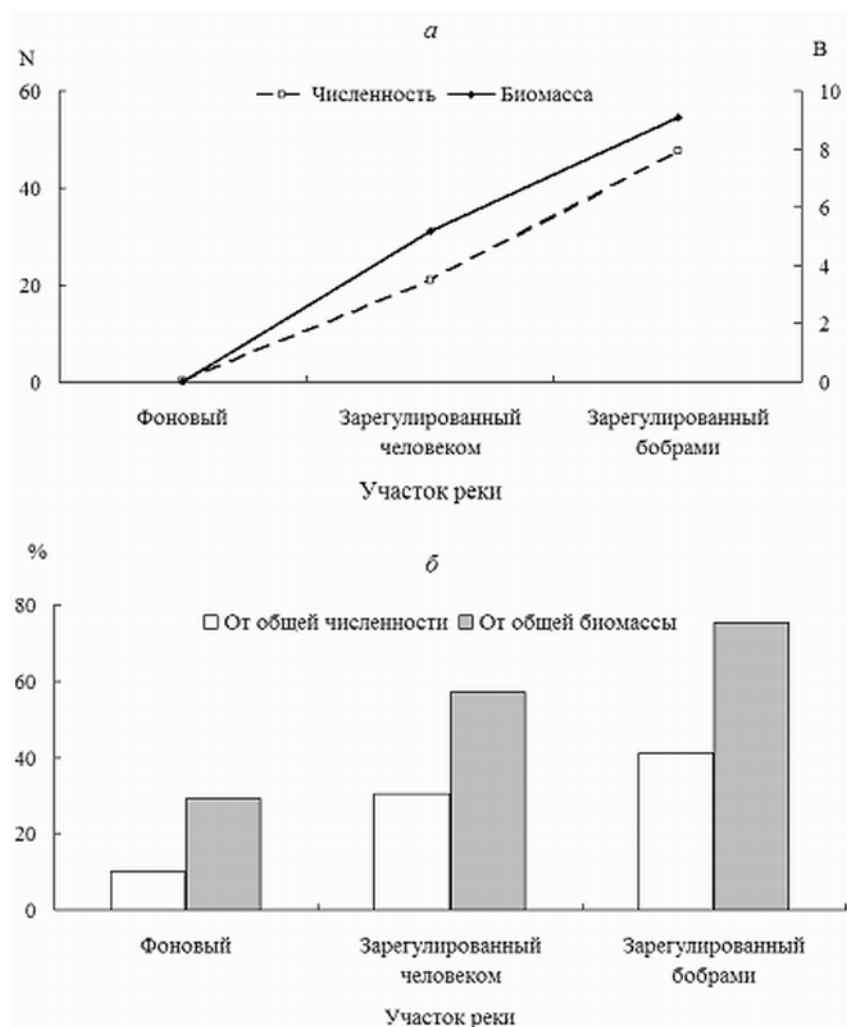


Рис.2. Численность (N, экз./м³), биомасса (B, г/м³) ветвисто-улых ракообразных (а) и их доля (%) в численности (□) и биомассе (■) зоопланктона (б) изучаемых участков малых рек.

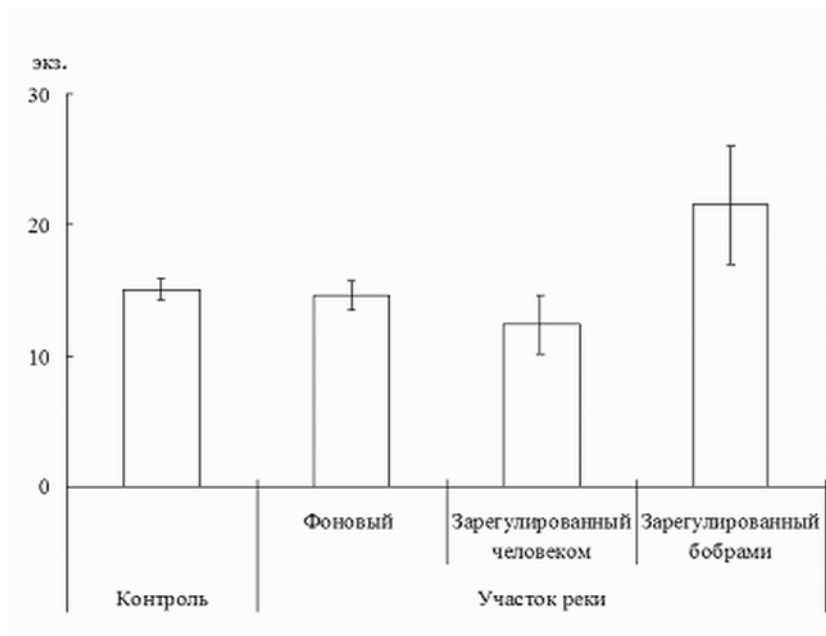


Рис. 3. Плодовитость *Ceriodaphnia affinis* в контрольной воде и воде изучаемых участков малых рек.

Наиболее значимые отличия наблюдались в межень, когда каждый участок реки наиболее дискретен, и на развитие *Cladocera* решающее влияние оказывают факторы, характерные для данного биотопа.

Таким образом, среди причин происходящих изменений, наряду со снижением скорости течения, можно также назвать стимулирующий эффект комплекса факторов, в том числе и тех, которые могут быть инициированы продуктами метаболизма бобров.

Опыт использования цериодафниевых тестов в исследованиях лаборатории физиологии и токсикологии ИБВВ РАН подтвердил возможность его применения для решения не только токсикологических, но и широкого круга гидробиологических задач.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Защита речных бассейнов, озер и эстуариев от загрязнения. Л.: Гидрометеиздат, 1989. 210 с.
- [2] Лосев К.С., Горшков В.Г., Кондратьев К.Я и др. Проблемы экологии России. М.: Федеральный экологический фонд РФ, 1993. 348 с.
- [3] О состоянии окружающей природной среды Российской Федерации в 1995 году // Зеленый мир. Российская экологическая газета. 1996. № 24 (230). С. 3–5.
- [4] Емельянова В.П., Данилова Г.Н., Колесникова Т.Х. Оценка поверхностных вод суши по гидрохимическим показателям // Гидрохим. материалы. 1983. Т. 88. С. 119–129.
- [5] Абиева Р.М., Зотова В.И., Борисов А.И. Использование биологических тест-систем для оценки токсичности промышленных сточных вод // Биоиндикация и биотестирование природных вод. Тез. докл. Всесоюз. конф. Ростов-на-Дону, 1986. С. 160.
- [6] Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Бражникова Л.В., Жулидов А.В. Мониторинг качества вод: Оценка токсичности. СПб: Гидрометеиздат, 2000. 160 с.
- [7] Правила охраны поверхностных вод (Типовые положения). М.: Госкомприроды СССР, 1991. 38 с.
- [8] Критерии оценки экологической обстановки территории для выявления чрезвычайной экологической ситуации и зон экологического бедствия // Зеленый мир. Российская экологическая газета. 1994. № 12. С. 8–11.
- [9] Ежегодник качества поверхностных вод РФ за 1989 г. Обнинск: Изд. ВНИИГМИ-МЦД, 1990. 492 с.
- [10] Непомнящих В.А., Елякова Н.Б. Сравнение чувствительности простого и сложного поведения пиявки *Hemiclepsis marginata* к хлорофосу // Биол. внутр. вод: Информ. бюл. 1987. № 47. С. 42–46.
- [11] Непомнящих В.А., Флеров Б.А., Хенри М.Д. Влияние метилпаратиона на строительное поведение личинок ручейников *Chaetopteryx villosa* (F.) // Научн. докл. высшей школы. Биол. науки. 1988. № 9. С. 70–72.
- [12] Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Использование пиявок для идентификации пестицидов в воде // Гидроб. ж. 1980. Т. 16. № 3. С. 113–119.
- [13] Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Экспресс обнаружение в воде веществ, обладающих раздражающими свойствами // Токсикол. вестник. 2001. № 3. С. 16–21.
- [14] Mount D.I., Norberg T.J. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test // Environ. Toxicol. Chem. 1984. V. 3. P. 425–434.
- [15] Флеров Б.А., Жмур Н.С., Очирова М.Н., Чалова И.В. Метод биотестирования природных и сточных вод с использованием рачка

- Ceriodaphnia affinis* // Методы биотестирования вод. Черноголовка. 1988. С. 111–114.
- [16] Флеров Б.А., Жмур Н.С. Биотестирование с использованием цериодафний // Методическое руководство по биотестированию воды. РД-118-02-90. М.: 1991. С. 19–28.
 - [17] Henry M.G., Flerov B.A., Komov V.T., Heming T.A. On-site toxicity testing applications in the United States and Soviet Union // Fate and effects of pollutants on aquatic organisms and ecosystems. Proc. of USA-USSR Symp. Athens, USA. EPA/600-9-88/001. 1988. P. 70–77.
 - [18] Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. Федеральный реестр ФР.1.39.2001.00282. М.: Акварос, 2001. 52 с.
 - [19] U.S. Environmental Protection Agency: Quality criteria for water. EPA-440/5-86-001. Washington: DC:USEPA, 1994.
 - [20] Чалова И.В. Комплексное воздействие антропогенных загрязняющих веществ на *Ceriodaphnia affinis* // Материал. 7-го съезда Гидроб. общ. РАН. Казань, 1996. Т. 3. С. 94–97.
 - [21] Чалова И.В. Исследование комбинированного действия парных смесей токсических веществ на планктонных ракообразных (*Ceriodaphnia affinis*) // Токсикол. вестник. 1998. № 3. С. 18–21.
 - [22] Чалова И.В., Флеров Б.А. Действие парных смесей токсических веществ (фенол+додецилсульфат натрия; карбофос+додецилсульфат натрия) на *Ceriodaphnia affinis* при различных количественных соотношениях компонентов // Токсикол. вестник. 2001. № 6. С. 27–30.
 - [23] Флеров Б.А., Гремячих В.А., Изюмов Ю.Г. Изменение биологических показателей (плодовитости и размеров тела) поколений ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* Lill. при сублетальном воздействии хозяйственных сточных вод и токсикантов // Токсикол. вестник. 2001. № 6. С. 17–21.
 - [24] Флеров Б.А., Гремячих В.А., Изюмов Ю.Г. Плодовитость и размеры *Ceriodaphnia affinis* Lill. в ряду поколений при действии бытовых сточных вод // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 3. С. 375–377.
 - [25] Воркута – город на угле, город в Арктике // Сыктывкар: ОАО «Коми респуб. типография». 2004. 352 с.
 - [26] Крылова И.Н., Томилина И.И., Степанова В.М., Чалова И.В. Оценка токсических и мутагенных свойств сточных вод основных промышленных предприятий г. Рыбинска (Ярославская область) // Биол. внутр. вод. 2000. № 4. С. 156–162.
 - [27] Крылов А.В., Морзжухина С.В., Флеров Б.А. и др. Изучение качества воды р. Сестры (Московская область), как среды обитания гидробионтов // Малые реки: Современное экологическое состояние, актуальные проблемы. Тез. докл. Тольятти, 2001. С. 114.

- [28] Чалова И.В. Изучение токсичности вод Рыбинского водохранилища с помощью семисуточного теста на *Ceriodaphnia affinis* // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск: Госкомиздат РСФСР. 1990. С. 20–24.
- [29] Чуйко Г.М., Копылов А.И. и др. Оценка загрязнения коммунально-промышленными сточными водами р. Волги на территории г. Рыбинска // Современное экологическое состояние Верхней Волги. Ярославль. 1994.
- [30] Флёрв Б.А. Экологическая обстановка на Рыбинском водохранилище в результате аварии на очистных сооружениях г. Череповца в 1987 г. // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск: Госкомиздат РСФСР. 1990. С. 3–12.
- [31] Флёрв Б.А., Томилина И.И., Кливленд Л. и др. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. 2000. № 2. С. 148–155.
- [32] Крылов А.В. Зоопланктон равнинных малых рек. М.: Наука, 2005. 263 с.
- [33] Крылов А.В., Цельмович О.Л., Отыкова Н.Г., Чалова И.В. Влияние строительной деятельности бобров на качество вод загрязняемой малой реки // Биол. внутр. вод. 2005. № 3. С. 91–97.
- [34] Чалова И.В., Крылов А.В. Изменение плодовитости *Ceriodaphnia affinis* и развития ветвистоусых ракообразных зоопланктона малой реки при комплексном влиянии антропогенного и зоогенного факторов // Современные проблемы водной токсикологии. Всеросс. конф. Тез. докл. Борок, 2002. С. 179–180.
- [35] Чалова И.В., Крылов А.В. Методы биотестирования в диагностике изменений качества среды малых рек при влиянии ключевых факторов // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем. Международ. конф. Тез. докл. СПб, 2006. С. 176.
- [36] Chalova I.V., Krylov A.V. The changes in Cladocera fertility and abundance in beaver ponds // Third International Beaver Symposium. Abstracts. The Netherlands, 2003. P. 13.
- [37] Krylov A.V., Tselmovich O.L., Otyukova N.G., Chalova I.V. Changes in water quality of small polluted river and processes of self-purification under the effect of Beaver's activity // Third International Beaver Symposium. Abstracts. The Netherlands, 2003. P. 26.
- [38] Krylov A., Chalova I. Plankton Cladocera of the small rivers at a water flow regulated by men and beavers // The 4th European Beaver Symposium and 3rd Euro-American Beaver Congress. Abstracts. Germany, 2006. P. 37.
- [39] Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии и качество воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 344 с.
- [40] Влияние фенола на гидробионтов. Л.: Наука, 1974. 224 с.

- [41] Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжёлые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. М.: Мир, 1987. 286 с.
- [42] Маврин А.С., Виноградов Г.А., Ершов И.Ю. и др. Влияние основных загрязняющих веществ на рост и физиологическое состояние молоди осетра в хроническом эксперименте // 2-я Всесоюзная конф. по рыбохозяйственной токсикологии. Тез. докл. СПб, 1991. С. 20–21.
- [43] Шотгер Р. Мок В. Токсичность экспериментальных инсектицидов, предназначенных для лесного хозяйства, для рыб и водных беспозвоночных // Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л.: Наука, 1979. С. 224–239.
- [44] Hermens J., Canton H., Steyger N., Wegman R. Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of *Daphnia magna* // *Aquatic Toxicol.* 1984. V. 5. P. 315–322.
- [45] Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск: Госкомиздат РСФСР. 1990. 156 с. Koreneva E., Chalova I. Ecologo-toxicological characteristic of water-bodies in the region of the Vorcuta complex // *Arctic town and environment. International conference. Abstracts.* Syktyvkar. 1994. P. 41.
- [46] Абдуллина Г.Х. Зоопланктон и сапробность реки Туры // Современные проблемы водной токсикологии. Тез. докл. Борок, 2002. С. 156–157.
- [47] Яковлев В.А. Биоиндикация и биотестирование арктических водоемов в условиях токсификации, эвтрофирования, ацидификации и термофикации // Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга. XI Международ. симпоз. по биоиндикац. и биомонитор. Сыктывкар, 2001. С. 215–216.
- [48] Завьялов Н.А., Крылов А.В., Бобров А.А. и др. Влияние речного бобра на экосистемы малых рек. М.: Наука, 2005. 186 с.

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ПРЕСНОВОДНОГО
ЗООПЕРИФИТОНА И ЗООБЕНТОСА И ПРОБЛЕМЫ
ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО БИОМОНИТОРИНГА**

© 2007г. И.А.Скальская, А.И. Баканов А.И., Б.А. Флеров

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

Одно из фундаментальных направлений современной гидробиологии - изучение обусловленных взаимосвязями различных биотопических группировок гидробионтов закономерностей функционирования и устойчивости экосистем разнотипных водоемов в условиях антропогенного загрязнения. Экологически близкие сообщества перифитона и бентоса в силу методической сложности и биологического своеобразия исследуются специалистами разного профиля и независимо друг от друга. Выявленные к настоящему времени закономерности формирования структуры и функционирования этих сообществ в водоемах различного типа не сопоставлялись друг с другом, отсутствовали комплексные синхронные исследования зооценозов, не рассматривались перспективы их совместного использования для биомониторинга и оценки эколого-токсикологического состояния водоемов. В последующий период этот пробел был восполнен специалистами по зооперифитону и бентосу под руководством и активном участие заведующего лабораторией физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН, доктора биологических наук профессора Б.А. Флерова. В данной публикации приводится краткое изложение результатов исследований, выполненных на водоемах бассейна Верхней Волги.

Термин «бентос» издавна используется для обозначения обитателей дна водоемов. Донные организмы способны зарываться в грунт и проникать на значительную глубину. В отличие от них перифитонные организмы обитают на поверхности

твердых субстратов. Соответственно ключевые направления адаптивного развития сообществ перифитона и бентоса различны. Одни сообщества обрастателей, граничащие с дном, по видовому составу и ряду других характеристик сходны с бентосными. Другие, непосредственно примыкающие к рыхлому грунту, но обитающие на жестком (твердом) субстрате и имеющие черты как биообрастания, так и бентоса, можно выделить в особую группу промежуточных (пограничных). В состав бентоса и обрастаний могут входить одни и те же виды микро- и макроорганизмов. В период размножения они отрождают в планктон расселительные формы, которые оседают на твердые и мягкие субстраты и принимают участие в формировании этих сообществ. Следовательно, для организмов второй группы можно говорить о бентосном или перифитонном образе жизни.

Мы считаем целесообразным отнести к экологической группировке организмов - перифитону сообщество гидробионтов, пространственной нишей которого служат находящиеся в толще воды различные субстраты (природные и антропогенные), функционально тесно связанное с пелагиалью, имеющее общие исторические корни, а также прямые (при контакте субстратов с дном) и косвенные (через толщу воды) экологические связи с бенталью [10]. Многие другие частные характеристики, например, размеры субстратов, их ориентация в пространстве, глубина погружения, скорость разрушения оказывают влияние на структуру формирующихся сообществ, но не меняют их биотопической обособленности и экологической специфики, которые заключаются в том, что перифитон занимает пространственные ниши попавших в воду природных и антропогенных субстратов.

Водохранилища. При образовании водохранилищ на реках затоплению подвергаются их долины вместе с расположенными на ней пойменными водоемами. На залитой водой суше наблюдаются процессы возникновения и развития донной фауны, одновременно происходит трансформация

фауны ранее существовавших водоемов. Для равнинных водохранилищ основным является первый процесс, при котором водная фауна создается там, где она ранее не существовала, иными словами происходит смена наземной фауны на водную. Часто этот процесс происходит на большей части площади нового водохранилища, так как при образовании крупных водохранилищ прежние водоемы занимают незначительную долю затопляемой местности (иногда менее 5%). Глубокой перестройке во вновь созданных водоемах подверглись все ниши гидробионтов - пространственная, трофическая, многомерная. Процесс формирования современных структур бентоса и перифитона был растянут во времени и сопряжен с изменениями основных их биотопов – грунтов и твердых субстратов в виде затопленных лесов, макрофитов, камней, антропогенных сооружений. Трансформация исходных каменистых и крупно-песчанистых грунтов в верхнем течении реки Волги началось со времени заполнения водохранилищ под влиянием абразионной деятельности водной массы, разрушающей берега и размывающей ложе водоемов, а также поступления взвешенных наносов р. Волги и ее притоков. Большая часть взвешенного вещества аккумулируется на дне, образуя вторичные донные отложения (ДО), но темпы седиментации в водохранилищах низки и исключают проблему их заиления. Для водохранилищ Верхней Волги специфичным является наличие песков и трансформированных грунтов в мелководной зоне на глубинах от 0 до 4 м и лишь в Рыбинском водохранилище – до 8-10 м., в последнем глубоководная зона (более 14 м.) занята серыми глинистыми илами и лишь местами (северо-западная часть этого водоема) имеются илы торфогенного происхождения. Интенсивная стадия формирования ДО в первом десятилетии существования водохранилищ сменилась пассивной, поэтому в ближайшем будущем сохранится нынешнее распределение основных типов грунтов и ДО [20].

При создании ряда волжских водохранилищ оказались затопленными большие площади лесов, особенно велики они были в Рыбинском водохранилище. Эти биотопы обильно заселялись беспозвоночными-обрастателями. Во многих местах мелководий еще долго сохранялись затопленные стволы мертвых деревьев, которые впоследствии разрушались, но до сего времени кое-где сохранились остатки пней, корней деревьев. Свежезатопленные, упавшие с берегов деревья встречаются в основном в притоках водохранилища. Субстратами для перифитона служат также потерянные при транспортировке бревна, крупные валуны, камни, макрофиты, антропогенные сооружения. Основные площади, занятые водными растениями, расположены в заливах и в речных плесах. Резкие колебания уровня воды в водохранилище постоянно меняют степень зарастания мелководий. В годы с низким уровнем воды большие участки литорали остаются сухими. Площади затопленных лесов в Горьковском водохранилище по сравнению с Рыбинским были невелики. Колебания уровня режима не столь масштабны, как в Рыбинском водохранилище, поэтому характер зарастания мелководий относительно стабилен.

Уникальный материал, накопленный специалистами по перифитону и бентосу водоемов различного типа за многие годы расширил, а в ряде случаев и скорректировал существующие представления о формировании и функционировании биоты водохранилищ, озер и малых рек.

Анализ формирования бентоса и перифитона водохранилищ Верхней Волги позволил выявить общие и специфические особенности этого процесса. Подтверждена обоснованность классической схемы формирования бентоса, предложенной Ф.Д. Мордухай-Болтовским [7, 13]. Одновременно показана целесообразность объединения первой и второй стадии в единую «мотылевую». Для бентоса отмечена высокая вариабельность процесса сукцессий в разных водоемах, что

связано с региональными особенностями каждого водоема и спецификой фауны.

Определяющую роль в формировании перифитона водохранилищ, кроме вышеуказанных факторов, имеет «перифитопотенциал» водоема, т.е. наличие твердых субстратов в толще воды и ее насыщенность зачатками перифитонных (и эвритопных) форм, обеспеченность пищей обрастателей, среди которых преобладают беспозвоночные-фильтраторы. Для бентоса (при отсутствии экстремальных условий) наиболее значимые факторы – характер грунта, его структурные характеристики и наличие пищи для разных трофических групп.

Сравнение процесса формирования бентоса и перифитона показало, что первый этап имел сходный, олигомиксный «хирономидный» тип. Это связано с тем, что в новом водоеме собственный перифитон, обогащающий толщу воды зачатками обрастателей, еще не сформировался, на свободных субстратах также, как и в бентосе поселялись беспозвоночные приносимые биостоком, а также личинки насекомых, появляющиеся из кладок, сбрасываемых в воду имаго насекомых, которые из воздуха «осеменяли» водоем. Однако структура ранних сообществ создавалась разными экологическими группами: в бентосе – типичными донными личинками *p.Chironomus*, в перифитоне – минерами древесины (*p.Glyptotendipes*, *p. Endochironomus*). В дальнейшем сукцессионный процесс дивергировал. В перифитоне олигомиксная «хирономидная» стадия сравнительно быстро сменилась олигомиксной «дрейсеновой». В бентосе этот моллюск встречался только на локальных участках. Относительная стабилизация в перифитоне наблюдалась примерно в середине 80-х гг., когда в водохранилищах завершилось расселение губок и мшанок – истинных обрастателей и сообщества приобрели полимиксный характер. В настоящий момент в водохранилищах Верхней Волги сформировался собственный перифитон, водоемы "осеменены" зачатками перифитонных форм в виде геммул, статобластов, коконов, а также обитают

эвритопные беспозвоночные с многолетним жизненным циклом. К этому времени в обрастаниях были обнаружены почти все представители крупных систематических групп перифитона пресных вод.

Формирование бентоса произошло гораздо быстрее, хотя полное насыщение пространственной ниши дна водоемов практически недостижимо. Процесс обогащения фауны продолжается и в основном за счет вселенцев из южных водоемов. В бентосе прогрессирующие группы, увеличивающие свою значимость – это гипания, моллюски сферииды (не живут в обрастаниях), личинки хирономид, дрейссена, олигохеты. С течением времени во многих водохранилищах в бентосе увеличивается доля олигохет, относящихся к сем. Tubificidae. В зонах загрязнения легкоусвояемыми органическими веществами в перифитоне тоже в массе развиваются олигохеты, но другого сем. Naididae. При разнице в биотопической приуроченности они выполняют одну и ту же функциональную нагрузку – утилизируют избыток питательных веществ на рост и размножение. В ряде случаев быстрое возрастание биомассы бентоса связано с успешной акклиматизацией кормовых беспозвоночных, например, во многих южных водоемах, где особо подходящие условия для существования организмов понто-каспийского комплекса.

Современные синхронные исследования двух эволюционно близких, но пространственно разделенных толщей воды экологических группировок гидробионтов зооперифитона и зообентоса на обширной акватории водохранилищ Верхней Волги показали их резкие различия по составу доминирующих комплексов [15]. К современным массовым видам, создающим ядро зооперифитона, относятся губки *Spongilla lacustris* L., *S. fragilis* Leidy, *Ephydatia mulleri* (Lieb.), мшанки *Plumatella fungosa* (Pall.), *P. emarginata* Allm., *Hyalinella punctata* (Hanc.) и др., личинки хирономид *Cricotopus intersectus* (Staeg.), *C. gr. silvestris* F., олигохета *Nais barbata* Mull., моллюск *Dreissena polymorpha* (Pall.).

В бентосе по численности доминируют олигохеты-тубифициды *Limnodrilus hoffmeisteri* Clap., *Potamothrix hammoniensis* (Mich.), *P. moldaviensis* Vejd., *Tubifex newaensis* (Mich.), личинки хирономид *Procladius choreus* Meig., *Chironomus plumosus* L. Доминирование дрейссены локально. Из всего состава лидирующих гидробионтов общими для перифитона и бентоса оказались три вида (7%) – личинки хирономид *Glyptotendipes glaucus* Mg., байкальский бокоплав *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) и моллюск *Dreissena polymorpha* (Pall.). Несмотря на присутствие в бентосе и перифитоне ряда общих эвритопных видов эти эволюционно близкие экологические группировки гидробионтов по многим характеристикам экологически автономны.

Потенциал пространственных ниш для перифитона в виде возможного количества погруженных в воду твердых субстратов фактически никогда полностью не реализуется, т.е. это уникальное сообщество, роль которого в водоеме может регулироваться не только природой, но и человеком. Пространственная ниша бентоса связана с площадью дна водоема, она всегда в той или иной степени заполнена в соответствии с конкретными экологическими условиями.

Историческая общность перифитона и бентоса при довольно значительных различиях по видовому составу находит отражение в сходной трофической структуре и трофических уровнях данных сообществ [16]. В них присутствуют беспозвоночные с фильтрационным типом питания, детрито- и альгофаги, хищники. На конкретных участках водоемов при низком сходстве таксономического состава величины их видового разнообразия очень близки, но показатели трофического разнообразия различались. Наибольшее число видов перифитона (без учета колониальных беспозвоночных - губок и мшанок) относилось к трофической группе детритофагов-собирателей, а бентоса – детритофагов-глотателей. По численности в перифитоне преобладали всеядные собиратели + хвататели и детритофаги-глотатели, а в бентосе свыше поло-

вины особей принадлежало к детритофагам- глотателям. Самыми малочисленными были хищники. При сходных способах добывания пищи перифитонными и донными беспозвоночными они занимают различные трофические ниши и чаще всего прямые конкурентные отношения за пищу между ними отсутствуют, что позволяет им полнее использовать ресурсы среды. При наличии большого количества твердых субстратов в толще воды возможен перехват зооперифитоном пищевого материала в виде водорослей и детрита, что существенно может уменьшить объем оседающего на дно пищевого материала, частично восполняемого потоком пеллет беспозвоночных-обрастателей. Особенно заметное влияние такого рода оказывает дрейссена.

Различия между источниками пищи зооперифитона и зообентоса хорошо заметны на самых низших трофических уровнях. Мирные зооперифитонные организмы потребляют фитопланктон и детрит толщи воды, а также фитоперифитон и детрит, накапливающийся на субстратах. Небольшое число обрастателей использует в пищу мягкие ткани водных растений. Бентосные животные потребляют питательный материал грунтов, а также фитопланктон и детрит придонных слоев воды. Остальные трофические уровни, имеющие неменьшее значение в жизнедеятельности перифитонных и донных сообществ, характеризуются наибольшим сходством, но реализуются они в масштабах разных трофических ниш. В наименее подверженных антропогенному загрязнению участках водохранилищ Верхней Волги в перифитоне доминируют истинные беспозвоночные-обрастатели с фильтрационным типом питания – губки и мшанки, личинки хирономид – *Glyptotendipes glaucus* Mg., *Endochironomus albipennis* Mg., дрейссена. В антропогенно нарушенных зонах беспозвоночные-фильтраторы исчезают и замещаются собирателями пищевого материала на субстратах – альго-, детритофагами и хищниками, среди которых личинки хирономид *Cricotopus intersectus* (Staeg.), *C. gr. silvestris* F., олигохеты – *Nais barbata*

Mull., *N. variabilis* Piguet., *Dero obtusa* Udek., нематоды – *Diplogaster rivalis* (Leyd.), *Tobrilus helveticus* (Hofm.), *Plectus cirratus* (Bast.) и др. Адаптивные возможности к использованию пищевых ресурсов в зонах загрязнения выше у донных организмов по сравнению с беспозвоночными-обрастателями, что указывает на большую экологическую пластичность бентоса по сравнению с перифитоном. Смена трофической структуры зооперифитона в загрязненных зонах свидетельствует о высокой чувствительности типичных обрастателей к антропогенному воздействию, в результате чего создается потенциальная угроза вымирания древней специфической биотопической группировки сессильных беспозвоночных и экспансии на освободившиеся пространственные ниши твердых субстратов толщи воды эвритопных и бентосных беспозвоночных.

Озера. Сравнительный анализ структуры сообществ макрозообентоса, зоофитоса и зооперифитона 5 слабоминерализованных озер Дарвинского заповедника, подвергающихся антропогенному закислению, показал, что в каждом озере наиболее высокое разнообразие таксонов отмечено на макрофитах, которое в 2-4 раза превосходило таковое на других субстратах [17]. Общее количество таксонов перифитона и бентоса в озерах снижается в направлении: нейтральное эвтрофное > кислотное дистрофное > кислотное олиготрофное озеро. Из всего состава беспозвоночных эврибионтные виды, которые встречались бы в исследованных озерах на разных типах субстратов не обнаружено, однако можно выделить ряд видов, которые встречены во всех водоемах, но на разных биотопах. К числу наиболее распространенных видов относятся: нематода *Prismatolaimus dolichurus* de Man, олигохеты – *Stylaria lacustris* (L.), *Chaetogaster diaphanus* (Gruit.), *Ch. langi* Bret., *Nais pseudobtusa* Piguet, *Vejdovskella comata* Vejd., личинки ручейников – *Cyrtus flavidus* McL., *Phryganea bipunctata* Retz., *Limnophilus politus* McL., личинки хирономид – *Chironomus plumosus* L., *Endochironomus tendens* Fabr., *Tanytarsus* gr. *gregarius* Kieff., *Cladotanytarsus* gr. *mancus*

v.d.Wulp., *Procladius ferrugineus* (K.), *Cricotopus gr. silvestris* (F.), *Parakiefferiella bathophila* Kieff., *Corynoneura scutellata* Winn., личинки мокрецов – *Palpomyia lineata* (Meig.), *Bezzia xantocephala* Goetgh., личинка хаоборин – *Chaoborus crystallinus* De Geer. Широкие биологические возможности наиболее представленных групп водных насекомых и олигохет способствуют формированию разнообразных специализированных групп, способных адаптироваться к экстремальным условиям среды. Особенно заметны эти тенденции при выделении доминирующих комплексов беспозвоночных в нейтральных и кислых озерах на разных субстратах. Среди самого богатого видами семейства хирономид наибольшую эврибионтность проявляли бентосные личинки *Chironomus plumosus*, *Procladius ferrugineus* и эвритопные личинки *Cricotopus gr. silvestris*. Значительно больше число доминантов, предпочитавших нейтральные озера – *Glyptotendipes glaucus*, *G. paripes*, *G. gripekoveni*, *Cricotopus intersectus*, *Endochironomus albipennis*, *Limnochironomus gr. tritonus*, *Polypedilum nubeculosum*, *Corynoneura scutellata*, *C. celeripes*. Только в кислых озерах доминировали личинки хирономид *Tanytarsus gr. gregarius*, *Pagastiella orophila*, *Procladius choreus*, *Psectrocladius simulans*, *P.sp.* Из четырех доминирующих видов нематод *Ironus ignavus* Bast. оказался ацидофильным видом. Он обнаружен только в закисленных озерах и отсутствовал в нейтральных. Другой доминант – *Panagrolaimus rigidus* (Schn.) приурочен к мезотрофному высокоцветному олигокислотному оз. Кривое. Два других вида – *Trypila glomerans* и *Prismatolaimus dolichurus* лидировали во всех типах озер. Среди олигохет аналогичным образом можно выделить три группы – ацидофильные, ацидофобные и эврибионтные. К первой группе тяготели черви *Chaetogaster langi*, *Vejdovskiiella comata*, *Aelosoma niveum*, ко второй – *Nais variabilis*. Такие виды как *Stylaria lacustris*, *Ripistes parasita*, *Nais pseudobtusa*, *N. communis*, *N. barbata*, *N. simplex*, *Tubifex tubifex* доминировали только в эвтрофном нейтральном оз.

Хотавец. При высоком видовом разнообразии моллюсков формирования разных экологических групп среди них не отмечено. Они встречались только в нейтральных озерах. По всей вероятности, основным фактором, ограничивающим их развитие, оказалось не только низкие значения pH озер, но и низкая минерализация воды. Среди групп беспозвоночных, представленных небольшим числом видов, такого разнообразия экологических групп не наблюдалось.

Сравнение доминантного состава фауны перифитона на различных субстратах и всего бентоса в каждом из озер показывает его значительное различие. Общих видов для перифитона и бентоса мало: в нейтральных озерах Хотавец (3,2%) и Кривое (6,6%), соответственно это олигохеты *Chaetogaster diaphanus* и *Nais variabilis*; в кислотном оз. Дубровское (4,0%) – личинки ручейников *Cyrtus flavidus*, личинки хирономид *Tanytarsus gr. gregarius*, оз. Мотыкино (11,1%) – *Cyrtus flavidus*, *Procladius ferrugineus*. В оз. Змеиное общих доминирующих видов не отмечено.

В целом, высокое разнообразие фауны на водных растениях свойственное всем исследованным озерам, по всей вероятности связано с тем, что среди макрофитов формируется специфический, более «мягкий» гидрохимический и гидрологический режим за счет их метаболизма, защиты от разрушающего действия волн, наличия пищевого материала, убежищ для беспозвоночных. Сокращение или исчезновение водных растений в закисленных озерах – одна из причин обеднения их фауны.

Малые реки. Это самый многочисленный и наименее изученный класс водных объектов, которые нередко подвергаются неконтролируемому антропогенному загрязнению, а в последние годы и активному заселению бобрами. В результате суммарного влияния человека и крупных позвоночных на очень малых реках, протяженностью менее 50 километров, радикально изменяется гидрологический, гидрохимический режим, соответственно могут происходить значительные пе-

рестройки всех звеньев речной флоры и фауны. К числу таких водных объектов относится малая р. Латка – приток Рыбинского водохранилища. Гидробиологические исследования реки в 1996 г. не выявили бобровых поселений, но уже к 2003 г. в ее верхнем и среднем течении насчитывалось более десятка бобровых плотин, в результате чего этот район превратился в систему прудов, между которыми разной протяженности оставались не зарегулированные участки. Река стала более полноводной. В 2003 г. отмечены изменения в составе и встречаемости преобладающих видов [12, 14]. Наиболее распространенные доминанты 1996 г. – личинки хирономид *Micropsectra praecox*, *Tanytarsus usmaensis*, личинки ручейников *Pothamophylax stellatus*, живущие в ручьях, речках, нередко с ключевым питанием, и личинки мошек *Simulium sp.* в 2003 г. не вошли в состав лидеров. Их сменили олигохеты *Stylaria lacustris*, молодь разных видов хирономид и личинки *Paratanytarsus confusus*. Рассматривая структуру зооперифитона реки по каскадному принципу – от истоков до низовьев, тенденции постепенного увеличения разнообразия зооперифитона не наблюдается, что в большей мере связано с высокой мозаичностью микробиотопов со специфическими, иногда экстремальными условиями обитания для беспозвоночных.

Самое низкое видовое разнообразие зооперифитона зарегистрировано на фоновой мелководной станции, что не является показателем загрязнения реки на данном участке. Причина бедности фауны заключается в малой водности биотопа. Глубина реки в межень при слабой проточности составляет всего 12-15 см. В данном случае в качестве экстремального фактора выступает мелководность, с которой связаны другие важные для беспозвоночных факторы среды, такие как ограниченное жизненное пространство, высокая освещенность, неблагоприятная для животных с отрицательным фототаксисом, отсутствие макрофитов, недостаток убежищ и пищи. Листовой опад, который попадает в реку осенью, смывается весенним половодьем и дождевыми паводками. В свя-

зи с этим мы можем говорить о таком понятии как экстремальная глубина местообитания. В процессе эволюции беспозвоночные выработали ряд адаптаций к снижению водности – смена биотопа активными перемещениями или всплывание в толщу воды, зарывание в грунт и т.д.

Под влиянием поселений бобров в верхнем и среднем течении р. появляются различной протяженности участки со слабопроточной водой, более высокой, чем исходная, температурой, глубиной, минерализацией. При дальнейшем сокращении зон обитания реофильных видов произойдет их замена эврибионтными или специфичными для нарушенных зон беспозвоночными, к числу которых принадлежат личинки хирономид, олигохеты, нематоды. Такие изменения станут возможными при полном зарегулировании реки бобровыми плотинами и превращении ее в непрерывную систему прудов. Положительная сторона бобровых поселений заключается в увеличении водности реки, усилении процессов самоочищения в зонах прямого антропогенного воздействия.

Синхронные исследования зооперифитона и зообентоса малых рек Латка (Ярославская обл.) и Сестра (Московская обл.) показали, что в отличие от крупных водоемов, где твердые субстраты могут находиться на любом расстоянии от дна, особенностью обитания перифитона и бентоса малых водотоков служит максимальное сближение пространственных ниш этих группировок гидробионтов. Однако, несмотря на возможность тесных контактов между обитателями дна и твердых субстратов толщи воды эти сообщества так же, как и в крупных водоемах (водохранилищах, озерах) в основном сохраняют таксономическую и функциональную обособленность [14, 18]. Различия в составе перифитона и бентоса р. Латка хорошо заметны, в первую очередь, по составу олигохет и моллюсков. В перифитоне живут главным образом представители сем. Naididae и сем. Limnaeidae, а в бентосе – сем. Tubificidae и сем. Pisidiidae. Соответственно и структура доминирующих комплексов различна. При незначительном

отличии средней численности зооперифитона и зообентоса (соответственно 2700 и 2200 экз./м²) биомасса донных беспозвоночных превосходила таковую обрастателей на порядок (соответственно 17.0 и 1.7 г/м²), т.е. бентосные организмы значительно крупнее перифитонных. При сравнении с верхневолжскими водохранилищами биомасса зооперифитона в р. Латка весьма низка, т.к. условия для развития беспозвоночных, дающих высокую биомассу в крупных водоемах (главным образом дрейссены и мшанок) неблагоприятны. Однако таксономическое разнообразие зооперифитона реки не уступает таковому водохранилищ. Ранжировка по средней биомассе показала, что на первом месте и в перифитоне и в бентосе оказался подвижный крупный хищник - пиявка *Erpobdella octoculata* (соответственно 28,6 и 26,7%). Тесное сближение пространственных ниш этих группировок гидробионтов способствует биологической активности эвритопных беспозвоночных.

Поступление неочищенных стоков маслозавода в р. Латка вызывает резкое падение видового разнообразия, снижение биомассы бентосных организмов, а в перифитоне - смену доминирующих видов и увеличение биомассы за счет беспозвоночных, не свойственных для данной биотопической группировки. Сходное воздействие оказывает строительная деятельность бобров - на дне бобрового пруда недостаток кислорода негативно сказывается на гидробионтах.

Гидробиологические исследования на другой малой реке Сестра показали, что бентос представлен в основном личинками водных насекомых, наибольшее число их принадлежит личинкам комаров сем. Chironomidae. К самым массовым относятся представители рода Chironomus. Малощетинковые черви Oligochaeta имеют 100% встречаемость, они представлены видами подсемейства Tubificidae, на участках с заметным течением доминировал вид *Tubifex newaensis* (Mich.), а в застойной зоне - *Limnodrilus hoffmeisteri* Clap. Максимальная численность бентоса 15200 экз./м² отмечена в верховьях р.

Сестра на ст. 2, причем 84.2% численности давали олигохеты-тубифициды, остальное – хирономиды. Максимальная биомасса бентоса (116 г/м²) наблюдалась на ст. 10 в р. Яхроме на заиленном глинистом грунте, олигохеты составляли 77.6% биомассы [4, 18].

Состав зооперифитона гораздо богаче и таксономически иной. Как и в бентосе по числу таксоном лидируют личинки хирономид, олигохеты представлены видами сем. Naididae. Из личинок хирономид самыми распространенными оказались *Corynoneura scutellata* Winn. и *Dicrotendipes nervosus* Staeg. Среди олигохет по частоте встречаемости лидировали *Nais pardalis* Piguet., *Stylaria lacustris* L. а из нематод – *Tobrilus helveticus* (Hofm.). В зооперифитоне наибольшее число видов и максимальная численность (21800 экз/м²) отмечены в низовьях реки, где преобладали личинки хирономид *Polypedilum sordens* (V.D.Wulp.), *Glyptotendipes glaucus*, *Dicrotendipes nervosus* и др. Однако максимальная биомасса (16,2 г/м²) зарегистрирована на загрязненной ст.8. Доминировали бентосные личинки хирономид *Chironomus gr. piger* (73,5% численности и 99,2% биомассы), которые нетипичны для обрастаний. Из нематод преобладали полисапробные черви *Paraigolaimella bernensis* (14,4% численности). Перифитонные беспозвоночные отсутствовали, и свободные пространственные ниши твердых субстратов захватывали типично бентосные личинки *Chironomus gr. piger*. Аналогичные данные получены для зон наибольшего загрязнения стоками сырзавода в р. Латка, где массовым компонентом обрастаний становились полисапробные личинки *Chironomus gr. piger*. В данном случае оптимальная обеспеченность пищей бентосных личинок перекрывает влияние других экологических факторов. Для перифитона с более чувствительным к загрязнению таксономическим составом в таких условиях создавался экологический пессимум.

Следовательно, наибольшую устойчивость к загрязнению проявляют бентосные организмы, способные в условиях

перенаселенности к захвату не свойственных им пространственных ниш - находящихся в толще воды и контактирующих с дном твердых субстратов. Фактор обеспеченности пищей беспозвоночных, который измерить чрезвычайно трудно, нередко перекрывает влияние многих естественных параметров среды, а также и загрязнений. Так, например, обнаруженная положительная корреляция между бентосом и содержанием в грунтах тяжелых металлов не является причинной зависимостью, а объясняется тем, что илистые грунты, интенсивно аккумулирующие загрязняющие вещества, наиболее привлекательны и для бентоса [2, 5].

Мониторинг. Вода и грунт – разные субстраты, разные компоненты экосистемы водоема, их качество взаимосвязано, но не жестко, не однозначно. Если зоо-, фито-, бактериопланктон и перифитон обитают в воде, и их характеристики отражают качество воды непосредственно, то характеристики бентоса – лишь опосредованно, они показывают загрязненность грунтов.

Как в России, так и за рубежом бентос является незаменимым и важным компонентом системы мониторинга водоемов разных типов, чему способствует наличие огромного количества (свыше шестидесяти) различных методик. Поскольку существуют разные виды загрязнения, то нет универсального метода, пригодного для всех возможных в водоеме ситуаций. В последние десятилетия перифитон стал также интенсивно использоваться для целей мониторинга, чему, несомненно, способствовало и то, что многие методики, применявшиеся первоначально для бентоса, оказались пригодными и для перифитона. В первую очередь это касается индекса сапробности по Пантле-Букку в модификации Сладечека [8, 9, 11].

Согласно биотической концепции контроля среды, оценки экологического состояния должны проводиться по комплексу биотических показателей, но не по уровням абиотических факторов. Большинство бентосных показателей достоверно связаны с характеристиками биотопа - глубиной,

скоростью течения и физическими параметрами грунта [2, 5, 6, 19]. Особенно сильно бентос связан с гранулометрическим составом грунта: чем выше доля крупнозернистой фракции, тем беднее бентос в количественном и качественном отношении, тем хуже его общее состояние и тем слабее в нем накапливаются загрязняющие вещества. В новейшей системе оценки качества грунтов проводится по четырем показателям: общей численности бактерий, численности сапрофитных бактерий, тубифицидному индексу и индексу Шеннона, рассчитанному по численности отдельных видов зообентоса. Один из подходов к оценке качества состоит в оценке близости реального наблюдаемого сообщества к стандарту - сообществу, репрезентативному для экосистем данного типа. В качестве такого стандарта использованы средние за 1992-2001 годы характеристики сообществ зообентоса Иваньковского, Угличского, Рыбинского и Горьковского водохранилищ: численность организмов $N = 3700$ экз./м², их биомасса $B = 15$ г/м², число видов в пробе с площадью 250 см² $S = 6.7$, видовое разнообразие, рассчитанное по формуле Шеннона с использованием данных по численности отдельных видов $H = 1.8$ бит/экз., тубифицидный индекс $ТИ = 54\%$, средняя сапробность $СС = 3$ [3]. Поскольку эти средние величины на водоемах иного типа и в иных регионах будут различаться, то можно говорить о регионально-типологических нормативах (РТН), в данном случае - это РТН зообентоса верхневолжских водохранилищ. Значения отдельных показателей на каждой станции могут быть выражены в процентах от соответствующих РТН. Затем вычисляются «комбинированный индекс состояния сообществ зообентоса» (КИСС) и «комбинированный индекс загрязнения по зообентосу» (КИЗ). $КИСС = (N + 2B + S + H) / 5$, $КИЗ = (B + ТИ + 2СС) / 4$ [1]. Стандартные значения этих индексов равны 100%. Чем выше значение КИСС, тем лучше состояние сообщества бентоса (он богаче в количественном отношении и разнообразнее), чем больше КИЗ, тем сильнее загрязнены грунты. На основании вычисле-

ния этих индексов предложена двухпараметрическая классификация грунтов. Состояние зообентоса на станциях, КИСС которых лежит в пределах 54-146, считается удовлетворительным, КИСС > 146 – хорошим, КИСС < 54 – плохим. Если КИЗ находится в границах 75-125, то загрязненность грунтов средняя, КИЗ > 125 – сильная, КИЗ < 75 – слабая. В результате образуется девять классов качества грунта. В исследованных водохранилищах 45.8% станций относятся к V классу, характеризующемуся удовлетворительным состоянием зообентоса при средней загрязненности грунтов. Интересно отметить отсутствие станций, грунт которых принадлежит к I (хорошее состояние бентоса при слабом загрязнении) и IX классам (плохое состояние бентоса при сильном загрязнении).

При оценке экологического состояния верхней Волги по зооперифитону (1992-1997 гг.) на основании ряда критериев было выделено три уровня качества водной среды: экологическое благополучие, удовлетворительное и неудовлетворительное состояние. Последний уровень по характеру и силе антропогенного воздействия разделен на несколько типов [8]. Результаты исследований показали, что экологическая обстановка на верхней Волге подвергалась значительным изменениям, которые обуславливались не только степенью антропогенного воздействия, но и зависела от ежегодных колебаний климатических факторов (уровенный и температурный режим, характер и объем поверхностного стока). Участки с почти постоянно высоким уровнем загрязнения располагались вблизи крупных городов и поселков. Большая часть акватории находилась в зоне с постоянно меняющимся уровнем загрязнения, иногда с резким ухудшением качества водной среды, которое может совпадать не только с изменениями объемов поступающих сточных вод, но и неблагоприятными климатическими факторами. В целом, высокий уровенный режим, сформированный паводковыми водами и сохраняющийся длительное время, в сочетании с низким поверхностным стоком и высоким прогре-

вом воды в летний период способствовали снижению уровней загрязнения в Верхне-Волжском регионе.

Оценка загрязненности малых рек значительно сложнее, чем в крупных озерах и водохранилищах. Это объясняется значительно большей гетерогенностью биотопов, наличием резких градиентов физико-химических факторов. Высокая вариабельность всех характеристик в пространстве и времени предъявляет повышенные требования к репрезентативности и объему собираемого материала. Оценки состояния р. Сестра по материалам 2000 г., полученные с помощью индекса загрязнения среды по химическим показателям, индексу сапробности по зоопланктону и средней сапробности по зообентосу и зооперифитону показали, что хотя они и различаются, но наблюдается определенная синхронность их колебаний, поэтому их целесообразно объединить в единый комплексный ранговый индекс загрязнения (КРИЗ). Для этого величины отдельных показателей переводятся в ранги от 1 до 16 по мере увеличения степени загрязнения. Результирующий показатель находится по формуле: $\text{КРИЗ} = (\text{ИЗВ} + \text{Ббак} + \text{ИС} + \text{КИЗ} + \text{ССпф})/5$ Если, как принято в статистике, от среднего значения показателя КРИЗ отложить влево и вправо значения 0.67σ (где σ – среднеквадратичное отклонение) то состояние среды на станциях, попавших в этот интервал 5.6-9.2 (интервал статистической нормы), можно считать удовлетворительным (ст.3,5,7,9,11, 13-15), ниже этого интервала – хорошим (ст.1,5,10), выше этого интервала – плохим (ст.6,8,12) [4, 18]. Результат более оптимистичный, чем дает оценка только по бентосу, но это не удивительно, грунты обычно бывают более загрязнены, чем вода. Следует иметь в виду, что характеристики бентоса показывают состояние донного населения, зависящее, главным образом, от параметров грунта и отчасти придонного слоя воды. Перифитон же характеризует состояние толщи воды, в которой размещается субстрат, с которого собран соответствующий материал. Эти методы взаимно дополняют друг друга.

Оценка корреляций между уровнем развития зооценозов с отдельными факторами, например со скоростью течения, затрагивает только количественную сторону этих изменений, но не качественную. Например, в перифитоне малых рек на проточных участках, как правило, доминируют реофильные виды, отсутствующие на «тиховодье», хотя количественные характеристики зооценозов на этих участках могут быть сходными. Фактор глубины исследуемых участков также может перекрывать влияние антропогенного воздействия. В связи с этим непреходящую ценность в исследованиях уровней загрязнения реки по состоянию различных сообществ представляют сапробиотические показатели, характеризующие качественную сторону состояния зооценозов - способность организмов обитать в загрязненной среде. Среди беспозвоночных перифитона и бентоса наиболее перспективными в этом плане могут быть круглые черви - нематоды, характеризующиеся высоким разнообразием экологических групп, обитающие в широком диапазоне содержания кислорода и при его отсутствии. Например, в перифитоне р. Сестра обнаружено 24 вида нематод. По видовому разнообразию эта группа занимает 2-е место после личинок хирономид. Среди них обнаружены явные сапробиотические виды *Pelodera punctata* и *Paraigolaimella bernensis*, обитающие на разлагающейся органике, а также сапробиотический хищник *Diplogaster rivalis*. Обычно эти виды живут в загрязненных водоемах. Нередко в зонах сильного загрязнения при исчезновении многих обитателей чистых вод, нематоды доминируют или остаются почти единственными представителями фауны.

Заключение. Результаты исследований позволяют сделать вывод о глубокой экологической дифференциации перифитона и бентоса водохранилищ, озер, малых рек, обусловленной длительной адаптацией гидробионтов к разным пространственным нишам - твердым субстратам толщи воды и дну водоемов. Функционально сообщества обрастаний связаны с пелагиалью, а бентосные - с грунтами и придонными

слоями воды. Наибольшее сходство путей формирования этих группировок беспозвоночных в водохранилищах наблюдалось на первоначальных этапах, хотя доминантная и трофическая структуры сообществ создавалась разными таксонами.

Наиболее чувствительными к бытовым и токсическим стокам оказались перифитонные организмы. В зонах сильного загрязнения типичные обрастатели исчезают, и свободные пространственные ниши занимают полисапробные бентосные организмы. При использовании различных количественных показателей состояния сообществ для оценки экологического состояния водоемов, необходимо учитывать влияние естественных экстремальных факторов, которые могут сильно искажать результаты исследований. Обосновывается необходимость совместного использования бентоса и перифитона при мониторинге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

- [1] Баканов А.И. Использование комбинированных индексов для мониторинга пресноводных водоемов // Водные ресурсы. 1999. Т. 26, № 1. С. 108-111.
- [2] Баканов А.И. Современное состояние зообентоса верхневолжских водохранилищ // Водные ресурсы. 2003. Т. 30, № 5. С. 605-615.
- [3] Баканов А.И. Регионально-типологические и биотопические нормативы как основа мониторинга и оценки качества грунтов пресноводных водоемов // Экологические проблемы бассейнов крупных рек -3. Тольятти: ИЭВБ РАН. 2003. С. 23.
- [4] Баканов А.И. Бентос малой реки Сестра (Московская обл.) и влияние на него антропогенной нагрузки // Биология внутр. вод. 2006, № 3. С. 65-72.
- [5] Баканов А.И. Оценка качества донных отложений по зообентосу // В кн.: Современное состояние экосистемы Шекснинского водохранилища. Гл.7. ИБВВ РАН: Ярославль. 2002. С.304-308.
- [6] Баканов А.И., Флеров Б.А. Состояние сообществ донных организмов Верхней Волги // Гидроб. ж., 1998. Т.34, № 2. С. 38-45.
- [7] Баканов А.И., Скальская И.А., Флеров Б.А. Особенности первоначального формирования группировок бентоса и перифитона в водохранилищах Верхней Волги// Гидроб. ж. 2003. Т.39, №6. С.25-33.
- [8] Скальская И.А., Флеров Б.А. Оценка экологического состояния Верхней Волги (территория Ярославской обл.) по зооперифитону // Экология, 1999, № 6. С. 442-448.

- [9] Скальская И.А., Флеров Б.А. Мониторинг водоемов по зооперифитону с учетом экологических факторов разной пространственной значимости // Тез. докл. конф. "Современные проблемы водной токсикологии", 19-21 ноября 2002 г., Борок, 2002, С.153-154.
- [10] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Концептуальные и методические проблемы совместного изучения перифитона и бентоса // Биология внутренних вод, 2003. № 4. С. 3-9.
- [11] Скальская И.А., Баканов А.И. Сравнение результатов мониторинга водохранилищ по зооперифитону и зообентосу // Тез. докл. конф. "Перифитон континентальных вод: современное состояние и перспективы дальнейших исследований", 4-6 февраля 2003 г., Тюмень. С. 102-103.
- [12] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Сравнительный анализ зооперифитона и зообентоса реки Латка // Тез. конф. "Экосистемы малых рек: биоразнообразие, экология, охрана". ИБВВ РАН. Борок. 2004. С.78-79.
- [13] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Закономерности процесса формирования перифитонных и бентосных сообществ (обзор) // Биология внутр. вод. 2005, № 1. С. 3-10.
- [14] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Структура зооперифитона и зообентоса реки Латка (бассейн Рыбинского водохранилища) // Биологические ресурсы пресных вод: беспозвоночные. ИБВВ РАН. 2005. Рыбинск. С. 328-346.
- [15] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Структура доминирующих комплексов зооперифитона и зообентоса верхневолжских водохранилищ // Биология внутр. вод. 2006, № 1. С. 85-92.
- [16] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Сравнение трофической структуры сообществ зооперифитона и зообентоса верхневолжских водохранилищ // Биология внутр. вод. 2006, № 2. С. 75-82.
- [17] Скальская И.А., Жгарева Н.Н. Сравнительный анализ структуры зооперифитона и зообентоса слабоминерализованных озер Дарвинского заповедника // Биология внутр. вод. 2007. №1. С.106-113.
- [18] Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Зооперифитон и зообентос малой реки Сестра (Московская обл.) и влияние на них антропогенной нагрузки // Биология внутр. вод. 2007. №3. (в печати).
- [19] Флеров Б.А., Томилина И.И., Кливленд Л., Баканов А.И., Гапеева М.В. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод, 2000, № 2. С. 148-155.
- [20] Экологические проблемы Верхней Волги // ИБВВ РАН. Ярославль. 427с.

**Программа и курс лекций по теме:
«БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ»
Экономический прогресс и экологическая деградация
планеты. Причины эколого-экономического кризиса на
примере состояния водных ресурсов.¹**

© 2007 г. **Б.А. Флеров**

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

**АННОТАЦИЯ
к программе курса “Биологические последствия загряз-
нения”**

Программа включает комплекс сведений о биологических последствиях загрязнения как необходимый элемент экологического образования в университетах. Акцент делается на получении студентами знаний о негативном действии приоритетных загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов.

Известно, что водная среда является наиболее чувствительным звеном биосферы. Запас пресной воды составляет всего 2-3% от ее общего объема на Земле. Если учесть, что 70% пресной воды законсервировано в ледниках и снежном покрове, а 30% находится под землей, то оставшиеся 100 тыс. км³ - небольшая величина наиважнейшего природного ресурса. Поэтому знания о состоянии водных экосистем при постоянно увеличивающемся антропогенном воздействии, сохранении их нормального функционирования, а также охране от дальнейшего загрязнения являются основополагающими в системе экологического образования.

Цель курса - получение углубленных знаний о биологических последствиях загрязнения окружающей среды.

¹ Лекции прочитаны в Международном Университете природы, общества и человека «Дубна» (г. Дубна) в период 2000-2004гг.

Основные задачи:

- дать целостное представление об экологической деградации планеты, детально - о деградации водных ресурсов водных экосистем РФ;
- ознакомить студентов с проблемой загрязнения, обратить специальное внимание на наиболее опасные виды загрязнения биологических ресурсов, критерии определения их вредного воздействия;
- кратко изложить основы водной токсикологии как дисциплины, исследующей токсические свойства водной среды для гидробионтов всех уровней организации и научно обосновывающей защиту водных экосистем от загрязнения;
- дать детальное представление о структурно-функциональной трансформации водных экосистем в условиях загрязнения, ознакомить с проблемой адаптации гидробионтов к токсическим веществам;
- изложить принципы нормирования загрязняющих веществ и организацию экологического контроля за природными и сточными водами.

Программа курса **Биологические последствия загрязнения (8 час)**

Введение (1 час)

Экономический прогресс и экологическая деградация планеты. Причины эколого-экономического кризиса на примере состояния водных ресурсов.

Раздел 1. Проблема загрязнения (2 часа)

Понятие загрязнения. Категории загрязнений. Приоритетные загрязняющие вещества. Биоаккумуляция. Токсичность: острая и хроническая. Критерии токсичности. Сравнительная чувствительность и устойчивость гидробионтов к загрязняющим веществам

Раздел 2. Биотестирование и биоиндикация загрязнения (2 часа)

Терминология, основные задачи, возможности и ограничения биотестирования и биоиндикации. Области применения. Биотестирование природных вод и донных отложений

Раздел 3. Влияние загрязняющих веществ на экосистемы водоемов (2 часа)

Структурно-функциональная трансформация водных экосистем в условиях загрязнения. Последствия загрязнения и адаптивные возможности гидробионтов к токсическим веществам.

Раздел 4. Нормирование загрязняющих веществ и экологический контроль (1 час)

Принципы нормирования содержания загрязняющих веществ в сточных водах. Организация экотоксикологического контроля природных и сточных вод. Нормативные документы, регламентирующие экотоксикологический контроль.

ЛЕКЦИИ

Введение

Экономический прогресс человечества обусловлен научно-технической революцией (НТР), когда успехи естественных наук привели к коренному усовершенствованию механизмов, машин, технологических процессов, стимулировав тем самым более интенсивное и разнообразное использование человеком минеральных, сырьевых, почвенных, водных ресурсов биосферы. Начало НТР принято относить ко 2-й половине XX века. Начиная с этого времени, резко усилилось воздействие человека на природу в целом, но, прежде всего, на природные ресурсы.

Я приведу лишь один факт, ярко свидетельствующий о тотальном экономическом прогрессе: на планете в целом к середине 90-х годов производимый валовый продукт по сравнению с серединой XX века увеличился в 5 раз. Мировое сельское хозяйство, за исключением России, развивалось рекордными темпами. Высокий уровень спроса на продукты питания, обусловленный ростом численности населения и повышением его благосостояния, способствовал увеличению производства зерна в 2.6 раза. **Ни одно поколение людей не видело ничего подобного.**

Но эти успехи не повод для торжества. Приведенные цифры - преувеличенная оценка экономического прогресса. Она иллюзорна. Система подсчетов не учитывает истощения природных ресурсов. За последние 50 лет человечество потеряло более 20 % плодородного почвенного слоя на пахотных землях и столько же влажных тропических лесов, а также десятки тысяч различных видов растений и животных,

«Нет худа без добра» и, наоборот, добра не бывает без плохого. Обратной стороной НТР и связанного с ней экономического прогресса является возникновение серьезной экологической проблемы: **ухудшения качества окружающей среды** вследствие загрязнения атмосферы, гидросферы, почвы и биосферы промышленными, сельскохозяйственными и коммунально-бытовыми отходами. Загрязнение происходит настоль-

ко быстро и интенсивно, что, начиная с последней четверти уходящего столетия, можно утверждать: все человечество вступило в эпоху глубокого экологического кризиса, который проявляется в разных странах и регионах по-разному.

Кризис носит комплексный характер и обусловлен нарушением равновесия между обществом и природой. Проявляется он, с одной стороны, в деградации окружающей природной среды, с другой - в неспособности государственных структур выйти из создавшегося положения. Истоки кризиса связаны с истощением природных ресурсов (особенно водных), с опасным загрязнением окружающей среды, ухудшением здоровья людей, деградацией национально-этнических групп населения.

Подавляющее большинство стран мира (в том числе и Россия) обладают “грязной”, ресурсорасточительной экономикой, основанной на экстенсивной эксплуатации, добыче и распределении собственных природных богатств. Высокоразвитые страны, истощив собственные природные ресурсы, стараются получить за бесценок сырьевые ресурсы слаборазвитых стран, заполнить их рынок старыми, “грязными” технологиями, использовать территории слаборазвитых стран для хранения, захоронения токсичных и радиоактивных отходов. Экологический кризис в конце тысячелетия продолжает углубляться.

На экологическую ситуацию в России оказывают воздействие две тенденции: мировой экологический кризис и распад социально-экономической системы. Все это отрицательно сказывается на всех отраслях производства. Проиллюстрирую это на примере состояния водных ресурсов РФ. Но, прежде всего, несколько слов о воде, как о важнейшем ресурсе.

Вода занимает 70 % поверхности земного шара (0.03% всей массы земли или 8% массы земной коры). Наша планета представляет собой «шарик в мокрой оболочке». На моря и океаны приходится 96% запасов воды, на внутренние водоемы и ледники – остальные 4%. Вода - источник жизни, без нее невозможно существование ни растений, ни животных,

ни человека. Вода - основа живой материи. Человек на 65% состоит из воды, помидор, для примера, - на 95%.

Вода способствует формированию климата на Земле. Ее могучая сила преобразует нашу планету, уничтожая иногда творения рук человечества. Вода помогает соблюдать гигиену, готовить пищу, восстанавливать силы, лечить нас. Она уносит нечистоты и орошает поля.

Особое место в жизни на Земле занимают пресные воды. Их суммарный запас оценивается 35 млн км³ или 2,5% общего количества (1400 млн км³) воды на Земле. Причем, 24 млн км³ (70%) пресной воды законсервировано в ледниках и снежном покрове, а 10-11 млн км³ - находится под землей. Пресная вода рек, озер, водохранилищ составляет около 100 тыс км³. Это небольшая величина наиважнейшего природного ресурса. К тому же водная среда является наиболее уязвимым звеном биосферы, поэтому нуждается в особой защите. Вернемся теперь к состоянию водных ресурсов в России.

Прежде всего, **происходит ухудшение качества воды**. Водные объекты становятся хранилищами отходов. Несмотря на спад производства, и в связи с этим сокращение сброса сточных вод, загрязненность большинства рек не сокращается. 50% населения РФ употребляет не отвечающую санитарно-гигиеническим требованиям воду. В то же самое время не рационально используются очищенные питьевые воды, практически прекращено освоение подземных источников питьевого водоснабжения.

Значительно ухудшается состояние водных объектов и гидротехнических сооружений. Десятки тысяч гидротехнических сооружений, возраст которых от 40 до более 100 лет оказались бесхозными и обветшалыми. Около 400 плотин находятся в аварийном состоянии. Практически не проводятся работы по расчистке дна малых рек, водохранилищ, укреплению берегов.

Все чаще **возникают крупные технические аварии**. Недавно произошел разрыв газопровода выше г. Астрахани в результате повышения правого берега р. Волги, что вызвало

гигантский взрыв и пожар. Хорошо известен случай разрыва трубопровода в зимнее время на р.Белой, в результате которого река сплошь была загрязнена нефтепродуктами.

Истоки кризиса водопользования в России лежат в тоталитарной модели бывшей экономики СССР, и к настоящему времени произошло следующее: система разрушилась, а управление и функционирование остались прежними. К этому надо добавить, что водное хозяйство всегда было на задворках отечественной экономики. Кризисная ситуация в водном хозяйстве России остается по следующим причинам:

1. Сохраняется жесткая централизация системы управления и распределения средств.
2. Все еще действует концепция бесплатного водопользования. (Существующие платежи символичны, поскольку доля платежей за воду от себестоимости продукции крайне мала и составляет 0.5-2% . В Европе величина платежей - 6-8%)
3. Водопользование в России расточительно: продолжает осуществляться стратегия экстенсивного водопользования (освоение новых источников, строительство водохранилищ, перераспределение стоков).
4. Сохраняется не бассейновый принцип выбора водохозяйственных решений.
5. Осуществляется борьба с последствиями загрязнения, а не с причиной.
6. Финансирование расходов на водную службу крайне ничтожно. С 1991 г финансирование сократилось в 10 раз. В итоге на все водное хозяйство (на восстановление, охрану, ремонт федеративных гидротехнических сооружений, противопаводковые мероприятия, науку) в 1997 г. выделено 164 млрд руб, тогда как на ремонт одной аварийной плотины Краснодарского водохранилища надо затратить треть выделенной суммы.

Вода - ресурс со своей стоимостью. Она должна не забираться из водного объекта, а покупаться у государства или

его представителя. Сточная вода должна не сбрасываться, а передаваться или сдаваться за определенную плату на хранение или регенерацию. Так говорит закон от 15.09.98 г. ” О плате за пользование водными объектами”.

Если человеческая цивилизация, включая сельское хозяйство и промышленность, использующие водные ресурсы, нуждаются в устойчивости, то она должна соответствовать законам природы. Мы же, к сожалению, в повседневной жизни руководствуемся сию минутными потребностями или, если хотите , прихотями, которые слабо соответствуют процессам и законам природы. Нарастание числа проблем, связанных с состоянием окружающей среды и истощение ресурсов - свидетельство неверного пути развития. Мы стоим у опасной черты. Предотвратить падение можно лишь, осознав основные экологические принципы, идти по пути устойчивого развития.

Раздел 1. Проблема загрязнения

Загрязнение стало обыденным словом и на бытовом уровне означает отравленную воду, воздух, землю. На самом же деле загрязнению невозможно дать простое определение, поскольку оно включает в себя сотни факторов, связанных с самыми разными источниками. В общем понимании загрязнение - это неблагоприятное изменение нашего окружения, являющегося в основном побочным результатом деятельности человека. Такие вредные изменения как загрязнение воздуха или питьевой воды непосредственно влияют на здоровье и самочувствие человека. Другие чреваты косвенными эффектами. Например, выбросы углекислого газа сказываются на климате, что в свою очередь отражается на производстве продуктов питания. Сдвиги в концентрации биогенов приводят к гибели одних популяций и бурному размножению других. Всеобъемлющее, но пространное определение загрязнению дал известный эколог Ю. Одум. “ Загрязнение - это нежелательное изменение физических, химических или биологических характеристик воздуха, земли и воды, которое может сейчас или в буду-

щем оказывать неблагоприятное влияние на жизнь человека, нужных ему растений и животных, на разного рода производственные процессы, условия жизни и культурное достояние, а также истощать или портить сырьевые ресурсы.” Загрязнители - это остатки того что мы производим, используем и выбрасываем прочь. К загрязнению относятся и побочные продукты транспорта, промышленности и сельского хозяйства.

К наиболее значительным категориям загрязнения относятся:

1) неблагоприятное влияние на водные экосистемы смытых в процессе эрозии почвы твердых частиц.

Пример с Чесапикским заливом - крупнейшим эстуарием Северной Америки. До 70 гг. очень продуктивный, давал миллионы кг рыбы и моллюсков и был местом обитания огромных стай водоплавающей дичи. Пищевые цепи, обеспечивающие такое изобилие, начинались от укорененной (бентосной) растительности, ее еще называют макрофитами. Они служили пищей и убежищем для рыб и, главное - источником кислорода. После 70 г. морские травы начали гибнуть, а в 75 г. отмирание стало катастрофическим. Соответственно сократилась численность рыб, моллюсков и дичи. Резко уменьшилось содержание растворенного кислорода в придонных слоях. Начали искать причины. Вначале подозрения пали на ЗВ, в том числе и гербициды, но замеры концентраций не дали положительного ответа. Тогда обратили внимание на то, что воды становились более мутными и темными. Причиной помутнения были взвешенные вещества (наносы) и фитопланктон - мелкие одноклеточные водоросли у которых короткий жизненный цикл и их быстрый рост компенсируется отмиранием. Дождь отмершего фитопланктона оседает на дно, образуя детрит, который поедают редуценты, потребляя при этом растворенный в воде кислород и в результате содержание последнего падает. Детрит уносит биогены на дно, редуценты разлагают детрит, освобождая биогены, и цикл повторяется. Это и есть процесс эвтрофикации (эвтрофирования), т.е. обо-

гащения водоема биогенами, стимулирующими рост фитопланктона. В геологическом масштабе времени водоемы постепенно обогащаются биогенами и заполняются поступающими с суши наносами, т.е. эвтрофикация является составной частью естественного процесса сукцессии. Дело во времени. Люди резко ускорили процесс эвтрофирования. За десятилетия они привели к изменениям, которые в природных условиях происходили бы в течение тысячелетий. Поэтому мы говорим об антропогенной эвтрофикации. Обычно все беды сваливали на влияние ядовитых загрязняющих веществ. Однако эвтрофикация вызывается тем, что всегда считалось безвредным - почвенными частицами и удобрениями.

2) повышение концентрации биогенов;

Источники биогенов: нитратные, фосфатные и калийные ионы прикрепляются к частицам глины и гумуса и, следовательно, они в водоемы поступают с наносами. Далее - удобрения, вымываемые с полей, газонов, садов. Канализационные стоки человека и отходы животноводства с пастбищ, ферм с мест скопления животных. Увеличивают содержание биогенов фосфатсодержащие детергенты и кислотные дожди, вносящие в водоемы ион NO_3 . (Классический пример антропогенной эвтрофикации - оз. Эри. До 1910 г - оно было чистым, затем его водосборная территория начала интенсивно заселяться, усилилось поступление биогенов главным образом фосфатов. В результате бурно разрослась популяция кладофоры, которая формирует очень большие скопления. Что приводит к увеличению детрита и заморным явлениям. Меры, принятые властями - уменьшение в стоках детергентов, позволили улучшить состояние озера.

3) загрязнение болезнетворными микроорганизмами из канализационных стоков водоемов - источников питьевой воды и мест отдыха населения.

Болезнетворные организмы или патогены (бактерии, вирусы, паразиты) с экскрементами выделяются в огромных количествах зараженными животными и человеком. Чем вы-

ше плотность населения, тем вероятность заражения выше. Она возрастает, когда канализационные стоки попадают в места купания или еще хуже - в места водозаборов для питьевых нужд. Можно легко заразиться брюшным тифом, гепатитом, аскаридозом. Выявлять патогенные организмы сложно, дорого и трудоемко. Существует широко практикуемый косвенный метод определения - тест на кишечную палочку. В прямой кишке человека и др. животных эта бактерия находится в огромных количествах, в чистой воде она отсутствует. Кишечная палочка не патогенна и необходима для нормального пищеварения. Она и служит индикатором неочищенных канализационных стоков, показывая возможного наличия патогенных организмов. Следует знать, если вода содержит 100-200 клеток кишечной палочки в 100 мл, то такая вода считается безопасной. Неочищенные канализационные стоки содержат миллионы клеток.

4) отравление воды ядовитыми химическими веществами промышленного и сельскохозяйственного происхождения, а также пестицидами.

5) воздействие на воду и почву продуктов сжигания топлива, снижающих качество воздуха и вызывающих кислотные дожди.

6) заражение воздуха, воды, почвы радиоактивными отходами и материалами, используемыми при производстве атомной энергии и ядерного оружия.

7) выбросы углекислого газа и других ЗВ, снижающих содержание озона.

Чистый воздух состоит примерно из 80% азота и 20% кислорода. Двуокись углерода составляет 0.03%. В природной биосфере содержание CO_2 стабильно в связи с круговоротом C , в ходе которого количество CO_2 , извлекаемого из атмосферы фотосинтезирующими растениями, компенсируется за счет дыхания и горения. Сейчас люди нарушают это равновесие, уничтожая леса, сжигая ископаемое топливо. К настоящему времени содержание углекислого газа в атмо-

сфере увеличилось до 0.035%, т.е. выросло на 20%. Процесс усугубляется другими газами: метаном и хлорфторуглеродом, которые поглощают инфракрасное излучение в 50-100 раз сильнее, чем CO_2 . Что такое парниковый эффект? Солнечный свет проникает через стекла теплицы, поглощается землей теплицы. При этом световая энергия переходит в тепловую в виде инфракрасного излучения. В отличие от светового излучения инфракрасное не проникает сквозь стекло наружу, т.е. остается внутри теплицы и повышает температуру. В глобальном масштабе CO_2 играет роль стекла. Он поглощает инфракрасное излучение и нагревает атмосферу в целом.

Потепление климата происходит очень быстро. Прогноз - к 2050 г. концентрация CO_2 удвоится и расчеты показывают увеличение потепления на 1.5-5° С. Это явление будет сильнее выражено в полярных районах (10°С), меньше в акваториальных (2°С). Последствия - поднятие уровня мирового океана на 1.5 м, что приведет к климатическим бедствиям. Доказательством потепления является возрастание с каждым годом на 0.1°С температуры мирового океана, который обладает огромной теплоемкостью. Так что, такое повышение не случайно.

Загрязнение в первую очередь связано с ростом населения. Оно уменьшает доступное для каждого человека пространство. Во вторую очередь - с увеличением потребностей на душу населения. По мере расширения областей деятельности человека возрастает и загрязнение. В настоящее время загрязнение - один из важнейших лимитирующих факторов для человека. Усилия, которые приходится прилагать для сокращения или предупреждения загрязнения являются эффективной отрицательной обратной связью, которая предотвращает полное разграбление человеком ресурсов земли. Проблема загрязнения глобальна и различается лишь в одном аспекте. В развивающихся странах (70% населения Земли) загрязнение связано в основном с испражнениями человека и животных, тогда как в развитых странах - с промышленным и аграрным химическим загрязнением. Последний вид загрязнения, исхо-

дящий из развитых стран, глобально загрязняет воды и воздух и угрожает сейчас каждому. Применительно к воде Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) дает следующее определение загрязнению: «Под загрязнением следует понимать такие изменения физических, химических или биологических свойств воды любых водоемов или внесение в них жидких, газообразных или твердых веществ, которые делают воду опасной для здоровья населения, а также наносят вред при использовании водоемов для хозяйственно-питьевых, рекреационных, коммерческих, промышленных, сельскохозяйственных нужд, или делают воду непригодной для домашнего скота, диких животных, птиц, рыб, гидробионтов».

Имеются разные виды классификации загрязнений. Распространена классификация по типам сред (воздух, почва, воды), по загрязняющим веществам (металлы, CO_2 , твердые отходы, пестициды и т.д.). Однако с точки зрения уменьшения загрязнения в целом следует различать два основных типа загрязнения. К первому относятся стойкие (неразлагающиеся) вещества, такие как бытовая алюминиевая посуда, соли ртути, хлорорганические пестициды, ПХБ, диоксины, которые в естественной среде либо вовсе не разрушаются, либо разрушаются очень медленно. Для этих веществ не существует естественных природных процессов, которые могли бы их разлагать с такой же скоростью, с какой они вводятся в экосистему. Такие стойкие загрязнители не только накапливаются, но и часто усиливают свое неблагоприятное действие по мере прохождения в биогеохимических циклах и по пищевым цепям. Этот процесс называется “биологическим усилением”. Единственный возможный способ очистки от таких загрязнителей - это их изъятие из системы жизнеобеспечения окружающей среды, что связано с большими расходами. Но удаление таких загрязнителей из биосферы практически не возможно. Очевидное решение состоит в том, чтобы запретить их выброс в окружающую среду или хотя бы осуществлять контроль выбросов, чтобы избежать токсичного уровня.

Второй тип - загрязняющие вещества, разрушаемые биологическими процессами. К ним относятся вещества, для которых существуют естественные механизмы переработки, и проблемы с ними возникают тогда, когда их поступление в окружающую среду превышает способность среды разлагать их. Ярким примером такого рода загрязнений являются бытовые, канализационные сточные воды.

Загрязняющие вещества в водную среду поступают из естественных и антропогенных источников. Естественное загрязнение обусловлено вулканической активностью, разрушением горных пород, выделением продуктов жизнедеятельности различных организмов. Круг веществ биогенного происхождения широк и разнообразен. Это - алкалоиды, антибиотики, токсичные метаболиты сине-зеленых водорослей. Многие морские организмы синтезируют ядовитые галогенсодержащие соединения.

Из загрязняющих веществ антропогенного происхождения по объему поступления в водоемы, прежде всего, заслуживают внимания **нефтепродукты** и **металлы**. Источником загрязнения нефтепродуктами являются утечки транспортных предприятий и нефтеперегонных заводов, особенно опасны аварийные ситуации с нефтеналивными судами. **Нефть** - представляет собой сложную смесь предельных углеводородов (парафинов), наftenов (циклопарафинов) и ароматических углеводородов, в которые входят кислород-, серу- и азот-содержащие вещества, а также меркаптаны и минеральные соли. Обычно нефть разделяют на легкие (имеющие плотность до 0.87 г/см^3) и тяжелые фракции (более 0.91 г/см^3). В пресной воде растворимость нефтепродуктов возможна до концентрации 1.5 мг/л , в 30 раз превышающие ПДК.

Из **металлов** наибольший вред биоте водоемов наносят тяжелые (плотность не менее 5 г/см^3). Это - ртуть, медь, никель, кобальт, свинец, олово, кадмий, хром. Однако, например, в условиях закисления, и легкие металлы (алюминий) проявляют высокую токсичность. Источником поступления

металлов являются предприятия металлургической, химической, энергетической отраслей промышленности, а также транспорта (выхлопные газы). Токсичность солей металлов зависит как от токсичности катионов, так и анионов. Наиболее распространенные анионы, входящие в состав солей металлов в сточных водах - хлориды, нитраты и сульфаты, имеют примерно одинаковую токсичность, в противоположность этому, катионы металлов значительно отличаются по токсичности. По мере убывания токсичности катионы располагаются в следующий ряд: $\text{Hg} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Sn} > \text{Ba} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Sr} > \text{Mg} > \text{Ca}$.

Далее идут **пестициды** - средства борьбы с вредителями сельского хозяйства - хлорорганические, фосфорорганические, карбаматные, в последнее время - синтетические пиретроиды.

Среди органических загрязняющих веществ особую опасность представляют **ПАУ** (полициклические ароматические углеводороды) и полихлорированные бифенилы (**ПХБ**). Последние - обширная группа галогензамещенных ароматических углеводородов, широко использовались до недавнего времени в качестве диэлектриков, тормозных жидкостей, пластификаторов. Загрязнения ими происходят при утечках в процессе производства и применения. Будучи чрезвычайно устойчивыми соединениями ПХБ кумулируются в объектах окружающей среды и передаются по пищевым цепям. Период их полураспада приблизительно составляет 5 лет. ПХБ как загрязняющие вещества впервые обнаружены в конце 60-х годов в тканях рыб и птиц. ПАУ и ПХБ обладают высокой хронической токсичностью и способны вызывать мутагенные эффекты, что в конечном итоге приводит к генетической патологии потомства и увеличению частоты развития раковых заболеваний.

Из ароматических полициклических углеводородов выделяются чрезвычайно опасные соединения - **диоксины**, которые в ничтожных количествах вызывают гено- и эмбриотоксические эффекты и нарушают ферментативные реакции. Диоксины отличаются от ПХБ тем, что два хлорированных

бензольных кольца связаны кислородной связью. Они также как и ПХБ чрезвычайно устойчивы в окружающей среде, период их полураспада в почве - от полугода до 12 лет, в организме человека 6-8. Химический анализ диоксинов затруднен из-за крайне малых величин (ПДК = 10^{-7} мг/л) и многочисленных изомеров. Стоимость определения диоксинов в пробе в РФ составляет около \$2000.

СПАВ (синтетические поверхностно-активные вещества) В этой группе основными загрязняющими веществами являются синтетические бытовые детергенты и эмульгаторы нефти. Они достаточно устойчивы в окружающей среде.

В связи с развитием ядерной энергетики и захоронением радиоактивных отходов радиоактивные вещества приобретают все большее значение. Основные искусственные радионуклеиды это - стронций и цезий.

Несколько слов о превращении загрязняющих веществ в водной среде. В превращении и распределении веществ, поступающих в водную среду играют роль процессы физические (механическое перемешивание, осаждение, адсорбция и десорбция, испарение, фотолиз), химические (диссоциация, гидролиз, комплексообразование, окислительно-восстановительные реакции), биологические (разрушения и превращения при участии ферментов, поглощение живыми организмами, захоронение с отходами жизнедеятельности). Загрязняющие вещества в водной среде распределяются между различными фракциями и фазами. Помимо растворенных форм, проникающих через фильтры с сечением пор 0.5 мк, происходит образование слаборастворимых соединений и комплексов, адсорбция их органическими и неорганическими взвесями, поглощение донными отложениями, т.е. происходит изъятие из водной фазы большей доли ЗВ. Значительная часть нефтепродуктов, пестицидов, ПХБ, СПАВ локализуется (концентрируется) в поверхностной пленке толщиной до нескольких десятков микрон. В водах океана концентрация ме-

таллов в этом слое в 100-1000 раз превышает концентрацию этих металлов в толще воды.

Как уже говорилось ранее тяжелые металлы и галогенированные углеводороды особенно опасны ввиду способности к биоаккумуляции. Она заключается в том, что малые, кажущиеся безвредными дозы, получаемые в течение длительного времени, накапливаются в организме, создают в итоге токсичную концентрацию и наносят ущерб здоровью. **Биоаккумуляция** происходит, во-первых, из-за отсутствия биodeградации. ТМ как простые элементы невозможно разрушить. Хлорсодержащие углеводороды разлагаются при очень высокой температуре. В организме нет ферментов, способных их расщеплять. Во-вторых, эти вещества легко поглощаются, а выводятся медленно. Организм не способен освобождаться от металлов с мочой, поскольку они связываются с белками, а хлорированные углеводороды растворяются в жирах организма и удерживаются как на фильтре. Биоаккумуляция усугубляется в пищевой цепи. Организмы, находящиеся в начале пищевой цепи, поглощают химикаты из внешней среды и аккумулируют их в своих тканях. Питаясь этими организмами, животные следующего трофического уровня накапливают более высокие концентрации. В результате на вершине пищевой цепи концентрации химиката в организме на много порядков выше, чем во внешней среде. Неудивительно, что при этом происходит гибель организмов. Из-за биоконцентрирования хлорсодержащих углеводородов (ДДТ) сократилась численность хищных птиц (белоголового орлана и скопы). Еще пример - болезнь Минаматы.

Многие ЗВ обладают токсическими свойствами. **Токсичность** - способность химических соединений вызывать патологию (заболевание) или гибель организмов. Токсичность можно охарактеризовать как степень химического воздействия, нарушающего биологические системы на различных уровнях организации. Различают острую и хроническую токсичность. Под острой токсичностью понимается гибель или

глубокая патология организмов, развивающаяся за короткий промежуток времени. Как правило, токсикологические острые опыты имеют экспозицию 24, 48 и 96-час. Хроническая токсичность выявляется при длительном воздействии токсикантов. Экспозиция хронических опытов достигает недель, месяцев и, когда исследуются полные жизненные циклы, годов.

Критерии токсичности - определяются уровнем организации биологических систем. Не будем останавливаться на молекулярном, тканевом и органном уровнях, поскольку токсикология, главным образом, имеет дело с более высокими уровнями биологической организации. Прежде всего, с организмами, популяциями, биоценозами и экосистемами.

Терминология.

Популяция организмов - совокупность особей одного вида с общими потенциально наследуемыми задатками, совместно проживающих на одной территории. **Вид** - совокупность популяций особей способных к размножению и образованию потомства. **Биоценоз** - сообщество взаимосвязанных организмов (бактерий, грибов, растений, животных), населяющих любое ограниченное пространство и приспособленных к условиям в этом пространстве (примеры - устричная банка, березовая роща, побережье и т.д.). **Экосистема** - единый природный комплекс, образованный живыми организмами и средой обитания, в котором все компоненты связаны причинно-следственными связями, обменом веществ и потоками энергии.

Критерий токсичности на организменном уровне (по Н.С. Строгонову) - снижение выживаемости, воспроизводства (плодовитости) и качества потомства. Это основные критерии сохранности вида. На популяционном уровне приняты следующие критерии: сохранение баланса между рождаемостью и смертностью, снижение продуктивности, сдвиги в соотношении полов в сторону преобладания самцов, переход от партеногенеза к половому размножению, появление карликовых форм. На биоценотическом - критерием токсичности является сохранение устойчивой структуры биоценоза (видовой со-

став, доминантные формы, численность биомассы, соотношение основных систематических групп в биоценозе). Критерий токсичности на экосистемном уровне - сдвиг равновесия в экосистеме в сторону снижения соотношения первичной продукции и деструкции, поскольку в основе функционирования экосистем лежит биотический круговорот, включающий 2 противоположных процесса: первичное продуцирование, базирующееся на фотосинтезе, и расход органического вещества в сети потребления - деструкция. В норме соотношение продукции к деструкции равно единице. Чем дальше от 1 и ближе к 0, тем более глубоко нарушена экосистема.

Проявление токсичности или возникновение токсического эффекта, его выраженность и исход определяются не только природой химического вещества, его концентрацией и временем воздействия, но и особенностями устойчивости (резистентности) организма. Ранее говорилось, что токсичность проявляется только по отношению к организму, тест-объекту. Многочисленные данные, полученные как в экспериментальных, так и полевых исследованиях однозначно свидетельствуют о важной роли видовых особенностей организма в проявлении токсического эффекта. Но, прежде всего, терминология. **Чувствительность** - способность организмов реагировать на различные раздражители, это - проявление первой реакции на химические вещества. **Устойчивость** - способность переносить внешние воздействия, это выживание в условиях загрязнения среды обитания. Оценка устойчивости организма проводится по концентрации загрязняющих веществ, вызывающих гибель определенного % тест-объектов. Обычно устанавливается 50% гибель (LC_{50}) организмов за 24, 48 или 96 часов. Это - основная токсикологическая характеристика.

Бытует устоявшееся мнение, что чем чувствительнее организм, тем он менее устойчив к различным повреждающим воздействиям и, наоборот, низко чувствительные организмы являются высоко устойчивыми. На самом деле это не так. Нельзя по чувствительности судить об устойчивости организ-

ма. Приведу пример собственных токсикологических исследований чувствительности и устойчивости рыб к одному из распространенных загрязняющих веществ - фенолу. В порядке убывания резистентности к фенолу пресноводные рыбы располагаются в следующий ряд: карась>плотва>лещ>синец>щука>ерш>окунь>ручьевая форель>налим>радужная форель, в котором первые 4 вида высоко устойчивые, а последние 5 – низко устойчивые. В порядке возрастания чувствительности к этому веществу виды рыб составляют следующий ряд: карась<синец<налим<лещ<окунь<щука<ерш <плотва<ручьевая форель<радужная форель. При сравнении двух рядов видно, что плотва обладает высокой устойчивостью и вместе с тем высокой чувствительностью к фенолу. Налим, наоборот, низко устойчив и низко чувствителен к фенолу. Видам, занимающим срединное положение по чувствительности (окунь, щука), свойственна различная резистентность к фенолу: окунь – низко устойчив, а щука среднеустойчива. И такие примеры можно найти и среди беспозвоночных животных. Следовательно, нельзя упрощенно понимать соотношение между чувствительностью и устойчивостью организмов к токсикантам.

В какой мере данные по сравнительной устойчивости к одним загрязняющим веществам можно переносить на действие других токсикантов? Ведь принято считать, опять же на примере рыб, что лососевые (форель) – низко устойчивый вид по отношению практически ко всем загрязняющим веществам, а карась или золотая рыбка из карповых, наоборот, высоко устойчива. В большой степени это мнение справедливо. Однако сопоставлять устойчивость гидробионтов следует к токсикантам, объединенных химическим родством или обладающим сходным механизмом действия.

В подавляющем числе токсикологических работ приводятся лишь токсикологические характеристики ЗВ и очень мало внимания уделяется рассмотрению сравнительной устойчивости гидробионтов к токсикантам. Такой анализ затруднен из-за большого разнообразия и различия используе-

мых тест-организмов, их возраста, стадий развития, токсических веществ, их препаративных форм и условий проведения экспериментов. Довольно мало отечественных работ, результаты которых можно было бы сравнивать. Тем не менее, имеются некоторые обобщения.

Сравнение устойчивости пресноводных животных (пиявок, моллюсков, ракообразных и рыб) к токсическим веществам по данным острых опытов не выявило взаимосвязи между местом водных беспозвоночных и рыб в филогенетическом ряду и резистентностью их к фосфор-, хлорорганическим пестицидам и фенольным соединениям. Это опровергает устоявшееся априорное представление, что более древние организмы характеризуются высокой устойчивостью ко всем абиотическим факторам, включая и токсический. К ХОП (ДДТ, альдрин, эдрин, дилдрин, токсафен, полихлорпинен, линдан, гептахлор) пресноводные животные, за небольшим исключением, проявляют примерно одинаковую устойчивость: их 96 ч LC_{50} составляют десятки мкг/л активного начала. К фосфорорганическим пестицидам (хлорофос, карбофос, тиофос, метилпаратион, ДДВФ) рыбы значительно устойчивее по сравнению с беспозвоночными. Среди последних наименее устойчивы ветвистоусые рачки - дафнии.

Раздел 2. Биотестирование и биоиндикация загрязнения

Идея **биотестирования**, т.е. оценки в экспериментальных условиях действия ЗВ на гидробионтов путем регистрации биологических показателей, была предложена отечественными исследователями-ихтиологами О.А. Гриммом, Н.К. Чермаком и И.Р. Арнольдом в конце XIX века. Впервые был применен так называемый метод “рыбной пробы”, который в последствие стал основным методом ихтиотоксикологических исследований. Прием биотестирования не является новым и для западных исследователей. Безусловно, к числу методов биотестирования следует отнести определение БПК, поскольку этот анализ основан на оценке окислительной ак-

тивности микроорганизмов. Анализ БПК впервые был применен английскими исследователями Мак-Гоуэном, Фри и Кершау в 1913 г. В России (бывшем СССР) биотестирование начало разрабатываться в 30 годах. Однако только к 80 годам научной общественностью и ведомствами, призванными контролировать состояние водной среды, осознана необходимость его широкого осуществления. До этого времени для оценки качества водной среды использовались в основном гидрохимические показатели. Они недостаточны.

Наличие токсикантов в воде само по себе не означает наличие токсических свойств воды. Токсические вещества должны быть доступными для гидробионтов. Токсичность - характеристика биологическая. Бывают случаи, когда химический состав ЗВ не определяется, а вода токсична. И, наоборот, химический анализ показывает наличие токсикантов, а токсические свойства не проявляются, т.е. тест-объекты не гибнут. Еще один недостаток гидрохимических показателей - они не оценивают влияния трансформации загрязняющих веществ в водной среде, взаимодействия веществ, не дают интегральную оценку вреда, наносимого токсикантами. Биотестирование в этом смысле по сравнению с гидрохимическими анализами методологически более верно. Кроме того, аналитическая химия водной среды далека от совершенства и очень дорогостояща. Бесспорно, что биотестирование может существенным образом ограничить объем громоздких гидрохимических работ и занять надлежащее место в системе контроля природных и сточных вод.

Что же такое биотестирование, как его можно и должно определить? У западноевропейских и американских токсикологов существуют термины "bioassay" и "biotest", которые означают практически одно и то же, а именно - определение действия веществ на живые организмы в стандартных условиях. Таким образом, под **биотестом** понимается оценка (испытание) в строго определенных условиях действия вещества или комплекса веществ на водные организмы путем регистрации

изменений того или иного биологического (или физиолого-биохимического) показателя исследуемого объекта по сравнению с контролем. Можно дать более короткое определение. Биотестирование - определение токсичности водной среды по биологическим объектам или процессам. Как можно видеть из всех определений, под биотестированием понимается эксперимент. В этом отличие биотестирования от **биоиндикации** и **мониторинга** состояния водной среды по биологическим параметрам. Под биоиндикацией понимаются полевые наблюдения за гидробионтами, а под мониторингом - полевые наблюдения по жестко осуществляемой программе (в пространстве и во времени). В обоих последних случаях о качестве водной среды судят по присутствию или отсутствию тех или иных видов гидробионтов, а также изменению их биологических параметров: численности, биомассы, наличию патологии.

Главной задачей, которую решает биотестирование, является получение быстрого ответа: имеют или нет токсичность тестируемые образцы воды. В контроле загрязнения водной среды биотестирование обеспечивает решение целого ряда конкретных задач. Оно позволяет:

- определять токсичность природных вод, устанавливать районы и источники загрязнения;
- выявлять степень токсичности промышленных стоков, определять пределы их очистки;
- контролировать токсичность сточных вод, поступающих на биологические очистные сооружения (БОС);
- осуществлять предварительную токсикологическую оценку отдельных загрязняющих веществ.

Кроме того, биотестирование применяется для оценки токсичности лекарственных препаратов и при контроле качества продуктов питания.

На основе изучения чувствительной устойчивости гидробионтов различных систематических и экологических групп на воздействие различных токсикантов в РФ и бывшем СССР разработано более 50 методов биотестирования и их

модификаций (для сравнения, Агентством по охране окружающей среды США (ЕРА) применяется около 150 методик биотестирования).

В нашей стране в качестве тест-объектов используются бактерии, грибы, водоросли (*Scenedesmus quadr.*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena*), простейшие (*Tetrachymena pyriformis*, *Spirostomun*), беспозвоночные (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, пиявки, моллюски, олигохеты), рыбы (гольян, гуппи, карп, окунь). В методах биотестирования с использованием бактерий регистрируются интенсивность размножения клеток, биолюминисценция, активность окислительных ферментов бактерий активного ила. В случае использования грибов регистрируется рост. В биотестах на водорослях используются различные реакции: интенсивность размножения клеток, флюорисценция, фотосинтетическая активность клеток, способность клеток к дифференцированному окрашиванию. В методах с использованием простейших регистрируется интенсивность размножения, двигательная активность, морфологические изменения. В биотестах на дафниях учитывается выживаемость, плодовитость, интенсивность дыхания, сердцебиение, поведение. У рыб в качестве тест-функций используются поведенческие реакции, интенсивность сердцебиения, дыхание, активность ферментативных систем и выживание.

Для определения токсичности природных вод используются наиболее чувствительные методы биотестирования. Как правило, в качестве тест-объектов используются дафнии: *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*. Для тестирования донных отложений применяют бентосных животных, которые пропускают через свою пищеварительную систему детрит вместе с грунтом, содержащим ЗВ. Это - хирономиды, олигохеты. Американские токсикологи широко используют амфипод *Hyalella azteca*.

Раздел 3. Влияние загрязняющих веществ на экосистемы водоемов

При токсическом воздействии в **экосистемах** происходят структурные и функциональные изменения, при этом существенное значение имеют не индивидуальные реакции гидробионтов, а массовые биологические процессы, приводящие к нарушению равновесия в водных экосистемах, т.е. процессы надорганизменного уровня. В популяциях - это преобладание смертности над рождаемостью, сдвиг в соотношении полов (в сторону преобладания самцов). В биоценозах - изменение видового состава в сторону уменьшения видового разнообразия, уменьшения численности и биомассы основных систематических групп и, самое главное, распад биоценоза на бесструктурные системы. В экосистеме - сдвиг в равновесии экосистемы, т.е. устойчивое снижение соотношения первичной продукции и деструкции.

Разберем 2 типа воздействия сточных вод на водоем : бытовых и промышленных. В первом случае ниже источника загрязнения по течению снижается концентрация кислорода, возрастает величина БПК и концентрации **биогенов** (как правило , азотистых соединений). Одновременно с этим увеличивается численность бактерий, особенно сапрофитных и простейших. Повышенное содержание биогенов стимулирует развитие водорослей, затем изменяется состав зоопланктона за счет отмирания олигосапробных форм и развитие сапробных видов, характерных для биологических очистных сооружений.

Промышленные сточные воды оказывают более сильное воздействие. Микрофлора, а также флористический состав дрожжей замещаются специфическими группами организмов, которые начинают разрушать основные ЗВ промышленных стоков. Например, при действии сточных вод коксохимического производства появляются фенол-, нафталинразрушающие микроорганизмы, а из грибов - представители р. *Candida*, *Metschnikova*, использующие углеводороды для своего роста. Если же в промышленных сточных водах преобладают тяжелые

металлы, то бактериофлора может сильно подавляться. Под влиянием промышленных стоков уменьшается численность водорослей, снижается их фотосинтетическая активность. В зоне максимального воздействия численность, биомасса зоопланктона сокращается, снижается видовое разнообразие. Так же, как при бытовых сточных водах, наблюдается массовое развитие сапробных видов. Бентос становится олигохетным. При сильном воздействии происходит массовая гибель рыб, при умеренном - разного рода проявления хронической токсичности.

Как экосистема водоемов борется с разного рода загрязнениями? Прежде всего, происходит разбавление стоков, концентрации ЗВ сильно уменьшаются и тем самым наносится все меньший вред водоему. В борьбу с ЗВ вступают процессы самоочищения. Кроме того, в процессе токсического воздействия гидробионты могут приспосабливаться. Здесь стоит подробнее остановиться на проблеме **приспособления** или **адаптации**.

Под **адаптацией** принято понимать изменения, направленные на повышение жизнеспособности вида, популяции, организма, органа и т.д. ко всякого рода воздействиям. Более строгое определение - адаптация (приспособление) - совокупность реакций биологической системы, поддерживающих ее функциональную устойчивость при изменении окружающей среды. Выделяют 2 принципиально различных вида адаптации: генетическую (передаваемую по наследству) и негенетическую или фенотипическую (ее синонимы - индивидуальная, физиологическая, онтогенетическая, экологическая). В свою очередь фенотипическая адаптация разделяется на поведенческую адаптацию и привыкание. Если под поведенческой понимается уход организма от воздействия (реакции избегания), т.е. устойчивость организма к фактору не изменяется, то привыкание характеризуется повышением устойчивости самого организма.

Нашими отечественными исследователями Хлебовичем и Бергером (1981) установлено, что динамика процессов фенотипической адаптации (привыкания) носит фазный харак-

тер и завершается примерно через 2 недели. В связи с этим постановка корректных экспериментов по исследованию адаптаций требует соблюдения, прежде всего, достаточной продолжительности периода адаптации. Однако токсикологи часто ограничивались кратковременными опытами (1-4 суток). При таких экспозициях процесс адаптации не завершается, а в зависимости от видовой принадлежности организмов и специфики действия токсикантов находится на разных переходных стадиях адаптационного процесса, что в конечном итоге приводит к невозможности сопоставления результатов и необоснованным выводам.

По этой причине данные о привыкании гидробионтов к ЗВ противоречивы. Многие работы выполнены в короткие сроки и поэтому выводы ошибочны. Наш опыт работы по акклимации разных гидробионтов к токсикантам свидетельствует о том, что фенотипической адаптации к качественно новым химическим соединениям, каковыми является большинство токсикантов, не происходит. Она осуществляется лишь к ЗВ по химической природе близким к естественным природным соединениям (например, к углекислому газу, амонию и т.д.) Адаптация гидробионтов осуществляется путем отбора, причем приобретаемая устойчивость может возрастать на несколько порядков по сравнению с резистентностью исходного поколения и носит неспецифический характер, т.е. устойчивые особи после отбора к одному токсиканту одновременно становятся устойчивыми к токсическому действию другого по химическим свойствам вещества.

Что же касается поведенческой адаптации, то это реальный механизм активной защиты у гидробионтов, особенно у рыб (избегание, уход от места загрязнения) к действию токсических веществ. Ясно, что избегаются те вещества, которые действуют непосредственно на химические рецепторы гидробионтов или обладают общим раздражающим действием. Реакция избегания зависит от химической природы токсиканта, концентрации и времени воздействия. Токсиканты, как в ле-

тальных, так и сублетальных концентрациях, могут избегать-ся гидробионтами, а могут привлекаться ими. По реакциям избегания имеется обширная литература.

Раздел 4. Нормирование загрязняющих веществ и экологический контроль

Действующее водное законодательство РФ основывается на 2 стандартах: стандарта качества природных вод (сохранения фонового уровня загрязнения) и стандарта сбросов (расчет предельно-допустимого сброса (ПДС), учитывающего предельно-допустимые концентрации), т.е. при выпуске сточных вод к их качеству установлены требования соответствия природным водам. Это благая цель, но практически недостижимая. Даже наилучшие современные сооружения очистки не могут обеспечить установленные в России нормы качества сточных вод. Стратегия защиты водоемов в России себя не оправдала. Установленные чрезвычайно жесткие нормативы ПДС повсеместно нарушаются, потому что был нарушен принцип справедливости предъявляемой претензии за превышение норм качества при сбросе сточных вод. В большинстве развитых стран при определении норматива на качество сточных вод учитываются возможности наилучшей технологии очистки.

Тем не менее, в РФ продолжает действовать система установления нормативов на предельно допустимые сбросы (ПДС) индивидуальных ЗВ. Она предполагает необходимость контроля всех присутствующих в сточных водах ЗВ. Расчет ПДС производится с учетом предельно допустимых концентраций (ПДК). К настоящему времени разработано около 2000 санитарно-гигиенических ПДК и более 1000 - рыбохозяйственных. Но такого количества ПДК недостаточно для полноты контроля. Кроме того, при государственных инспекционных проверках реально определяется не более 10-20 показателей загрязнения. Да и методическое и приборное обеспечение гидрохимического контроля в России сейчас крайне неудовлетворительно. Был необходим переход к интеграль-

ному, экологическому контролю. Указом Президента РФ от 4 февраля 1994 г. N.236 определена необходимость оценки качества окружающей среды по экосистемным признакам с учетом влияния ЗВ на самые чувствительные звенья экосистемы. Для этой цели используются методы биотестирования.

Экотоксикологический государственный контроль осуществляется с целью регулярного слежения за соблюдением нормативов качества водной среды и предупреждения попадания токсичных веществ в водные объекты. Производственный токсикологический контроль предполагает контроль технологических звеньев предприятий. Он обеспечивает оценку токсичности сточных вод непосредственно в местах их образования. Экотоксикологический и производственный токсикологический контроль осуществляют специализированные аккредитованные лаборатории, которые выполняют анализы на токсичность сред методом биотестирования. Аккредитацию проводит Госстандарт и метрологическая служба Госкомэкологии РФ.

Основным нормативным документом являются ПРАВИЛА ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД (М, 1991), в которых заложен токсикологический норматив: «сточная вода на выпуске в водный объект не должна оказывать острого токсического действия на тест-объекты. Вода водного объекта в контрольном створе не должна оказывать хронического токсического действия на тест-объекты». Эти правила обязывают водопользователей осуществлять токсикологический контроль сточных вод. В соответствии с этими требованиями водопользователи обязаны предоставлять сведения о токсичности сбрасываемых сточных вод в природоохранные органы, которые оценивают получаемую информацию. В 1990 г. введен в действие экологический паспорт предприятия, где предусмотрена графа о токсичности сбрасываемых предприятием в водоем сточных вод. Токсичность определяется аттестованными методами биотестирования или методами, вошедшими в Государственный реестр методик и допущенными для экологического контроля качества окружающей среды.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ

1. В чем проявляется ухудшение качества окружающей среды, деградация природных ресурсов?
2. Охарактеризуйте водную среду как важнейший природный ресурс.
3. Дайте оценку состояния водных ресурсов в РФ.
4. Назовите основные причины кризисной ситуации в водном хозяйстве РФ.
5. Что такое загрязнение? Какими основными факторами оно определяется?
6. Назовите наиболее значительные категории загрязнения. Приведите примеры.
7. Что такое эвтрофирование? Что такое парниковый эффект?
8. Основные типы загрязнения. Расскажите о приоритетных загрязняющих веществах.
9. Что такое биоаккумуляция? От каких факторов она зависит?
10. Дайте определение токсичности. Назовите критерии токсичности с учетом уровня биологической организации.
11. Понятие чувствительности и устойчивости организмов к химическим веществам.
12. Определение биотестирования. Каково отличие биотестирования от биоиндикации и биомониторинга?
13. Почему биотестирование должно дополнять определение содержания загрязняющих веществ в контроле качества природных и сточных вод?
14. Какие задачи решает биотестирование?
15. Назовите тест-объекты, наиболее употребляемые в целях биотестирования. На каких организмах проводится биотестирование грунтов?
16. Категории организмов в биотической структуре экосистем.
17. Основные принципы функционирования экосистем.

18. Реакция экосистемы на бытовые и промышленные стоки.
19. Проблема адаптации организмов к токсическому фактору.
20. Основные виды адаптации гидробионтов к загрязняющим веществам
21. Принципы нормирования загрязняющих веществ.
22. Токсикологический норматив.
23. Предельно-допустимые концентрации загрязняющих веществ.
24. Комплексная оценка состояния водных экосистем.
25. Основные принципы функционирования экосистем.
26. Продуценты, консументы, детритофаги, редуценты. Популяция, вид, биоценоз, экосистема.

ЛИТЕРАТУРА

1. Одум Ю. Основы экологии. М.: Мир, 1975. 740 с.
2. Одум Ю. Экология. В 2-х томах. М.: Мир, 1986. 704с.
3. Алабастр Д., Ллойд Р.. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: 1984. 337 с.
4. Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград: ИБВВ АН СССР, 1983. 194 с.
5. Методы биотестирования вод. Черноголовка: ГКОП СССР, 1988, 127 с.
6. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989, 141 с.
7. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М., 1983, 319с.
8. Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. М., 1997, 144 с.

**СПИСОК
ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ Б.А.
ФЛЕРОВА ЗА ПЕРИОД 1960-2007гг.**

1. Долин А.О., Крылов В.Н., Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Новые экспериментальные данные по условно-рефлекторному воспроизведению и подавлению иммунных и аллергических реакций // Ж. высш. нервн. деят. 1960. Т.10. №6. С.832-841.
2. Брискин А.И., Флеров Б.А. Изменение условнорефлекторной деятельности белых крыс под влиянием курареподобных препаратов // Тр. Ин-та высш. нервн. деят. 1961. Т.9. С.160-167.
3. Брискин А.И., Флеров Б.А. Влияние курареподобных веществ на условнорефлекторную деятельность белых крыс // Ж. фармакол. и токсикол. 1961. № 5. С.523-529.
4. Флеров Б.А. Подавление патологических реакций, вызываемых столбнячной интоксикацией механизмами динамического стереотипа // Патолог. физиол. и эксперим. терапия. 1962. № 2. С.39-42.
5. Флеров Б.А. Обоняние рыб (Обзор литературы) // Вопр. ихтиол. 1962. Т.2. №3(24). С.517-529.
6. Лукьяненко В.И., Кузнецов С.М., Флеров Б.А., Роль высших отделов центральной нервной системы в торможении местной аллергической реакции – феномена Артюса-Сахарова // Вест. МГУ. Сер. биол. 1962. № 2. С.24-28.
7. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Зависимость динамики токсического процесса от концентрации яда при фенольном отравлении карасей // В кн.: Матер. по биол. и гидр. Волжских. водохр. М.-Л.: АН СССР, 1963. С.47-52.
8. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. О токсикорезистентности сеголетков карася // В кн.: «Матер. по биол. и гидр. Волжских. водохр». М.-Л.: АН СССР, 1963. С.52-55.
9. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Динамика обратимости фенольной интоксикации карася // В кн.: «Матер. по

- биол. и гидрол. Волжских водохр». М.-Л.: АН СССР, 1963. С.107-110.
10. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Экспериментальные данные к возрастной токсикологии рыб // Фармакол. и токсикол. 1963. № 5. С.625-629.
 11. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Влияние сезонного фактора на токсикорезистентность рыб // Вопр. ихтиол. 1964. Т.4. № 1/30. С.179-184.
 12. Флеров Б.А. Влияние малых концентраций фенола на двигательную, пищевую активность и прирост живого веса карасей // Вопр. ихтиол. 1965. Т.5. №1(34). С. 164-172.
 13. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Видовые особенности чувствительности и устойчивости пресноводных рыб к фенолу // Гидроб. ж. 1965. Т.1. № 2. С.48-53.
 14. Флеров Б.А. Влияние фенола на условно-рефлекторную деятельность рыб // Гидроб. ж. 1965. № 3. С. 49-53.
 15. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Экспериментальный анализ характера зависимости токсикорезистентности радужной форели от возраста и веса тела на модели фенольной интоксикации // Вопр. ихтиол. 1966. Т.6. № 2(39). С.375-380.
 16. Флеров Б.А. О возможности применения «электробиологического» теста в качестве определителя степени загрязненности водоемов // В кн.: Биология рыб Волжс. водохр. Тр. ИБВВ АН СССР. М.-Л.: Наука, 1966. №10(13). С. 291-294.
 17. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Сравнительное изучение резистентности двух возрастных групп радужной форели к токсическому действию фенола // В кн.: Биология рыб Волж. водохр. Тр. ИБВВ АН СССР. М.-Л.: Наука, 1966. №10/13. С. 293-299.
 18. Володин В.М., Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. Сравнительная характеристика устойчивости рыб к фенолу на ранних этапах онтогенеза // В кн.: Биология рыб Волж. водохр. Тр. ИБВВ АН СССР. М.-Л.: Наука, 1966. №10(13). С. 300-310.

19. Флеров Б.А., Лукьяненко В.И. Роль факторов водной среды в устойчивости рыб к фенолу // В кн.: Биология рыб Волж. водохр. Тр.ИБВВ АН СССР. М.-Л.: Наука, 1966. №10/13. С. 319-330.
20. Флеров Б.А., Романенко В.И. Исследование элиминации корпускулярного антигена у рыб // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1969. № 3. С. 40-44.
21. Романенко В.И., Флеров Б.А. Методика определения элиминации антигена у рыб // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1969. № 3. С.53-57.
22. Флеров Б.А. Исследование острого фенольного отравления *Lebistus reticulatus* (P) // В кн.: Физиология водных организмов и их роль в круговороте органического вещества. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1969. №19(22). С.55-60.
23. Степанов В.С., Флеров Б.А. Влияние субтоксических концентраций фенола на количество и качество потомства // В кн.: Физиология водных организмов и их роль в круговороте органического вещества. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1969. №19(22). С.60-61.
24. Флеров Б.А. Влияние субтоксических концентраций фенола на сексуальное поведение *Lebistus reticulatus* (P) // В кн.: Физиология водных организмов и их роль в круговороте органического вещества. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1969. №19(22). С.66-70.
25. Флеров Б.А. Изучение адаптации гуппи к фенолу // Гидроб. ж. 1970. Т.6. № 2. С.104-106.
26. Флеров Б.А., Романенко В.И. Сравнительное изучение выведения меченого C^{14} антигена у некоторых холодно-кровных и теплокровных животных // Гидроб. ж. 1970. Т.6. № 2. С.121-123.
27. Флеров Б.А. Влияние пахучих веществ на сексуальное поведение *Lebistus reticulatus* (P) // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1970. № 6. С.52-55.

28. Микряков В.Р., Флеров Б.А., Распределение корпускулярного антигена в организме рыб // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1970. № 7. С.62-64.
29. Флеров Б.А. Исследование хронической фенольной интоксикации *Lebistus reticulatus* (P) // В кн.: Вопр. водн. токсикол. Л.: Наука, 1970. С.163-168.
30. Флеров Б.А., Матей В.Е. Влияние субтоксических концентраций фенола на условные рефлексy *Lebistus reticulatus* (P) // В кн.: Вопр. водн. токсикол. Л.: Наука, 1970. С.175-181.
31. Микряков В.Р., Флеров Б.А. Картина крови карпов *Cirrinus carpio* (L) при хронической фенольной интоксикации // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1971. № 9. С.52-54.
32. Луферова Л.А., Флеров Б.А. Исследование фенольного отравления дафний // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1971. № 10. С.42-46.
33. Луферова Л.А., Флеров Б.А. Сравнительная устойчивость некоторых *Phyllozoa* к фенолу // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1971. № 11. С.43-46.
34. Флеров Б.А. К вопросу о приспособлении гидробионтов к токсическому фактору // Гидроб. ж. 1971. Т.7. № 6. С.61-66.
35. Флеров Б.А., Матей В.Е. Методика изучения групповых двигательнo-пищевых условных рефлексов у рыб // В кн.: Методы биол. иссл. по вод. токсикол. М.: Наука, 1971. С.136-140.
36. Алексеев В.А., Флеров Б.А. Действие фенола на фотореакции и устойчивость *Chironomus plumosus* и *Limnochares aquatica* // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1972. № 13. С.33-37.
37. Алексеев В.А., Флеров Б.А., Реакция избегания токсических растворов у некоторых водных насекомых и паукообразных // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1972. № 14. С. 32-35.
38. Алексеев В.А., Флеров Б.А. Некоторые особенности поведения водных беспозвоночных (*Insecta*, *Arachnoidae*) в условиях фенольной интоксикации // В кн.: Поведение

- водных беспозвоночных. Матер. I Всесоюзн. симпози. Борок, 1972г. Борок: ИБВВ АН СССР, 1972. С.3-13.
39. Флеров Б.А. Полихлорпинен и его влияние на водные организмы (Литературный обзор) // В кн.: Эксперим. водн. токсикол. Рига: Зинатне, 1973. № 4. С.104-111.
 40. Флеров Б.А. Экспериментальное исследование фенольного отравления рыб // В кн.: Влияние фенола на гидробионтов. Тр. ИБВВ. Л.: Наука, 1973. Т.24(27). С.5-38.
 41. Флеров Б.А., Ривьер И.К. Действие полихлорпинена на некоторые биологические показатели и структуру популяции *Daphnia pulex* // В кн.: Эксперим. водн. токсикол. Рига: Зинатне, 1973. № 5. С.117-133.
 42. Флеров Б.А. Об использовании в водной токсикологии исследований поведения животных // Гидроб. ж. 1974. № 5. С.114-120.
 43. Гдовский П.А., Флерова Г.И., Флеров Б.А. О влиянии фенола на нервную систему и нервно-мышечное соединение низших позвоночных // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1974. № 22. С.44-46.
 44. Флеров Б.А., Ершов Ю.В. Исследование элиминации фенола из организма рыб // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1974. № 22. С.47-50.
 45. Владимирова В.Л., Флеров Б.А. Восприимчивость к ихтиофтириозу у рыб после отравления фенолом и полихлорпиненом // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1974. № 25. С.35-37.
 46. Ривьер И.К., Флеров Б.А. Изменение биологических показателей *Daphnia pulex* (De Geer) при воздействии некоторых токсических веществ // В кн.: Формирование и контроль качества поверхностных вод. Водная токсикология. Вып.1. Киев: Наукова думка. 1975. С.52-60.
 47. Флеров Б.А., Ривьер И.К. Экспериментальное исследование отравления *Daphnia pulex* (De Geer) фенолом, перхлоратом аммония и полихлорпиненом // В кн.: Антропогенные факторы в жизни водоемов. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1976. №30(33). С.117-127.

48. Флеров Б.А., Лапкина Л.Н. Избегание растворов некоторых токсических веществ медицинской пиявкой // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1976. № 30. С.48-52.
49. Флеров Б.А., Брагинский Л.П. Методы контроля загрязнения водоемов (II советско-американское совещание) // Гидроб. ж. 1976. № 6. С.116-118.
50. Флеров Б.А. Как животные ведут себя в грязной воде // Химия и жизнь. 1976. № 7. С.98-101.
51. Флеров Б.А., Микряков В.Р. Влияние некоторых токсических веществ на устойчивость карпов к аэромоназу // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1977. № 33. С.59-61.
52. Флеров Б.А. Физиологические механизмы действия токсических веществ и приспособления к ним водных животных // Гидроб. ж. 1977. Т. 13. №4. С.80-85.
53. Романенко В.И., Смирнов Н.П., Флеров Б.А. Численность, интенсивность дыхания и размножение бактерий и химический состав воды в подземных источниках Хазо-Чашмы на Памире // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1978. №38. с.5-9.
54. Тагунов В.Б., Флеров Б.А. Реакция избегания токсических веществ у водяного ослика // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1978. № 39. С.80-84.
55. Флеров Б.А., Тагунов В.Б. Анализ реакции избегания токсических веществ у жабронога *Streptocephalus torvicornis* (Waga) // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1978. № 40. С.68-70.
56. Flerov B.A. The behavioral aspects of aquatic toxicology // In: Proceed. First&Second USA-USSR Symposia on the Effects of Pollutants Upon Aquatic Ecosystems. Duluth, Minnesota, October 21-23, 1975 – Borok, Jaroslavl Oblast, June 22-26, 1976. EPA-600/3-78-076. 1978. V.2. P.122-132.
57. Kamshilov M.M., Flerov B.A. Experimental research on phenol intoxication of aquatic organisms and destruction of phenol in model communities // In: Proceed. First&Second USA-USSR Symposia on the Effects of Pollutants Upon Aquatic Ecosystems. Duluth, Minnesota, October 21-23,

- 1975 – Borok, Jaroslavl Oblast, June 22-26, 1976. EPA-600/3-78-076. 1978. V.1. P.181-192.
58. Флеров Б.А., Виноградов Г.А., Козловская В.И., Гдовский П.А., Лапкина Л.Н. К вопросу о механизмах действия некоторых токсических веществ у водных животных // В кн.: Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1978. № 32(35). С. 134-143.
 59. Гдовский П.А., Флеров Б.А. Физиолого-биохимические механизмы действия хлорорганических соединений у водных животных (Обзор) // Гидроб. ж. 1979. Т.15. №6. С.76-85.
 60. Виноградов Г.А., Жариков Г.П., Флеров Б.А. Действие полихлорпинена и гексахлорана на дыхание и осморегуляцию карасей // В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1979. С. 26-31.
 61. Козловская В.И., Новичкова Н.С., Флеров Б.А. Изменение белкового состава сыворотки крови карпа при отравлении хлорофосом и полихлорпиненом // В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1979. С. 42-49.
 62. Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Исследование острого отравления пиявок некоторыми токсическими веществами // В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1979. С. 50-59.
 63. Флеров Б.А. Сравнительное изучение реакций избегания токсических веществ у некоторых водных животных // В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. Тр. ИБВВ АН СССР. Л.: Наука, 1979. С. 81-87.
 64. Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Использование пиявок для идентификации пестицидов в воде // Гидроб. ж. 1980. Т.16. №3. С.113-119.
 65. Kozlovskaya V.I., Flerov D.F. Organophosphorus pesticides and their hazards to aquatic animals // In: Proceed. Third USA-USSR Symposium on the Effects of Pollutants Upon

- Aquatic Ecosystems. Borok, Jaroslavl Oblast USSR, July 2-6, 1979. ЕРА-600/9-80-034. 1980. P.84-96.
66. Жарикова Т.И., Флеров Б.А. Влияние хлорофоса на восприимчивость к инвазии рода *Dactylogyrus* Diesing, 1850 // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1981. № 49. С.43-46.
 67. Майер Ф.Л., Пети Дж.Д., Козловская В.И., Флеров Б.А. Определение остаточных количеств пестицидов в рыбе Рыбинского водохранилища // Гидроб. ж. 1981. Т. 17. №5. С.83-87.
 68. Флеров Б.А., Микряков В.Р., Куперман Б.И. Инвазионные и инфекционные процессы у рыб при токсическом воздействии // В кн.: Гельминты в пресноводных биоценозах. М.: Наука, 1982. С.58-67.
 69. Буторин Н.В., Козловская В.И. Флеров Б.А. О советско-американском сотрудничестве в области охраны водоемов от загрязнения // В кн.: Проблемы сохранения, защиты и улучшения качества природных вод. М.: Наука, 1982. С.47-55.
 70. Флеров Б.А. Механизмы приспособления водных животных к токсическим веществам // В кн.: Реакции гидробионтов на загрязнение. М.: Наука, 1983. С.30-33.
 71. Флеров Б.А. Биотестирование: терминология, задачи, перспективы // В кн.: Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград: ИБВВ АН СССР, 1983. С.13-20.
 72. Лапкина Л.Н., Флеров Б.А., Обнаружение антихолинэстеразных веществ при помощи биотестирования (тест-объект – *Hirudo medicinalis*, пиявка) // В кн.: Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград: ИБВВ АН СССР, 1983. С.121-126.
 73. Романенко В.И., Флеров Б.А., О проведении совместных исследований советскими и американскими специалистами в Борке по проекту «Влияние загрязняющих веществ на водные организмы и экосистемы» Разработка критериев качества воды // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1983. № 61. С.3-4.
 74. Ружинская Н.Н., Флеров Б.А. Действие токсических веществ на нервную систему водных животных // В кн.: Физиологиче-

- ские и биохимические аспекты токсикологии пресноводных животных. Деп. ВИНТИ № 1637-84Деп. Борок, 1984. С.2-34.
75. Little E.E., Flerov B.A., Ruzhinskaya N.N. Behavioral approaches in aquatic toxicity investigations: a review // In: Toxic substances in the aquatic environment: an international aspect. Bethesda: Am. Fish. Soc., 1985. P.72-98.
 76. Флеров Б.А., Чалова И.В., Яковлева И.И. Использование поведенческих реакций молоди пиявки *Hiruda medicinalis* для биотестирования // В кн: Вопросы сравнительной физиологии и водной токсикологии. ЯрГУ: Ярославль, 1987. С.11-17.
 77. Хенри М.Г., Флеров Б.А., Комов В.Т., Хемминг Т.А. Полевые тесты на токсичность: применение в Соединенных Штатах и Советском Союзе // В кн.: Влияние загрязняющих веществ на водные организмы и экологические системы. Матер. советско-амер. симп. 19-21 октября 1987г., Атенс, Джорджия, США. ГХИ-ИБВВВ АН СССР: Харьков, 1988. С.160-166.
 78. Henry M.G., Flerov B.A., Komov V.T., Heming T.A. On-site toxicity testing applications in the United States and Soviet Union //In: Fate and effects of pollutants on aquatic organisms and ecosystems: Proceed. of USA-USSR Symp. October 19-21, 1987. Athens, USA. 1988. EPA/600-9-88/001. P.70-77.
 79. Nepomniashchikh V.A., Flerov B.A. Biotesting of aquatic environments based on the behavioral reactions of aquatic animals // In: Protection of River, Basin, Lakes and Estuaries. AFS: Bethesda, Maryland, USA, 1988. С.147-152.
 80. Лапкина Л.Н., Мензикова О.В., Флеров Б.А. Влияние острого, подострого и хронического отравления медицинской пиявки хлорофосом на уровень активности холинэстеразы и некоторые биологические показатели // В кн: Физиология и токсикология гидробионтов. ЯрГУ: Ярославль, 1988. С.69-76.
 81. Флеров Б.А., Жмур Н.С., Очирова М.Н., Чалова И.В. Метод биотестирования природных и сточных вод с использова-

- нием рачка *Ceriodaphnia dubia* // В кн.: Методы биотестирования вод. Черноголовка: ГКОП СССР, 1988. С.111-114.
82. Флеров Б.А., Лапкина Л.Н., Жмур Н.С., Яковлева И.И. Метод биотестирования токсичности сточных вод содержащих ионы металлов (Cu^{++} , Hg^{++} , Cd^{++} , Al^{+++}) по смене статичного состояния на динамичное у медицинской пиявки // В кн.: Методы биотестирования вод. ГКОП СССР: Черноголовка, 1988. С.114-117.
83. Непомнящих В.А., Флеров Б.А., Хенри М.Г. Влияние метилпарагидроксибензоата на строительное поведение личинок ручейников *Chaetopteryx villosa* (F) // Биол. науки. 1988. №9. С.70-78.
84. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии водных животных. - Л.: Наука, 1989. 144с.
85. Павлов Д.Ф., Козловская В.И., Флеров Б.А. Использование коллагена для оценки токсического действия загрязняющих веществ на рыб // В кн.: Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. Тр. ИБВВ. №57(60). Л.: Наука, 1990. С.85-94.
86. Little E.E., Archeski R.D., Flerov B.A., Kozlovskaya V.I. Behavioral Indicators of sublethal toxicity in Rainbow trout // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1990. V.19. P.380-385.
87. Флеров Б.А. Экологическая обстановка на Рыбинском водохранилище в результате аварии на очистных сооружениях г.Череповца // В кн.: Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. ИБВВ АН СССР: Рыбинск, 1990. С.3-12
88. Флеров Б.А., Жмур Н.С. Биотестирование с использованием цериодафний. // В кн.: Методическое руководство по биотестированию воды. РД 118-02-90. М.: ГКОП СССР, 1991. С.19-28.
89. Флеров Б.А., Комов В.Т. Оценка экологического состояния водоемов при антропогенном воздействии // Гидробиол. ж. 1991. Т.27. № 3. С.23-31.
90. Лапкина Л.Н., Томилина И.И., Флеров Б.А. Хроническое действие хлорофоса на пиявок *Caspiobdella fadejewi* в

- разные периоды их онтогенеза // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1991. №90. С.28-33.
91. Флеров Б.А., Шишинашвили Л.В. Токсикозэкологические аспекты экологических модификаций // В кн: Экологические модификации и критерии экологического нормирования. Л.: Наука, 1991. С.253-258.
 92. Флеров Б.А. Проблемная записка по оценке состояния водных ресурсов и экосистем, причин их кризиса, путей вывода из него: стратегия и тактика // Докл. Высш. школы. Биол. науки. 1992. №9. С.16-18.
 93. Виноградов Г.А., Матей В.Е., Комов В.Т., Непомнящих В.А., Тагунов В.Б., Флеров Б.А., Хемминг Т.А., Хенри М.Д. Минеральный обмен, ультраструктура жабр и пищевое поведение окуня *Percu fluviatilis* (Percidae) в связи с проблемой закисления водоемов // В кн.: Структура и функционирование экосистем кислых озер. С.-Пб.: Наука, 1994. С.237-247.
 94. Флеров Б.А., Лапкина Л.Н., Томилина И.И. Адаптивные возможности пиявок к фенолу // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1995. №98. С.34-37.
 95. Флеров Б.А., Баканов А.И. Состояние сообществ донных организмов Верхней Волги (территории Ярославской обл.) // Биол. внутр. вод. 1996. №1. С.79-84.
 96. Флеров Б.А., Королева Э.К. Комплексная оценка качества природной воды Верхней Волги (территория Ярославской области) // Водные ресурсы. 1996. Т.23. №5. С.599-607.
 97. Флеров Б.А., Воронин А.А., Чуйко Г.М., Конов В.В. Экоотоксикологический мониторинг поверхностных вод на территории Рыбинского промышленного центра // Водные ресурсы. 1996. Т.23. №4. С.463-466.
 98. Флеров Б.А. Интегральная оценка качества воды // Газета «Берегиня» 1996. № 5.
 99. Флеров Б.А., Чуйко Г.М., Королева Э.К. Волжская вода и волжская рыба крайне опасна для здоровья // Газета «Известия». 13 сентября 1995.

100. Флеров Б.А., Волков Е.Д., Воронин А.А., Конов В.ВВ., Папушкина О. Влияние сточных вод Рыбинского центра на качество поверхностных вод // Биол. внутр. вод. 1997. №2. С.94-97.
101. Баканов А.И., Флеров Б.А. Состояние сообществ донных организмов Верхней Волги // Гидроб. ж. 1998. Т.34. №2. С.38-45.
102. Флеров Б.А., Королева Э.К. Санитарно-гигиеническая и токсикологическая характеристика природной воды Верхней Волги (территория Ярославской области) // Гигиена и санитария. 1999. №1. С.14-15.
103. Скальская И.А., Флеров Б.А. Оценка экологического состояния Верхней Волги по зооперифитону (территория Ярославской области) // Экология. 1999. №6. С.442-448.
104. Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Комбинированное действие пестицидов в сублетальных концентрациях на прирост массы пиявки *Herpobdella octoculata* // Токсикол. вест. 2000. №2. С.148-156.
105. Флеров Б.А., Томилина И.И., Кливленд Л., Баканов А.И., Гапеева М.В. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2000. № 2. С. 148-155.
106. Флеров Б.А., Власова Л.В. Определение качества воды и донных отложений малой реки Латки в зимний период // В кн.: Совр. пробл. биол. химии. экол. и экол. образ. Ярославль: ЯрГУ, 2001. С.40-43.
107. Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Экспресс-обнаружение в воде веществ, обладающих раздражающими свойствами // Токсикол. вест. 2001. № 3. С.16-21.
108. Флеров Б.А., Гремячих В.А., Изюмов Ю.Г. Изменение биологических показателей (плодовитости и размеров тела) поколений ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* Lill. при сублетальном воздействии хозяйственных сточных вод и токсикантов // Токсикол. вест. 2001. № 6. С.17-21.

109. Чалова И.В., Флеров Б.А. Действие парных смесей токсических веществ (фенол+додецилсульфат натрия) на *Ceriodaphnia affinis* при различных количественных соотношениях компонентов // Токсикол. вест. 2001. №6. С.27-30.
110. Флеров Б.А., Лапкина Л.Н., Подгорная В.А. Кровососущие пиявки – перспективные тест-объекты для биоконтроля разных сред // В кн.: Биосфер-совместимые и средозащитные технологии при взаимодействии человека с окружающей природой. Пенза: ПГУ, 2001. С.83-86.
111. Флеров Б.А., Жмур Н.С. Методика биотестирования по гибели ракообразных *Ceriodaphnia affinis* // Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: ГКОП РФ, 2002. С.4-62.
112. Флеров Б.А., Жмур Н.С. Методика биотестирования по выживаемости и плодовитости ракообразных *Ceriodaphnia affinis* // Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: ГКОП РФ, 2002. С.62-66.
113. Флеров Б.А., Гремячих В.А., Изюмов Ю.Г. Плодовитость и размеры *Ceriodaphnia affinis* Lill. в ряду поколений при действии бытовых сточных вод // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. №3. С.375-377.
114. Флеров Б.А., Филенко О.Ф. Всероссийская конференция с участием специалистов из стран ближнего и дальнего зарубежья «Современные проблемы водной токсикологии» // Гидроб. ж. 2003. №4. С.114-118.
115. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Концептуальные и методические проблемы совместного изучения зооперифитона и зообентоса // Биол. внутр. вод. 2003. №4. С.3-9.
116. Баканов А.И., Скальская И.А., Флеров Б.А. Особенности первоначального формирования группировок бентоса и перифитона в водохранилищах // Гидроб. ж. 2003. Т.39. № 6. С.25-33.

117. Флеров Б.А. Итоги исследований Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН в области водной токсикологии // В кн.: Антропогенные влияния на водные экосистемы. По матер. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. проф. Н.С. Строганова. М.: МГУ, 2005. С.60-69.
118. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А., Особенности формирования перифитонных и бентосных сообществ в водохранилищах (обзор) // Биол. внутр. вод. 2005. №1. С. 3-10.
119. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Структура зооперифитона и зообентоса реки Латки (бассейн Рыбинского водохранилища) // В кн.: Биологические ресурсы пресных вод: беспозвоночные. Рыбинск: РДПИБВВ РАН, 2005. С.328-346.
120. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Структура доминирующих комплексов зооперифитона и зообентоса верхневолжских водохранилищ // Биол. внутр. вод. 2006. № 1. С. 85-92.
121. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Сравнение трофической структуры сообществ зооперифитона и зообентоса верхневолжских водохранилищ // Биол. внутр. вод. 2006. №1. С.85-92.
122. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Таксономическая структура зооперифитона и зообентоса верхневолжских водохранилищ // Биол. внутр. вод. 2006. №2. С.75-82.
123. Chuiko G.M., Tillitt D.E., Zajicek J.L., Flerov B.A., Stepanova V.M., Zhelnin Y.Y., Podgornaya V.A. Chemical contamination of the Rybinsk Reservoir, Northwest Russia: relationship between liver polychlorinated biphenyls (PCB) content and health indicators in bream (*Abramis brama*) // Chemosphere. 2007. V. 67. No 3. P.527-536.
124. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Зооперифитон и зообентос малой реки Сестра (Московская обл.) и влияние на них антропогенной нагрузки // Биология внутр. вод. 2007. №3. (в печати).

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие.....	3
Жаворонкова О.Д. Памяти Б.А. Флерова посвящается.....	7
Флерова Г.И. Нас познакомили шахматы и музыка.....	9
Чуйко Г.М., Скальская И.А. Ученый, генератор научных идей, талантливый руководитель, учитель.....	21
Флеров Е.Б. Флеров Б.А.: опыт 30-летнего российско-американ-ского научного сотрудничества в области охраны окружающей среды.....	30
Флеров Б.А. История создания и основные итоги научной деятельности лаборатории физиологии и токсикологии водных животных за 30 лет (1973-2003 гг.).....	39
Гдовский П.А., Ружинская Н.Н., Мензиков С.А. Структурно-функциональная организация периферического отдела обонятельной системы рыб.....	46
Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Холинэстеразы пресноводных костистых рыб.....	100
Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М. Физиолого-биохимические реакции пиявок на действие фосфорорганических пестицидов..	140
Павлов Д.Ф. Некоторые проблемы загрязнения водоемов России органическими загрязняющими веществами – хлорорганическими пестицидами и полициклическими ароматическими углеводородами.....	178
Томилина И.И., Гремячих В.А., Гребенюк Л.П., Комов В.Т. Использование методов биотестирования и биоиндикации для эколого-токсикологического мониторинга пресноводных водоемов, испытывающих воздействие атмосферного загрязнения.....	205
Медведев И.В. Влияние ртутьорганических соединений природного происхождения на свободноживущих червей.....	231
Чалова И.В. Использование биотеста на <i>Ceriodaphnia affinis</i> Lilljeborg в экотоксикологических исследованиях.....	252

Скальская И.А, Баканов А.И. , Флеров Б.А. Экологические связи пресноводного зооперифитона и зообентоса и проблемы биомониторинга.....	269
Флеров Б.А. Биологические последствия загрязнения: Экономический прогресс и экологическая деградация планеты. Причины эколого-экономического кризиса на примере состояния водных ресурсов. <i>Курс лекций для студентов ВУЗов</i>	291
Список основных публикаций Б.А. Флерова.....	322
Содержание.....	337