

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

МАТЕРИАЛЫ

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

**АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ
НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ**

И

ШКОЛЫ-СЕМИНАРА

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКИ
КАЧЕСТВА ВОД, СОСТОЯНИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ И ЭКОСИСТЕМ
В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

24-29 сентября 2011 г.

ЧАСТЬ 1

БОРОК 2011



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД

ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН



РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

МАТЕРИАЛЫ

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

АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ И

ШКОЛЫ-СЕМИНАРА

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКИ
КАЧЕСТВА ВОД, СОСТОЯНИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ И
ЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

24-29 сентября 2011 г.

ЧАСТЬ 1

БОРОК 2011

УДК 574.47(063) + 504.4.064(063) + 504.06.08(063)

Материалы IV Всероссийской конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, **«Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы»** и школы-семинара **«Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки»**. В двух частях. Часть 1. (Борок, 24-29 сентября 2011 г.). – Борок, 2011. – 245 с.

Сборник материалов опубликован при финансовой поддержке:
Отделения биологических наук РАН
Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 11-04-06109-Г)

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

В части 1 материалов рассматриваются судьба, биодоступность, биотрансформация, биоаккумуляция загрязняющих веществ; биохимические, физиологические, поведенческие реакции гидробионтов на действие антропогенных факторов.

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

Материалы печатаются в авторской редакции

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

Фото на обложке: на лицевой – цветение сине-зеленых водорослей в Чебоксарском водохранилище летом 2010 г. © Г.М. Чуйко, 2011; на обороте – р. Большая Лоптюга, Удорский район, Республика Коми, лето 2010 г. © Д.М. Филиппов, 2011

ISBN 978-5-905039-09-6

© Институт биологии внутренних вод РАН, 2011
© ООО «ТР-принт», 2011

Мы, люди — не единственный вид, наносящий ущерб окружающему миру, но в наше оправдание можно сказать, что мы — единственные, кто осознаёт последствия своего поведения и пытается хоть как-то поправить дело.

Дуглас Адамс, английский писатель, драматург и сценарист

Влияние человека на окружающую среду – неизбежный результат его жизнедеятельности, как одного из элементов биосферы. Преследуя цель создать для своего существования более благоприятные условия жизни, человечество сознательно и целенаправленно изменяет среду своего обитания. По мере развития цивилизации её влияние на природу постоянно усиливается. Продолжающийся рост численности населения на планете и его все возрастающие потребности требуют вовлечения в эксплуатацию все новых и новых минерально-энергетических сырьевых ресурсов, создания и активного использования новых химических соединений, материалов и технологий, наращивания промышленного и сельскохозяйственного производства. Все это влечёт за собой масштабное поступление в природную среду веществ антропогенного происхождения, отсутствующих или встречающихся в естественных условиях в незначительных количествах, неспособных оказать существенное влияние на функциональное состояние живых организмов. Накопление этих веществ в природной среде ведёт к её загрязнению и ухудшению качества, что приводит к гибели организмов, деградации сообществ и целых экосистем.

На ранних этапах истории человечества его влияние на природу носило локальный, ограниченный характер и изменения в окружающей среде развивались достаточно медленно, в течение жизни нескольких поколений. В последнее столетие это влияние все больше и больше приобретает глобальные черты и заметные изменения происходят уже за период жизни одного-двух поколений. Полевые испытания ядерного оружия, активно проводившиеся во второй половине XX века, и аварии на атомных электростанциях в Чернобыле и Фукусиме, повлекшие за собой поступление большого количества радиоактивных веществ в окружающую среду, авария на буровой платформе в Мексиканском заливе, приведшая к утечке нефти и масштабному загрязнению её шельфовой зоны океана, возрастающий в результате сжигания углеводородов выброс углекислого газа в атмосферу, вызывающий потепление климата, трансграничный атмосферный перенос антропогенных химических веществ, способствующий их повсеместному распространению, разрушение озонового слоя – вот лишь некоторые из большого числа происходящих в последние десятилетия событий и процессов, вызванных деятельностью человека и имеющих последствия планетарного масштаба.

Окружающая среда на нашей планете едина и неделима. Однако системное представление позволяет выделить в ней элементы, упорядоченные структурными отношениями. Условно можно выделить водную, воздушную и наземную среды, однако все происходящие в них процессы взаимосвязаны. Любое масштабное изменение в одной из них приводит к глобальному изменению всей окружающей среды. Джеральд Даррелл, английский писатель, натуралист и учёный-зоолог написал по этому поводу: «Наш мир так же сложен и уязвим, как паутина. Коснитесь одной паутинки, и дрогнут все остальные. А мы не просто касаемся паутины, – мы оставляем в ней зияющие дыры».

Вода играет ключевую роль в существовании жизни на Земле. Она покрывает большую часть поверхности нашей планеты, образуя Мировой океан и водные объекты суши. От качества водной среды зависит судьба не только водных, но во многом и наземных живых организмов. В связи с этим вспоминаются слова Антуана де Сент-Экзюпери, французского писателя, поэта и профессионального летчика: "Вода!... Ты не просто необходима для жизни, ты и есть жизнь...Ты не терпишь примесей, ты не выносишь ничего чужеродного, ты - божество, которое так легко вспугнуть..."

В связи с антропогенным загрязнением водной среды современное состояние многих водных объектов можно охарактеризовать как неудовлетворительное. Однако ошибочно считать, что в обозримом будущем человечеству удастся полностью исключить свое негативное влияние на окружающую среду в целом, и на водную – в частности. Какие бы совершенные технологии малоотходного производства и способы очистки выбросов и стоков не внедрялись, прямо или косвенно человек своей деятельностью будет воздействовать на воды суши и океанов. Поэтому усилия общества должны быть направлены на то, чтобы оптимизировать его взаимоотношение с окружающей средой и минимизировать негативные последствия воздействия на неё. Это диктует необходимость проведения исследований судьбы загрязняющих веществ в водных экосистемах, их биодоступности, биотрансформации, биоаккумуляции, влияния на организмы и структурно-функциональные характеристики отдельных популяций гидробионтов и водных экосистем в целом, а также нормирования допустимого уровня содержания этих веществ в водных объектах. На решение данных задач и направлены усилия современной водной экотоксикологии.

Публикуемые ниже материалы являются обобщением результатов исследований специалистов из России и стран ближнего зарубежья, выполненных в области водной экотоксикологии за последние три года, прошедшие с момента предыдущей конференции «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» (Борок, 2008).

д.б.н. Г.М. Чуйко

СУДЬБА, БИОДОСТУПНОСТЬ, БИОТРАНСФОРМАЦИЯ, БИОАККУМУЛЯЦИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

УСКОРЕНИЕ БИОДЕСТРУКЦИИ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ

А.Р. Амирова, А.С. Григориади, Н.А. Киреева, Т.С. Онегова

*Башкирский государственный университет
450074 Уфа, ул. Заки Валиди 32, Россия, vodop@yandex.ru*

В настоящее время одними из основных источников загрязнения окружающей среды в регионах с развитой промышленностью являются нефть и нефтепродукты. Они попадают в реки и водоемы вследствие аварийных разливов, утечек из трубопроводов, при аварийном сбросе больших объемов нефтесодержащих сточных вод из временных амбаров, накопителей, отстойников промышленных предприятий и городской канализации (Квасников, Клошникова, 1981; Пашаян, Нестеров, 2008).

Загрязнение водоемов поллютантами ухудшает качество воды и нарушает естественное равновесие. Удаление нефтяных углеводородов механическим путем малоэффективно. В настоящее время существуют следующие основные подходы биологических методов очистки: внесение чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов; использование ассоциаций микроорганизмов-деструкторов; активизация аборигенной нефтеокисляющей микробиоты (Вельков, 1995; Плешакова и др., 2005). Наиболее перспективной, на наш взгляд, является технология, основанная на активации естественной микробиоты при внесении питательных элементов.

В данной работе представлены результаты биоремедиации водоема, с использованием активного ила целлюлозно-бумажного (биопрепарата Белвитамил). В результате аварии на СП “Белые ночи” было замазучено 0,5 га озера и прибрежных участков. Содержание нефтепродуктов в различных точках водоема варьировало от 68,3 до 229,3 г/л. В целях рекультивации на водную поверхность было внесено 3 тонны биопрепарата Белвитамил. Биопрепарат представляет собой сухой остаток активного ила очистных сооружений целлюлозно-бумажного производства. Активный ил богат азотом, фосфором, калием, железом и другими макро- и микроэлементами, широким спектром органических веществ. Биопрепарат представляет собой готовую смесь промышленной ассоциации аэробно-анаэробных микроорганизмов, углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ) представлены, в основном, родами *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Desulfimbrio*, *Pseudomonas* (всего 10 видов) (Онегова и др., 2006).

Эффективность биопрепарата оценивали по содержанию остаточных углеводородов нефти и микробиологическим показателям. Содержание нефтепродуктов в воде определяли методом ИК-спектроскопии на приборе АН-1. Определение численности микроорганизмов производили общепринятыми методами посева воды на твердые и жидкие питательные среды. Дегидрогеназная активность определялась спектрофотометрическим методом.

Уже через 20 дней после обработки биопрепаратом озера на территории СП “Белые ночи” содержание нефтепродуктов в различных точках отбора проб снизилось в среднем на 13,9-16,2 % как за счет улетучивания легких фракций, так и интенсивного разложения углеводородокисляющими микроорганизмами, численность которых возросла на порядок. Через 1,5 месяца степень разложения углеводородов достигла 45-50%, а через 2,5 месяца после применения сухого активного ила – 84,5-92,5% (табл.).

Таблица. Содержание нефтепродуктов в водоеме на территории СП “Белые ночи” в разные сроки наблюдения, г/л

Точки отбора проб	Срок наблюдения, сут			Убыль углеводородов за 2,5 месяца, %
	20	45	75	
1	57,3±5,2	32,2±4,7	5,9±0,2	91,3
2	103,4±4,4	57,5±6,8	13,7±0,5	88,7
3	126,0±7,1	52,8±3,9	22,4±2,0	84,5
4	170,4±2,4	100,5±11,1	19,3±1,3	90,6
5	197,2±9,5	109,6±13,5	17,2±0,7	92,5

Визуально изменилось состояние поверхности водоема. Первоначально нефтяная пленка потеряла маслянистый блеск, затем она коагулировалась, исчез характерный мазутный запах.

По мере разрушения нефти количество УОМ в воде увеличивалось и достигло значительных величин через 20 дней, а максимума – через 1 месяц (рис. 1). В последующем, по мере уменьшения концентрации нефти в воде, отмечалась тенденция к стабилизации численности разлагающих ее микроорганизмов. Возможно, наряду с компонентами нефти УОМ использовали компоненты Белвитамила в качестве источника питания и энергии.

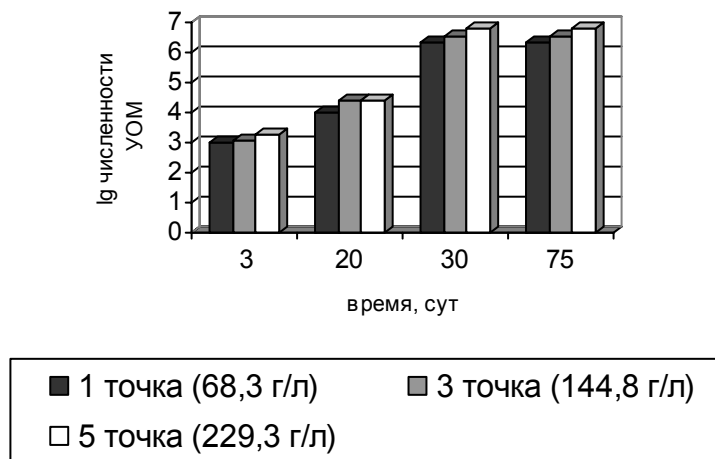


Рис. 1. Динамика численности УОМ в водоеме в процессе его биологической очистки

Известно, что ни один полный биологический процесс не совершается без участия дегидрогеназ. Эта группа окислительно-восстановительных ферментов катализирует первые этапы биологического окисления многих органических веществ, в том числе и углеводов. Высокая чувствительность дегидрогеназ к химическим веществам широко используется для оценки токсичности промышленных вод.

Изучение дегидрогеназной активности в озерной воде показало, что первоначально активность этого фермента значительно возросла (рис. 2). В дальнейшем по мере очищения водоема от нефтепродуктов, дегидрогеназная активность снижалась и стабилизировалась на определенном уровне, что свидетельствует о нормализации окислительно-восстановительных процессов. Поскольку высокий титр углеводородокисляющих микроорганизмов в озерной воде, в отличие от активности дегидрогеназы, регистрировался и на последних этапах и по завершении процесса деструкции нефтепродуктов, показатель активности данного фермента может использоваться в качестве более чувствительного теста, позволяющего судить о направлении окислительных процессов в рекультивируемом водоеме.

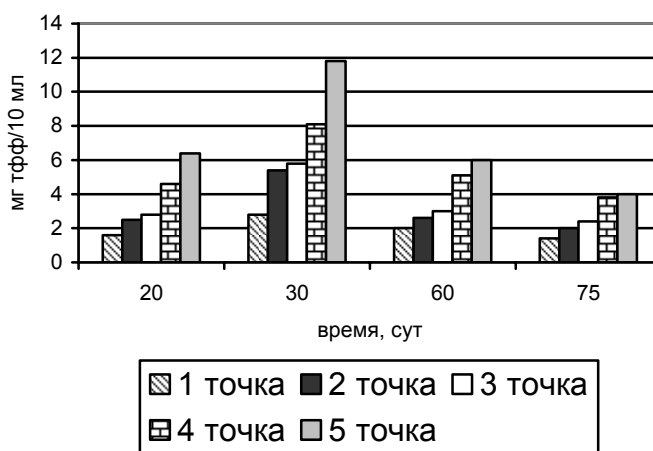


Рис. 2. Динамика изменения дегидрогеназной активности в водоеме СП «Белые ночи» в процессе биологической очистки

К концу летнего сезона содержание нефти в воде удалось снизить до предельно допустимого уровня; рекультивированные участки были приняты Нижневартовским комитетом по экологии.

Таким образом, биотехнология интенсификации самоочищения воды от нефти с помощью Белвитамила успешно прошла промышленные испытания на загрязненных нефтью озерных экосистемах. Ее применение позволило значительно улучшить экологическое состояние водоемов и почти полностью ликвидировать их загрязнение, что было подтверждено как визуальными наблюдениями так и данными химических анализов. Основным механизмом, позволяющим ускорить удаление нефти с поверхности воды, можно считать повышение титра и активности углеводородокисляющих микроорганизмов, которые были зарегистрированы как во время рекультивации, так и по ее завершении.

Список литературы

- Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. – 1995. – № 3-4. – С.20-27.
- Квасников Е.М., Ключникова Т.М. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. - Киев: Наукова думка, 1981. -131 с.
- Онегова Т.С., Волочков Н.С., Киреева Н.А. и др. Способы очистки почвы и водоемов от нефтяных загрязнений. Патент №2279472. РФ. Бюлл. изобр. 2006, №19.
- Пашаян А.А., Нестеров А.В. Проблемы очистки загрязненных нефтью вод и пути их решения // Экология и промышленность России. – 2008. – май. – С. 32-35.
- Плешакова Е.В. Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры // Биотехнология. – 2005. – №1. – С. 42-50.

ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ В ПЕЧЕНИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ АЗОВСКОГО МОРЯ В 2009–2010 ГГ.

А.В. Войкина, Л.А. Бугаев

*Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГУП «АзНИИРХ»)
344007, Ростов-на-Дону, ул. Береговая 21В, Россия, bugayov@list.ru*

Интенсивное возделывание сельскохозяйственных культур в Ростовской области и Краснодарском крае невозможно без применения средств защиты растений. По данным исследований сотрудников Федерального научного центра гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, в Ростовской области в последние годы пестицидная нагрузка на поля составляла около 2 кг/га по действующим веществам (Ракитский, 2004). В настоящее время в перечень разрешенных для применения включено более 24 тыс. композиций пестицидов на основе 600 действующих веществ.

Химические вещества, используемые в сельском хозяйстве, в растворенном и твердом виде вносятся в акваторию Азовского моря, где происходит их седиментация в донных отложениях или разбавление в водной массе. Загрязнение моря пестицидами и продуктами их разложения весьма опасно для его нормального биологического функционирования.

При рациональном применении химикатов в сельском хозяйстве в водоемы попадает минимальное количество препаратов (Санитарная охрана..., 1974 г). Несмотря на сравнительно низкие концентрации в воде и донных отложениях, пестициды могут довольно интенсивно накапливаться в жизненно важных органах и тканях практически всех гидробионтов моря, особенно у рыб, как высшего трофического звена в водных экосистемах. В организм рыб пестициды поступают в основном осмотически через жабры и частично кожу, распределяются по всем органам и тканям, концентрируясь в наибольших количествах во внутренних органах (печени, почках, стенке кишечника, селезенке).

Целью данного исследования являлось выявление уровня накопления пестицидов в печени производителей бычка кругляка, тарани, судака и пиленгаса. Все исследуемые объекты занимают различные экологические ниши в экосистеме Азовского моря, следовательно, степень накопления поллютантов, в том числе и пестицидов, в организмах исследуемых видов рыб зависит от ряда факторов: ареала обитания, миграционной активности, спектров питания и др.

Исследования проводились в 2009–2010 гг. в весенний и осенний периоды в Азовском море и Таганрогском заливе. В полевых условиях производилось первичное обследование рыб, которое

заключалось в регистрировании основных изменения внешних покровов и состояния естественных отверстий. При осмотре внутренних органов особое внимание уделялось исследованию печени: устанавливалась её форма и величина, цвет, консистенция, гиперемия или анемия, кровоизлияния. Сбор морфологических данных включал в себя определение длины тела рыб, массы тушки без внутренних органов, массы печени и расчета индекса печени.

Для химико-токсикологических исследований производился анализ содержания пестицидов в печени рыб. Акцентирование на этом органе связано с тем, что печень в организме играет большую роль по детоксикации вредных веществ, а высокое содержание жира обеспечивает условие для накопления в органе липофильных веществ, к которым относятся и пестициды нового поколения. У выловленных производителей перечисленных выше видов рыб отбирались пробы тканей печени. Печень замораживалась и хранилась при температуре -18°C для последующего лабораторного анализа.

Экстракция веществ проводилась согласно принятым методикам, описанным в методических указаниях и справочниках по аналитической экотоксикологии (Другов, Родин, 2002а, б). Химический анализ предусматривал количественное определение содержания пестицидов в печени рыб методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Условия хроматографирования были следующие: колонка 4.6×150 мм Reprosil-PUR ODS-3,5 мкм (Элсико, Россия); рабочая длина волны – 230 нм; термостатирование – $+40^{\circ}\text{C}$; подвижная фаза: ацетонитрил – 0.005 М ортофосфорная кислота в соотношении 60%:40% (по объему) в изократическом режиме; скорость потока 0.6 мл/мин; объем вводимого в хроматограф экстракта пробы – 10 мкл.

Результаты исследований. В ходе токсикологических исследований было обследовано по 30–40 половозрелых особей каждого вида рыб в каждый из сезонов наблюдения.

Патолого-анатомический анализ рыб, как в весенний, так и осенний периоды, показал отсутствие признаков, характерных для острой или хронической интоксикации. К постоянным признакам при большинстве токсикозов рыб относят различные формы нарушения кровообращения в жаберном аппарате: застой крови, кровоизлияния, токсический отек, увеличение объема и дряблости жабр. Изменений в жаберном аппарате не было обнаружено ни у одной особи. Состояние печени у представителей всех исследуемых видов рыб было удовлетворительным.

Сравнительный анализ морфологических параметров рыб, принадлежащих к разным экологическим группам в период 2009–2010 гг. приведен в таблице 1. Видно, что средняя длина рыб внутри конкретного вида, выловленных в разные сезоны, статистически не различается. Сезонная динамика условий среды отражается на морфофизиологических показателях осенью индекс печени был наиболее высокий, что можно объяснить подготовкой к наиболее напряженным и сложным условиям существования в зимний период – синдром зимнего стресса (Лэмли, 1993).

Таблица 1. Морфологические показатели производителей исследуемых видов рыб

Вид	Сезон	Длина, см	Масса тушки, г	Масса печени, г	Индекс печени, %
Бычок кругляк	весна	$18,7 \pm 0,32$	$101 \pm 4,3$	$4,8 \pm 0,63$	$4,4 \pm 0,42$
	осень	$14,5 \pm 0,32$	$68 \pm 4,8$	$4,3 \pm 0,49$	$5,8 \pm 0,42$
Пиленгас	весна	$42,6 \pm 1,30$	$998 \pm 84,5$	$19,6 \pm 2,27$	$1,8 \pm 0,12$
	осень	$38,8 \pm 1,97$	$846 \pm 91,7$	$23,5 \pm 2,59$	$2,9 \pm 0,18$
Судак	весна	$40,3 \pm 1,79$	$770 \pm 107,2$	$16,0 \pm 2,86$	$1,5 \pm 0,21$
	осень	$37,9 \pm 1,65$	$680 \pm 81,8$	$10,8 \pm 1,26$	$2,1 \pm 0,06$
Тарань	весна	$18,5 \pm 0,29$	$113 \pm 6,1$	$2,0 \pm 0,18$	$1,2 \pm 0,11$
	осень	$20,3 \pm 0,25$	$152 \pm 5,8$	$1,8 \pm 0,14$	$1,7 \pm 0,08$

Степень накопления пестицидов в тканях печени рыб зависит от ряда факторов: концентрации пестицидов в воде и его способности кумулироваться в жиросодержащих тканях, скорости обменных процессов в организме рыб, особенностей гидрологического и гидрохимического режима водоёма, сезона года и др.

У производителей бычка кругляка в весенний период было обнаружено 16 наименований пестицидов, а в осенний – 10 (рис. 1). Видно, что весной уровень пестицидного накопления в

печени рыб был выше, чем осенью. Наиболее часто в весенний период встречались димоксистробин, ипродион, метрибузин, пенцикурон, фамоксадон, флорасулам, флумиоксазин и этабоксам (более 50 % от общей выборки). Осенью наиболее часто обнаруживался имазалил (60 %).

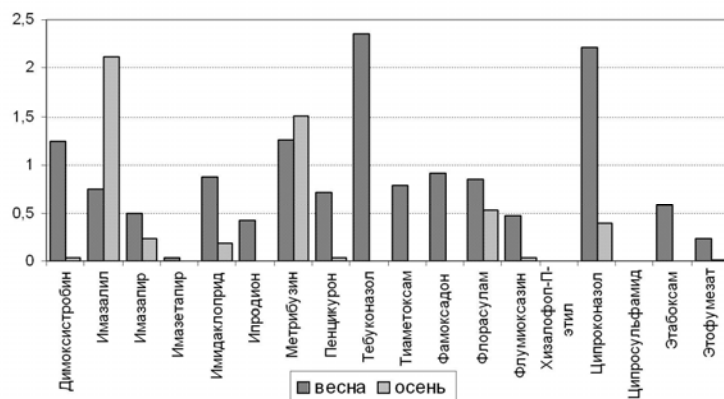


Рис. 1. Средние значения накопления пестицидов в печени бычка кругляка (мкг/г сырой массы)

Уровень интоксикации, как в количественном, так и в качественном выражении у пиленгаса в весенний период был выше, чем в осенний (рис. 2) Наиболее часто в весенний период были отмечены: флумиоксазин (44 %) и метрибузин (45 %). В осенний период наиболее часто обнаруживались имазалил (58 %) и имидаклоприд (58 %); остальные действующие вещества в обследованной выборке отмечались реже, или единично.

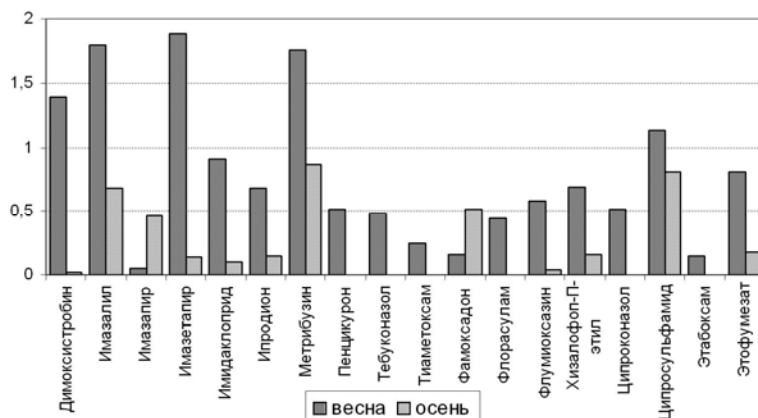


Рис. 2. Средние значения накопления пестицидов в печени пиленгаса (мкг/г сырой массы)

Токсикологический анализ судака показал наличие в весенней выборке обследованных рыб 18 наименований пестицидов, а в осенней - 15 (рис. 3). Весной наиболее часто отмечались имазетапир (55 %), метрибузин (60 %) и флумиоксазин (40 %). Осенью имидаклоприд встречался во всей выборке рыб, а имазетапир у 80 %, остальные токсиканты выявлялись реже.

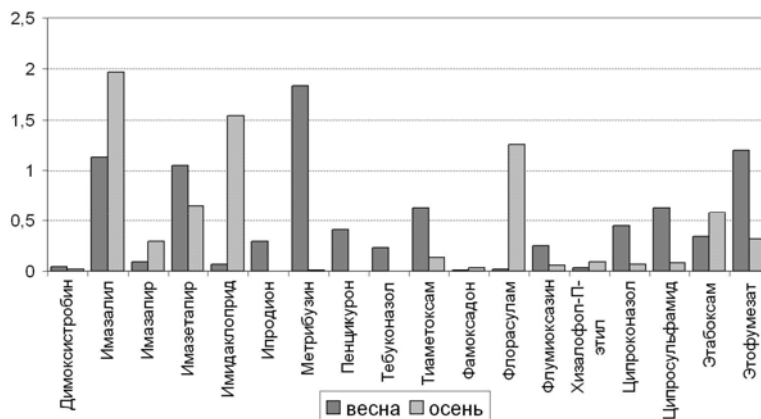


Рис. 3. Средние значения накопления пестицидов в печени судака (мкг/г сырой массы)

В печени тарани в весенний период обнаружено 18 пестицидов (рис. 4), что сопоставимо с количеством обнаруженных токсикантов в осенний период. Наиболее часто встречались в весенний период метрибузин (60 %), пенцикурон (60 %) и флумиоксазин (53 %). В осенний период были отмечены димоксистробин (60 %), имазапир (80 %), фамоксадон (80 %) и флорасулам (60 %). Остальные вещества в обследованной выборке рыб встречались менее, чем в половине случаев.

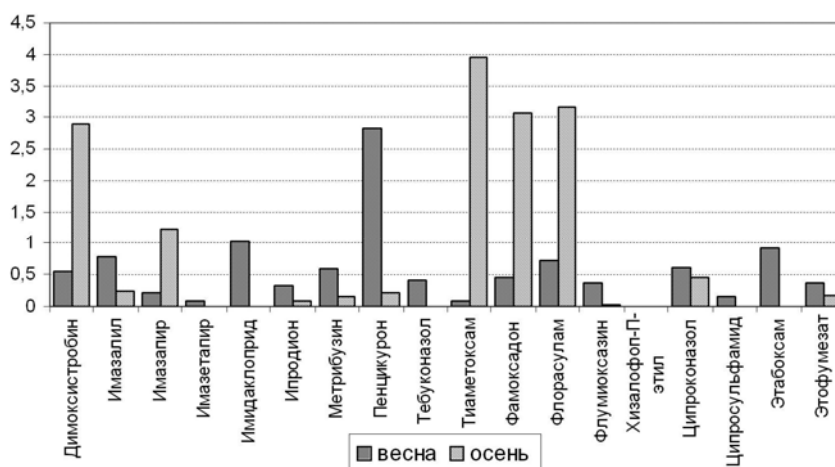


Рис. 4. Средние значения накопления пестицидов в печени тарани (мкг/г сырой массы)

Обобщая полученные данные можно отметить, что наибольший уровень накопления токсических поллютантов в печени рыб был отмечен в весенний сезон. Данные факты согласуются с результатами эколого-токсикологических исследований среды обитания гидробионтов: максимальное загрязнение воды и донных отложений любыми группами поллютантов (нефтяные углеводороды, хлорорганические вещества, соли тяжелых металлов и т.д.) выявляется в первой половине весны. Это объясняется сезонными особенностями поступления и циркулирования персистентных веществ в экосистему водоема вместе с талыми поверхностными и грунтовыми водами.

Сравнение уровня накопления пестицидов в печени рыб в период 2009–2010 гг, относящихся к разным экологическим группам, но выловленных примерно в одни сроки, показало, что весной уровень пестицидного накопления в тканях бычка кругляка, тарани, судака и пиленгаса был выше, чем осенью. Анализ показал, что в обследованной выборке всех видов рыб в весенний период наиболее часто встречались метрибузин, флумиоксазин, фамоксадон и пенцикурон. Было отмечено, что общий уровень интоксикации у судака и пиленгаса был ниже, чем у тарани и бычка кругляка. Это можно объяснить тем, что судак и пиленгас обладают большей миграционной активностью и обитают в более благоприятных слоях водной экосистемы. Для бычка кругляка характерна низкая миграционная активность, что позволяет его рассматривать как вид-индикатор состояния среды обитания в районе отлова. Основная часть поколений тарани распределяется в Таганрогском заливе, который испытывает существенный прессинг антропогенного происхождения.

В связи с обнаружением в тканях рыб токсических веществ, закономерен вопрос о влиянии накопления пестицидов на физиологическое состояние рыб. При оценке экологического состояния водоемов, физиологические показатели (данные гематологических и биохимических исследований, индекс печени и др.), имеют очевидные преимущества, так как непосредственно отражают «ответы» биоты на загрязнение.

Информативную картину для понимания изменчивости морфофизиологических параметров дают гематологические показатели (таблица 2).

Известно, что гематологические исследования позволяют установить качественные и количественные изменения форменных элементов крови. Форменные элементы крови при интоксикации подвергаются дистрофии и некробиозу, в эритроцитах регистрируют анизоцитоз, пойкилоцитоз, шистоцитоз, полихромазию и другие патологические изменения. Оценка состояния производителей бычка кругляка, тарани, судака и пиленгаса по показателям крови свидетельствует о том, что состояние рыб в целом было нормальным. Осенью преобладали нарушения, связанные с водно-солевым обменом и гипоксией, что сопровождалось гипохромазией

и набуханием эритроцитов. Причиной подобных отклонений от нормы может выступать аномально жаркие летние периоды 2009–2010 гг. Нарушений, связанные с токсическим стрессом обнаружены не были.

Таблица 2. Гематологические показатели бычка кругляка, пиленгаса, судака и тарани

Сезон	ИЭ, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Нейтрофилы, %	Полиморфноядерные, %	Морфологические нарушения, частота встречаемости
Весна Бычок кругляк	$\frac{2,9 \pm 0,30}{1,5-6,4}$	$\frac{97,0 \pm 0,30}{94,5-98,5}$	$\frac{1,2 \pm 0,11}{0,5-2,0}$	$\frac{1,1 \pm 0,19}{0,0-3,0}$	$\frac{0,6 \pm 0,15}{0,0-2,0}$	гипохромия (29,4 %), пойкилоцитоз (5,9 %), набухание эритроцитов (17,6 %), шистоцитоз (5,9 %)
Весна Пиленгас	$\frac{2,8 \pm 0,13}{1,0-4,7}$	$\frac{97,7 \pm 0,14}{95,5-99,0}$	$\frac{1,0 \pm 0,09}{0,0-3,5}$	$\frac{0,8 \pm 0,09}{0,0-2,0}$	$\frac{0,6 \pm 0,11}{0,0-3,5}$	гипохромия (68,3 %), пойкилоцитоз (9,8 %), анизоцитоз (2,4 %), смещение ядер эритроцитов (12,2%), набухание эритроцитов (14,6 %), тени ядер эритроцитов (12,2 %)
Весна Судак	$\frac{2,9 \pm 0,45}{1,5-6,4}$	$\frac{98,5 \pm 0,16}{97,5-99,0}$	$\frac{0,9 \pm 0,12}{0,5-1,5}$	$\frac{0,5 \pm 0,17}{0,0-1,5}$	$\frac{0,2 \pm 0,08}{0,0-0,5}$	гипохромия (90,0 %), тени ядер эритроцитов (10,0 %)
Весна Тарань	$\frac{2,3 \pm 0,22}{0,0-5,3}$	$\frac{97,8 \pm 0,22}{94,5-100,0}$	$\frac{0,8 \pm 0,13}{0,0-3,0}$	$\frac{0,6 \pm 0,11}{0,0-2,0}$	$\frac{0,8 \pm 0,11}{0,0-2,0}$	гипохромия (18,5 %), пойкилоцитоз (11,1 %), коагуляция цитоплазмы эритроцитов (3,7 %), смещение ядер эритроцитов (14,8%), набухание эритроцитов (14,8 %)
Осень Бычок кругляк	$\frac{3,0 \pm 0,16}{1,5-5,8}$	$\frac{97,7 \pm 0,14}{95,5-100,0}$	$\frac{1,0 \pm 0,07}{0,0-2,0}$	$\frac{0,5 \pm 0,10}{0,0-2,5}$	$\frac{0,9 \pm 0,09}{0,0-2,0}$	гипохромия (90,7 %), пойкилоцитоз (18,6 %), анизоцитоз (9,3 %), смещение ядер эритроцитов (16,3%), набухание эритроцитов (11,6 %), тени ядер эритроцитов (11,6 %)
Осень Пиленгас	$\frac{2,2 \pm 0,18}{1,0-3,6}$	$\frac{98,0 \pm 0,16}{97,0-99,0}$	$\frac{1,0 \pm 0,10}{0,0-1,5}$	$\frac{0,1 \pm 0,05}{0,0-0,5}$	$\frac{0,9 \pm 0,13}{0,0-2,0}$	гипохромия (40,0 %), пойкилоцитоз (10,0 %), смещение ядер эритроцитов (30,0%), набухание эритроцитов (80,0 %), тени ядер эритроцитов (25,0 %)
Осень Судак	$\frac{2,4 \pm 0,27}{1,5-4,2}$	$\frac{97,8 \pm 0,23}{97,0-99,0}$	$\frac{1,1 \pm 0,13}{0,5-2,0}$	$\frac{0,5 \pm 0,16}{0,0-1,5}$	$\frac{0,5 \pm 0,20}{0,0-1,5}$	гипохромия (81,8 %), пойкилоцитоз (18,2 %), вакуолизация (9,1 %), смещение ядер эритроцитов (9,1 %), набухание эритроцитов (63,6 %)
Осень Тарань	$\frac{3,7 \pm 0,55}{2,6-5,8}$	$\frac{97,8 \pm 0,46}{96,5-99,0}$	$\frac{0,8 \pm 0,25}{0,0-1,5}$	$\frac{0,8 \pm 0,30}{0,0-1,5}$	$\frac{0,6 \pm 0,29}{0,0-1,5}$	гипохромия (60,0 %), набухание эритроцитов (60,0 %)

Примечание: ИЭ - интенсивность эритропоэза.

Анализ токсикологического состояния бычка кругляка, тарани, судака и пиленгаса позволяет сделать заключение о том, что современный уровень пестицидного загрязнения акватории Азовского моря не оказывает выраженного негативного влияния на физиологическое состояние исследуемых видов рыб. Тем не менее, несмотря на небольшую историю применения этих пестицидов в сельском хозяйстве, обнаружение их в тканях рыб является сигналом для актуализации мониторинговых наблюдений с целью предотвращения отрицательных влияний на количественные и качественные параметры экосистемы Азовского моря.

Список литературы

Другов Ю.С., Родин А.А. Пробоподготовка в экологическом анализе. С-Пб: «Анатолия», 2002. – 755 с.
Другов Ю.С., Родин А.А. Экологическая аналитическая химия. С-Пб: «Анатолия», 2002. – 464 с.

Ракитский В.Н., Синицкая Т.А. Ассортиментный индекс пестицидной нагрузки территорий в системе социально-гигиенического мониторинга // Гигиена и санитария, – 2004, – № 5. – С. 38–40.
Санитарная охрана внешней среды / Под ред. В.А. Руденко. Л., –1974. –191 с.
Lemly A.D. Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. Aquat. Toxicol. –1993, – vol. 27. – PP. 133–158.

СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ВОДЕ И ВОДНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ Р. ЕНИСЕЙ НА РАЗНОМ УДАЛЕНИИ ОТ Г. КРАСНОЯРСКА

Н.С. Давыдова¹, Т.А. Зотина², Е.А. Трофимова²

¹Сибирский Федеральный Университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, 660074 г. Красноярск, Россия, n.s-davidova@mail.ru

²Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, Россия

Загрязнение тяжелыми металлами (ТМ) – одна из причин ухудшения качества природных вод, поэтому большое значение имеет мониторинг содержания металлов в водных экосистемах. ТМ токсичны для живых организмов, участвуют в биологических процессах, передаются по трофическим цепям [1]. Река Енисей – одна из крупнейших рек – загрязнена тяжелыми металлами в результате деятельности промышленно-коммунального комплекса г. Красноярск [2; 3]. Загрязнение водных экосистем обычно оценивают по содержанию загрязняющих веществ в воде, донных отложениях и биоте. Макрофиты – важное звено пресноводных экосистем, представители погруженных макрофитов широко используются как биоиндикаторы при мониторинге техногенного загрязнения [5; 6]. В данной работе изучалось содержание тяжелых металлов в воде и водной растительности р. Енисей на разном удалении от г. Красноярск с целью оценки возможностей их использования для мониторинга.

Отбор проб воды и растений проводился в прибрежной зоне реки Енисей, вдоль восточного берега на расстоянии до 110 км от г. Красноярск вниз по течению реки с марта по ноябрь 2009-2010 гг. Контролем служила точка отбора, расположенная в 12 км выше Красноярск. Для исследования использовали 3 вида водных растений: *Elodea canadensis* Michx. (элодея), *Potamogeton lucens* L. (рдест), *Ulothrix zonata* Kuitz. (улотрикс) – относящихся к числу массовых на данном участке реки (Зотина, 2008). После отбора растения неоднократно промывали водопроводной и дистиллированной водой, высушивали при 105 °С и измельчали. Пробы воды на содержание металлов фильтровали через мембраны с размером пор 1.2 мкм (RAWP, Millipore). Измерение pH проводили с помощью pH-метра (Radelkis, Budapest). Для определения содержания металлов пробы минерализовали методом мокрого окисления в смеси азотной и хлористой кислот 1:1. Содержание Na и K в пробах определяли на пламенном фотометре FLAPHO-4 (Carl Zeiss, Jena); Ca и Mg определяли атомно-абсорбционным методом в воздушно-ацетиленовом пламени на спектрофотометре ASS-IN (Carl Zeiss, Jena); Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, Cd и Pb – на спектрофотометре «ААС Квант 2А». Пределы обнаружения (мг/л) для Na, Ca и K составляют 0.1; Mg, Fe, Ni, Pb и Co – 0.01; Zn – 0.001; Cr – 0.006; Cu и Mn – 0.003. В качестве эталонов определяемых элементов использовали государственные стандартные образцы (ОАО «Уральский завод химреактивов»). Анализы выполнены аналитической лабораторией Института биофизики СО РАН.

Концентрации металлов в воде варьировали в диапазоне 0.35-0.9 мг/л для K, 1.5-3.25 мг/л для Na, 14.9-60 мг/л для Ca, 1.6-6.1 мг/л для Mg, 0.0083-0.1 мг/л для Fe, 0.0004-0.0098 мг/л для Cu, 0.001-0.03 мг/л для Zn, 0.001-0.01 мг/л для Mn, 0.0002-0.01 мг/л для Ni, 0.0002-0.003 мг/л для Pb, до 0.002 мг/л для Cr. Полученные нами величины не превышают ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения. Величины pH воды изменялись от 5.5 до 7.4, минимальное значение зарегистрировано вблизи п. Березовка (24 км от Красноярск).

Содержание Pb, K, Fe, Mn в сестоне было больше, чем в фильтрате воды в 1.3, 1.6, 1.7, 12 раз соответственно. Концентрации Ca, Na, Mg, Ni, Cu, Zn были больше в воде, чем в сестоне. Также в сестоне был зарегистрирован кобальт (0.0004 мг/л), который не обнаруживался в воде. Кобальт регистрировался в нефильтрованной воде р. Енисей другими авторами [4]. Тенденций по изменению концентрации металлов в воде и сестоне на разном удалении от Красноярск не выявлено, что согласуется с данными других авторов [4], использовавших для анализа нефильтрованную воду р. Енисей.

Удельное содержание металлов в биомассе водных растений в 2009-2010 гг. представлено в таблице.

Удельная концентрация Ni, Mg, Co, Cr, Pb и Fe в биомассе *U. zonata* была больше, чем в биомассе *E. canadensis* и *P. lucens* в 1.4, 1.5, 2.5, 2.7, 5.6 и 10 раз соответственно. Концентрация Mn была в 1.9 раза больше в биомассе *E. canadensis*, чем в *U. zonata*, и 1.2 раза больше, чем в *P. lucens*. Содержание Ca и K было близким в биомассе *E. canadensis* и *P. lucens*, но в 1.5 и 5 раз выше, чем в пробах *U. zonata*. Концентрации Cu, Zn и Cd были самыми высокими в пробах *E. canadensis*. По удельному содержанию Ni, Mg, Co, Cr, Pb и Fe водные растения можно расположить в следующей последовательности *U. zonata* > *P. lucens* > *E. Canadensis*; по содержанию K, Mn и Cd: *E.canadensis* > *P. lucens* > *U. zonata*; по содержанию Ca: *P. lucens* > *E.canadensis* > *U. zonata*; по содержанию Zn и Cu: *E.canadensis* > *U. zonata* > *P. lucens*.

Таблица. Диапазон концентраций металлов (мг/кг сух. веса; для Fe, K, Ca, Mg, Mn – г/кг) в биомассе растений р. Енисей на разном удалении от г. Красноярска.

Металл	<i>Ulotrix zonata</i>	<i>Elodea canadensis</i>	<i>Potamogeton lucens</i>
Fe	1.7-15.3	0.5-1.8	0.5-1.9
Cu	7.2-27.5	4.8-15.3	7.7-12.4
Zn	35.5-136.2	49.3-82.8	32.7-86.3
Mn	0.182-0.559	0.273-1.570	0.139-0.857
Ni	1.8-44	5.9-21.3	6.2-20.2
Pb	0.117-27.3	0.1-4.6	0.2-1.9
Co	1.9-6.7	1.3-2.6	0.9-4
Cr	2.4-46.8	3.9-14.2	2-19.8
Cd	0-1.2	0.03-0.8	0.1-0.6
K	1.1-9.4	18.5-37	16-34
Ca	2.1-50.1	11.8-28.1	7.4-48.2
Mg	3.8-6.2	2.5-3.5	2.4-3.2

Концентрации металлов в биомассе *E. canadensis* и *P. lucens* менялись одинаково при удалении от Красноярска. Концентрации Fe, Pb, Co, Ni, Cr, Zn и Cu в биомассе элодеи и рдеста находились на одном уровне на расстоянии до 86 км от центра Красноярска, а далее концентрации этих металлов, за исключением цинка и меди, значительно возрастали (Рис. 1).

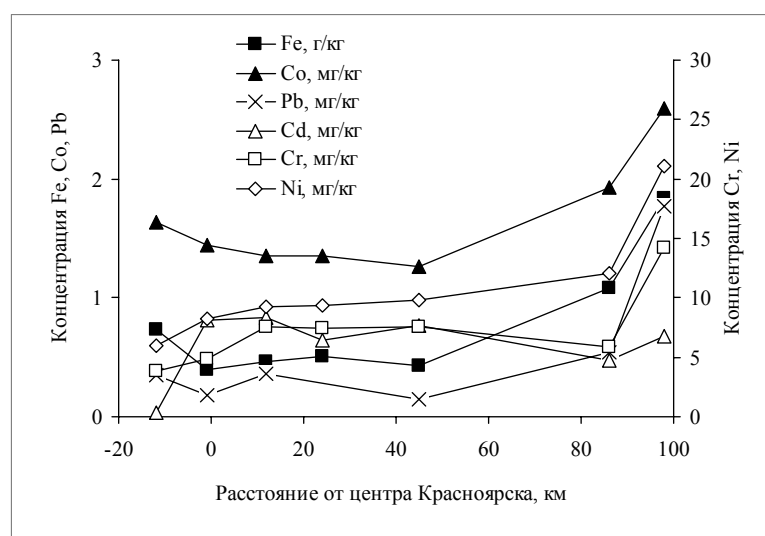


Рис. 1. Содержание тяжелых металлов в биомассе *E. canadensis* на разном удалении от центра г.Красноярска (0 км) по течению р. Енисей.

Содержание металлов (Co, Ni, Cr, Pb) в биомассе улотрикса увеличивалось на расстоянии до 45 км от центра Красноярска, а затем снижалось (Рис. 2). Исключение составили Zn и Cu, концентрации которых резко возрастали на участке от 45 до 86 км (Рис. 2). Самые высокие концентрации кадмия в биомассе улотрикса зарегистрированы на участке от 12 до 45 км от центра города, что свидетельствует об антропогенном загрязнении прибрежной зоны реки предприятиями, расположенными на этом участке. Для рдеста и элодеи аналогичного изменения концентрации кадмия в биомассе не выявлено.

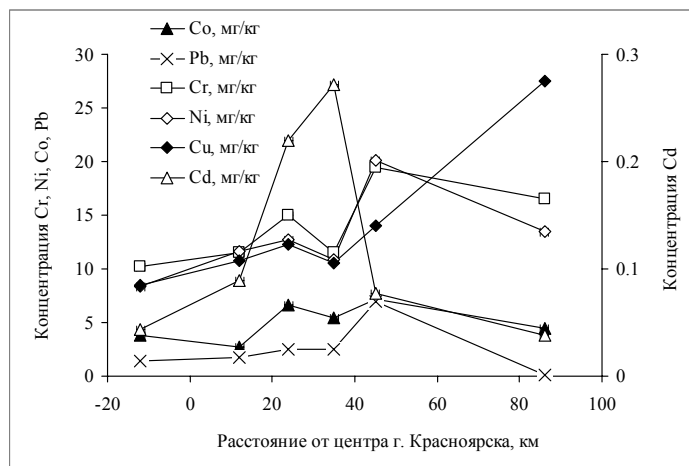


Рис. 2. Содержание тяжелых металлов в биомассе *Ulothrix zonata* на разном удалении от центра г.Красноярска (0 км) по течению р. Енисей.

Таким образом, концентрации металлов в фильтрованной воде р. Енисей на исследованном участке не превышали ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения. Не было выявлено зависимости концентрации металлов в воде и сестоне от расстояния от г.Красноярска.

Сравнение трех видов водных растений показало, что эпилитные нитчатые зеленые водоросли *Ulothrix zonata* характеризуются большим накоплением ряда тяжелых металлов (Ni, Mg, Co, Cr, Pb, Fe), чем укорененные макрофиты рдест (*P.lucens*) и элодеи (*E.canadensis*).

Отмечены различия в изменении концентраций ряда металлов в биомассе улотрикса и укорененных макрофитов элодеи и рдеста при удалении от Красноярска.

Полученные результаты показали, что исследованные компоненты экосистемы р. Енисей (вода, сестон, водные растения) по-разному отражают загрязнение реки тяжелыми металлами в количественном и пространственном аспектах.

Работа выполнена при поддержке программы РАН «Биоразнообразии», проект №23.16.

Список литературы:

- Кондратьева Л.М., Канцыбер В.С., Зазулина В.Е., Боковенко Л.С. Влияние крупных притоков на содержание тяжелых металлов в воде и донных отложениях реки Амур//Тихоокеанская геология. — 2006. -Т. 26; № 6. -С. 103-114.
- Болсуновский А.Я., Муратова Е.Н., Суковатый А.Г. Радиоэкологический мониторинг реки Енисей и цитогенетические характеристики водного растения *Elodea canadensi* // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. -Т. 47; №1. - С. 63-73.
- Анищенко О.В., Гладышев М.И., Кравчук Е.С. и др.Распределение и миграция металлов в трофических цепях экосистемы реки Енисей в районе г. Красноярска// Водные ресурсы.—2009. -Т.36;№5. -С.623-632.
- Анищенко О.В., Гладышев М.И., Кравчук Е.С. и др. Оценка антропогенного загрязнения р. Енисей по содержанию металлов в основных компонентах экосистемы на участках, расположенных выше и ниже г. Красноярска// Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология.—2010. -Т.3;№1. -С.82-98.
- Чукина Н.В., Борисова Г.Г. Структурно-функциональные показатели высших водных растений из местообитаний с разным уровнем антропогенного воздействия// Биология внутренних вод — 2010. -№ 1. - С. 49-56.
- Arts G.H.P., Belgers J.D.M., Hoekzema C.H., Thissen J.T.N.M. Sensitivity of submerged freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests// Environ. Pollut. — 2008. - 153. - №1. - P. 199-206.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕМПА РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ РТУТИ В ОРГАНИЗМЕ ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS* L. ИЗ ОЗЕР ДАРВИНСКОГО, РДЕЙСКОГО И ПОЛИСТОВСКОГО ЗАПОВЕДНИКОВ.

Т.Б. Камшилова, В.Т. Комов, В.А. Гремячих

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
п. Борок, Ярославской обл., Россия, ktb@ibiw.yaroslavl.ru*

Повышенное содержание ртути (Hg) в рыбе, населяющей слабоминерализованные и закисленные озера, удаленные от источников локального загрязнения, отмечено во многих странах (Hakanson et al., 1990; McMurtry et al., 1989; Haines et al., 1994). Одним из основных биологических факторов, способствующих накоплению металла, принято считать низкий темп роста рыб (Verta M., 1990).

Цель работы состояла в оценке зависимости темпа роста окуня от уровня накопления ртути в мышцах этого вида рыб.

Исследования проводились на 9 озерах Дарвинского заповедника (Вологодская обл. – 61-59° с.ш., 40-37° в.д.) в 1989-2009 гг. и на 15 озерах Рдейского (Новгородская обл. – 58° с.ш., 30° в.д.) и Полистовского заповедников (Псковская обл. – 57° с.ш., 31° в.д.) в 2005-2006. Все озера характеризуются малыми и очень малыми размерами площадей водных зеркал (от менее, чем менее 0.1 км² до немногим более 6 км²). Территории водосборов заболочены, площади дренируемых бассейнов небольшие и большей частью не выходят за пределы охраняемых территорий, что исключает локальное антропогенное воздействие на них. Это – бессточные, реже сточные озера с максимальными глубинами 1-3-5 м. Большинство из них сильно гумифицировано, цветность воды в некоторых превышает 500 град. Преобладающие значения рН воды лежат в пределах 4.1-6.3.

Отлов рыбы, отбор проб и их хранение, измерение концентраций металла в образцах мышечной ткани, а также обработка и сканирование жаберных крышек окуня производили по описанной ранее методике (Комов и др., 2009).

При анализе использовали данные промеров длины, массы и площади прироста жаберной крышки 1117 экземпляров рыб. Значения показателей накопления Hg в мышечной ткани окуня Рдейского и Полистовского заповедников рассчитаны по большей части выборок, Дарвинского – по средним значениям показателя для отдельных озёр.

Индекс соотношения массы и длины тела окуня (ИС) рассчитывали по формуле: $k=w/100/l^3$, где w – общий вес рыбы, в граммах; l – длина рыбы от начала рыла до конца чешуйного покрова, в сантиметрах.

Весь массив данных по заповедникам был разбит на две группы. Первую – составили рыбы из озер, среднее содержание ртути в мышцах у которых не превышало 0.2 мг/кг, т.е. в пределах фоновых значений (Хотавец, Святое, Островское (Дарвинский заповедник), Домшинское, Корниловское, Роговское, Островистое, Долгое, Русское (Рдейский и Полистовский заповедники). Вторую – выше 0.45 мг/кг сырой массы (Змеиное, Мотыкино, Утешково, Дорожив, Дубровское, Темное (Дарвинский заповедник), Большое и Малое Гореецкие, Березайка, Межницкое (Рдейский заповедник)).

Достоверность различий оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест, $p=0.05$, если не указано иное). Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel и Statistica 7.0.

Размерно-весовые характеристики окуня и содержание ртути в мышечной ткани.

Длина рыб варьировала от 9 до 26 см, масса тела 14-300 г и возраст от 2+ до 6+.

Средние значения массы и длины тела рыб из двух групп озер Рдейского и Полистовского заповедников статистически значимо не отличались (Табл.1), в отличие от групп озер Дарвинского заповедника.

Окунь из второй группы озер Рдейского и Полистовского заповедников в возрасте 2+, 3+ имел большую длину тела (12.3; 12.9 см соответственно) и достоверно отличался от выборки рыб из первой группы озер. Для рыб из озер Дарвинского заповедника достоверные отличия по длине отмечены для возрастов 4+, 6+, причем длина рыб в возрасте 4+ выше во второй группе (16.3 см). По средним значениям массы окуней достоверные различия отмечены у рыб из озер Рдейского и Полистовского заповедников в возрасте 3+, при этом масса рыб во второй группе выше (29 г), чем в первой (21.6 г). В возрасте 2+, 3+, 4+ рыбы из озер Дарвинского заповедника практически не

различались по массе тела, а в возрасте 5+ и старше наблюдалось снижение массы тела у окуней из второй группы (82-91.8 г) по сравнению с первой (148-282 г).

Содержание ртути в мышцах окуня второй группы Дарвинского заповедника в среднем составило 0.5-1.0 мг/кг сырой массы и не зависело от возраста рыб. У окуня из первой – установлена корреляционная зависимость между содержанием ртути в мышцах и возрастом ($r=0.8$, $p<0.0004$, $n=16$). Для групп рыб Рдейского и Полистовского заповедников такой зависимости не выявлено.

Таблица 1. Размерно-весовые характеристики и уровни накопления ртути в мышцах рыб разного возраста.

Показатель	Дарвинский заповедник		Рдейский и Полистовский заповедники	
	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа
Возраст, годы	2.7±0.3 (157) a	2.9±0.1 (771) a	3.7±0.1 (108) b	3.1±0.1 (81) a
Длина, см,	13.1±0.9 (119) a	14.4±0.2 (704) b	12.6±0.2 (118) a	12.7±0.2 (93) a
Длина, см, возраст, 2 +	12.3±0.7 (17) a	13.1±0.2 (250) a	10.9±0.9 (15) a	12.3±0.3 (23) b
Длина, см, возраст, 3 +	14.7±1.1 (20) a	14.7±0.2 (236) a	11.1±0.4 (37) a	12.9±0.9 (36) b
Длина, см, возраст, 4 +	14.3±1.2 (13) a	16.3±0.3 (111) b	12.4±0.6 (31) a	13.5±0.5 (14) a
Длина, см, возраст, 5 +	19.2±3.1 (8) a	17.2±0.4 (38) a	14.6±0.6 (16) a	14.5±0.8 (5) a
Длина, см, возраст, 6 +	24.8±4.1 (4) b	17.9±0.6 (13) a	16.8±2.2 (6) a	17.1±4.2 (2) a
Масса, г	69±23.9 (113) b	50.6±1.9 (704) a	37.0±2.5 (118) a	33.4±2.9 (93) a
Масса, г, возраст, 2 +	30.6±6.8 (17) a	35.9±1.5 (250) a	20.0±.5 (15) a	25.2±2.2 (22) a
Масса, г, возраст, 3 +	58.8±14.2 (20) a	50.7±2.0 (236) a	21.6±2.6 (37) a	29.0±1.7 (36) b
Масса, г, возраст, 4 +	53.4±14.1 (13) a	69.5±3.5 (111) a	31.4±5.4 (31) a	35.8±3.6 (14) a
Масса, г, возраст, 5 +	148.3±61.8 (8) a	82.0±8.4 (38) a	55.1±9.5 (16) a	42.6±10.9 (5) a
Масса, г, возраст, 6 +	282.3±110.8 (4) b	91.8±15.5 (13) a	94.0±42.0 (6) a	95.3±86 (2) a
Hg, мг/кг	0.054±0.014 (16) a	0.555±0.040 (106) b	0.160±0.020 (107) a	0.630±0.020 (90) b
Hg, мг/кг, возраст, 2 +	0.073±0.016 (3) a	0.670±0.130 (16) b	0.150±0.048 (12) a	0.640±0.060 (21) b
Hg, мг/кг, возраст, 3 +	0.060±0.004 (2) a	0.530±0.040 (49) b	0.160±.026 (31) a	0.600±0.060 (34) b
Hg, мг/кг, возраст, 4 +	0.115 (2) a	0.510±0.070 (27) b	0.150±0.023 (32) a	0.530±0.070 (14) b
Hg, мг/кг, возраст, 5 +		0.520±0.140 (6)	0.150±0.033 (16) a	0.760±0.023 (5) b
Hg, мг/кг, возраст, 6 +		1.000±0.350 (3)	0.160±0.059 (5) a	0.690 (2) b

Примечание. Здесь и далее – наличие одинаковых буквенных символов в строке означает отсутствие статистически значимых различий между выборками, принадлежащими к озерам одного заповедника, в скобках приведено количество проанализированных особей.

Статистически значимая зависимость содержания ртути в мышечной ткани окуня от длины и массы его тела установлена только для рыб из первой группы Дарвинского заповедника ($r=0.7$, $p<0.005$, $n=16$; $r=0.5$, $p<0.04$, $n=16$) и Рдейского - Полистовского заповедников ($r=0.4$, $p<0.001$, $n=104$). Для второй группы рыб Дарвинского заповедника зависимости между показателями не установлено имела место только в том случае, если при анализе учитывался крупный (198 г) окунь с очень высоким содержанием Hg (2.4 мг/кг сырой массы).

Соотношение массы и длины тела окуня. Индексы соотношения массы и длины тела окуня (ИС) были достоверно ниже у рыб из второй группы озер всех заповедников (Табл.2). Отличия между самками и самцами статистически значимы у окуней из второй группы озер Рдейского и Полистовского заповедников. Во всех группах ИС выше у самок, чем у самцов, хотя и не всегда статистически значим. У рыб из вторых групп всех заповедников отмечено статистически значимое увеличение ИС в марте месяце. Слабая, но значимая зависимость содержания ртути от ИС установлена только для окуня из первой группы Дарвинского заповедника ($r=0.4$, $p<0.001$, $n=16$). При анализе второй группы Дарвинского наблюдается отрицательная зависимость между показателями ($r=-0.3$, $p<0.02$). В пределах каждой группы Рдейского-Полистовского заповедников никакой связи между уровнем накопления ртути и ИС не установлено. Вместе с тем, если анализировать всю выборку в целом (187 экз.), то отрицательная зависимость проявляется ($r=-0.32$, $p<0.0001$).

Таблица 2. Индексы соотношения массы и длины тела окуня.

Выборка рыб	Дарвинский заповедник		Рдейский и Полистовский заповедники	
	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа
Вся выборка	1.72±0.05 (86) b	1.57±0.01 (672) a	1.57±0.04 (106) b	1.37±0.05 (81) a
Самки	1.80±0.11 (35) b	1.59±0.02 (473) a	1.59±0.05 (67) b	1.42±0.06 (53) a
Самцы	1.71±0.08 (51) b	1.54±0.03 (199) a	1.52±0.06 (39) b	1.30±0.07 (28) a
Вся выборка, март	1.89±0.17 (11) a	1.76±0.04 (55) a	1.61±0.09 (32) a	1.47±0.05 (35) a
Вся выборка, июль	1.75±0.07 (38) b	1.57±0.02 (370) a	1.65±0.04 (22) b	1.26±0.06 (16) a

Оценка темпов роста окуня по приросту жаберной крышки. Площадь зоны жаберной крышки, соответствующая первому году жизни, у рыб из второй группы озер Дарвинского заповедника на 12 % больше, чем у рыб из первой группы, а у рыб второй группы озер Рдейского и Полистовского заповедников - на 27% (Табл. 3). В отличие от рыб первой группы, у рыб из второй группы в последующие годы жизни прирост площади жаберной крышки не превышал величины первого года.

Таблица 3. Площадь прироста жаберной крышки за один год (условные единицы).

Год жизни	Дарвинский заповедник		Рдейский и Полистовский заповедники	
	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа
1 – й	3130±139 (157) a	3567±58 (771) b	1711±107 (108) a	2336±153 (81) b
2 – й	2742±267 (102) b	2141±44 (726) a	1490±103 (107) a	1510±108 (80) a
3 – й	2774±330 (80) b	2017±52 (459) a	1480±129 (92) b	1221±111 (58) a
4 – й	2920±454 (45) b	2019±74 (196) a	1498±168 (55) b	1125±167 (22) a
5 – й	3880±834 (22) b	2090±158 (73) a	2142±461 (28) b	1230±353 (8) a
6 – й	4146±899 (10) b	2181±166 (29) a	2428±625 (8) a	1595±449 (3) a

У рыб из всех групп озер установлена устойчивая зависимость величины прироста жаберной крышки в последующий год от прироста в предыдущий (Табл.4), за исключением величины прироста жаберной крышки первого и второго года у окуней из второй группы Рдейского и Полистовского заповедников.

Таблица 4. Коэффициент корреляции между величиной прироста площади жаберной крышки в предыдущий год и последующий.

Годы жизни	Дарвинский заповедник		Рдейский и Полистовский заповедники	
	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа
1-й и 2-й	0.47 (102)	0.07 (726)	0.22 (108)	-0.04 (80)
2-й и 3-й	0.75 (80)	0.53 (459)	0.53 (92)	0.18(57)
3-й и 4-й	0.84 (45)	0.55 (196)	0.66 (57)	0.51 (21)
4-й и 5-й	0.78 (22)	0.69 (73)	0.46 (24)	0.41 (8)
5-й и 6-й	0.69 (10)	0.72 (29)	0.63 (8)	—

Соотношение полов. Во всех группах в целом соотношение полов было смещено в сторону преобладания самок (Табл. 5), за исключением первой группы рыб Дарвинского заповедника и второй группы Рдейского и Полистовского заповедников, в них соотношение полов до возраста 3+ составляло 56 % и 67% (соответственно.) С увеличением возраста процент самцов снижался.

Таблица 5. Соотношение полов (% самцов) у окуня.

Выборка рыб	Дарвинский заповедник		Рдейский и Полистовский заповедники	
	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа
Вся выборка	52±4 (78) b	43±1 (672) a	36±5 (107) a	35±5 (81) a
До 3 лет	56± 5 (44) b	45±2 (287) a	44±13 (16) a	67±10 (24) a
3 +	48±9 (14) a	42±2 (225) a	38±8 (34) a	31±8 (36) a
Старше 3 лет	45±7 (20) a	41±2 (160) a	33±6 (57) b	5±1 (21) a

Низкий темп роста рыб принято считать одним из основных биологических факторов, способствующих накоплению ртути (Verta M., 1990). Однако результаты наших исследований не подтверждают данное положение. Более высокие показатели длины и веса одновозрастного окуня отмечены в группе рыб с содержанием металла в мышечной ткани более 0.45 мг/кг сырой массы. Различия в размерах исчезают только на 5-6 годах жизни. Аналогичную тенденцию выявил анализ прироста площади жаберной крышки. Ранее было показано, что окунь в озерах Северной Америки с уровнем pH воды 4.5 растет первые 3-4 года быстрее, чем в озерах с более высокими значениями pH (Harvey H., 1982). В дальнейшем лидеры и аутсайдеры меняются местами. При более интенсивных темпах роста окунь с высоким содержанием ртути в мышцах имел низкие показатели индекса соотношения массы и длины тела окуня, что соответствует наблюдениям Санса (Suns K. et al., 1990). У самок величина показателя ИС, как правило, была выше, чем у самцов. С увеличением возраста рыб, в популяциях окуня в озерах, для которых характерны высокие уровни накопления ртути, отмечена элиминация самцов.

Несмотря на сходные характеристики озер заповедников, окуни, обитающие в них, отличаются по весоростовым показателям, ИС и проценту самцов. Более высокие показатели зарегистрированы у окуня из озер Дарвинского заповедника. Возможно, такие различия связаны с кормовой базой исследуемых водоемов. Биомасса зоопланктона в озерах Рдейского, Полистовского заповедников колеблется от 0.2 до 1.9 г/м³ (в среднем 0.9 г/м³), а в озерах Дарвинского заповедника - от 0.6 до 3.5 г/м³ (в среднем 2 г/м³).

Таким образом, окунь из озер Дарвинского, Рдейского и Полистовского заповедников, с повышенным содержанием ртути в мышцах рыб, в первые годы жизни растет быстрее, по сравнению с окунем из озер, где содержание металла в мышцах рыб ниже. В старших возрастных группах ситуация меняется на противоположную. Высокие уровни накопления ртути в рыбе соответствуют низким показателям соотношения массы и длины тела окуня. В озерах, условия которых способствуют накоплению ртути в окуне, количественно преобладают самки. Линейно-весовые показатели более высокие у окуня из озер Дарвинского заповедника.

Список литературы

Комов В.Т., Гремячих В.А. и др. Содержание ртути в мышцах окуня из озер Полистово-Ловатского верхового болотного массива//Труды государственного природного заповедника «Рдейский». 2009. Вып.1. С.102-115.

Haines T.A., Komov V.T., Jagoe C.H. Mercury Concentration in Perch (*Perca fluviatilis* L.) as Influenced by Lacustrine Physical and Chemical Factors in Two Regions of Russia // Mercury Pollution Integration and Synthesis. Eds.: J. Watras and W. Huckabee. Lewis Publishers. 1994. № 5. P.397-407.

Hakanson L., Andersson T., Nilsson A. Mercury in fish in Swedish lakes - linkages to domestic and European sources of emissions. Water Air Soil Pollut. 1990.50:171-191.

Harvey H.. Population responses of fish in acidified waters // Acid rain/Fisheries. Proc. Int. Symp. Ed. R.E. Johnson. 1982. P. 227-244.

McMurtry M., Wales D., Scheider W., Beggs G. and Dimond P. Relationship of mercury concentrations in lake trout (*Salvelinus namaycush*) and smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) to the physical and chemical characteristics of Ontario lakes// Can.J.Fish.Aquat.Sci. 1989.46:426-434.

Suns K. and Hitchin G. Interrelationships between mercury levels in yearling yellow perch, fish condition and water quality// Water Air Soil Pollut. 1990. № 650. P. 255–265.

Verta M. Changes in fish mercury concentrations in an intensively fished lake// Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1990. № 47. P.1888–1897.

СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В МЫШЦАХ РЫБ ИЗ РЕКИ ОРХОН И ЕЁ ПРИТОКОВ (МОНГОЛИЯ)

В.Т. Комов¹, Д. Тиллит², В. Брумбо², М. Эрдэнбат³, Ч. Жавзан³, В.А. Гремячих¹

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, vkomov@ibiw.yaroslavl.ru

²US Geological Survey, Columbia Environmental Research Center
4200 New Haven Rd., Columbia, MO USA

³Institute of Geoecology, Mongolian Academy of Sciences
Baruun Selbe –15, Ulaanbaatar, Mongolia 211238

Ртуть (Hg) в окружающей среде присутствует в результате поступления из природных и антропогенных источников. Около половины от общего количества мировых антропогенных выбросов металла приходится на страны Азии [2]. Среди приоритетных источников загрязнения малые рудники по добыче золота занимают особое положение не только потому, что практически вся используемая при амальгамировании ртуть не возвращается в производство. Золотоносные руды сами по себе характеризуются повышенными концентрациями ртути [Satoshi Murao et al., 2006]. Несмотря на то, что Монголия богата полезными ископаемыми, золотом в том числе, исследования по миграции и накоплению ртути в экосистемах немногочисленны и направлены преимущественно на решение санитарно-гигиенических вопросов [2]. В связи с этим целью настоящей работы было изучение содержания ртути в мышцах рыб реки Орхон и её притоков.

Рыбу отлавливали сетями и на удочку, измеряли длину. Затем отбирали образцы мышечной ткани и высушивали при температуре не выше 40° для последующего определения в них содержания Hg (ИБВВ РАН, Борок, Россия). Измерение массовой доли общей ртути в мышцах рыб проводили атомно-абсорбционным методом на ртутном анализаторе РА-915+ с приставкой ПИРО-915+. Метрологический контроль данных осуществляли с использованием сертифицированного биологического материала Dorm-II (мышцы акулы) со стандартным содержанием металла, полученным из Канадского института химии окружающей среды. Всего было отобрано и проанализировано 139 проб мышц 8 видов рыб на 12 станциях р. Орхон. Гидрохимические показатели на всех станциях оказались довольно однородными (Табл.1).

Значения pH воды находились в пределах 7.0-8.8: минимальные – зарегистрированы на верхнем и среднем участке р. Тола, максимальные – на нижнем участке р. Тола и на среднем участке р. Хаара. Как правило, высокие значения pH соответствовали повышенным показателям электропроводности воды. В целом величины электропроводности воды свидетельствуют о низкой или умеренной её минерализации. Содержание растворенного в воде кислорода находилось в пределах максимального насыщения для измеренной температуры, за исключением проб со станций на р. Тола ниже Улан-Батора и на р. Борогол.

Таблица 1. Места отбора проб и гидрохимические показатели воды (август-сентябрь 2010 г.)

Название места	Координаты	pH	O ₂ , мг/л	O ₂ , %	Электро- проводность, μS/cm	C°
р. Тола, мост Терелж, выше Уланбатора	N:47°49'22.0" E: 107°20'19.0"	6.97	10.3	10.3	55.0	15.3
р. Тола, мост Сонгино, ниже Уланбатора	N:47°50'50.3" E: 106°40'28.2"	7.12	7.2	72	175.5	15.1
р. Тола, перед впадением в р. Орхон	N:48°49'48.8" E: 104°47'10.3"	8.77	8.7	100	195.8	22.5
р. Орхон, перед впадением р. Хангал	N:48°50'50.5" E: 104°37'10.4"	8.58	8.0	92	184.7	22.0
р. Орхон, мост на трассе Дархан – Эрдэнэт	N:49°07'46.3" E: 105°20'37.9"	8.55	8.7	94	210.0	18.9
р. Орхон, перед впадением в р. Селенгу	N:50°15'09.4" E: 106°08'16.1"	8.38	9.0	99	184.1	20.2
р. Хара, выше моста в п. Баянгол	N:48°53'00.7" E: 106°05'50.7"	8.42	9.7	98	243.0	14.6
р. Хара, выше г. Дархан (ниже п. Хонгор)	N:49°19'29.7" E: 105°54'30.7"	8.63	9.7	98	243.0	14.6
р. Хара, ниже г. Дархан	N:49°30'43.6" E: 105°53'52.6"	8.46	9.8	105	291.0	16.2
р. Борогол, ниже места промывки золота	N:48°46'12.4" E: 106°17'00.0"	8.30	6.5	65	355.0	14.6
р. Шарингол (выше моста через Шарингол по трассе Дархан – Уланбатор)	N:49°45'25.4" E: 106°10'02.4"	8.18	8.4	97	268.0	22.8

Максимальные значения концентраций ртути во всей выборке всех видов рыб зарегистрированы в мышечной ткани ельца, минимальные – хариуса (Табл.2). Однако высокие показатели содержания Hg в мышцах ельца связаны с наличием в выборке рыб из р. Борогол, концентрация металла у которых в среднем составила около 3 мг/кг сухого веса. Если данные по этой группе рыб не учитывать при анализе, среднее содержание ртути в мышцах ельца не будет отличаться от значений показателя для щиповки, голяка и голец.

Содержание ртути в мышечной ткани ельца и щиповки, выловленных на верхних участках течения рек, выше, чем на нижних. Такая закономерность в большей степени выражена для рыб из рек Хаара и Тола, и в меньшей – р. Орхон. Как правило, концентрация ртути в мышцах рыб положительно коррелировала с их массой. Эта зависимость была более выражена у ельца из р. Борогол и отсутствовала у ельца из р. Хаара.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о несколько повышенных уровнях накопления ртути в мышцах мирных видов рыб, по сравнению с аналогичными показателями рыб из Рыбинского водохранилища [1]. Высокие уровни накопления ртути в мышцах рыб из р. Борогол однозначно свидетельствуют о загрязнении реки в результате маломасштабной добычи золота. Зарегистрированные концентрации металла в мышцах этих рыб не соответствуют фоновым. Употребление в пищу этой рыбы может представлять угрозу здоровью птиц, животных и людей.

Работа выполнена при поддержке Российско-Монгольской Комплексной Биологической Экспедиции.

Список литературы

- Комов В.Т., Степанова И.К., Гремячих В.А. Содержание ртути в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России: причины интенсивного накопления и оценка негативного эффекта на состояние здоровья людей // Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: ИБВВ РАН, 2004. С.99-123.
- Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites P. Li, X.B. Feng, G.L. Qiu, L.H. Shang, Z.G. Li Journal of Hazardous Materials 168 (2009) 591–601
- Mercury content in electrum from artisanal mining site of Mongolia Satoshi Murao a*, Kazuki Naito a, Gunchin Dejidmaa b, Soey H. Sie c Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 249 (2006) 556–560

Таблица 2. Содержание Hg в мышцах рыб, мг/кг сухой массы.

Станция	Елец <i>Leuciscus leuciscus</i> , L.	Щиповка <i>Cobitis taenia</i> , L.	Гольян <i>Phoxinus phoxinus</i> , L.	Голец <i>Barbatula barbatula</i> , L.	Хариус <i>Thymallus thymallus</i> , L.	Карась <i>Carassius auratus</i> , L.	Плотва <i>Rutilus rutilus</i> , L.	Сом <i>Silurus glanis</i> , L.
р. Тола								
Выше Уланбатора	-	1.69 (1)	0.45 0.42–0.49 (2)	-	0.22±0.03 0.15–0.29 (4)	-	-	-
Ниже Уланбатора	0.98 (1)	-	-	-	0.15 (1)	-	-	-
Устье	0.79±0.21 0.54–1.05 (11)	0.76±0.13 0.57–1.08 (4)	-	0.55±0.08 0.47–0.60 (4)	-	-	-	-
р. Орхон								
Выше р.Хангал	0.77±0.19 0.25–1.47 (14)	-	-	-	-	-	-	-
У моста по трассе на Эрдэнэт	0.76±0.17 0.4–1.33 (16)	-	-	-	-	-	-	-
Устье	0.60±0.22 0.45–0.76 (10)	-	-	-	-	-	-	-
Борогол–р. Хара								
Борогол	2.99±0.22 0.89–8.03 (10)	-	-	-	-	-	-	-
Выше г.Баянгол	0.95±0.23 0.73–1.41 (9)	0.75 0.74–0.76 (2)	1.05±0.12 0.63–1.42 (5)	1.05 0.78–1.31 (2)	-	-	-	-
Выше г.Дархан	0.80±0.26 0.68–1.15 (7)	0.54±0.12 0.41–0.77 (5)	-	-	-	-	0.62 (1)	0.27 (1)
Ниже г.Дархан	0.55±0.26 0.36–0.91 (7)	0.40±0.11 0.07–0.96 (6)	-	-	-	0.31 0.12–0.49(2)	-	-
р. Шарингол								
У моста по трассе Уланбатор-Дархан	0.20± 0.34 0.15–0.25 (4)	0.31 (1)	-	0.38±0.09 0.31–0.46 (3)	-	0.51 (1)	-	-

Примечание: в таблице представлены средние значения и их ошибки ($\bar{x} \pm m_x$), минимальное – максимальное значение показателя, количество исследованных рыб (в скобках)

РОЛЬ БИОПЛЕНОК В ТРАНСФОРМАЦИИ СТОЙКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Л.М. Кондратьева, О.Ю. Морозова, З.Н. Литвиненко

*Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,
680000, г. Хабаровск, ул. Ким-Ю-Чена, 65, Россия, kondrlm@rambler.ru*

Загрязнение р. Амур стойкими полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) происходит под влиянием различных антропогенных факторов (формирование водохранилищ, загрязнение окружающей среды транспортом, сжигание всех видов топлива, лесные пожары и др.). Особое место отводится трансграничному поступлению ПАУ с территории Китая со стоком р. Сунгари (Кондратьева и др., 2007). Многие представители этой группы гидрофобных соединений распространяются со взвешенными частицами, оседают на дне и подвергаются медленному микробиологическому разложению. Продукты трансформации ПАУ мигрируют в водную среду, влияют на ее цветность и служат источником вторичного загрязнения водных экосистем летучими ароматическими веществами.

Экологический риск загрязнения природных вод ПАУ также связан с трудностью их аналитического определения, так как многие из них содержатся в воде в виде микропримесей. Для определения экологических предпосылок их присутствия в экосистеме и возможности вторичного загрязнения водной среды можно использовать микробиологические методы. Эти методы основаны на оценке адаптационного потенциала планктонных и бентосных микробиоценозов, участвующих в разложении стойких органических веществ.

В ряде случаев происходит комплексное загрязнение водных экосистем ПАУ и азотсодержащими органическими соединениями, которое сопровождается повышенной минерализацией водной среды. На микробиологическую деструкцию ПАУ в водных объектах, влияют различные абиотические (температура, pH, соленость, присутствие косубстратов и др.) и биотические факторы (структура и физиологическая активность микробных комплексов).

В последнее время особое внимание уделяется образованию структурированных, прикрепленных к поверхности различных субстратов, микробных сообществ – биопленок (Davey, O'Toole, 2000; Costerton, 2007). Способность образовывать защитный полисахаридный матрикс и объединение клеток в сложные консорциумы позволяет повысить устойчивость микроорганизмов к неблагоприятным факторам, вести прикрепленный образ жизни и ускорять трансформацию сложных, в том числе гидрофобных, субстратов. Роль биопленок обсуждается в разных сферах деятельности: медицине, биотехнологии, экологии (биосенсорика, биоремедиация), а также в энергетике – получение биоводорода. Публикации по этой тематике можно встретить в различных научных изданиях (Куюкина и др., 2011; Tsuneda et al., 2003; Singh et al., 2006; Yang et al., 2009).

На наш взгляд, активность бактериальной адгезии и способность микроорганизмов из различных экологических ниш к образованию биопленок при росте на гидрофобных органических субстратах можно использовать для оценки характера самоочищения водных экосистем и выявления предпосылок их вторичного загрязнения в контактной зоне вода-дно.

В настоящей работе представлены результаты экспериментального исследования адгезии и способности образовывать биопленки планктонными и бентосными микробными комплексами, выделенными из различных местообитаний р. Амур, при их длительном культивировании на стойких гидрофобных углеводородах (нафталин, фенантрен) при различном сочетании абиотических факторов (температура, соленость, присутствие легкодоступного косубстрата).

Объекты и методы. Исследование микробиологической трансформации стойких органических соединений проводили с использованием природных микробных комплексов из различных экологических ниш в экосистеме р. Амур. Для модельного эксперимента были использованы пробы воды и донных отложений, отобранных во время летней экспедиции 2009 г. на трансграничном участке р. Амур (выше и ниже устья р. Сунгари) и на Нижнем Амуре (в районе с. Савинское). Пробы донных отложений отбирали штанговым дночерпателем Петерсона с захватом 0–5 см слоя.

Культивирование планктонных и бентосных микробиоценозов проводили на минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.33; K_2HPO_4 – 2.67; NH_4Cl – 1.0; Na_2SO_4 – 2.0; KNO_3 – 2.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1. В стерильную минеральную среду вносили нафталин или фенантрен в виде тонкоизмельченной пудры из расчета 100 мг/100 мл. В одном из вариантов в

качестве косубстрата добавляли 1% раствор пептона. Для оценки влияния режима солености вносили 3% раствор NaCl. Посевной материал (10 мл воды или 10 мл суспензии донных отложений) вносили в колбы со 100 мл питательной среды.

С каждым субстратом (нафталин, фенантрен) были подготовлены 3 варианта температурного режима, имитирующих сезонные условия:

- 1) постоянная температура 23⁰ С;
- 2) постоянная температура 2⁰ С;
- 3) переменный режим 2⁰С–23⁰ С (30 суток культивирования при 2⁰ С, дальнейшее культивирование при 23⁰ С).

Культивировали микроорганизмы в стационарных условиях при 23⁰ С (в термостате) и 2⁰ С (в холодильнике).

В течение всего эксперимента (90 суток) проводили описание культуральных характеристик модельных микробных комплексов (образование биопленок, адгезия на стекле, изменение цветности питательной среды). В конце эксперимента для оценки интенсивности бактериальной адгезии проводили окрашивание 1% раствором генцианвиолета.

Результаты и обсуждение.

Бактериопланктон на нафталине. Образование крупных слизистых биопленок происходило при культивировании бактериопланктона с участка, расположенного выше устья р. Сунгари при внесении 3% NaCl (Табл. 1). Биомасса, накопленная в результате развития иммобилизованных микроорганизмов на частицах субстрата, имела различную окраску (лимонную, оранжевую или желтую). Специальный отсев слизистых биопленок на агаризованные среды показал, что они в основном представлены монокультурами.

Характерную бактериальную адгезию на стекле в виде плотных колоний наблюдали у бактериопланктона из проб воды, отобранных ниже устья р. Сунгари, при культивировании на нафталине в условиях имитации летних температур (23⁰С). Наиболее интенсивная адгезия в виде прикрепленных к стеклу пленок была отмечена при окрашивании генцианвиолетом у микробных комплексов из местообитаний, расположенных выше устья р. Сунгари. Внесение косубстрата – пептона снижало адгезивную активность этой экологической группы.

При культивировании планктонных микробценозов на одном нафталине, либо на нафталине с пептоном при 23⁰С в течение 45 суток иммобилизованные консорциумы бактерий на стекле отсутствовали. Однако в этом случае в модельных системах образовались цветные продукты трансформации нафталина интенсивного бурого цвета. Пептон способствовал быстрому развитию биомассы в толще питательной среды.

Следует подчеркнуть, что изменение солености и присутствие косубстрата стимулировало образование слизистых биопленок при 23⁰ °С, особенно при участии бактериопланктона, выделенного с участка выше устья р. Сунгари. Накопленная в результате развития иммобилизованных микроорганизмов биомасса приобретала оранжевую окраску.

Высокой адгезивной способностью отличался бактериопланктон из проб воды, отобранных ниже устья р. Сунгари. При 23⁰ °С и различном сочетании субстратов (нафталин, нафталин + пептон, нафталин + NaCl) биопленки формировались на гидрофобных частицах нафталина, разрыхляя и окрашивая их в темно-бурый цвет. Образование цветных продуктов трансформации нафталина начиналось уже через 10 суток, с увеличением цветности в течение следующих 30 суток культивирования.

Наиболее яркую окраску культуральной жидкости наблюдали при культивировании планктонных микробных комплексов с участков, расположенных выше устья р. Сунгари на одном нафталине при 23⁰С (желто-бурый цвет) и ниже устья р. Сунгари в варианте с внесением косубстрата (темно-бурый цвет). Учитывая потенциальные возможности микроорганизмов трансформировать нафталин можно предположить, что с выше расположенных участков регулярно поступают разнообразные ПАУ, в состав которых могут входить нафталин и его производные. Ниже устья р. Сунгари, в связи с повышенным содержанием взвешенных веществ в воде микроорганизмы развиваются преимущественно в прикрепленном виде. Это способствовало их адгезии на частицах нафталина.

Бактериопланктон на фенантрене. Известно, что в состав растительных остатков входит фенантрен природного происхождения. Во время паводка с поверхностным стоком в р. Амур поступают растительные остатки, частицы почв с развивающимися на них микроорганизмами, которые влияют на активность бактериопланктона и пополняют состав донных отложений, активизируя деятельность бактериобентоса. Следует подчеркнуть, что биотрансформация

фенантрена бактериопланктоном сопровождалась наиболее активной агрегацией клеток в слизистом матриксе и накоплением цветных продуктов, а их образование начиналось уже на 3-5 сутки. Активное формирование биопленок при культивировании микробных комплексов из зоны влияния р. Сунгари (ниже устья) происходило при 23° С, как на одном фенантрена, так и при добавлении пептона. Характерные слизистые тяжи, формировались в условиях летней температуры при участии бактериобентоса из приустьевой зоны р. Сунгари при добавлении 3% NaCl. Микробоценозы с Нижнего Амура при таком же сочетании абиотических факторов развивались только на частицах фенантрена и без образования слизистых биопленок.

Таблица 1. Влияние температуры и местообитания на образование биопленок бактериопланктоном р. Амур

Факторы	Нафталин	Фенантрен
Температура	Наиболее интенсивное образование биопленок в течение 30 суток наблюдали при температуре 23°С и внесении 3% NaCl. При температуре 2°С в течение 30 суток формирование биопленок не происходило; появление желтой окраски культуральной жидкости отмечали на 20 сутки.	При температуре 23°С на 10 сутки отмечали образование коричневых слизистых колоний на стекле и биопленок на частицах фенантрена. При температуре 2°С образование биопленок стимулировал косубстрат - пептон. Образование цветных продуктов менее выражено, чем при 23°С.
Местообитание	Бактериопланктон, отобранный выше устья р. Сунгари активно образовывал слизистые пленки при 23°С и при добавлении 3% NaCl. Микробоценозы из зоны влияния р. Сунгари развивались в прикрепленном состоянии на дне колб и на частицах нафталина, разрыхляли их и окрашивали в бурый цвет. Бактериопланктон с Нижнего Амура биопленки не образовывал.	Планктонные сообщества из зоны влияния р. Сунгари проявляли максимальную адгезивную активность к стеклу и частицам нафталина, по сравнению с микробоценозами с выше расположенных участков. Стимулирование образования слизистых биопленок происходило при 2°С и добавлении 3% NaCl. Бактериопланктон с Нижнего Амура менее активно формировал биопленки.

Максимальное изменение цветности культуральной жидкости было зарегистрировано при трансформации фенантрена бактериопланктоном, отобранным ниже устья р. Сунгари, особенно при внесении дополнительного источника углерода – пептона. Такие абиотические факторы как низкая температура и повышение солености питательной среды (внесение 3% NaCl) приводили к ингибированию образования цветных продуктов.

Эти результаты свидетельствуют о том, что изменение абиотических условий (температуры и режима солености, внесение косубстрата) влияет не только на адгезивную активность микробных комплексов из различных местообитаний, но и на механизмы трансформации ПАУ (с образованием или без образования цветных интермедиатов). Ведущими факторами формирования биопленок оказались температура и структура микробных комплексов, определяемых их местообитанием.

Бактериобентос на нафталине. При культивировании бактериобентоса из двух разных местообитаний (выше и ниже устья р. Сунгари) на нафталине были отмечены характерные хлопьевидные биопленки вокруг его разрыхленных частиц. Независимо от температурного режима изменения цветности культуральной жидкости не наблюдали.

Поведение этих же бентосных микробных комплексов существенно отличалось при использовании другого субстрата – фенантрена. Была зарегистрирована активная адгезия к стеклу (на дне колбы) и образование слизистых бурых скоплений непосредственно на частицах фенантрена. Интенсивное образование цветных интермедиатов наблюдали при двух температурных режимах культивирования (23° С и 2°С–23° С). Причем бактериобентос с участка, расположенного ниже устья р. Сунгари проявлял большую активность.

Активное образование скоплений биопленок на дне колбы бентосными микробными комплексами из местообитаний, расположенных ниже устья р. Сунгари, наблюдали при трансформации фенантрена уже на 10-15 сутки при температуре 23° С. При двух других

температурных режимах (2°C и $2^{\circ}\text{C}-23^{\circ}\text{C}$) активность бактериобентоса сопровождалась разрыхлением частиц субстрата только на 40 сутки. Нарастание цветности культуральной жидкости и формирование слизистых тяжей, прикрепленных ко дну колб, продолжалось в течение 90 суток. Образование цветных интермедиатов при трансформации фенантрена происходило, не зависимо от температурного режима, при участии бентосных микробных комплексов из донных отложений, отобранных как выше, так и ниже устья р. Сунгари, за исключением одного варианта (2°C , ниже устья р. Сунгари).

Разрыхление частиц субстрата, является следствием непосредственного прикрепления бактериальных клеток к поверхности субстрата и выделения ими экзогенных ферментов. В тоже время разрыхление приводит к увеличению площади поверхности для последующей адгезии других поколений делящихся клеток. «Прогрессирующая колонизация» и синтез бактериальных полимеров служат основой для формирования слизистых биопленок.

Были отмечены существенные различия в трансформации фенантрена при 2°C бактериобентосом их различных местообитаний (Табл.2). При участии в трансформации фенантрена бактериобентоса, адаптированного к влиянию стока р. Сунгари культуральная жидкость при 2°C оставалась бесцветной. Однако, бактериобентос с выше расположенного участка р. Амур при трансформации фенантрена изменял цвет питательной среды до ярко оранжевого цвета. Развитие микроорганизмов происходило не только в виде биопленок на частицах фенанатрена, но и в толще культуральной жидкости за счет растворимых интермедиатов. Исходя из выше изложенного, можно сделать вывод, что механизмы трансформации фенантрена могут существенно изменяться в зависимости от местообитания бактериобентоса и его адаптационного потенциала.

Можно предположить, что в структуру бактериобентоса входили психрофильные представители, которые могли осуществлять трансформацию ПАУ не только в зимнее время, но и зимне-весенний период. Об этом свидетельствуют результаты, полученные в варианте с изменением температуры от 2°C до 23°C . Экологической предпосылкой такого поведения бактериобентоса может служить развитая адгезивная способность у бактерий, связанных с растительными остатками, переносимыми во взвешенном состоянии из недавно созданного Бурейского водохранилища, и постепенно оседающих в зонах аккумуляции на дне р. Амур.

Таблица 2. Влияние температуры и местообитания на образование биопленок бактериобентосом р. Амур

Факторы	Нафталин	Фенантрен
Температура	При температуре 23°C и изменении температурного режима $2^{\circ}\text{C}-23^{\circ}\text{C}$ наблюдали разрыхление частиц нафталина. При температуре 2°C происходило образование белых биопленок, прикрепленных к частицам субстрата. Цветные продукты отсутствовали.	При температуре 23°C , $2^{\circ}\text{C}-23^{\circ}\text{C}$ наблюдали адгезию на стекле и густые слизистые скопления вокруг частиц фенантрена, образование цветных продуктов. При 2°C происходило разрыхление частиц фенантрена и образование разных цветных продуктов в зависимости от местообитания.
Местообитание	Бактериобентос с участка, расположенного выше устья р. Сунгари, наиболее активно образовывал биопленки в течение 15-30 суток, особенно при 2°C . Бентосные микробценозы ниже устья р. Сунгари при исследованных условиях были менее активными.	Интенсивную адгезию на стекле и образование слизистых, темно-бурых биопленок наблюдали у бактериобентоса из зоны влияния р. Сунгари. Бактериобентос с выше расположенного участка развивался на поверхности субстрата и в толще питательной среды.

При исследовании условий образования биопленок на гидрофобных стойких углеводородах было установлено следующее: повышение солености питательной среды стимулирует образование слизистых биопленок; адгезия микроорганизмов к стеклу и частицам субстрата может усиливаться при внесении косубстрата; низкие температуры могут приводить к разным эффектам, в зависимости от местообитания микробных комплексов; наиболее активное разрыхление частиц нафталина и фенантрена происходит при температуре 23°C при участии бактериопланктона; способность к адгезии зависит от структуры гидрофобного субстрата и условий местообитания микробных комплексов.

Список литературы

- Кондратьева Л.М., Фишер Н.К., Стукова О.Ю., Золотухина Г.Ф. Загрязнение р. Амур полиароматическими углеводородами // Вестник ДВО РАН. 2007. № 4. С. 17–26.
- Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рубцова Е.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И. Адсорбционная иммобилизация клеток родококков в гидрофобизованных производных широкопористого полиакриламидного криогеля // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. № 2 (47). С. 176–182.
- Costerton J. W. The Biofilm Primer. Springer –Verlag: Berlin–Heidelberg–New York., 2007. 1 ed. 199 p.
- Davey M. E., O'Toole G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000. Vol. 64. No 4. P. 847–867.
- Singh R., Paul D., Jain R.K. Biofilms: implications in bioremediation //Trends Microbiol. 2006. Vol.14. No 9. P. 389–397.
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. FEMS Microbiology Letters. 2003. Vol. 223. No 2. P. 287–292.
- Yang Liu Y., Zhang W.; Tadas Sileika T., Warta R., Nicholas P. Cianciotto N.P., Packman A. Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems // Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 2009. Vol. 25. No 3. P. 241–253.

ВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

М.В. Крупина

*МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет
119991 г. Москва, Ленинские горы, д.1, корп.12, Россия, markrupina@yandex.ru*

Тяжелые металлы, в отличие от большинства других веществ антропогенного происхождения, не разрушаются, находясь в природной среде, а только переходят из одного ее компонента в другой, сохраняя свою токсичность практически бесконечно (Филенко, Хоботьев, 1976). Эти процессы во многом определяют развитие экологической ситуации в современных водоемах. Поэтому оценка, прогноз и очистка водных объектов от загрязнения тяжелыми металлами может осуществляться только на основе глубокого изучения процессов их депонирования (временного содержания) в биотическую и абиотическую части экосистемы. Рассмотрим прибрежно-морскую сообщества твердых грунтов Черного моря как модельный объект. Фитобентос Черного моря и биология массовых видов всесторонне была изучена выдающимся альгологом А.А. Калугиной – Гутник и изложена в ее монографии «Фитобентос Черного моря»,¹ чьи данные использованы для иллюстрации значения временного аспекта процессов накопления-выведения и содержания тяжелых металлов гидробионтами. Морские макрофиты и моллюски-фильтраторы по численности и биомассе являются основными компонентами прибрежного сообщества. Фитоценозы с доминированием бурых водорослей рода *Cystoseira* относятся к региональным, они широко распространены на твердых грунтах. Биомасса цистозир составляет 75 - 96 % от общей биомассы водорослевого сообщества, в зависимости от сезона и местообитания. На долю сопутствующих видов приходится 4-25%.

Биомасса цистозир по сезонам может различаться в 7 раз. Это обусловлено биологией развития растения – таллом цистозир состоит из многолетнего ствола (до 20 лет) и боковых ветвей, срок жизни которых от 5 до 7 месяцев. Соотношение веса таллома к весу ствола колеблется от 1,3 до 7,9 и зависит от возраста и сезона. Наибольшая биомасса цистозир 8,7 кг/кв.м отмечалась в Новороссийской бухте и 8,1 кг/кв.м у Анапы (Калугина – Гутник, 1975). Нами исследовалось распределение металлов в разных частях слоевища на растениях *Cystoseira crinita* в возрасте 10 лет. Талломы водорослей были поделены на четыре части: 1 - ствол, 2 - короткие ветви (4,1-4,7 см), 3 - ветви средней длины (4,7-6,0 см), 4 - длинные ветви (6,0-13 см).

¹ С 1975 по наши дни на Черном море проводилось много работ по изучению видового состава, учету и распределению донной растительности, влиянию загрязнения и эвтрофикации на растительные сообщества, но для целей данной статьи, нужно было абстрагироваться от современных данных, но опираться на реальные соотношения выявленные и обобщенные А.А.Калугиной-Гутник.

Длина ветвей соответствует их возрасту – чем длинней, тем старше. Концентрация металлов в этих частях слоевища в относительных единицах представлена на рис. 1.

Концентрации Fe, Mn, Zn и Ni убывают в ветвях цистозиры по мере старения ветвей. В молодых ветвях концентрация Fe в 2,5 раза, а Mn и Zn в 1,7 раза больше, чем в старых. В стволах обнаружена самая высокая концентрация Ni. По сравнению с самыми старыми ветвями концентрация его в стволах в 1,5 раза, а Fe в 1,7 раза выше. Концентрация Cu в стволах и неразрушающихся ветвях примерно одинакова, а в старых ветвях ее в 2 раза меньше. В старых ветвях концентрация Pb в несколько раз выше, чем в других частях растения.

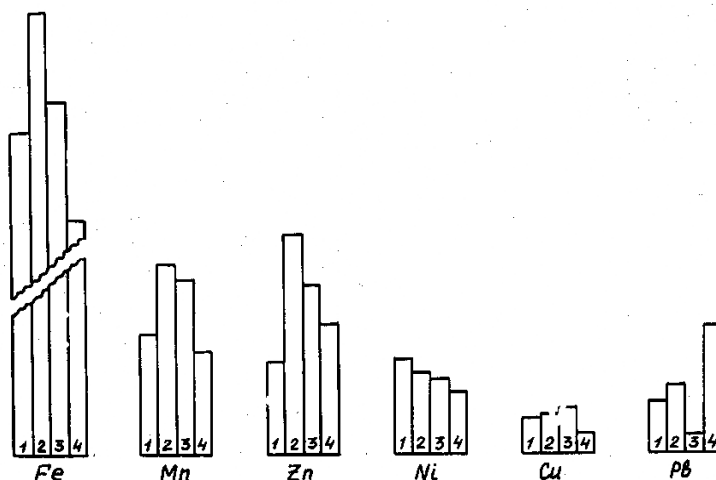


Рис 1. Распределение металлов в стволе и ветвях *C. crinita* разной длины

Приблизительные подсчеты показывают, что только 1 часть (около 1 кг) биомассы цистозиры с 1 кв. м в году сохраняет свой микроэлементный состав и этот 1 кг находится в многолетних стволах. 7 частей (около 7 кг) органического вещества вместе с включенными тяжелыми металлами, находится в перманентной стадии синтеза - распада. Если учесть соотношение биомасс цистозиры и сопутствующих видов (75-96%), то поток веществ не меньше 5 кг с 1 кв. м дна поступает в прибрежную экосистему ежегодно! По расчетам А.А. Калугиной-Гутник на 1975 г, общие запасы цистозиры вдоль бывшего советского побережья составляли 2 млн. т. Для наглядности можно продолжить наши подсчеты, и получается, что только около 250 тыс. т органического вещества были связаны на срок до 20 лет, а 1млн. 750 тыс. т ежегодно включалось в круговорот веществ Мирового океана.

Есть еще одно наблюдение: наибольшее число сопутствующих видов отмечается летом и весной (всего отмечается в Севастопольской бухте 67 видов: весна – 47, лето -50, осень – 41, зима - 33). Из сообщества выпадают однолетние и сезонные виды, которые вносят свой вклад в ежегодный поток веществ внутри или через экосистему. В 1975 году Черном море насчитывалось 75 видов многолетних макроводорослей, что составляло около 28,5 % от всего видового состава.

Род *Phyllophora* в Черном море представлен 4 видами и образует целые «поля», запасы которых исчисляется также в млн. т. Возраст водорослей может достигать 15 лет и более, но элиминируется за год в среднем 30% органической массы (Возжинская и др., 1971), в 2-3 раза меньше, чем у цистозиры. Учитывая, что наибольшую биомассу макрофитов Черного моря образуют многолетние макроводоросли (филлофора, цистозира), то время жизни водоросли или частей ее таллома играет важное значение при решении задач загрязнения или очистки водоемов.

Для подкрепления положения о значении временного фактора при изучении загрязнения водной среды тяжелыми металлами, приведем данные по соотношению концентраций тяжелых металлов в раковинах мидий, к концентрации металлов в мягких тканях (размерная группа $44 \pm 10\%$): для Zn – 0,47, Fe – 0,11, Pb – 19,8, Mn - 1,3, Cu – 0,30, Cd – 0,12. Содержание Zn, Fe, Cu и Cd в телах моллюсков в 7 -10 раз больше, чем в раковинах. Pb концентрируется преимущественно в раковинах – его концентрация в 10 - 20 раз больше, чем в телах моллюсков (Крупина, 2006). Мидии живут более 10 лет, если не стали объектом добычи или промысла, а створки раковин могут сохраниться значительно дольше и стать депо для высоких концентраций Pb. Вес раковины мидии в 4,7 – 10,4 раз больше сухого веса тела, что увеличивает значение долговременного депонирования некоторых тяжелых металлов.

Морская трава *Zostera marina*, доминирующий вид многих морских фитоценозов мягких грунтов тоже имеет различия в содержании тяжелых металлов в многолетней части растения (корневищах) и сезонных частях – листьях. Средние значения концентраций по 4 станциям Zn (6,1), Mn (1,6), Cu (1,2) и Cd в листьях 1,2 – 6,1 раз выше, чем в корневищах, а концентрации Fe и Ni выше в 1,5 и 5 раз выше в многолетней части растения – корневищам. Cd в корневищах не обнаружен (Крупина, Любимов, Стуколова, 2004).

Нахождение тяжелых металлов в биологическом объекте имеет временные ограничения и «депонирование», подразумевающее «временное размещение» более точно отражает суть процесса, чем привычный термин «содержание». Если рассматривать грунты водоемов по аналогии с почвами, то грунт любого водоема имеет биокостную природу и микроэлементы, захороненные там можно рассматривать также, как депонирование на некоторый срок, пока комплекс сложных биофизикохимических процессов не вернет их в круговорот веществ. Физические и химические факторы среды определяют распределение тяжелых металлов в абиотических компонентах экосистемы, что может также приводить к изменению количества тяжелых металлов, например образования и выпадение в осадок некоторых солей. Исследование этих явлений также необходимо для разработки эффективных мероприятий по защите морских акваторий от загрязнения и экологической деградации. Однако только живые компоненты экосистемы имеют обусловленные их биологией способности депонировать тяжелые металлы на предсказуемый период времени.

Список литературы.

- Филенко О.Ф., Хоботьев В.Г. Загрязнение металлами.// В сб. «Общая экология. Биоценология. Водная токсикология». М. т.3,1976.
- Калугина-Гутник А.А. Фитобентос Черного моря.// Изд. «Наукова думка» 1975.
- Возжинская В.Б., Цапко А.С., Блинова Е.И., Калугина А.А., Петров Ю.Е. Промысловые водоросли СССР. (Справочник) //М., «Пищевая промышленность», 1971.
- Крупина М.В. Соержание тяжелых металлов в мидиях *Mytilus edulis* Белого моря.// В сб. Водные экосистемы и организмы -7. Moscow. MAX Press, 2004.
- Крупина М.В., Любимов М.В., Стуколова И.В. Содержание тяжелых металлов в *Zostera marina* Белого моря. //В сб. Водные экосистемы и организмы -5 . Moscow. MAX Press, 2004.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАЗЛИЧНЫХ ГИДРОБИОНТАХ

В.А. Кудрявцева, А.А. Новичкова, М.В. Крупина

*МГУ им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет,
119991 г. Москва, Ленинские Горы, д.1, корп.12, Россия,
white-out@yandex.ru, anna.hydro@gmail.com, markrupina@yandex.ru*

За последние годы проблема антропогенного загрязнения продолжает оставаться одной из наиболее актуальных. Загрязняющие вещества, поступающие из атмосферы, с бытовыми и промышленными стоками в водоёмы, накапливаются в тканях живых организмов и наносят вред не только самим гидробионтам, но и водным экосистемам в целом. Более того, передаваясь вверх по трофическим цепям, они могут оказывать негативное воздействие на человека, который активно использует морепродукты. Только контроль, оценка и прогноз состояния окружающей среды позволят избежать тяжелых последствий, наносимых поллютантами. Для этих целей используются разнообразные программы мониторинга. Мониторинг – это такая система наблюдений, которая позволяет выделить изменение состояния биосферы под влиянием антропогенной деятельности, т.е. мониторинг антропогенных изменений окружающей природной среды (Израэль, 1974). Одним из методов является биологический мониторинг, в котором используются живые объекты как мониторы и индикаторы загрязнения. Создание теории биологического мониторинга в нашей стране принадлежит В.Д.Федорову (1974,1975). Под биологическим мониторингом следует понимать систему наблюдений, оценки и прогноза любых изменений в биоте, вызванных факторами антропогенного происхождения.

Одними из наиболее опасных загрязняющих веществ являются тяжелые металлы, оказывающие сильное токсическое воздействие на живые организмы. Металлы поступают, циркулируют и практически не выводятся из водоёмов. Одним из путей удаления металлов из круговорота является захоранивание в донных осадках. Но и из осадков может происходить их возврат из-за взмучивания или изменения физико-химических условий водной среды.

Целью нашей работы являлось определить содержание тяжелых металлов, накопленных морскими организмами из различных таксономических групп из различных районов Мирового океана и выявить особенности накопления отдельных элементов разными гидробионтами.

Объектами нашей работы были выбраны представители флоры и фауны из различных районов Мирового океана:

- Чёрное море:
 1. *Littorina sp.* (Mollusca: Gastropoda); (раковина)
 2. *Ulva lactuca* (Plantae: Chlorophyta: Ulvophyceae);
 3. *Cystoseira crinita* (Plantae: Chromalveolata: Phaeophyceae).
- Тропический рейс:
 4. Мшанки... (Bryozoa);
 5. *Halimeda sp.* (Plantae: Chlorophyta: Bryopsidophyceae);
 6. *Zostera asiatica* (phyllospadix) (Plantae: Angiospermata: Alismatales);
- Японское море:
 7. *Asterias amurensis* (Echinodermata: Asteroidea);

При подготовке биологического материала к определению содержания тяжелых металлов готовили усредненные пробы (3-10 экземпляров, высушенных до постоянного веса), гомогенизировали, органическую составляющую удаляли методом сухого озоления, оставшуюся неорганическую часть растворяли HNO_3 с последующей фильтрацией. Измерения Cu, Zn, Cd, Pb, Mn и Fe проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре Hitachi 180-80. Содержание тяжелых металлов рассчитывали в мкг/г сухого веса. Определяли зольность исследуемых гидробионтов.

В ходе исследований были получены следующие результаты.

Зольность объектов колеблется от 25 до 97% (Рис.1). Наибольшее содержание минеральной компоненты в раковинах моллюсков *Littorina sp.* (96,7%), также высокие значения у Мшанок с известковыми скелетными элементами и зеленой водоросли *Halimeda sp.*, таллом которой пропитан известью (91% и 88,7% соответственно). Несколько меньшая зольность у морской звезды *Asterias amurensis* с известковыми скелетными элементами (72,7%). У остальных растительных объектов зольность значительно ниже, минимальная – у бурой водоросли *Cystoseira crinita* (24,9%). Корреляции между зольностью и содержанием микроэлементов в гидробионтах не выявлено.

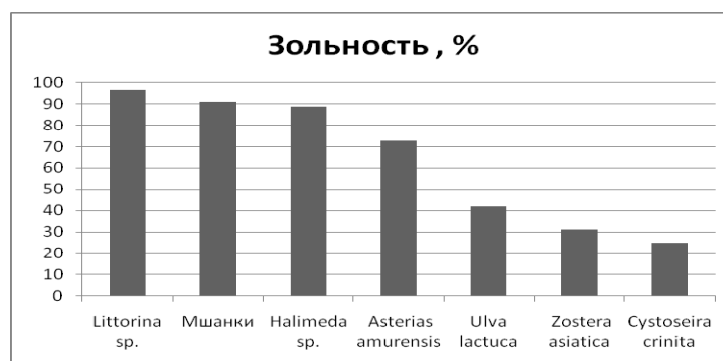


Рис. 1. Зольность объектов, %.

В таблице 1 и на рисунках 2-8 представлены данные по содержанию и распределению некоторых тяжелых металлов в пробах исследованных гидробионтов.

Все образцы содержат большое количество Fe (до 590 мкг/г), концентрации Mn (до 161 мкг/г) и Zn также довольно высоки (до 23,63 мкг/г). Cu в пробах присутствует в малых концентрациях (менее 2,5 мкг/г), а Cd и Pb – в следовых количествах (менее 0,15 и 0,6 мкг/г соответственно).

Таблица 1. Содержание тяжелых металлов в исследованных объектах, мкг/г с.в.

Объект	Cu	Zn	Cd	Pb	Mn	Fe
<i>Littorina sp.</i>	1,245	15,33	0,144	<0,206	161,1	47,7
<i>Ulva lactuca</i>	<0,577	4,55	<0,032	<0,128	33,3	239,0
<i>Cystoseira crinita</i>	1,988	11,51	<0,030	<0,121	32,8	590,3
Мшанки	0,458	1,64	0,085	<0,131	5,2	20,0
<i>Halimeda sp.</i>	1,341	1,91	<0,035	<0,141	12,7	29,8
<i>Zostera asiatica</i>	2,528	11,23	<0,140	<0,562	30,1	47,7
<i>Asterias amurensis</i>	0,209	23,63	0,104	<0,139	10,4	21,3

Рис. 2.

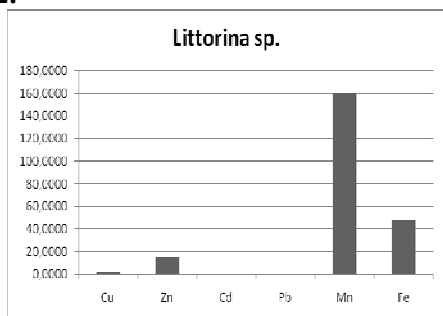


Рис. 6.

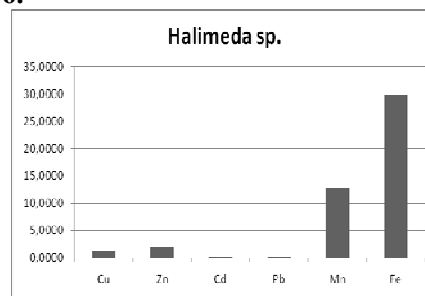


Рис. 3.

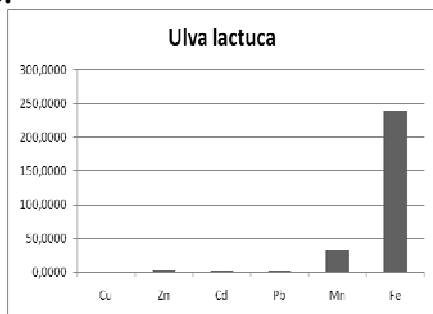


Рис. 7.

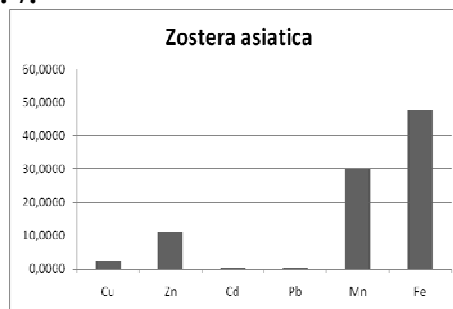


Рис. 4.

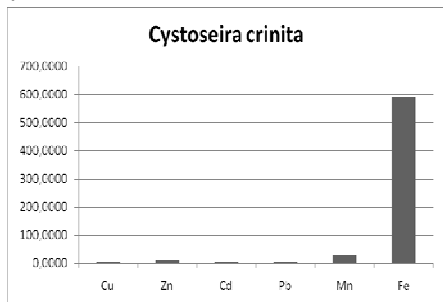


Рис. 8.

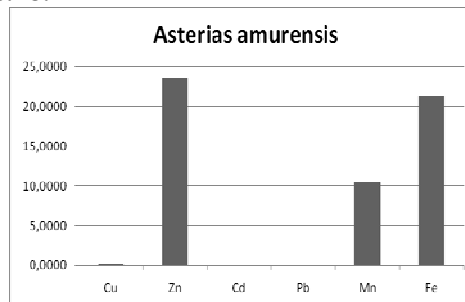
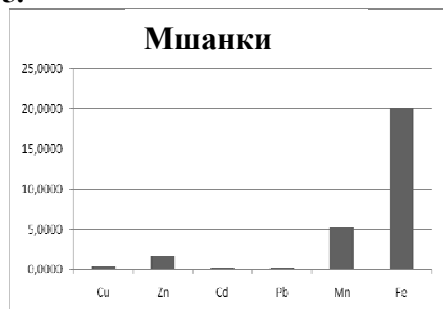


Рис. 5.



Fe в пробах колеблется в 30 раз (от 20 мкг/г у Мшанок до 590 мкг/г у *Cystoseira crinita*). Концентрация Mn колеблется также в 30 раз (от 5, 2 мкг/г у Мшанок до 161 мкг/г у *Littorina sp.*). Содержание Zn – до 15 раз (от 1,64 мкг/г у Мшанок до 23,63 мкг/г у *Asterias amurensis*). Колебания Cu – в 12 раз (от 0,209 мкг/г у *Asterias* до 2,528 мкг/г у *Zostera*). Cd – 5 раз (от 0,03 мкг/г у *Cystoseira* до 0,14 мкг/г у *Littorina*) и Pb – в 5 раз (от 0,56 мкг/г у *Zostera* до 0,12 мкг/г у *Cystoseira, Ulva*).

Наибольшие и наименьшие показатели выявлены у 5 исследованных гидробионтов. Мшанки имеют min показатели по трём элементам – Fe, Mn, Zn. Зеленая водоросль *Halimeda* не достигала max и min значений ни по одному из элементов, хотя у морской травы *Zostera* из того же района обитания выявлены наибольшие значения по Cu и Pb. В пробах *Asterias amurensis* обнаружено max значение Zn и min значение Cu. В исследованных пробах для пяти гидробионтов выявлено следующее соотношение содержания металлов: Fe>Mn>Zn>Cu>Pb>Cd.

Однако, в двух пробах выявлены другие соотношения:

Zn>Fe>Mn>Cu>Pb>Cd - морская звезда;

Mn>Fe> Zn>Cu>Pb>Cd - раковины Литторины.

По-видимому, повышенное содержание Zn в морской звезде объясняется физиологическими особенностями накопления данного микроэлемента. Высокое содержание Mn в Литторине связано с тем, что для исследования брали раковины, а не мягкие ткани моллюска (Крупина, 2006).

На рисунках 9-11 представлено сравнительное содержание металлов для семи видов гидробионтов.

Рис. 9.

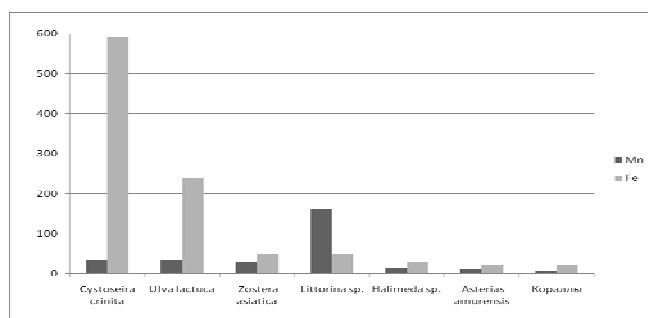


Рис. 10.

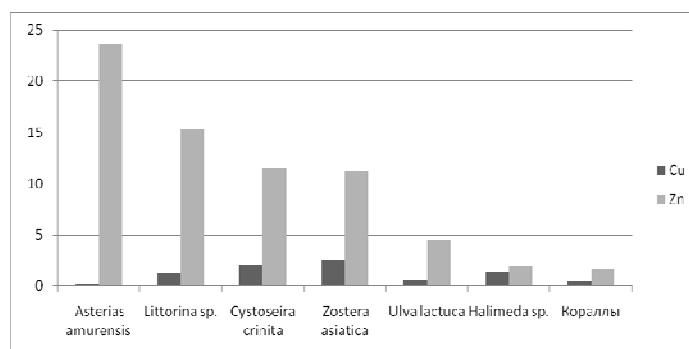
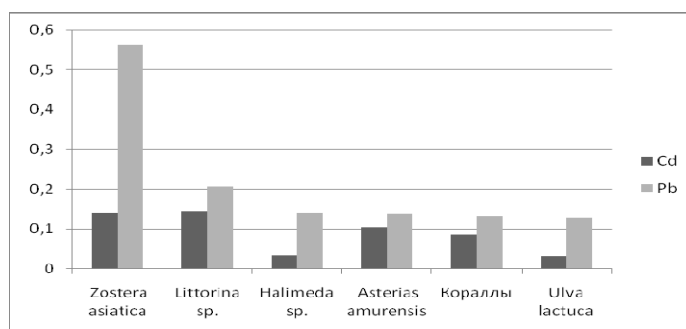


Рис. 11.



Нами не выявлено закономерных различий в соотношениях микроэлементов у животных и растений.

Сравнивая растения из одного местообитания Чёрного моря (*Cystoseira*, *Ulva*) и два вида из тропического района (*Zostera*, *Halimeda*) можно сказать, что уровень содержания Fe у первых в среднем отличается в 11 раз, однако различий по Mn, Cu, Zn и Cd не выявлено.

По нашему мнению, высокое содержание отдельных элементов у гидробионтов (Mn – *Littorina*, Zn – *Asterias*, Pb – *Zostera*) можно объяснить видоспецифичностью их накопления, что связано с биохимическими и физиологическими особенностями данных организмов, а не загрязнением района обитания. Выявленные особенности накопления отдельных элементов, специфичные для разных гидробионтов, можно использовать для контроля загрязнения среды этими элементами. Так, *Zostera asiatica* может быть использована для контроля среды по Pb, а *Asterias amurensis* – по Zn.

Список литературы.

- Израэль Ю.А. Глобальная система наблюдений. Прогноз и оценка изменений состояния окружающей природной среды. Основы мониторинга. // Метеорол. и гидрол., 1974, №7.
- Патин С. А. Антропогенное воздействие на морскую среду и биоресурсы: Методология оценок и современная ситуация. // В сб. «Антропогенные влияния на водные экосистемы». М.: Т-во науч. изд. КМК 2005, С. 32-59.
- Федоров В.Д. К стратегии биологического мониторинга. // Науч. докл. высш. школы, Биол. науки, 1974, №10.
- Федоров В.Д. Биологический мониторинг: обоснование и опыт организации. // Гидробиол. журн., 1975, Т.2, №5.
- Крупина М.В. Содержание тяжелых металлов в мидиях *Mytilus edulis* Белого моря. // В сб. "Водные экосистемы и организмы – 7". Москва. Мах-Press, 2006.

СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ЭСТУАРНЫХ ЗОН ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

О.Н. Лукьянова¹, Е.С. Бродский², Г.М. Чуйко³

¹ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, Владивосток, Россия

² Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

³ Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, Борок, Россия

onlukyanova@tinro.ru

Залив Петра Великого расположен в северо-западной части Японского моря и является наиболее освоенной в хозяйственном отношении акваторией на российском побережье Тихого океана. На берегах залива расположены крупные города-порты Владивосток и Находка, плотность населения в прибрежной зоне максимальна для Дальневосточного федерального округа. В последние годы на акватории залива развернуто большое строительство объектов саммита глав государств Азиатско-Тихоокеанского экономического сотрудничества, который пройдет во Владивостоке в 2012 г. Промышленность, сельское хозяйство, морской и автомобильный транспорт вызывают значительное загрязнение прибрежной зоны залива, влияют на его биологические, технические и рекреационные ресурсы.

В залив впадает несколько больших и малых рек, водосборные территории которых отличаются по степени антропогенной трансформации. Крупнейшая на территории Приморского края река Раздольная берет начало в Китае и протекает по основным сельскохозяйственным районам края, впадая в залив в его северной части. Река является одним из основных поставщиков загрязняющих веществ в прибрежную зону. Река Суходол впадает в залив в западной части, относится к рекам горного типа, с быстрым течением, ее бассейн менее освоен в хозяйственном отношении. Река Гладкая протекает по южным районам Приморья, это река равнинного типа, с медленным течением, в настоящее время ее бассейн в основном представляет собой зону летнего отдыха жителей Дальнего Востока. На водосборных территориях всех рек в недавнем прошлом размещались воинские части, в настоящее время здесь весьма активен автотранспорт.

Как правило, выносимые реками загрязняющие вещества в значительной степени оседают в эстуариях, в зоне смешения морских и пресных вод, в области биогеохимического барьера. В связи с этим загрязнение в эстуариях может быть максимальным по сравнению с граничащими экосистемами. В донных отложениях эстуарных зон отмечены повышенные концентрации тяжелых металлов.

Стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ) относятся к группе хлорорганических соединений и отличаются высокой токсичностью, чрезвычайной биологической активностью, необычайной устойчивостью и способностью накапливаться в различных звеньях пищевой цепи.

Они воздействуют на все компоненты природных экосистем, в том числе и на человека. Среди СОЗ наиболее часто встречаются полихлорированные бифенилы (ПХБ) и хлорорганические пестициды (ХОП) - гексахлорбензол (ГХБ), смесь изомеров гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) с его метаболитами. Несмотря на постепенное сокращение применения СОЗ в хозяйственной деятельности, они продолжают загрязнять окружающую среду и в настоящее время присутствуют практически по всему Земному шару во всех объектах окружающей среды, включая живые организмы. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), основными путями поступления СОЗ в окружающую среду являются: производства, использующие СОЗ в технологических процессах, а также получающие их в качестве побочных продуктов; испарение из пластификаторов; сжигание бытовых и промышленных отходов, при утечке и повреждении промышленных трансформаторов, конденсаторов и другого оборудования (для ПХБ); выброс в атмосферу и в водные объекты с другими промышленными отходами; другие неконтролируемые пути (Гигиенические...1980; Клюев, Бродский, 2000).

Данные о содержании СОЗ в донных отложениях южной части тихоокеанского побережья России носят ограниченный характер. Целью данной работы было установить уровень содержания СОЗ в донных отложениях эстуарных зон залива Петра Великого, как областей с максимально возможным загрязнением.

Пробы донных отложений были отобраны в сентябре-октябре 2008 года в эстуариях трех рек, впадающих в залив Петра Великого (рисунок): по одной пробе в эстуариях р.Гладкой и р.Суходол и 2 пробы в эстуарии р.Раздольной. Высушенные на воздухе образцы анализировали в лаборатории аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, в соответствии с «Методикой выполнения измерений массовой концентрации полихлорированных бифенилов и хлорсодержащих пестицидов в почвах, шламах, твердых отходах, биологических и растительных материалах, природных и сточных водах методом хромато-масс-спектрометрии» (МВИ ЛАЭ-04/05), разработанной в ИПЭЭ РАН. Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения при разрешении около 10000, на газовом хроматографе HP 6890 Plus, масс-спектрометре Finnigan MAT 95XP.

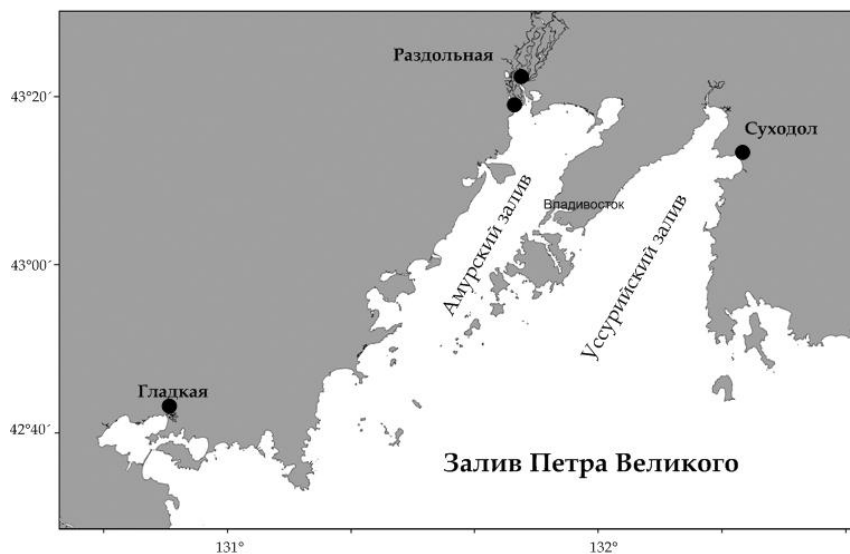


Рисунок. Места отбора проб донных отложений в эстуарных зонах залива Петра Великого.

Всего было определено 27 конгенов ПХБ с различной степенью хлорирования, ГХБ, изомеры ГХЦГ и ДДТ с его метаболитами.

Обобщенные результаты определения ПХБ и ХОП (ГХБ, ГХЦГ и ДДТ) представлены в таблице 1. Во всех исследованных пробах по мере увеличения содержания исследованные СОЗ располагались в ряду ПХБ<ГХБ<ГХЦГ<ДДТ. Наибольшие уровни всех СОЗ обнаружены в эстуарии р. Раздольная, а наименьшие – в эстуарии р. Гладкая. Максимальные различия для разных групп СОЗ составили от 4.7 (ПХБ) до 7.1 раза (ДДТ). В целом это соответствует полученным ранее данным о разной интенсивности антропогенного загрязнения и степени токсичности грунтов в этих зонах (Лукиянова и др., 2010).

Таблица 1. Содержание разных групп СОЗ в грунтах эстуарных зон залива Петра Великого (нг/г сухой массы)

СОЗ	Гладкая	Суходол	Раздольная 1	Раздольная 2
Сумма ПХБ	6.9	11.5	32.6	17.3
ГХБ	63	26	753	434
Сумма ГХЦГ	508	485	2006	2185
Сумма ДДТ	6296	12908	44732	41429

Сравнение уровней содержания СОЗ в ДО в этом регионе и в пресноводных объектах Европейской части России выявило существенные различия. Так в северной части Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища в зоне влияния коммунально-промышленного комплекса г. Череповец содержание в ДО ПХБ, ГХБ и ДДТ с метаболитами в 2006 г. составило 425.6, 0.83 и 27.1 нг/г сухой массы. Для ПХБ это в десятки раз выше, а для остальных СОЗ – в сотни раз ниже того, что выявлено в эстуариях рек Гладкая, Суходол и Раздольная. В остальной части водохранилища, где содержание СОЗ находится на фоновом уровне, эти величины были соответственно 24.3, 0.34 и 2.3 нг/г сухой массы (Чуйко и др., 2010). Выявленные различия указывают на то, что содержание ГХБ и ДДТ в эстуарных зонах рек залива Петра Великого в несколько сотен и тысяч раз превышало, а ПХБ было на уровне или ниже фоновых уровней соответствующих СОЗ, зарегистрированных в Европейской части России.

Качественный анализ ХОП в ДО рр. Гладкая, Суходол и Раздольная показывает, что в составе смеси ГХЦГ доминирует его γ -изомер, а ДДТ преобладает над его метаболитами, что в целом свидетельствует о недавнем поступлении этих СОЗ в водные объекты. Такой качественный состав наряду с высокими уровнями содержания этих ХОП указывают на их активное применение в водосборной зоне исследованных рек до настоящего времени, несмотря на официальный запрет их производства и использования. Наиболее интенсивно эти соединения применяются в бассейне р. Раздольная.

Качественный анализ ПХБ показал, что в целом их конгенерный профиль в пробах донных отложений из трех исследованных рек ближе всего соответствует составу коммерческой смеси Арохлор-1254: везде доминируют ПеХБ, занимая в пробах 43-59%, а в коммерческом препарате – 53% от общего содержания (таблица 2).

Таблица 2. Суммарное содержание гомологичных групп ПХБ с разной степенью хлорирования в донных отложениях эстуариев зал. Петра Великого (нг/г сухой массы)

Группа ПХБ	Гладкая	Суходол	Раздольная 1	Раздольная 2
Монохлорированные (МоХБ)	33	< 5	83	32
Дихлорированные (ДиХБ)	189	< 5	1559	916
Трихлорированные (ТриХБ)	839	201	800	240
Тетрахлорированные (ТеХБ)	2191	3066	11658	6276
Пентахлорированные (ПеХБ)	3002	6762	15425	7762
Гексахлорированные (ГкХБ)	604	1400	3043	2046
Гептахлорированные (ГпХБ)	26.9	70.7	55.9	34.4
Октахлорированные (ОкХБ)	1.0	6.8	9.1	4.6
Нонахлорированные (НоХБ)	< 0.1	< 0.7	< 0.3	< 0.3
Сумма ПХБ	6886	11505	32633	17311

Вместе с тем, в отличие от Арохлора-1254, в донных отложениях высока доля ТеХБ – 15 и 26.6-36.3% соответственно, а также присутствуют более низкохлорированные конгенеры (МоХБ-ТриХБ). Их относительное содержание в пробе из р. Гладкая наибольшее и составляет 15.4%, р. Суходол - 1.8%, р. Раздольная - 6.9 -7.5%, а в Арохлор-1254 - <1%. Среди исследованных рек наиболее соответствуют составу коммерческой смеси пробы из. р. Суходол, что может свидетельствовать, хотя и о незначительном, но достаточно свежем поступлении ПХБ в эту реку из какого-то близко расположенного локального источника. Пробы из двух других рек в большей степени отличаются по конгенерному профилю от Арохлор-1254, что указывает на длительное нахождение ПХБ в окружающей среде, в процессе которого произошла их трансформация, направленная на редуцирование высокохлорированных конгенеров (как результат, низкохлорированные конгенеры начинают преобладать). Обычно этот процесс в водных экосистемах протекает в донных отложениях в результате деятельности анаэробных

микроорганизмов и протекает сравнительно медленно (Borlakoglu, Neagele, 1991). В случае с пробами из рр. Гладкая и Раздольная такая деградация ПХБ может быть обусловлена либо давним их поступлением из локального источника, либо длительной циркуляцией в атмосфере и попаданием в реку в результате постоянного трансграничного атмосферного переноса.

В нашей стране нормативы для содержания СОЗ в донных осадках не разработаны. В воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования установлены следующие ПДК: ДДТ и его метаболиты, а также ГХЦГ – отсутствие, ПХБ (суммарно) - 0,5 мкг/л. Для почв ориентировочно допустимое количество (ОДК) для этих групп СОЗ соответственно составляет 0.1 и 0.6 мкг/г сухой массы. Определение суммарного содержания ПХБ часто является неинформативным, так как не учитывается разница в токсичности различных составляющих, а методы определения являются либо излишне трудоемкими, либо неточными. Потому в странах Евросоюза в настоящее время разрабатывается система нормирования индикаторных конгенов ПХБ. В Нидерландах безопасный уровень содержания ПХБ в почвах при проведении рекультивации определен как 0.02 мкг/г сухой массы, а критический уровень – 1 мкг/г. Для донных отложений голландские (ГХБ, ДДТ и его метаболитов, ПХБ) и канадские (ГХЦГ) экологические нормативы следующие: 2.5, 2.5, 20 и 0.94 нг/г сухой массы соответственно.

Сравнение полученных уровней содержания разных групп СОЗ в донных отложениях трех рек с зарубежными нормативными значениями показывает, что только для ПХБ эти нормативы выдерживаются. Для всех исследованных ХОП они значительно превышены. Особенно высокое превышение (около 2000 раз) отмечается для ДДТ и его метаболитов, а также ГХЦГ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-05-00805).

Список литературы

Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Протокол №2. Полихлорированные бифенилы и трифенилы. Совместное издание Программы ООН по окружающей среде и Всемирной организации здравоохранения, Женева, 1980.

Клюев Н.А., Бродский Е.С. Определение полихлорированных бифенилов в окружающей среде и биоте. Полихлорированные бифенилы. Супертоксиканты XXI века. Инф. выпуск №5 ВИНТИ, Москва, 2000, с. 31-63.

Лукьянова О.Н., Ирейкина С.А., Черняев А.П., Важова А.С., Боярова М.Д. Экоотоксикологическая оценка некоторых эстуарных зон Южного Приморья. // Изв. ТИНРО. 2010. Т.162. С. 214-224.

Чуйко Г.М., Законнов В.В., Морозов А.А., Бродский Е.С., Шелепчиков А.А., Фешин Д.Б. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) и хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и лебде (*Abramis brama* L.) из Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. – 2010. – №2. – С.98-108.

Borlakoglu J.T., Neagele K. D. Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism and toxicity with PCBs // Comp. Biochem. Physiol. – 1991. – V. 100C. – No.3. – P. 327-338.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В МОЛЛЮСКАХ р. DREISSENA ИЗ ВОДОХРАНИЛИЩ МАНЫЧСКОГО КАСКАДА

Н.А. Небесихина¹, Д.Ф. Павлов²

¹ ФГУП «АзНИИРХ», ул. Береговая, 21/2, г. Ростов-на-Дону, Россия

² Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Борок, Ярославской обл., Россия,
Pavlov@biw.yaroslavl.ru

В XX веке моллюски р. Dreissena (*D. polymorpha* (Pallas) and *D. bugensis* Andrusov) стали массовыми представителями бентоса многих водоемов Евразии и Северной Америки. Эти моллюски играют огромную роль в функционировании экосистем водоемов, населенных ими. Достаточно хорошо изучены их влияние на общие продукционные процессы в водоемах, роль в формировании специфических высокопродуктивных донных сообществ, обеспечении кормовой базы некоторых промысловых видов рыб (Щербина, 2003, 2008). Известно также, что во многих водоемах дрейссениды формируют мощные обрастания, препятствующие нормальной работе гидротехнических сооружений. Поэтому неоднократно поднимался вопрос об изъятии из водоемов части накопленных запасов этих моллюсков в целях контроля их численности (мелиорация) и, попутно, для использования в качестве корма (или высоко-белковых кормовых

добавок) для домашнего скота и птицы. Так, из водохранилищ Манычского каскада, в которых дрейссены сформировали очень продуктивные, устойчивые донные сообщества, можно ежегодно изымать до 90,52 тыс. т в Веселовском водохранилище и до 5,64 тыс. т в Пролетарском. Однако, для оценки пригодности использования дрейссен в этих целях необходимо не только выяснить степень их кормовой ценности (например, содержание потенциально «полезных» микро- и макроэлементов), но и оценить уровни потенциально «вредных» тяжелых металлов ТМ и органических соединений (например, пестицидов, включая высоко-опасные хлорорганические пестициды (ХОП)).

По результатам исследований ФГУП «АзНИИРХ», ежегодное изъятие до 30% общего запаса дрейссен не нанесет ущерба воспроизводству их популяций и кормовой базе промысловых рыб Манычских водохранилищ. Однако при этом не учитывается один аспект - влияние дрейссен на качество воды в водоемах. До настоящего времени плохо изучена роль этих моллюсков-фильтраторов в перестройке биогеохимических циклов химических элементов и соединений в водоемах при массовом развитии в них дрейссен (Klerks et al., 1997; Pavlov et al., 2005). В то же время, согласно существующим представлениям, дрейссены играют важнейшую роль в так называемом «биологическом самоочищении» водоемов (Львова и др., 1980; Дрейссена..., 1994; Остапеня, 2007 и др.), хотя на наш взгляд эта концепция представляется небесспорной (Павлов и др., 2008). «Улучшение качества воды» было отмечено при вселении и массовом развитии дрейссены в Плещеевом озере (Щербина, 2008). Однако в этом исследовании не проводилась количественная оценка гидрохимических показателей и вывод об «очищении воды» дрейссенами строится на экспертной оценке. Таким образом, с одной стороны, отсутствуют точные количественные оценки влияния на гидрохимический режим водоемов вселения и массового развития дрейссен, а с другой стороны, не ясно, как повлияет на качество среды изъятие очень значительной части биомассы этих моллюсков. Наконец, следует отметить, что сих пор не ясно, корректно ли и, если да, то с какими оговорками, использовать анализ уровней накопления дрейссенами загрязняющих веществ, для мониторинга уровней загрязняющих веществ, в частности - тяжелых металлов (ТМ), в водоемах в целом (Camusso et al., 2001; Richman, Sommers, 2005).

Большая часть исследований уровней накопления разных загрязняющих веществ моллюсками р. *Dreissena* была выполнена в 70-90х годах прошлого столетия, т. е. в иных социально-экономических (определяющих антропогенную нагрузку) и экологических условиях (например, при иных климатических условиях и уровне трофности) и только на *D. polymorpha*. В некоторых водоемах (например, в водохранилищах Манычского каскада на юге России) моллюски, в данном аспекте, ранее не изучались. Основой для решения указанных проблем должно послужить накопление данных о химическом составе дрейссен, населяющих водоемы различного типа.

Цель работы - предварительная оценка современных уровней накопления ТМ и ХОП у моллюсков *Dreissena polymorpha* (Pallas) и *D. bugensis* Andrusov из системы водохранилищ Манычского каскада. Решения задач исследования позволит не только оценить качество моллюсков, как корма для домашних животных, но и возможную роль их изъятия в изменениях биогеохимических циклов ряда химических элементов и, следовательно, в изменении гидрохимического режима водохранилищ.

Пробы моллюсков *Dreissena polymorpha* и *D. bugensis* отбирали в летне-осенний период 2008 г. Моллюсков собирали вручную с заселенных ими субстратов или (с больших глубин) при помощи дночерпателя. Свежевыловленных моллюсков тщательно промывали от ила и посторонних примесей. Разновозрастные моллюски обоих видов (в количестве до нескольких десятков с каждой точки отбора проб), отобранные в разных частях Веселовского и Пролетарского водохранилищ, объединялись в одну интегральную пробу. Моллюски, предварительно просушенные на фильтровальной бумаге, перемалывались целиком (т. е. раковины вместе с мягкими тканями), полученный фарш гомогенизировали в фарфоровой ступке и высушивали до постоянного веса при температуре не более 39°C. Такой подход к подготовке проб моделировал практику изъятия моллюсков из водоема (смесь видов и разновозрастных особей, зачастую формирующих смешанные дружки, разные участки водоемов) в качестве сырья для последующей переработки в корма. Содержание элементов определяли в интегральной пробе методом рентгенфлуоресцентного анализа на спектрометре типа 3270E, фирмы Rigaku (Япония). Для определения уровней ХОП использовали стандартные методы пробоподготовки (экстракции) и газохроматографического анализа (*Методика выполнения измерений...* 2008). Для

предварительной грубой оценки влияния изъятия биомассы дрейссен из водохранилищ на баланс химических элементов в экосистемах водоемов, рассчитаны количества химических элементов, которые будут изыматься с моллюсками. Для этого, полученные концентрации химических элементов в биомассе умножались на сухую биомассу моллюсков, которую предлагается изымать из водоемов. При расчетах исходили из данных Львовой (1980) и Baines et al. (2007), согласно которым сухая масса моллюска с раковиной составляет 45–52% (т. е., примерно половина – такое осреднение представляется нам достаточно точным для целей данного исследования) от сырой массы.

Результаты оценки уровней накопления ряда химических элементов, включая ТМ, в «дрейсеновом сырье» приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Уровни содержания ряда химических элементов в дрейссенах (*Dreissena polymorpha* и *D. bugensis*, интегральная проба) Веселовского и Пролетарского водохранилищ и величины их выноса при изъятии биомассы дрейсенид

Элемент	Концентрация, мкг/г сухой массы	Норматив*	Вынос химических элементов (кг)	
			Веселовское вдхр.**	Пролетарское вдхр.***
Условно «не токсичные элементы»				
Кальций	295220	Не нормируется	13373466	767572
Магний	3400	--	154020	8840
Кремний	77000	--	3488100	200200
Фосфор	2200	--	99660	5720
Олово	1,8	--	81.5	7566
Стронций	2910	--	131823	7566
Железо	8470	--	383691	22022
Марганец	660	--	29898	1716
Барий	100	--	4530	260
Алюминий	29395	--	13315935	76427
Ванадий	56	--	2536.8	145.6
Цинк	256	--	115968	6656
Хром	75	--	3397.5	195
Никель	30	--	1359	78
Потенциально «токсичные элементы (тяжелые металлы)»				
Свинец	3,7	5.0	167.6	9.6
Мышьяк	1,8	10.0	81.5	4.7
Кадмий	0,02	2.0	0.91	0.05
Ртуть	0.02	0.5	0.91	0.05

Примечание. * Нормативы приведены по *ВемПуН* (2003). Объемы изъятия дрейсенид: ** - 45. 3 тыс. т, сухая масса; *** - 2.6 тыс. т, сухая масса.

Ранее было показано, что уровни большинства химических элементов, за исключением кальция и стронция, в мягких тканях дрейсенид выше, чем в их раковинах (Павлов и др., 2008; Pavlov et al., 2005). Поскольку проанализированные пробы биомассы дрейсенид содержали как раковины, так и мягкие ткани, и масса раковин у этих моллюсков значительно превышает сухую массу мягких тканей (Львова, 1980), не удивительно, что концентрации таких элементов, как кальций, кремний, стронций и алюминий, которые накапливаются преимущественно в раковинах, были высокими. Что касается других элементов, включая потенциально токсичные ТМ, их концентрации были относительно низкими, ниже установленных нормативами РФ для корма (*ВемПуН*, 2003).

Поскольку в данном исследовании анализировалась смесь тканей моллюсков, а не их содержание в мягких тканях и раковинах по отдельности, прямое сравнение выявленных уровней ТМ с данными других исследований будет некорректным. Однако оценочно, при достаточно условном сравнении выявленных концентраций с данными по другим водным животным, включая тех же дрейсенид (Никаноров, Жулидов, 1991; Горяйнова и др., 2008; Goryaynova et al., 2008; Pavlov et al., 2005) можно заключить, что уровни ТМ, накопленные в биомассе дрейсенид Манычских водохранилищ, невелики и характерны для слабо загрязненных этими элементами водоемов.

Это может свидетельствовать об относительном благополучии исследованных водохранилищ в отношении загрязнения ТМ. Кроме того, очевидно, что в данном случае имело место «разбавление» элементов, содержащихся в метаболически более активных мягких тканях, менее активным «балластом» раковин, содержащих намного меньше этих элементов: усредненная масса раковин составляет 41–52% (Львова, 1980), т. е. примерно 50% от сырой массы целого моллюска.

Данные по содержанию в дрейссенах ХОП (Табл. 2) показывают, что содержание исследованных пестицидов в «дрейссенном сырье» Манычских водохранилищ, находится на пределе их количественного определения и значительно меньше нормативных предельно допустимых величин. Это также может указывать, как на низкий уровень загрязнения водоемов, так и на указанное выше «разбавление» мягких тканей сравнительно инертными раковинами. Причем, совершенно очевидно, что в случае с липофильными ХОП, эффект такого разбавления массой раковин, не содержащих липиды, будет особенно выраженным.

Таблица 2. Уровни содержания ряда хлорорганических пестицидов в дрейссенах (*Dreissena polymorpha* и *D. bugensis*, интегральная проба) Веселовского и Пролетарского водохранилищ

Наименование вещества	Содержание, мг/кг сырой массы	Норматив*
Альдрин (в сумме с дильдрином)	0,001	0,01
Эндрин	<0,0001	0,01
ΣГХЦГ	<0,0002	0,2
ΣДДТ	0,005	0,05
Тиодан	<0,0001	0,1
ΣХлордан	<0,0001	0,02

Примечание. * Нормативы приведены по *ВемПун* (2003).

Таким образом, проведенная предварительная оценка уровней ТМ и ХОП в биомассе дрейссенид показывает, что выявленные уровни этих загрязняющих веществ ниже соответствующих нормативов, не представляют опасности и эти моллюски могут быть использованы в качестве сырья, для приготовления корма и кормовых добавок для скота и домашней птицы. Однако, полученные данные совершенно не достаточны для корректных выводов о загрязнении моллюсков водохранилищ Манычского каскада ТМ и ХОП. Необходимо проведение дальнейшего мониторинга, в том числе с отдельным анализом содержания потенциально опасных загрязняющих веществ в мягких тканях и раковинах дрейссенид.

Что касается оценки возможного влияния изъятия биомассы дрейссенид на качество воды (или в более общем виде - «среды»), для точного ответа на этот вопрос необходимо проведение балансовых расчетов циклов химических элементов и соединений (включая загрязняющие вещества) в экосистеме водохранилищ и определения вклада дрейссенид в баланс элементов в водоеме. В качестве первого шага нами проведен расчет выноса химических элементов, накопленных дрейссенидами, при их изъятии из водоема (Табл. 1).

Приведенные данные показывают, что при изъятии биомассы дрейссенид в предполагаемых объемах из водоемов будет выноситься весьма значительное количество химических элементов, как потенциально «полезных» (микро- и макроэлементы), так и потенциально опасных (ТМ).

Отметим, что как было выявлено ранее, дрейссениды выводят металлы из толщи воды (точнее, из планктонного цикла) не только и не столько за счет их накопления в собственных тканях: моллюски способствуют очень интенсивной седиментации ТМ в форме комплексов, адсорбированных на псевдофекалиях и агглютинатах, осаждаемых дрейссеной (Klerks et al., 1997). Это означает, что оценка реального вклада изъятия дрейссены из водоема в изменения его гидрохимического режима представляет собой намного более сложную задачу, чем просто учет массы физически выносимых элементов. Изъятие живых моллюсков приведет к сокращению переноса химических элементов из динамических пелагических трофических цепей в более консервативные бентосные за счет снижения масштабов указанного выше процесса осаждения с псевдофекалиями и агглютинатами. Определение масштаба таких изменений невозможно без проведения в дальнейшем специальных исследований.

Список литературы

- Ветеринарные правила и нормы по безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства кормов. ВетПиН 13-05-01/0101, (проект), Москва, 2003 - 28с
- Горайнова З. И., Павлов Д. Ф., Фронтасьева М. В. Тяжелые металлы и редкоземельные элементы в донных отложениях и дрейссенидах Рыбинского водохранилища. Материалы III Всерос. конф. по водной токсикологии «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы». Часть 1. Борок. «Ярославский печатный двор», 2008. С. 19-22.
- Дрейссена *Dreissena polymorpha* (Pallas) (Bivalvia, Dreissenidae) Систематика, экология, практическое значение. М.: Наука, 1994. 240 с.
- Львова А.А. Экология дрейссены *Dreissena polymorpha polymorpha* (Pall.) // Бентос Учинского водохранилища. М.: Наука, 1980. С. 101–119.
- Львова А.А., Извекова Э.И., Соколова Н.Ю. Роль донных организмов в трансформации органического вещества и в процессах самоочищения водоемов // Бентос Учинского водохранилища. М.: Наука, 1980. С. 171–177.
- "Методика выполнения измерений массовых долей хлорорганических пестицидов в пробах биологического материала пресных и морских водных объектов методом газожидкостной хроматографии", Ростов-на-Дону -2008, св-во: С 8.24-2008; Ф.Р. 1.31.2008.04701; НДИ 05.15-2008.
- Никаноров А. М., Жулидов А. В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. Л. Гидрометеиздат. 1991. 310 с.
- Остапеня А.П. Дезэвтрофирование или бентификация? // Матер. III Междунар. научн. конференции. Минск–Нарочь. 2007. С. 31–32.
- Павлов Д. Ф., Г. Х. Щербина, Е. А. Прянишникова. Накопление некоторых тяжелых металлов *Dreissena polymorpha* (Pallas) и *D. bugensis* (Andrusov) Рыбинского водохранилища и вопрос о роли этих моллюсков в самоочищении водоема. «Дрейссениды: эволюция, систематика, экология». Лекции и материалы докладов 1-й Международной школы-конференции. ИБВВ РАН, 28 октября - 1 ноября 2008 г. «Ярославский печатный двор», 2008, С. 106-110.
- Щербина Г.Х. Роль видов-вселенцев в структуре макрозообентоса верхневолжских водохранилищ // Инвазии чужеродных видов в Голарктике. Борок: Изд-во Рыбинский печатный двор, 2003. С. 213–223.
- Щербина Г. Х. Структура биоценоза *Dreissena polymorpha* (Pallas) и роль моллюска в питании плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus) озера Плещеево. Биология внутренних вод. 2008. № 4. С. 89–97.
- Baines S., Fisher N., Cole J. Dissolved organic matter and persistence of the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) under low food conditions. Limnol. Oceanogr. 2007. V. 52. № 1. P. 70–78.
- Camusso M, Balestrini R, Binelli A. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. Chemosphere. 2001. V. 44. № 2. P. 263–70.
- Goryaynova Z.I., Pavlov D.F., Frontasyeva M.V. Heavy metals and REE in bottom sediments and dreissenids of the Rybinsk Reservoir. FLNP JINR Annual Report-2008, pp. 1-3.
- Klerks, P.L., P.C Fraleigh, J.E. Lawniczak. Effects of the exotic Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) on the metal cycling in Lake Erie. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1997, Vol. 54. P. 1630-1638.
- Pavlov D.F., Frontasyeva M.V. Comparative chemical composition of two invasive dreissenids, *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* in the Rybinsk Reservoir (the Upper Volga basin, Russia) and assessment of invasion-related modification of exchange and balance of chemical elements in the reservoir ecosystem// Alien Species in Holarctic (Borok-2). Book of abstracts. Second Intern. Symp., Borok, Russia, 27 Sept. - 1 Oct. 2005, Rybinsk-Borok, 2005, P. 126-127.
- Pavlov D.F., Frontasyeva M.V., Pavlov S.S., Pankratova Yu. Distribution of trace elements in freshwater ecosystem compartments of man-made Rybinsk Reservoir (Central Russia) using epithermal neutron activation analysis. Ovidius University Annals of Chemistry. 2005. 16. No 1, P. 72-75.
- Richman L., Somers K. Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the Niagara River? Water, air and soil pollution. 2005. V. 167. № 1–4. P. 155–178.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА МЕЛАФЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ И ТОКСИЧНОСТЬ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ

К.И. Резяпова, Л.В. Гурьева, Н.Ю. Степанова, С.Г. Фаттахов

Казанский (Приволжский) федеральный университет
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Россия, step090660@yandex.ru

В настоящее время для ликвидации нефтяных разливов на водных поверхностях используются различные методы. Однако применяемые физико-химические методы восстановления почв и вод, нередко сами по себе наносят больший экологический ущерб природе, чем нефтяное загрязнение. Целый ряд диспергентов, применяемых для ликвидации нефтяных разливов, оказывают токсическое воздействие на морские организмы, извлекая кислород из воды, создают мертвые зоны при штиле (Войно, 2006).

В настоящее время перспективным методом очистки акваторий и донных отложений от загрязнений нефтью и нефтепродуктами признан биологический метод, основанный на использовании биопрепаратов. В России разработано около 40 биопрепаратов на основе нефтеокисляющих бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов (Злотников, 2006). Одной из наиболее важных характеристик биопрепаратов является максимальный уровень загрязнения, подлежащий устранению. Многие из известных препаратов эффективны лишь при низком уровне загрязнения нефтью и нефтепродуктами, что существенно ограничивает их применение. В настоящее время расширяется использование биологически активных веществ для стимуляции процессов самоочищения от нефтяного загрязнения, преимуществом которых является их экологическая безопасность. Одним из таких препаратов является мелафен, зарекомендовавший себя как стимулятор процессов деструкции нефтепродуктов в почвах Западной Сибири (Захарова, 2008).

Целью настоящей работы было оценить влияние биологически активного вещества мелафена на содержание и токсичность нефтепродуктов в донных отложениях в условиях лабораторного моделирования.

Материалы и методы. В лабораторном моделировании использовали два типа стандартных донных отложений (ДО): песок, отобранный в экологически чистом районе и смесь песка с илом (1:1). Внесение нефти (Ново-Суксинское месторождение Республики Татарстан) производили в соответствии с «Временным...» (2002) в количестве 50 мл на 1 кг донных отложений.

В качестве биологически активного вещества был выбран мелафен - гетероциклическое фосфорорганическое соединение, регулятор биохимических процессов, которое характеризуется токсикологической безопасностью, оказывает свое действие при чрезвычайно низких концентрациях - 10^{-6} - 10^{-7} Моль/л (Фаттахов, 2006).

В ходе предварительного проведенного эксперимента была установлена эффективная концентрация ($1 \cdot 10^{-4}$ %) мелафена, при которой наблюдается максимальное снижение содержания нефтепродуктов в донных отложениях. Раствор мелафена использовали при отмывании замазученных нефтью донных отложений.

Определение нефтепродуктов осуществляли методом ИК-спектроскопии (ПНДФ 16.1:2.2.22-98). Тестирование проводили с использованием *Paramecium caudatum* Ehrenberg 1838 и *Daphnia magna* Straus 1820 в соответствии с «Временным...» (2002).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических и непараметрических методов сравнения выборок по критериям Фишера, Стьюдента и Вилкоксона (парного).

Результаты и их обсуждение. Сравнение содержания нефтепродуктов в ДО разного типа показало, что внесение мелафена привело к интенсификации деструкции нефтепродуктов в илистых ДО на 22 % по сравнению с песчаными (Рис. 1) и на 26 % по сравнению с контрольным вариантом. В то же время, достоверного различия в содержании нефтепродуктов в контрольных вариантах без внесения мелафена (илистые ДО + нефть и песчаные ДО + нефть) не отмечено. Такая разница в наблюдаемом эффекте свидетельствует, по-видимому, о механизме действия мелафена - стимуляторе биохимических процессов деградации нефти, и в большей степени проявляется в случае с матрицей, обогащенной органическим веществом.

Потенциальное токсическое воздействие продуктов биодеструкции нефти можно выявить в ходе биотестирования.

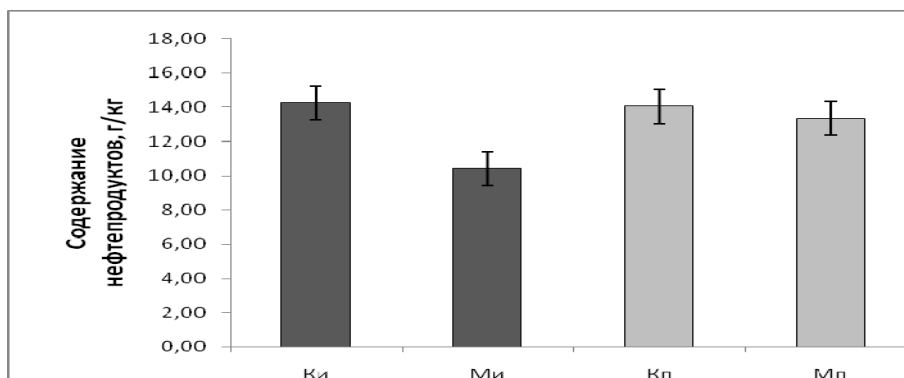


Рис. 1. Содержание нефтепродуктов в разных вариантах опыта:

Ки – контрольный вариант с илистыми ДО + нефть;

Кп – контрольный вариант с песчаными ДО + нефть;

Ми – илистые ДО с внесением мелафена и нефти;

Мп – песчаные ДО с внесением мелафена и нефти.

Результаты сравнения выборок непараметрическим методом парного критерия Вилкоксона по показателю «интенсивность деления» в опытах с использованием *Paramecium caudatum* в опытах с разными типами ДО показали достоверность отличий варианта с внесением мелафена в илистые ДО от контрольного варианта (ДО_и + нефть) и варианта с внесением мелафена в песок (ДО_п + нефть + мелафен). Интенсивность деления инфузорий в илистых ДО при внесении мелафена не зависела от содержания нефтепродуктов (Рис. 2). Напротив, отмечено, что при концентрации на уровне 5 г/кг наблюдается интенсификация клеточного деления. По-видимому, данная концентрация нефтепродуктов в ДО стимулирует развитие углеводородокисляющих бактерий и сапрофитной микрофлоры, увеличивая трофический потенциал инфузорий. В условиях ограниченности развития микрофлоры в песчаных ДО между интенсивностью деления инфузорий и содержанием нефтепродуктов наблюдается зависимость «доза-эффект», которая описывается уравнением $y = 1,98x^2 - 32,57x + 157,9$ ($R^2 = 0,97$).

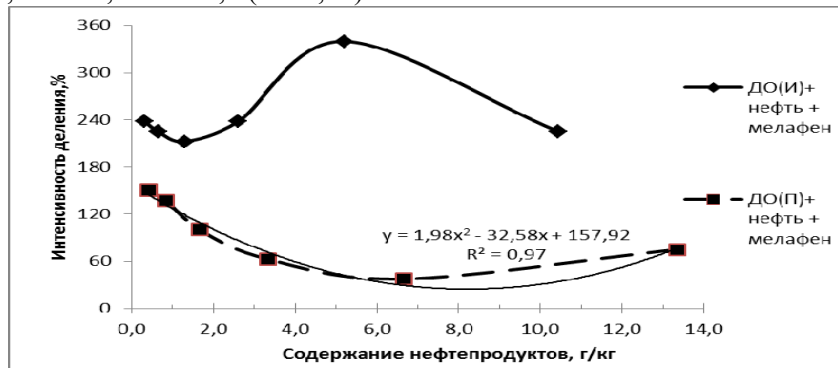


Рис. 2. Интенсивность деления *Paramecium caudatum* в вариантах с илистыми и песчаными донными отложениями с внесением мелафена (ДО(П) – песчаные донные отложения, ДО(И) – илистые донные отложения).

Выживаемость дафний в илистых ДО с внесением мелафена была также выше по сравнению с песчаными, что связано, как уже отмечалось, со стимуляцией процессов биохимического окисления нефтепродуктов в условиях повышенного содержания органических веществ и соответственно со снижением их токсичности. Для илистых ДО зависимость наблюдаемого эффекта от содержания нефтепродуктов описывается уравнением $y = -0,20x^2 - 0,93x + 92,22$ ($R^2 = 0,86$). Для песчаных ДО при внесении мелафена наблюдается резкое снижение токсического эффекта при уменьшении содержания нефтепродуктов в соответствии с уравнением $y = 1,47x^2 - 22,77x + 90,42$ ($R^2 = 0,84$), а, начиная с концентрации 7 г/кг и более наблюдается увеличение выживаемости. Такая инверсия, по-видимому, связана со снижением токсичности продуктов микробиологической деструкции нефтепродуктов. Деятельность аборигенной микрофлоры интенсифицируется при достижении вышеуказанной концентрации. Данный эффект хоть и в меньшей степени был отмечен и для инфузорий.

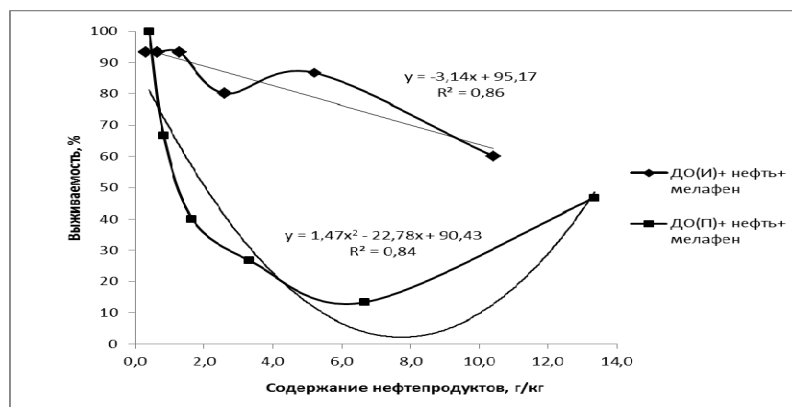


Рис. 3. Выживаемость *Daphnia magna* в илистых и песчаных отложениях с внесением мелафена (ДО(П) – песчаные донные отложения, ДО(И) – илистые донные отложения).

Выводы

1. Использование биологически активного вещества мелафена приводит к снижению содержания нефтепродуктов в илистых донных отложениях на 26 %.
2. Применение мелафена в случае загрязнения нефтью илистых донных отложений приводит к ликвидации токсического эффекта на инфузориях *Paramecium caudatum* и к значительному снижению токсичности в песчаных донных отложениях.
3. Аналогичный эффект отмечен и для *Daphnia magna*: выживаемость *Daphnia magna* в илистых донных отложениях после внесения мелафена выше по сравнению с песчаными. При внесении мелафена в песчаные донные отложения, начиная с концентрации 7 г/кг, наблюдается эффект инверсии токсичности, связанный с интенсификацией процесса микробиологической деструкции нефтепродуктов при данной концентрации.

Список литературы

- Войно Л.И. Биодegradация нефтезагрязнений почв и акваторий // Фундаментальные исследования. – 2006. – № 5 – С. 68-70.
- Временное методическое руководство по нормированию уровней содержания химических веществ в донных отложениях поверхностных водных объектов (на примере нефти). - М.: РЭФИА, НИА - Природа, 2002 – 138с.
- Захарова К.А., Моисеев В.В., Шулаев М.В., Емельянов В.М. Исследование биодеструкции нефтезагрязнений в подзолистых почвах Западной Сибири под воздействием препаратов «Мелафен» и «Fyte-Zyme» // Научный журнал Вестник Казанского ГАУ, 2007. -№1 -С 60-65.
- Злотников А.К. Биопрепарат альбит в технологии очистки почв от нефтяного загрязнения // Нефтегазовое дело, 2006. -№1- С. 13-17.
- ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектрометрии. - ФГУ ФЦАО, 2005. – 18 с.
- Фаттахов С.Г., Резник В.С, Коновалов А.И. Мелафен - перспективный регулятор роста растений для сельского хозяйства и биотехнологии // Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста растений нового поколения «Мелафена» в сельском хозяйстве и биотехнологии: сб. науч. статей участников Всерос. семинара-совещания, Казань, 12-14 октября 2006 г. - Казань: Школа, 2006. – с.3-10

БИОАККУМУЛЯЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ВИДАМИ -ИНДИКАТОРАМИ ПРИБРЕЖНЫХ ВОД СЕВАСТОПОЛЯ

И.И. Руднева¹, С.О. Омелеченко², О.В. Рощина³

¹Институт биологии южных морей НАН Украины
пр. Нахимова, 2, Севастополь, 99011, Украина, svg-41@mail.ru

² Государственное предприятие «Крымский региональный НПЦ стандартизации, метрологии и сертификации»

³Государственное предприятие «Севастопольский НПЦ стандартизации, метрологии и сертификации»

По содержанию ксенобиотиков в морской воде, донных осадках и биоте можно судить об уровне загрязнения среды обитания и пригодности морепродуктов для употребления в пищу человека. При этом в качестве критерия безопасности используют нормативные значения ПДК и ПДС. Однако в настоящее время выдвигаются ряд возражений против этих параметров, так как

они не отражают истинной опасности загрязнителей для водных систем и их обитателей. В связи с этим возникает необходимость поиска более информативных критериев оценки состояния гидробионтов и среды их обитания. Все большее распространение и признание получила концепция анализа качества воды с помощью биоиндикаторов и биомаркеров – показателей различного биологического уровня, реагирующих на действие неблагоприятных факторов среды, а также сравнительный анализ уровней загрязнителей у обитателей водоема, относящихся к разным таксонам.

Прибрежные воды Севастополя характеризуются высокой степенью загрязнения вследствие интенсивной антропогенной нагрузки. Согласно данным Государственной инспекции по охране Черного моря в бухты Севастополя ежегодно поступает 60 млн м³ сточных вод, из которых 4 млн м³ (73%) без механической очистки, 8 млн м³ (14%) полностью неочищенных и около 8 млн м³ (13%) после биологической очистки. При этом коммунальные сточные воды содержат 30 000 т загрязнителей, среди которых 10 т углеводов, 20 т Fe, 70 т детергентов, 780 т фосфатов, 2 100 т нитратов, 5 400 т хлоридов, 2 400 т сульфатов и других ксенобиотиков, включая тяжелые металлы. Различные токсиканты значительно ухудшают экологическое состояние севастопольских бухт и их обитателей. В то же время определение уровня этих компонентов в воде и сравнение их с действующими ПДК не является достаточно информативным, так как одновременно в пределах одной акватории значения могут различаться на порядок и выше. Совершенно очевидно, что такая ситуация существенно затрудняет объективную оценку экологического статуса прибрежных морских акваторий, на что мы указывали ранее (Руднева, 2010). В этом отношении определение содержания ксенобиотиков в различных гидробионтах из данной акватории может дать более реальную информацию о загрязнении вод и их обитателей.

Моллюски и донные рыбы являются в этом плане специфическими индикаторами различных водных объектов по причине особенностей их биологии и роли в пищевой цепи, в связи с чем они широко применяются для целей мониторинга и исследования путей биотрансформации и биоаккумуляции различных загрязнителей, включая тяжелые металлы (Nesto et al., 2007; Vlahogianni et al., 2007).

На этом основании целью настоящей работы явилось сравнительное изучение содержания тяжелых металлов – меди, свинца, кадмия и цинка в двух массовых прибрежных рыбах и мидиях из двух бухт Черного моря, расположенных в районе Севастополя.

Материалы и методы исследований. Объектами исследования служили два вида прибрежных черноморских рыб, относящиеся к донной группе – морской ерш *Scorpaena porcus* (L.) и бычок-мартовик *Mesogobius batrachocephalus* (Pallas), а также черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* (L.). Животных отлавливали в прибрежной части Черного моря в районе г. Севастополя в бухтах Мартынова и Карантинная в летний период 2003 – 2009 гг. Бухты различаются как уровнем антропогенной нагрузки, так и своим географическим положением. Бухта Мартынова является закрытой, входит в состав Севастопольской бухты, отделенной от открытой части моря искусственным молом. В ней находится выпуск аварийного коллектора городских сточных вод. Бухта Карантинная – открытая, непосредственно сообщается с морем, в нее постоянно поступают коммунальные сточные воды из коллектора в объеме 300 м³ ежедневно.

Тяжелые металлы медь, свинец, кадмий и цинк определяли в мышцах рыб и в мягких тканях моллюсков атомноабсорбционным методом (Методика определения..., 2000). Результаты обрабатывали статистически общепринятыми методами.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований позволили установить определенные закономерности в распределении тяжелых металлов в тканях моллюсков и рыб (Рис.).

Исследуемые элементы по уровню накопления в мышцах рыб и моллюсков были распределены следующим образом: Zn > Cu > Pb > Cd. Сходные данные, отражающие общую тенденцию аккумуляции токсичных элементов в тканях морских гидробионтов, отмечены и другими исследователями (Barata et al., 2005). Концентрации загрязнителей в тканях исследуемых видов не превышали ПДК, принятых на Украине. В то же время уровень тяжелых металлов в тканях мидий существенно выше, чем у обоих видов донных рыб.

Обнаружены определенные различия содержания токсичных элементов в тканях гидробионтов из двух исследуемых районов. Содержание кадмия незначительно превалирует у моллюсков и рыб из бухты Карантинной. Уровень свинца не имеет достоверных различий в тканях мидий и морского ерша из обеих бухт, но у бычка-мартовика, обитающего в бухте Мартынова, он выше, чем у особей из бухты Карантинной. Концентрация меди существенно не различается у гидробионтов из обеих акваторий. Такая же тенденция отмечена для уровня цинка в

тканях моллюсков, однако у обоих видов рыб, отловленных в бухте Мартынова, содержание этого элемента выше по сравнению с показателями особей из бухты Карантинной.

Следует отметить, что изучаемые элементы относятся к различным группам – эссенциальным и не эссенциальным, от чего, вероятно, и зависит характер их поступления и накопления в организме (Голованова, 2008; Скальный, 2004).

В тканях рыб и моллюсков в наибольших количествах содержится Zn, который поступает с пищей и является важным эссенциальным элементом, что отмечено и другими авторами (Голованова, 2008; Nesto et al., 2007). Цинк входит в состав более 20 ферментов, обеспечивающих важнейшие биохимические реакции. Он необходим для нормального деления клетки, поддержания обмена веществ, процессов размножения и т. д. В то же время при повышенных концентрациях Zn в воде и в тканях у рыб и беспозвоночных возникает интоксикация, выражающаяся в снижении pH крови, темпа роста, репродукции. Накопление цинка в организме гидробионтов зависит от экзогенных и эндогенных факторов, и в связи с высокой биофильностью уровень Zn в тканях не может быть индикатором природного загрязнения (Nesto et al., 2007).

Другим важнейшим биофильным элементом является Cu, содержание которой также достаточно стабильно в тканях рыб. Медь входит в состав многих ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные и гидролитические реакции. При высоких концентрациях ионов Cu в воде они вызывают интоксикацию у рыб, которая выражается в нарушении тканевого дыхания, кроветворения, минерального и азотистого обмена. Действие Cu синергично в сочетании с Zn и Cd (Скальный, 2004).

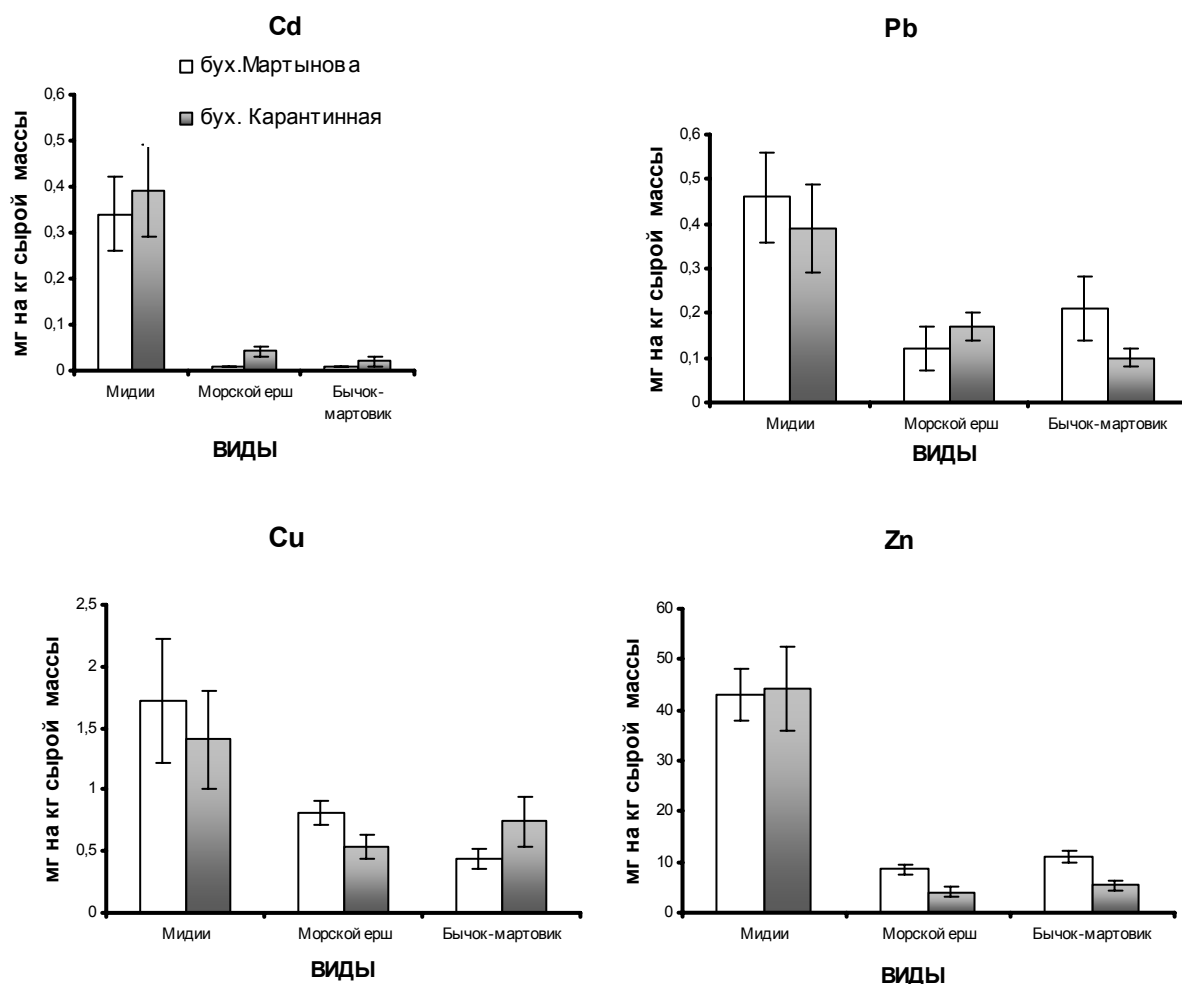


Рис. Содержание тяжелых металлов ($M \pm m$) в мягких тканях моллюсков и рыб из двух бухт, расположенных в районе Севастополя (Черное море).

Pb и Cd – не эссенциальные токсичные микроэлементы. Токсическая роль Pb обусловлена его способностью связываться с большим числом анионов, SH-группами, фосфатами и т.д. В

результате угнетается синтез белков, активность ферментов, синтез гема и гемоглобина (Скальный, 2004).

Результаты исследований позволили заключить, что тяжелые металлы аккумулируются в тканях моллюсков в больших количествах, чем в тканях рыб. Это может быть обусловлено как различием механизмов поступления токсикантов в организм моллюсков-фильтраторов и рыб, так и интенсивностью процессов их выведения и детоксикации, в частности, синтезом и эффективностью связывания металлотионеинами. В то же время, несмотря на различную антропогенную нагрузку на исследуемые акватории, уровни накопления тяжелых металлов в тканях моллюсков имеют близкие значения. У рыб сходная с мидиями тенденция установлена для кадмия, когда содержание этого элемента выше у гидробионтов из Карантинной бухты. В остальных случаях результаты неоднозначны, в связи с чем можно сделать вывод о существовании видоспецифических особенностей накопления тяжелых металлов, обусловленных образом жизни гидробионтов.

Совершенно очевидно, что определение тяжелых металлов в тканях различных организмов, принадлежащих к разным таксонам и имеющих разные биологические особенности, позволяет более полно и адекватно оценить экологическое состояние морских акваторий. Вместе с тем для проведения мониторинговых работ интерес представляют те виды, которые имеют промысловое значение и могут быть использованы в пище человека. В этом отношении мидии как объекты марикультуры и рыбы – морской ерш и бычок-мартовик вполне соответствуют данным требованиям. В этом случае целесообразно оценить уровень загрязнения данных видов тяжелыми металлами и сравнить с ПДК для морепродуктов. В то же время эти уровни могут существенно различаться в разных международных документах и в разных странах (Табл.).

Из приведенных в таблице данных можно видеть, что предельно допустимые концентрации тяжелых металлов в морепродуктах существенно варьируют в документах различных стран и международных организаций, что создает необходимость более детальной оценки содержания этих компонентов в морских объектах для определения их реальной опасности для здоровья человека и анализа экологического риска. Несмотря на то, что в наших исследованиях уровень тяжелых металлов в мидиях и рыбах из обеих севастопольских бухт не превышал ни одного значения ПДК, приведенного в таблице 1, однако их наличие даже в незначительных концентрациях может нанести ущерб как здоровью гидробионтов, так и людям, употребляющим их в пищу. Это обстоятельство требует разработки более тщательного и разностороннего подхода к анализу последствий накопления токсикантов в гидробионтах в акваториях, в течение длительного времени подверженных антропогенному воздействию.

Таблица. ПДК тяжелых металлов (мг на кг сырой ткани) в некоторых морских объектах, употребляемых в пищу человека (Nesto et al., 2007)

Документ, страна	Мидии		Рыбы		
	Pb	Cd	Pb	Cu	Zn
США, Агентство по защите окружающей среды, 1983 г.	1,7	4	4	120	480
Кодекс комитета по качеству пищи и ПДК, 2001			0,2		
ПДК, Российская Федерация, 1989			1	10	40
ПДК, Украина	10	2	1	10	40
ФАО, 1983			0,5	30	30
Официальный журнал Европейской Комиссии, 2003, 2006	1,5	1,0	0,3		
Стандарты Австралийского Института здоровья и благосостояния	2,0	2,0			

Список литературы

Голованова И.Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных. Биология внутренних вод. 2008. №1. С. 99-108.

Методика определения уровней токсичности поверхностных и глубинных вод для контроля пригодности их качества установленным нормативным требованиям.. Киев: Мин. экоресурсов Украины. 2000. 28 с.

- Руднева И.И. Морская экотоксикология. Экологические системы и приборы. 2010. № 2. С. 3-11.
- Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.:ОНИКС 21 век. ир. 2004, 216с.
- Barata C., Lecumberri I., Vila-Ascale M., Prat N., Porte C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Lobregat river basin (NE Spain). *Aquat. Toxicol.* 2005. V. 74. № 1. P. 3 – 19.
- Nesto N., Romano S., Modchino V., Mauri M., Da Ros L. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 2007. V.55. P. 469-484.
- Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M. J., Valavanidis A. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronicos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 2007. V.54. P. 1361 – 1371.

ИЗМЕНЕНИЕ КАЧЕСТВА СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ САМООЧИЩЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ВОДОЕМОВ ОТ СИНТЕТИЧЕСКИХ МОЮЩИХ СРЕДСТВ

Е.В. Рябухина

*Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова,
150057, Ярославль, проезд Матросова, 9, Россия, ryabuchina1959@yandex.ru*

Действующим законодательством при техническом регламентировании синтетических моющих средств (СМС) и товаров бытовой химии выделяются основные показатели свойств, которые представляют наибольший риск причинения вреда жизни и здоровью граждан, имуществу физических и юридических лиц, окружающей среде, жизни и здоровью животных и растений, и устанавливают допустимые уровни их воздействия. Однако, методы испытаний веществ, определенные для регламентирования, предполагают выявление в том числе и токсических свойств, но только для теплокровных животных. При этом современные СМС представляют собой сложные, многокомпонентные системы, которые в процессе очистки воды распадаются лишь частично. В результате в тех или иных количествах они присутствуют практически во всех водных объектах и отрицательно влияют как на их санитарное состояние, изменяют физические, химические, органолептические свойства и биологический состав воды, так и на жизнедеятельность гидробионтов.

Кроме того, следует отметить, что токсичность водных растворов СПАВ определяется суммарным воздействием на организм животных как самих СПАВ, так и продуктов их распада, при этом изменение токсичности исходного вещества может происходить за счет снижения его истинной концентрации в растворе или в результате физико-химических превращений. Устойчивость СМС к биохимической трансформации в водной среде во многом зависит от их состава и свойств (Калиниченко, 1985, 1991).

Целью работы явилось изучение изменений качества среды при детоксикации различных по составу СМС в процессе самоочищения искусственных водоемов (биоэкосистем).

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Выявить диапазон летальных концентраций СМС «Дени Автомат» и «Дени Экспресс» методом биотестирования на цериодафниях.
2. Проанализировать роль факторов среды в процессах самоочищения искусственных водоемов (биоэкосистем) от СМС по показателю выживаемости цериодафний в пробах воды из биоэкосистем за период экспозиции 15-ть суток.
3. Изучить влияние моющих средств на качество воды биоэкосистем по изменению водородного показателя в процессе экспозиции модельных водоемов.

Для изучения биоценозов в более полном приближении к реальным условиям их существования используются экспериментальные модельные системы – микрокосмы (Клерман и др., 1999). Использование модельных экосистем позволяет выяснить воздействие загрязнителей на биогеоценозы, а также проследить динамику очищения водоёмов с участием биотических и абиотических факторов.

На первом этапе работы для выявления диапазона летальных концентраций исследуемых веществ ставили острый опыт (48 часов) на *Ceriodaphnia affinis* (Жмур, 2001) в некоторой методической модификации. Регистрируемый показатель - выживаемость рачков в растворах исследуемых веществ с концентрациями: 15.6; 31.2; 62.5; 125.0 и 250.0 мг/л в трех параллельных

сериях. В качестве разбавителя и контрольной среды служила отстоянная аэрированная водопроводная вода. Эксперимент проводили при стандартных условиях. Число живых рачков по окончании острого опыта оценивали визуально. По результатам выживаемости цериодафний в контрольной среде и в растворах определенных концентраций СМС «Дени Автомат» и «Дени Экспресс» графическим методом устанавливали медианную летальную концентрацию - LC_{50-48} – концентрацию, вызывающую гибель 50% подопытных животных за период эксперимента (48 часов). Эти концентрации были использованы во втором этапе эксперимента.

На втором этапе в целях определения времени детоксикации исследуемых веществ и выявления роли абиотических (температура, освещенность) и биотических факторов в процессах самоочищения искусственных водоемов от СМС проводили модельный (15-ти суточный) эксперимент на биокосмах. Формирование искусственных водоёмов осуществляли в стеклянных ёмкостях объёмом пять литров, в которые вносили (кроме контрольных водоемов) рабочие растворы с концентрацией, соответствующей удвоенной LC_{50-48} для каждого СМС. Таким образом, среда опытных (с СМС) водоемов изначально была остротоксична для рачков. Биоконпоненты вносили в зависимости от варианта биокосма из расчёта нагрузки биомассы: пресноводные двустворчатые моллюски р. *Unio* – 10.0 г на 1 литр воды; макрофиты р. *Vallisneria* – 2.5 г сырой массы на 1 литр воды (Клерман и др., 1999). Эксперимент проводили в лабораторных условиях при температуре воды 15-17⁰С и естественной освещённости.

Варианты биокосмов для каждого СМС: В. 1 – Контроль, В. 2 - Раствор СМС, В. 3 - Раствор СМС + макрофит, В. 4 - Раствор СМС + моллюск, В. 5 - Раствор СМС + макрофит + моллюск, В. 6 - Контроль + макрофит, В. 7 - Контроль + моллюск, В. 8 - Контроль + макрофит + моллюск.

Для изучения влияния моющих средств «Дени Автомат» и «Дени Экспресс» на качество водной среды производили серийный отбор проб воды биокосмов по схеме: на 1-е (в день формирования водоемов - для анализа качества свежеприготовленных растворов СМС и качества контрольной воды), 4-е, 10-е и 15-е сутки экспозиции водоемов. В одной серии проб анализировали изменение гидрохимических свойств растворов по динамике активной реакции среды (рН), измеряемой лабораторным рН-метром-340. Другую серию проб использовали в целях установления изменений токсичности растворов (анализа процессов трансформации и детоксикации СМС под действием различных факторов) по показателю выживаемости цериодафний через 48 часов в пробах воды, отобранных в трех повторностях из разных вариантов биокосмов по указанной схеме. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики (Жмур, 2001).

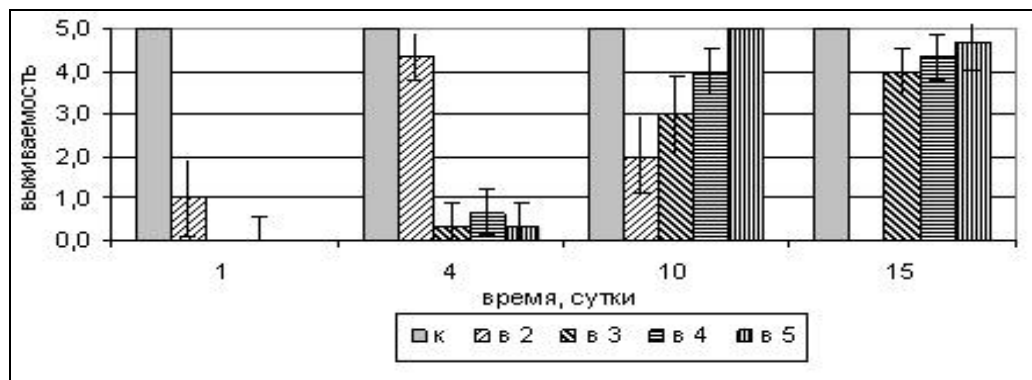


Рис. 1. Изменение качества водной среды по показателю выживаемости цериодафний в пробах воды из разных вариантов биокосмов с СМС «Дени Автомат»

В процессе изучения острой токсичности СМС «Дени Автомат» и «Дени Экспресс» методом биотестирования на цериодафниях был установлен диапазон летальных концентраций: LC_{0-48} – наибольшая концентрация, в которой нет признаков гибели - 31.2 мг/л для каждого вещества и LC_{100-48} – наименьшая концентрация, в которой происходит полное подавление жизнедеятельности цериодафний – 125.0 мг/л для СМС «Дени Автомат» и 250.0 мг/л для «Дени Экспресс». Графическим методом для каждого моющего средства определили LC_{50-48} , которые составили для СМС «Дени Автомат» 60.0 мг/л, для СМС «Дени Экспресс» - 90.0 мг/л.

Исследования, проведённые на искусственных водоёмах, показали, что в пробах воды, отобранных на 1-е сутки из всех вариантов биокосмов, кроме контрольного (В. 1), наблюдалась

гибель от 80.0 до 100.0% цериодафний, т.е. свежеприготовленные растворы СМС обладали высокой токсичностью для рачков (что входило в задачи исследования и подтвердило результаты первого этапа) (Рис. 1, 2). В контрольном водоеме выживаемость цериодафний в пробах оставалась на уровне 100%, что соответствовало требованиям, предъявляемым к контрольным средам (Жмур, 2001).

Анализ проб водной среды из 2-5-го вариантов на 4-е сутки экспозиции выявил изменения качества растворов СМС по сравнению с 1-ми сутками в зависимости от варианта биокосмов (Рис. 1, 2). Установлено, что токсичность растворов СМС «Дени Автомат» (по показателю выживаемости цериодафний в пробах) на 4-е сутки во 2-м варианте биокосмов снизилась практически до нуля, а за последующие 10-ть суток выросла до 100% (гибель 100% рачков). В растворах СМС «Дени Экспресс» значительное падение токсичности воды во 2-м варианте наблюдали только на 10-е сутки, но на 15-е сутки в пробах, также как и в СМС «Дени Автомат», погибли все цериодафнии. Наблюдаемое изменение качества воды в биокосмах свидетельствует о том, что моющие средства частично подвергаются трансформации под действием абиотических факторов (свет, температура, газовый обмен и т.д.) на фоне микробиологических процессов, присутствующих в той или иной степени во всех вариантах водоемов. В литературе показано, что адсорбция токсических веществ микроорганизмами и взвешенными веществами в биохимических процессах вод может явиться причиной нарушения развития самих микроорганизмов и блокирования распада целого ряда органических загрязнений (Лукиных, 1972). Кроме того, имеются сведения, что ПАВ, входящие в состав СМС, имеют неодинаковую стабильность в воде, которая зависит не только от характера веществ, но и от среды водоемов: t^0 , содержания кислорода, присутствия микрофлоры и т.п. (Калиниченко, 1985). Полученные в настоящей работе результаты, позволяют утверждать, что как токсичность, так и стабильность исследуемых веществ в растворах в значительной степени обусловлена их химической составляющей. Так, анализируемые растворы СМС теряли и вновь приобретали токсические свойства в разные сроки («Дени Автомат» - на 4-е, «Дени Экспресс» - на 10-е сутки) при прочих равных условиях (Рис. 1, 2), что, как можно полагать, и обусловлено разным составом: в рецептуре СМС «Дени Автомат» присутствуют дополнительно кислородсодержащий отбеливатель и пеногаситель.

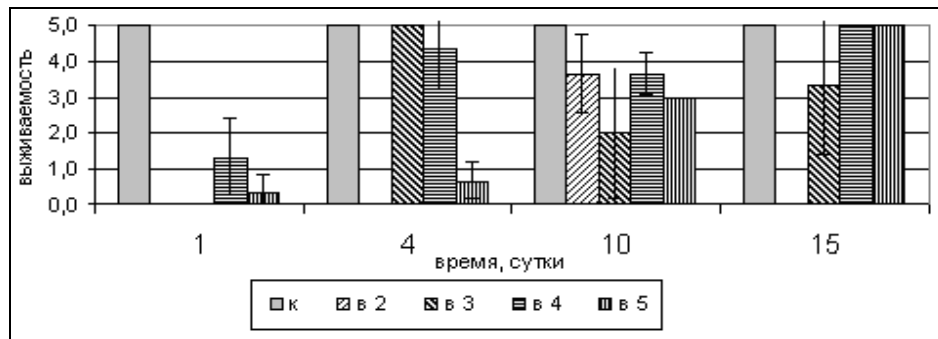


Рис. 2. Изменение качества водной среды по показателю выживаемости цериодафний в пробах воды из разных вариантов биокосмов с СМС «Дени Экспресс»

По данным литературы в порошкообразные кислородсодержащие отбеливатели в качестве активного вещества могут входить перборат натрия или чаще применяемый перкарбонат натрия, основным преимуществом которого является экологическая чистота, хорошая растворимость в воде и высокое содержание активного кислорода (от 5 до 7 %). Следовательно, активный кислород в составе СМС может влиять, например, на содержания растворенного кислорода или на величину рН, и, вступая в химические и биохимические реакции в растворах и в организмах, может нарушать их функции. С этим свойством СМС «Дени Автомат» возможно и связана повышенная токсичность проб по сравнению с СМС «Дени Экспресс».

Имеются также сведения, что многие ПАВ достаточно растворимы в воде, и поэтому биоаккумуляция исходного ПАВ не представляет большой угрозы. Однако начальная стадия биodeградации может заканчиваться образованием промежуточных продуктов, ограниченно растворимых в воде (Холмберг, 2007), чем, по-видимому, и объясняется повторное повышение токсичности СМС «Дени Автомат» и «Дени Экспресс».

Анализ качества среды 3, 4 и 5-го вариантов биокосмов показал, что процессы самоочищения водоемов в присутствии гидробионтов проходили значительно быстрее (Рис. 1, 2).

При этом, как установлено, моющие средства в исходной концентрации оказывали негативное влияние не только на качество среды, но и на функциональное состояние гидробионтов, находящихся в биокосмах. Об этом свидетельствовали гибель первой партии моллюсков и растений в водоемах 3-го и 4-го вариантов на вторые сутки экспозиции. Замена биообъектов позволила улучшить качества среды для цериодафний, но у повторно посаженных в водоемы моллюсков и макрофитов наблюдали увеличение биомассы (при сниженной фильтрационной активности моллюсков и отсутствии ростовых процессов у растений). Таким образом, можно полагать, что первичный токсический эффект СМС вероятнее всего связан с нарушением обменных процессов и гипергидратацией тканей. Так, по данным литературы компоненты моющих средств способны влиять на проницаемость биомембран (СПАВ), вступать в реакции с различными биологическими соединениями (полимеры), вызывать очаговые некрозы и дистрофию некоторых органов (отбеливающие агенты, в том числе активный кислород) и др. (Волощенко и др., 1991, Лукиных, 1972).

В контрольных вариантах биокосмов с биообъектами (В. 6, 7, 8) качество воды оставалось высоким в ходе эксперимента, что свидетельствовало о формировании в них стабильных микробиоценозов.

Анализ pH в пробах воды модельных водоемов за период экспозиции (на 1, 4, 10 и 15-е сутки) показал определенную закономерность в динамике исследуемого показателя. Отмечено, что при измерении pH в свежеприготовленных растворах наибольшее значение водородного показателя - 10,2 ед. - зафиксировано в растворах СМС «Дени Экспресс» в 5-м варианте биокосмов, а наименьшее – 7,6 ед. в СМС «Дени Автомат» также в 5-м варианте биокосмов (Рис.3, 4). В контроле (В. 1) этот показатель на 1-е сутки составил у обоих СМС 6,6 ед., что согласуется с литературными данными, из которых следует, что pH отстоянной аэрированной водопроводной воды должен быть в пределах 6-7 единиц (Лукиных, 1972). Динамика pH в контрольных водоемах (В. 1) связана с физико-химическими и микробиологическими процессами, которые протекают в стоячей воде под влиянием абиотических факторов, таких как температура, свет, растворённые вещества и т.п.

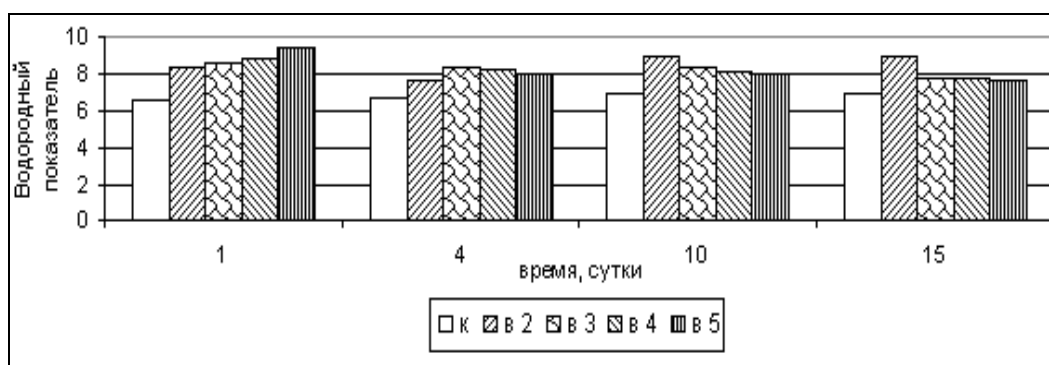


Рис. 3. Динамика водородного показателя в пробах воды из разных вариантов биокосмов с СМС «Дени Автомат».

Во всех опытных вариантах (кроме В. 2 - раствор СМС «Дени Автомат») наблюдалась общая тенденция снижения pH к концу эксперимента по сравнению со значениями водородного показателя на 1-е сутки (Рис. 3, 4). По-видимому, такой эффект связан с интенсивным разложением отдельных композитов моющих средств, придающих раствору основную щелочность (Калиниченко, 1991, Можаяев, 1972).

Более высокий уровень pH во II-м варианте СМС «Дени Автомат», вероятно, обусловлен дополнительным компонентом в его составе – активным кислородом, который, в свою очередь, оказывал влияние на физико-химические показатели воды. Кроме того, был отмечен повышенный уровень pH во всех вариантах опытных биокосмов по сравнению с контрольными водоемами с биообъектами, где величина pH держалась на уровне 8 ед. (В. 6, 7, 8).

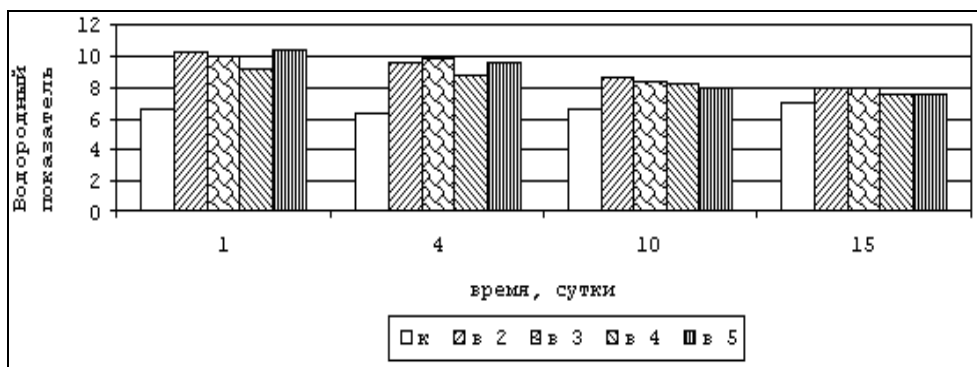


Рис. 4. Динамика водородного показателя в пробах воды из разных вариантов биокосмов с СМС «Дени Экспресс».

Также установлено, что даже при участии гидробионтов в биокосмах с СМС «Дени Автомат» за 15 суток не происходило восстановление качества воды водоемов до контрольных значений (по результатам биотестирования), а в биокосмах с СМС «Дени Экспресс» указанного периода экспозиции было достаточно для полного очищения водоемов от компонентов синтетического моющего средства.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что степень и скорость детоксикации моющих средств «Дени Автомат» и «Дени Экспресс» в водоёме зависят в первую очередь от химического состава и физико-химических свойств составляющих композитов, которые и обуславливают их биологическую активность. Этот факт, в свою очередь, требует более серьезного отношения к качественному составу СМС при регламентации.

Список литературы.

- Волощенко О.И., Мудрый И.В. Гигиеническое значение ПАВ. Киев: Здоровье. 1991. - 172 с.
- Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости церидафний. – М.: АКВАРОС, 2001. -52 с.
- Калиниченко К.П. Влияние некоторых факторов на скорость биораспада поверхностно-активных веществ. Гидробиологический журн. 1985, № 3, С. 82-85.
- Калиниченко К.П. Изучение деструкции анионных ПАВ. //Вторая всесоюзная конференция по рыбохозяйственной токсикологии Тезисы докладов. Под ред. В.И. Лукьяненко. С-Пб.: 1991. - 352 с.
- Клерман А.К., Виноградов Г.А. Экспериментальная оценка экологического риска при загрязнении водной среды токсическими веществами. 3. Исследования на основе применения непроточных экспериментальных экосистем // Водные ресурсы, 1999. Т. 26. № 3. С. 367-372.
- Лукиных Н.А. Очистка сточных вод, содержащих синтетические поверхностно-активные вещества / Н.А. Лукиных. – М: Стройиздат, 1972. – 330 с.
- Можаев Е.А., Литвинов И.И. Совместное действие на организм поверхностно-активных и других химических веществ.//Гигиена и санитария. - 1972. № 4, С.26.
- Холмберг К. Поверхностно-активные вещества и их полимеры в водных растворах \ К. Холмберг, Б. Йёнссон, Б. Кронберг, Б. Линдман. Пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 528 с.

О НАКОПЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РЫБАХ

Е.С. Светашова

*Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного
рыбного хозяйства (ФГНУ «ГосНИОРХ»), Санкт-Петербург, Россия, sveteka007@mail.ru*

Тяжелые металлы (ТМ) по степени экологической опасности подразделяются на три класса. К первому классу опасности относятся ртуть, кадмий, свинец, цинк, мышьяк. Эти же элементы, в том числе и медь, выделены комиссией ВОЗ как наиболее важные в гигиеническом контроле пищевых продуктов. Мышьяк, являясь типичным металлоидом, принято относить к ТМ, по-видимому, вследствие его высокой токсичности и способности накапливаться в водной экосистеме. Донные отложения и гидробионты, накапливая ТМ, способствуют очищению водной фазы и установлению равновесия в системе водная среда – биота - донные отложения. Нарушение этого равновесия под влиянием антропогенного воздействия может привести к снижению способности к самоочищению и потере устойчивости водной экосистемой.

Накопление ТМ в гидробионтах вызывает поражение жизненно важных физиологических функций, что приводит к снижению плодовитости и возможной гибели организмов, в результате этого нарушается биотический круговорот и теряется устойчивость экосистемы водоема.

Нормативные требования к качеству пищевого сырья регламентируют содержание наиболее токсичных ТМ в рыбе и морских нерыбных продуктах. (Гигиенические требования..., 1997; Продовольственное сырье..., 2002). В таблице 1 приведены допустимые остаточные концентрации (ДОК) перечисленных выше ТМ в рыбе и морепродуктах; в таблице 2 для сравнения приведены усредненные данные о фоновом содержании этих микроэлементов в рыбе и овощах (Кузубова и др., 2000).

Таблица 1. Допустимые остаточные концентрации ТМ в рыбе и морепродуктах (мг/кг сырой массы)

Элемент	Рыба (мышцы)	Печень рыб	Моллюски и ракообразные	Водоросли морские
Hg	0.3 (0.5)	0.5	0.2	0.1
Cd	0.2	0.7	2.0	1.0
Pb	1.0	1.0	10.0	0.5
As	1.0 (5.0)*	1.0	5.0	5.0
Cu	10.0	-	10.0	2.5
Zn	40.0	-	120	40.0

- в скобках – в морской рыбе.

Таблица 2. Фоновое содержание микроэлементов в рыбе и овощах (мг/кг сырой массы)

Элемент	Рыба	Овощи
Hg	0.15	0.003
Cd	0.1	0.02
Pb	0.45	0.2
As	0.1	0.1
Cu	1.5	1.1
Zn	10.0	4.0

Поглощение ТМ гидробионтами происходит с водой и пищей; для бентосных организмов имеет значение поступление ТМ из донных отложений. Наглядной иллюстрацией этого может служить накопление мышьяка в рыбах.

В таблице 3 приведены литературные данные о содержании мышьяка в водных животных различного вида (Безвредность..., 1986). Как видно из этих данных, наибольшей способностью накапливать мышьяк обладают донные морские животные – длинная камбала и креветки. Особенно ярко проявляется способность морских животных накапливать мышьяк в районах с естественными геологическими источниками мышьяка. На основании этих данных утверждается, что рыбы и креветки – главный источник мышьяка в продуктах питания.

Таблица 3 Содержание мышьяка в водных животных различного вида (мг/кг сырой массы)

Вид	As	ДОК
Пресноводная	судак	1.0
	щука	
	корюшка	
	сиг	
Морская придонная	треска	5.0
	палтус	
	камбала (нерудный регион)	
	камбала (рудный регион)	
	длинная камбала	
Пелагическая	сельдь	10.9
	лосось атлантический	
	тунец синий	
Ракообразные и моллюски	двустворчатые моллюски	
	омар	
	гребешок	
	креветки	

В таблице 4 приведены усредненные результаты исследований, выполненных нами на протяжении нескольких лет, по определению содержания цинка, кадмия, свинца и меди в рыбах различного вида, выловленных в одном и том же водоеме.

Таблица 4. Концентрация ТМ в мышцах, печени и жабрах рыб (над чертой средние значения, под чертой – пределы изменений)

Вид рыбы	Вид ткани	Концентрация ТМ, мг/кг сырой массы			
		Zn	Cd	Pb	Cu
Окунь	мышцы	<u>3.65</u> 1.96-7.81	<u>0.004</u> 0.001-0.011	<u>0.046</u> 0.011-0.158	<u>0.47</u> 0.16-1.67
		<u>16.26</u> 7.72-26.32	<u>0.211</u> 0.018-0.492	<u>0.186</u> 0.019-0.920	<u>4.69</u> 2.07-11.07
	жабры	<u>17.43</u> 7.15-32.96	<u>0.014</u> 0.002-0.059	<u>0.295</u> 0.012-0.784	<u>0.58</u> 0.32-1.09
Судак	мышцы	<u>6.67</u> 1.90-13.10	<u>0.007</u> 0.004-0.013	<u>0.044</u> 0.020-0.082	<u>0.49</u> 0.22-0.91
		<u>13.38</u> 7.68-22.2	<u>0.065</u> 0.023-0.100	<u>0.352</u> 0.006-0.810	<u>3.39</u> 1.77-5.13
	жабры	<u>14.3</u> 10.78-17.35	<u>0.020</u> 0.017-0.023	<u>0.279</u> 0.072-0.510	<u>1.02</u> 0.21-1.62
Плотва	мышцы	<u>6.22</u> 2.13-18.06	<u>0.008</u> 0.001-0.043	<u>0.045</u> 0.010-0.161	<u>0.56</u> 0.23-1.50
		<u>24.52</u> 8.43-50.61	<u>0.075</u> 0.021-0.202	<u>0.491</u> 0.083-1.65	<u>12.97</u> 2.89-21.89
	жабры	<u>83.22</u> 21.46-120.8	<u>0.024</u> 0.002-0.072	<u>0.248</u> 0.040-1.99	<u>1.82</u> 0.50-7.43
Ерш	мышцы	<u>6.96</u> 3.64-10.33	<u>0.006</u> 0.001-0.024	<u>0.054</u> 0.012-0.126	<u>0.50</u> 0.21-1.05
		<u>18.60</u> 5.99-32.21	<u>0.140</u> 0.057-0.346	<u>0.169</u> 0.033-0.853	<u>2.54</u> 1.15-5.00
	жабры	<u>10.73</u> 7.42-19.55	<u>0.018</u> 0.003-0.047	<u>0.204</u> 0.014-0.524	<u>0.70</u> 0.54-1.06
Салака	мышцы	<u>8.68</u> 2.60-18.21	<u>0.009</u> 0.001-0.020	<u>0.127</u> 0.010-0.525	<u>0.84</u> 0.29-1.98
		<u>13.79</u> 1.80-25.30	<u>0.212</u> 0.051-0.332	<u>1.24</u> 0.075-3.06	<u>3.78</u> 0.53-6.15
	жабры	<u>17.88</u> 12.31-26.60	<u>0.065</u> 0.023-0.108	<u>0.322</u> 0.106-0.858	<u>0.82</u> 0.41-1.54

Содержание ТМ определялось методом инверсионной вольтамперометрии на приборе АВА-2 по утвержденной методике (Продукты..., 2008). Анализу подвергались мышцы, печень и жабры рыб. Выбор этих органов для анализа обусловлен рядом причин.

Определение содержания ТМ в мышцах рыб необходимо для оценки пригодности их к употреблению в пищу. Обычно, в большинстве случаев содержание ТМ в мышцах рыб не превышает установленных нормативов для пищевой рыбы, что, однако, не может служить критерием благополучной экологической ситуации.

Накопление ТМ происходит во внутренних органах рыб – жабрах, печени, почках, гонадах и т.д. Наиболее показательны с этой точки зрения жабры и печень. Именно через жабры рыбы получают основную нагрузку от загрязнений водной экосистемы.

При контакте с водой, загрязненной ТМ, наряду с газообменом жабры играют важную роль в обеспечении водно-солевого обмена: поглощают и выделяют воду и ионы солей, выделяют аммиак и мочевину. Печень участвует в обмене минеральных веществ. Барьерная функция печени состоит в детоксикации продуктов обмена, инаktivации чужеродных веществ. Жизненно важная функция печени - накопление ионов железа - при загрязнении окружающей среды проявляется негативно в способности накапливать ионы ТМ.

Согласно полученным результатам, в мышцах всех анализируемых рыб концентрация ТМ не превышает допустимых норм в пищевой рыбе. Во внутренних органах концентрация ТМ значительно выше, чем в мышцах. Для большей наглядности результаты исследований представлены в таблице 5.

Как видно из результатов, представленных в таблице 5, в мышцах исследованных рыб концентрация ТМ не превышает ДОК в пищевой рыбе. В мышцах салаки концентрация ТМ, особенно свинца, выше, чем в мышцах других рыб. Концентрация всех анализируемых ТМ в жабрах выше, чем в мышцах, особенно цинка. Наиболее высокая концентрация цинка в жабрах

плотвы. В печени рыб концентрация ТМ значительно выше, чем в мышцах. В печени салаки наблюдается превышение допустимой концентрации свинца, в печени плотвы – наиболее высокая концентрация цинка и меди.

Таблица 5. Концентрация ТМ в органах рыб различного вида

Орган	Вид рыбы	Концентрация ТМ, мг/кг сырой массы			
		Zn	Cd	Pb	Cu
Мышцы	окунь	3.65	0.004	0.046	0.47
	судак	6.67	0.007	0.044	0.49
	плотва	6.22	0.008	0.045	0.56
	ерш	6.96	0.006	0.054	0.50
	салака	8.68	0.009	0.127	0.84
Печень	окунь	16.26	0.211	0.186	4.69
	судак	13.38	0.065	0.352	3.39
	плотва	24.52	0.075	0.491	12.97
	ерш	18.60	0.140	0.169	2.54
	салака	13.79	0.212	1.24	3.78
Жабры	окунь	17.43	0.014	0.295	0.58
	судак	14.30	0.020	0.279	1.02
	плотва	83.22	0.024	0.248	1.82
	ерш	10.73	0.018	0.204	0.70
	салака	17.88	0.065	0.322	0.82

Приведенные в таблицах 4 и 5 результаты свидетельствуют о том, что из исследованных видов рыб салака в большей степени способна накапливать такие высокотоксичные ТМ как кадмий и свинец.

Список литературы

Безвредность пищевых продуктов. / Под ред. Говарда Р. Робертса; Пер. с англ. М.Б.Розенберга; Под ред. А.М.Копелева. – М.: Агропромиздат, 1986.- 288с.
 Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.2.3.2. Продовольственное сырье и пищевые продукты: СанПиН 2.3.2.560-96. – М.: ЗАО «Деловой центр»: Фирма «Интерсэн», 1997.- 269с.
 Кузубова Л.И., Шуваева О.В., Аношин Г.Н. Элементы – экотоксиканты в пищевых продуктах. Гигиенические характеристики, нормативы содержания в пищевых продуктах, методы определения: Аналит. обзор. / ГПНТБ СО РАН - Новосибирск, 2000.- 67с.
 Продовольственное сырье и пищевые продукты: Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов: СанПиН 2.3.2.1078-01.- М.: Минздрав России, 2002.-164с.
 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрические методы определения токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка) ГОСТ Р 51301-99, М.: Госстандарт России, 2008. - 22с.

ОСОБЕННОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ИОНОВ ЦИНКА И КАДМИЯ ЖАБРАМИ КАРПА

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

*Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка
 г. Тернополь, ул. Максима Кривоноса, 2, 46027, Украина, senykjura@rambler.ru*

Рост содержания тяжелых металлов в водной среде приводит к чрезмерному их аккумулярованию водными организмами, нарушая нормальное функционирование метаболических систем гидробионтов.

В последнее время активно исследуются транспортные системы ионов тяжелых металлов в клетку. Мембранный транспорт не только регулирует поступление в клетку тяжелых металлов, но и обеспечивает их накопление, распределение и экскрецию из организма гидробионтов. Известно, что около 70 % вышеуказанных токсикантов поглощается жабрами рыб (Протасовски М., 1988) Поглощение жабрами ионов тяжелых металлов характеризуется сложными механизмами регуляции и изучено недостаточно. Известно также, что организм обладает способностью

адаптироваться к воздействию ионов металлов и регулировать количество их поступления (Хоменчук В.О., 2006). Исходя из сказанного, нами исследованы особенности поглощения ионов цинка и кадмия жабрами адаптированных к повышенным концентрациям Zn^{2+} и Cd^{2+} .

Материалы и методика исследований. Исследование проведено на карпах (*Cyprinus caprio* L.) двухлетнего возраста со средней массой 300-350 г. Рыб содержали в аквариумах объемом 200 л с отстоянной водопроводной водой и стандартным гидрохимическим режимом (содержание O_2 составляло $7,5 \pm 0,5$ мг/дм³; CO_2 - $2,5 \pm 0,3$ мг/дм³; pH - $7,8 \pm 0,1$).

Исследовали особенности поглощения ионов цинка и кадмия жабрами рыб адаптированных к действию этих токсикантов в концентрациях соответствующих 0,5 и 2,0 рыбохозяйственных ПДК (Беспаянцов Г.П., 1985). Необходимые концентрации ионов металлов в воде создавали внесением солей $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ и $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ квалификации "х.ч.". Рыб во время акклимации не кормили. Период акклимации рыб составлял 14 суток, что является достаточным для формирования адаптивного ответа на действие стрессового фактора (Хочачка П., 1988).

После 14 дневной акклимации рыб декапитировали, отбирали на холоде ткани жаберных дуг и *in vitro* исследовали концентрационную (0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5 мг/л) зависимость проникновения Zn^{2+} и Cd^{2+} в жабрах адаптированных и неадаптированных (контрольных) рыб.

Как инкубационную среду использовали раствор Рингера для хладнокровных. Соотношение массы ткани к объему исследуемого раствора составляло 1:10. После инкубации жабры промывали 2-3 раза раствором Рингера. Уровень накопления металлов определяли как разницу между содержанием металлов в контрольной (без добавления ионов металла) и опытной группах. Результаты выражали в мкг/г влажной массы. Для определения содержания тяжелых металлов в жабрах последние сжигали в азотной кислоте в соотношении 1:5 (масса: объем). Содержание металлов определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре С-115. Все полученные данные были обработаны статистически (Лакин Г.Ф., 1990).

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследований показали, что поглощение ионов цинка жабрами контрольной группы рыб возрастает линейно с увеличением концентрации ионов металла в среде инкубации от 20,5 до 38,3 мкг/г влажной массы (Рис. 1)

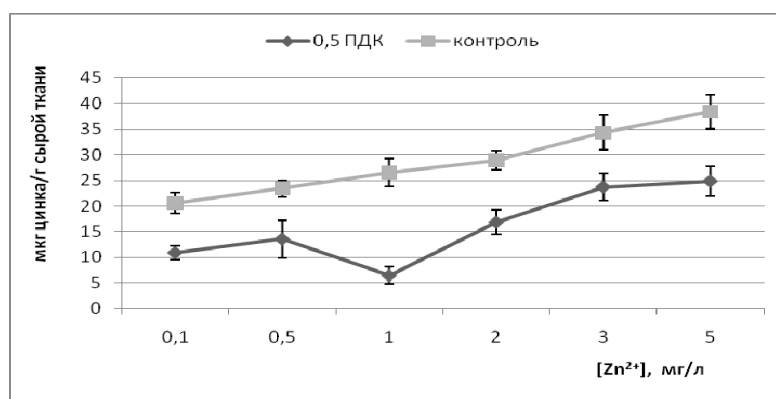


Рис. 1. Влияние 14 суточной адаптации к 0,5 ПДК цинка на поглощение Zn^{2+} жабрами карпа

Можно предположить, что проникновение цинка через апикальную мембрану жабр в данном случае осуществляется преимущественно путем облегченной диффузии. У рыб адаптированных к 0,5 ПДК металла отмечено эффект насыщения при 0,5 мг/л ионов Zn^{2+} в среде инкубации. В диапазоне концентраций 1-5 мг/л имеет место линейный рост количества поглощенного металла. При этом, количество сорбированного цинка жабрами рыб, адаптированных к допороговым концентрациям, была значительно ниже в сравнении с контрольной группой, что свидетельствует о значительных изменениях мембран клеток жаберного эпителия. В исследованиях Хогстранда и соавт. (Хогстранд С., 1995) указывается, что длительное воздействие повышенных концентраций цинка радужную форель индуцирует синтез изоформ его мембранных переносчиков в жабрах, константа Михаэлиса которых выше, что в свою очередь обуславливает уменьшение количества поглощенного металла.

Если проанализировать характер поглощения ионов цинка в жабрах рыб, акклимированных к сублетальной концентрации Zn^{2+} , то следует отметить стремительное накопление металла в интервале 0,1 - 1 мг/л ионов цинка в среде инкубации от 4,2 до 21,8 мкг/г (Рис. 2.) После этого

процесс накопления замедляется с последующим уменьшением количества сорбированного металла при 5 мг/л Zn^{2+} в инкубационной среде.

Как и у рыб, адаптированных к действию допороговых концентраций, количество аккумулированного цинка значительно ниже по сравнению с контрольной группой.

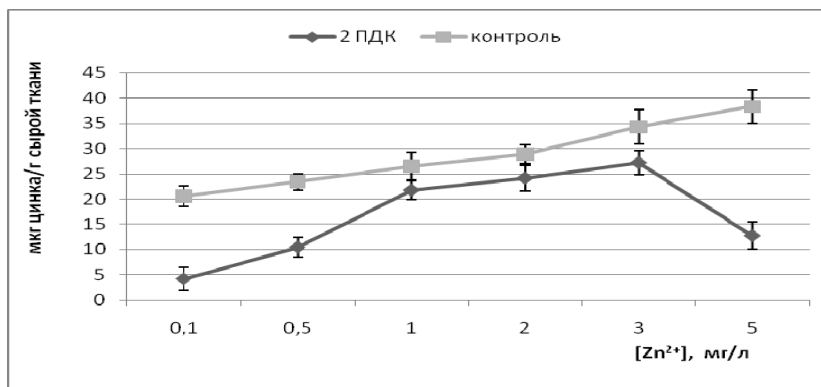


Рис. 2. Влияние 14 суточной адаптации к 2 ПДК цинка на поглощение Zn^{2+} жабрами карпа

Однако следует отметить, что сродство жаберного эпителия к ионам цинка выше у рыб адаптированных к действия 0,5 ПДК металла (насыщение при 0,5 мг/л), чем у группы рыб, акклиматизированных к сублетальным концентрациям (насыщение при 3 мг/л).

В общем, можно предположить, что не последнюю роль в адаптации к повышенным концентрациям цинка играют структурные и функциональные изменения мембранных белков-переносчиков, так как известно, что векторные ферменты, чрезвычайно чувствительные к стрессовым факторам (Кравцов А.В., 1990). Изменение их активности является часто критерием токсичности тех или иных токсикантов (Лионетто М.Г., 2000).

Кадмий, в отличие от предыдущего металла, типичный токсикант и не является жизненно необходимым для организма гидробионтов. Известно (МакГир Дж.С., 2000.), что в отличие биогенных металлов, уровень регуляции содержания кадмия в организме гидробионтов значительно ниже.

Как показали результаты проведенных исследований профиль кривых накопления кадмия жабрами рыб сходный как для контрольных, так и опытных групп рыб (Рис. 3, 4).

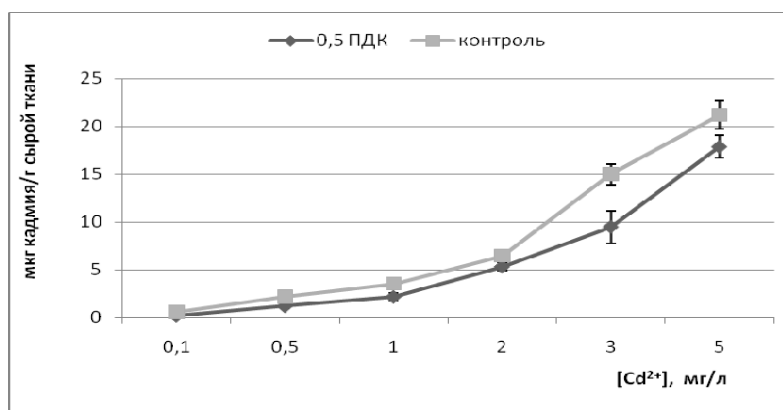


Рис. 3. Влияние 14 суточной адаптации до 0,5 ПДК ионов кадмия на поглощение Cd^{2+} жабрами карпа

Количество аккумулированного кадмия в жабрах во всех группах рыб возросло с повышением его концентрации в инкубационной среде. Вместе с тем, для неадаптированных рыб следует отметить сравнительно незначительное увеличение количества сорбированного металла в интервале 0,1-2 мг/л, после чего от 2 до 5 мг/л происходит стремительное накопление кадмия клетками жаберного эпителия (6,4-21,2 мг/г). Предположительно, проникновение ионов кадмия из апикальной мембраны жаберных клеток может осуществляться как белками переносчиками, так и путем диффузии. При низких концентрациях кадмия в среде (<2 мг/л) реализуется высокоаффинный, регулируемый мембраной транспорт, тогда как при высоких концентрациях

начинает преобладать поступления металла путем диффузии и количество аккумулированного металла растет пропорционально его концентрации в среде инкубации. Можно предположить, что высокие концентрации токсиканта инициируют открытие Ca^{2+} -ионных каналов, что способствует лавинообразному аккумулированию кадмия жабрами карпа.

Количество кадмия, аккумулированного жабрами опытных групп, было ниже по сравнению с контролем, особенно при инкубации с высокими концентрациями (3-5 мг/л) ионов металла. Предположительно, имеет место уплотнение апикальной мембраны жаберных клеток карпа в результате акклимации к повышенным концентрациям токсиканта.

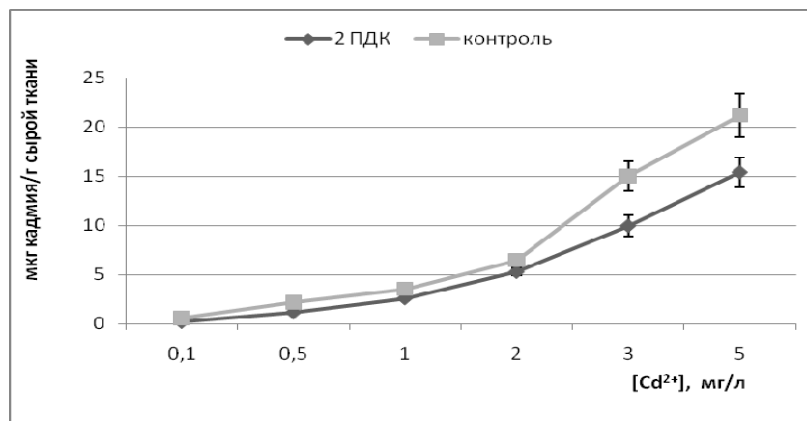


Рис. 4. Влияние 14-суточной адаптации до 2 ПДК ионов кадмия на поглощение Cd^{2+} жабрами карпа

В общем, следует отметить, что скорость поглощения кадмия жабрами достаточно высокая, что объясняется их высоким сродством к этому металлу и способностью накапливать сравнительно высокие его концентрации (Патина С.А., 1981). 14 - дневная преадаптация к повышенным концентрациям ионов кадмия в воде меньше влияет на характер его поглощения в сравнении с цинком. Предположительно, кадмий прочно связывается внутриклеточными метаболитами, что и обуславливает более эффективное его проникновения через клеточную оболочку жабр.

Список литературы

- Беспаятных Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. – Л.: Химия, 1985. – 304 с.
- Кравцов А.В., Алексенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран - К.: Наукова думка, 1990. - 176 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк, 1990. – 352 с.
- Патина С.А., Морозов Н.П. Микроэлементы в морских организмах и экосистемах. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. - 152 с.
- Хоменчук В.О., Курант В.З., Сімчук С.Р., Грубінко В.В. Механізми транспорту іонів міді та марганцю у зябрах неадаптованих та адаптованих до дії цих іонів риб // Наук. зап. ТНПУ ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2006. – № 2. – С. 107-112.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация – М.: Мир, 1988. – 568 с.
- Hogstrand C., Reid S.D., Wood C.M. Ca^{2+} versus Zn^{2+} transport in the gills of freshwater rainbow trout and the cost of adaptation to waterborne Zn^{2+} // J. Exp. Biol. – 1995. – Vol. 198. –P. 337-348.
- Lionetto M.G., Giordano M.E., Vilella S., Schettino T. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium // Aquat. Toxicol. – 2000. - Vol. 48, № 4 – P. 561-571.
- McGeer J.C., Szebedinszky C., McDonald D.G. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs // Aquat. Toxicol. – 2000. – Vol. 50, № 3. – P. 231-243
- Protasowcki M., Chodynieski A. Biochumulacja Cd, Pb, Cu, Zn w karpie – *Cyprinus carpio* L. w zaleznosci od stezeja w wodzie i czasu ekspozycji // Lesz. nauk. ryb. mor. i technol. zywn. – Szczecin, 1988. – Vol. 17. –P. 69-84.

УРОВЕНЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ БАССЕЙНА СРЕДНЕГО ТЕЧЕНИЯ РЕКИ ИЛИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Г.Г.Сливинский

Институт зоологии КН МОН РК

480060, г. Алматы, пр. аль-Фараби, 93, Казахстан, gslivinsky@mail.ru

Река Или -основная водная артерия на юго-востоке Казахстана – играет ключевую роль в обеспечении населения региона водой, продукцией сельского и охотничьего хозяйства, рыбного промысла. Возрастание масштабов антропогенного пресса в последние годы привело к ухудшению ее гидрологического и гидрохимического режимов. Продолжается загрязнение воды и атмосферного воздуха промышленными выбросами, бытовыми и канализационными отходами. Ситуацию ухудшает выкорчевывание и сжигание тугайных лесов вдоль пойм рек, впадающих в Или, интенсивная вырубка саксаульников, пожары, стихийное водопользование. Все это совпадает с уменьшением стока горных рек, происходящим из-за сокращения площадей горных ледников. Вследствие этого снижаются запасы поверхностных и подземных вод, а уровень их загрязнения тяжелыми металлами, сельскохозяйственными ядами, нефтепродуктами и другими токсическими веществами возрастает. Ситуацию усугубляет все возрастающий водозабор из рек бассейна на территории КНР и проникновение с сопредельной территории чужеродных видов водной фауны. Неуклонно снижаются уловы ценных видов рыбы, и увеличивается доля малоценных сорных рыб-вселенцев.

Целью сообщения является оценка загрязнения бассейна среднего течения Или тяжелыми металлами.

Сбор эколого-фаунистического материала проводился в июле 2010 г. на водных объектах бассейна среднего течения р. Или на территории Казахстана. Исследованиями были охвачены водоисточники разных категорий: р.Или в районе Государственного национального природного парка (ГНПП) «Алтын-Эмель», реки Баянкол и Кегень, горько-соленое озеро Тузколь, пойменное озеро р.Или и водохранилище на территории ГНПП «Алтын-Эмель»

Все пробы для определения содержания тяжелых металлов переводили в раствор методом мокрого озоления. Анализ содержания цинка, меди, кадмия, свинца, кобальта и хрома проводили методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре Solaar S2AA (США).

В период проведения исследований летом 2010 г. гидрологический режим в бассейне верхнесреднего течения реки Или определялся аномально высоким летним паводком, в связи с чем были затоплены косы и мелководья, а также часть береговой зоны.

Результаты определения содержания тяжелых металлов в воде и донных отложениях исследованных водоисточников приведены в таблице 1.

Несмотря на аномально высокий уровень водности в регионе в летний период, который способствовал вымыванию загрязняющих веществ с территории водосбора, в период исследований вода всех исследованных источников соответствовала санитарно-токсикологическим нормативам. Содержание цинка, кадмия, свинца было ниже, а содержание меди превышало установленный уровень для водоемов рыбохозяйственного значения. В р.Или кратность превышения ПДК – 12, 4. В воде рек Баянкол и Кегень превышение ПДК для меди составляло 12,0 и 13,7, соответственно.

Необходимо отметить, что повышенное содержание меди, превышающее ПДК для водоемов рыбохозяйственного значения, является устойчивым признаком для большинства водоемов Балхаш-Алакольского бассейна. Не исключено, что это связано не только с высоким уровнем антропогенного загрязнения бассейна растворимыми соединениями меди, но, возможно, и с геохимическими особенностями данного региона.

Среди исследованных нами пресных водоисточников бассейна относительно высокое содержание металлов в воде выявлено в пойменном озере р.Или. Здесь установлена наиболее высокая концентрация цинка, меди, свинца и хрома. В воде горько-соленого озера Тузколь кобальт не обнаружен, но цинк, свинец и хром содержались в относительно высоких концентрациях, превышающих таковые в пресноводных водоемах.

За исключением водохранилища, расположенного на территории ГНПП «Алтын-Эмель», концентрации отдельных металлов в донных отложениях пресных водоисточников не обнаруживали заметных различий (Табл. 1). Наиболее загрязнен грунт водохранилища на

территории ГНПП «Алтын-Эмель», где содержание тяжелых металлов было значительно выше, нежели в остальных пресноводных водоисточниках. Интересно отметить, что концентрации металлов в грунтах горько-соленого озера Тузколь были сравнимы с таковыми в пресноводных водоемах. Здесь были выявлены несколько более высокие концентрации только двух из шести исследованных нами металлов - меди и хрома.

Таблица 1. Концентрация тяжелых металлов в воде и донных отложениях

Место отбора проб	Ингредиенты, мг/дм ³ /кг					
	Zn	Cu	Cd	Pb	Co	Cr
Вода						
р.Или, территория ГНПП Алтын-Эмель	0,0047	0,0124	0,0003	0,0015	0,0014	0,0133
Пойменное озеро р. Или	0,0193	0,0508	0,0001	0,0048	0,0011	0,0430
р. Баянкол	0,0063	0,0120	0,0002	0,0029	0,0004	0,0090
р. Кегень	0,0059	0,0137	0,0002	0,0042	0,0005	0,0107
оз. Тузколь	0,0873	0,0196	0,0040	0,0240	0,0000	0,2149
Водохр-лище, п. Аралтобе	0,0107	0,0213	0,0002	0,0025	0,0004	0,0132
ПДК в питьевых и хоз.быт водоемах/рыб.хоз водоемах	1,0/0,01	1,0/0,001	0,001/0,005	0,03/0,01-0,1	-	0,05-0,5/ 0,005-0,02
Рекомендации ВОЗ	3,0-5,0	1,0-2,0	0,003-0,005	0,01-0,05	-	0,05 общий
Грунт						
р.Или, территория ГНПП «Алтын-Эмель»	30,9693	9,1290	0,0456	4,1697	4,7456	5,5936
Пойменное озеро р. Или	31,4835	10,1520	0,0181	5,4146	4,4889	6,5279
р. Баянкол	21,5969	8,8662	0,0250	5,2120	3,8135	6,1983
р. Кегень	26,7795	9,6786	0,0226	5,1541	4,7686	6,7045
оз. Тузколь	28,3621	11,1284	0,0189	5,6005	3,6543	8,3771
Водохр-лище, п. Аралтобе	57,8743	19,6897	0,0542	12,3622	7,8324	10,896

Отметим, что по результатам корреляционного анализа между концентрацией отдельных металлов в воде и их концентрацией в грунтах корреляции не обнаружено. Коэффициенты корреляции для отдельных металлов находились в пределах от $r=-0,35$, для кадмия, до $r=+0,23$, для хрома.

Таким образом, в период исследований концентрация тяжелых металлов в воде пресных водоисточников не превышала санитарно-токсикологических нормативов. Концентрация всех исследованных металлов, за исключением меди, была ниже ПДК для водоемов рыбохозяйственного значения. Концентрации каждого металла в грунтах пресноводных водоемов не обнаруживали заметных различий между собой.

Уровень загрязнения тяжелыми металлами организма рыб из р.Или определяли по их содержанию в мышечной ткани двух фоновых видов – сома и плотвы, характеризующихся высоким уровнем накопления металлов. В реках Баянкол и Кегень фоновыми видами были голый осман и тибетский голец. Результаты определения содержания тяжелых металлов у представителей этих видов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация тяжелых металлов в мышечной ткани фоновых видов ихтиофауны

Место отбора проб	Вид	Ингредиенты, мг/кг					
		Zn	Cu	Cd	Pb	Co	Cr
р. Или	Сом	10,7±2,7	0,4±0,2	0,04±0,02	0,0	0,003±0,01	2,4±0,5
	Плотва	24,2±1,1	3,1±0,1	0,03±0,002	0,0	0,0000	2,3±0,1
р. Баянкол	Голый осман	19,4±4,8	1,8±0,03	0,08±0,004	0,008±0,007	0,27±0,10	3,5±0,1
	Тибетский голец	52,2±2,0	3,3±1,2	0,15±0,01	1,1±0,05	0,46±0,0002	7,0±0,4
р. Кегень	Голый осман	20,1±1,9	13,5±13,5	0,03±0,004	0,22±0,21	0,020±0,01	2,3±0,04
	Тибетский голец	22,4±3,6	1,6±0,2	0,03±0,009	0,0	0,09±0,08	2,5±0,1
ПДК в мышечной ткани рыб		40,0	10,0	0,2	1,0	-	-

Представители исследованной нами выборки ихтиофауны характеризовались умеренным уровнем накопления цинка в мышечной ткани. Содержание этого металла у всех исследованных экземпляров рыб, за исключением представителей тибетского гольца из р.Баянкол, было ниже норматива, установленного в Казахстане (40 мг/кг).

Концентрация цинка в мышцах тибетского гольца была выше ПДК и, в среднем, составляла $52,2 \pm 2,0$ мг/кг.

Концентрация меди у всех исследованных экземпляров, за исключением представителей голого османа из р.Кегень, находилась ниже максимально допустимого уровня. Концентрации меди у отдельных экземпляров голого османа заметно различались, находясь в интервале (0,07-27,03) мг/кг, в среднем 13,5 мг/кг, что превышает максимально допустимый уровень для данного металла (ПДК=10 мг/кг).

Превышения установленного норматива по кадмию не обнаружено. Наиболее низкая концентрация металла, равная 0,03 мг/кг, была у плотвы из р.Или, голого османа и тибетского гольца из р.Кегень. Относительно высокое содержание этого металла, равное, в среднем, $0,15 \pm 0,01$ мг/кг выявлено у тибетского гольца из р.Баянкол.

Свинец в рыбе из р.Или не обнаружен. Он также отсутствовал у исследованных экземпляров тибетского гольца из р.Кегень. Незначительное превышение ПДК для данного металла имелось у тибетского гольца из р.Баянкол.

Наименьшее содержание кобальта в интервале (0 - 0,0030) мг/кг выявлено в рыбе из р.Или. Относительно высокое его содержание (0,27 - 0,46) мг/кг обнаружено в рыбе из р.Баянкол. Наиболее высокая концентрация хрома, равная $7,0 \pm 0,4$ мг/кг содержалась у тибетского гольца из р.Баянкол. У всех остальных экземпляров различия в содержании этого металла были незначительными, находясь в интервале от 2,3 мг/кг (голый осман, р.Кегень) до 3,5 мг/кг (голый осман, р.Баянкол).

По содержанию отдельных металлов и их суммарному содержанию в мышечной ткани наиболее загрязнена тяжелыми металлами рыба из р.Баянкол. Здесь у исследованных нами экземпляров тибетского гольца была наиболее высокая концентрация цинка и свинца, превышающая ПДК. Относительно высокими были и концентрации кадмия, кобальта и хрома. В сравнении с тибетским гольцом, в мышцах исследованных экземпляров голого османа из р.Баянкол содержание металлов было более низким. По суммарному содержанию металлов представители этого вида из рек Баянкол и Кегень отличались незначительно. Следует отметить, что выявленные различия в уровне накопления металлов у фоновых видов рыб из исследованных нами рек могут быть связаны не только с различным уровнем загрязнения среды обитания, но также зависеть от целого ряда факторов. В частности, различий в характере питания, физиологических особенностей аккумуляции и выведения тяжелых металлов у различных видов рыб, обитающих в горных и равнинных реках.

ГОМЕОСТАЗ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ПО ДАННЫМ ДИСТАНЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Б.Л. Сухоруков, И.В. Новиков

*Институт водных проблем РАН, Южный отдел
344091, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 198, Россия, bls-phys@yandex.ru*

В работе приведены результаты одного из направлений развития дистанционного мониторинга водных экосистем, в котором используют дистанционно полученную спектрометрическую информацию видимого спектра со спектральным разрешением, порядка 2 нм.

В настоящее время мониторинг воды водных объектов – «концентрационный» (по определению Ю.Одума – мерологический), основанный либо на определении концентрации одного компонента (или класса веществ, например пестицидов) либо на комплексных оценках, которые выполняют по большому числу химических, а чаще биологических показателей, таких как численность, биомасса соотношение видов планктона и т.д. Принципиальным отличием рассматриваемого подхода от традиционного является попытка найти объективные, внутренние присущие экосистеме параметры состояния. В подходе, основанном на измерении спектральных характеристик водной экосистемы, (по Ю.Одуму холистическом) в экосистеме на начальном этапе

не разделяют компоненты на химические и биологические, а измеряют спектр восходящего излучения, сформированный всеми присутствующими в воде компонентами. На следующем этапе при обработке всего массива, образованного из многих экспериментальных спектров, находят спектральные функции, характерные опять же для всей системы. Затем, понимая механизм формирования сигнала, строят по аналогии со статистической физикой соответствующую модель восходящего излучения и находят соответствие между найденными интегральными спектральными показателями и традиционными концентрациями видимых компонентов. Этот этап необходим исключительно как трансляционный, переходной. Известно, что при использовании спектров яркости восходящего от воды излучения возможно построение биооптических моделей, наиболее очевидного «практического продукта» многозональной спектрометрии, но мы этот выход считаем побочным.

С другой стороны, при рассмотрении основ любого биологического мониторинга, даже не связанного с дистанционным измерением параметров экосистемы, показатели, которые следует принимать во внимание при наблюдении за биосистемами должны удовлетворять следующим требованиям (Федоров, 1975):

- показатели должны относиться к процессам с гомеостатическими механизмами регуляции;
- предпочтение следует отдавать переменным, характеризующим неспецифический отклик по отношению к различным возмущающим факторам;
- необходимо избирать интегральные показатели, которые быстро и надежно могут быть измерены инструментально.

На наш взгляд параметры, измеряемые дистанционно в оптическом диапазоне длин волн – спектры яркости восходящего от воды излучения и спектры коэффициентов яркости, отвечают всем перечисленным выше требованиям. Кроме того, дистанционные спектрометрические измерения, обладают несомненным преимуществом перед традиционными методами исследования водных объектов. Этот метод наблюдений является «неразрушающим», т.е. в процессе измерений принципиально исключается взаимодействие «объекта и зонда». Размер площади, формирующей восходящее излучение зависит от высоты, на которой расположен объектив датчика и достигает тысяч дм^2 . В специальных экспериментах он может быть уменьшен до десятков дм^2 . Соответственно объем водной экосистемы, формирующий сигнал, составляет от десятков до тысяч дм^3 . Очевидно, что информация такого объема гораздо более представительна при изучении экосистем, чем данные, получаемые при отборе проб на традиционный химический или биологический анализ, даже в случае «сливных» проб.

Рассмотрим используемый в гидрооптике показатель: коэффициент яркости восходящего от воды излучения. По определению (Шифрин, 1983) коэффициент яркости восходящего от водной поверхности в направлении Ω излучения:

$$\rho_{om}(\Omega) = \frac{B(\Omega)}{B_0}, \quad (1)$$

где $B(\Omega)$ - интенсивность отраженного света в направлении Ω , B_0 - интенсивность света, рассеянного ортотропной абсолютно белой площадкой (идеальным ламбертовским рассеивателем), расположенной на верхней границе рассеивающего слоя. Если это выражение переписать в виде:

$$B(\Omega) = \rho_{om}(\Omega)B_0, \quad (2)$$

становится ясным физический смысл коэффициента яркости. Это величина, характеризующая способность среды распространения излучения трансформировать попадающее в нее излучение. В настоящем случае – способность водной экосистемы переизлучать (рассеивать, поглощать) падающее Солнечное излучение B_0 , достигшее водной поверхности. Принципиально важен тот факт, что величины $B(\Omega)$ и B_0 измеряют вне среды распространения излучения. Коэффициент яркости является «оптическим образом» водной экосистемы, интегральной оптической характеристикой ее оптически активных компонентов. Оптически активными или видимыми называют компоненты, изменяющие комплексный показатель преломления среды распространения излучения.

С другой стороны, известно, что коэффициент яркости связан с параметрами среды распространения излучения следующим образом:

$$\rho_{cp} \approx \frac{\sum_i C_i \sigma_i^\gamma}{\sum_i C_i (\alpha_i + (1 - \Phi_i) \sigma_i)}, \quad (3)$$

где C_i – концентрация i -го оптически активного компонента (включая чистую воду), которые образуют среду распространения излучения, $\alpha_i, \sigma_i, \sigma_i^\gamma$ – показатели поглощения, рассеяния и рассеяния излучения под углом γ этих ОАК. В процессе переизлучения принимают участие все оптически активные компоненты экосистемы как биотического так и не биотического происхождения: минеральные взвешенные вещества, растворенные органические вещества, планктон – фито- (в основном), бактерия- и зоо-. Вклад двух последних в интенсивность КЯ теоретически, хотя и возможен, но минимален. Важно отметить, что компоненты, являющиеся оптически неактивными, также, в большей или меньшей степени, влияют на спектральный ход восходящего от воды излучения, но, опосредованно, через оптически активные.

Современная спектральная аппаратура со спектральным разрешением около 2 нм регистрирует спектры КЯ видимой области (400–750 нм) по 512 каналам. Поэтому теоретически, для определения состояния водного объекта по спектрам КЯ, достаточно делать заключение после анализа полученной информации в 512-мерном пространстве. Так как анализ информации в таком многомерном пространстве весьма затруднителен, нами использован хорошо известный метод сжатия информации (Айвазян, 1989).

В литературе, связанной с интерпретацией данных о природных экосистемах имеется удачное, по нашему мнению, выражение по отношению к этой процедуре: «разложение по естественным ортогональным функциям» (Скляренко, Смирнов, 1974). Смысл его в том, что собственные функции находят непосредственно по исходному массиву экспериментальных (или модельных) данных. Устойчивость собственных функций при переходе от объекта к объекту зависит от набора экспериментальных спектров. Чтобы добиться такой устойчивости массив спектров должен представлять собой в идеале – генеральную выборку. В том случае, когда между элементами исследуемого массива имеется функциональная (неслучайная) связь, используемая процедура многомерной статистики позволяет ее выявить.

В связи с тем, что физически получить генеральную выборку оптических образов водных экосистем возможно лишь теоретически, пространство оптических образов получено по массиву модельных (более 7 тыс.) и экспериментальных (около 500) спектров. Экспериментально установлено, что максимальной дисперсией это пространство обладает в координатах ОК1-ОК3.

Использование модельных спектров для построения пространства оптических образов принципиально важно, так как появляется возможность проградировать его изоплетами, составленными из привычных для интерпретации концентраций оптически активных (видимых) компонентов, в конкретном случае – концентрации минеральных взвешенных веществ и хлорофилла *a* фитопланктона. Возможная неточность описания экспериментальных спектров модельными при таком подходе не играет важной роли, так как цель, преследуемая при интерпретации спектрометрической информации заключается в исследовании внутриводоемных процессов, их направленности, а сетка из изоплет дает возможность именно наблюдать за направленностью этих процессов.

На основании расчета модельных спектров КЯ показано, что первая обобщенная координата ОК1 коррелирует с концентрацией минеральных взвешенных веществ, тогда как ОК3 коррелирует, в первом приближении с концентрацией хлорофилла *a* фитопланктона (Сухоруков, Никаноров, 2005). Таким образом, спектр КЯ видимой области характеризует с одной стороны абиотическую компоненту экосистемы, через ОК1, а с другой стороны, характеризует биоту экосистемы через ОК3. Поэтому траектории оптического образа (редуцированные до трехмерных спектры коэффициента яркости) можно представить как отражение состояния водных экосистем, интегральную характеристику внутриводоемных процессов. Кроме того, показано, что нормированный спектр коэффициента яркости может выступать в качестве критерия подобия состояния водной экосистемы (Никаноров, Сухоруков, 2003).

В натурном эксперимент, проводимом в Гидрохимическом институте в течение многих лет (Трофимчук и др., 2010), изучали токсическое воздействие соединений кадмия на водные экосистемы. Условия загрязнения мезокосмов сведены в табл. 1.

Таблица 1. Условия нагрузки мезокосмов в натурном эксперименте 2009 г.

Номер мезокосма	Концентрации Cd 2+, мкг/дм ³	Количество ПДК (р/хоз)	Режим и сроки внесения, сут.
1	не вносили	0	не вносили
2	25	5	однократно в 1-е сутки
3	375	5+5+5....+5=75	многократно (по 5ПДК в течение 15 сут.)
4	50	10	однократно в 1-е сутки
5	125	25	однократно в 1-е сутки
6	250	50	однократно в 1-е сутки

Одна из задач эксперимента – проследить за процессами изменения состояния экосистем мезокосмов по неспецифическим показателям – соответствующим образом преобразованным спектрам коэффициентов яркости восходящего от воды излучения. Ожидалось, что различная токсическая нагрузка экосистем мезокосмов должна вызвать различный отклик, который может быть зафиксирован при измерении спектров коэффициентов яркости. В соответствии с поставленной задачей параллельно с измерением химических и биологических показателей экосистем мезокосмов измеряли спектры яркости восходящего от воды излучения.

Спектры яркости восходящего излучения преобразовывали в спектры коэффициентов яркости и выполняли указанную процедуру по расчету обобщенных координат каждой их экосистем мезокосмов в течение 28 суток эксперимента.

На рисунке представлена временная зависимость ОКЗ (максимально коррелирующей с концентрацией фитопланктона по данным модельных расчетов) для всех мезокосмов и материнской экосистемы. Начиная с 3-их суток, траектории оптического образа экосистем мезокосмов начинают незначительно различаться и «расходиться». Заметно это различие проявляется, начиная с 9 суток эксперимента. Максимальные отличия возникают на 23 сутки. Затем траектории оптического образа экосистем показывают тенденции к сближению.

Если считать, что измеренная нами обобщенная координата ОКЗ отражает поведение экосистемы, то такое поведение экосистем, изначально имеющих приблизительно одинаковый биохимический состав и практически одинаковое значение ОКЗ до внесения токсического загрязнения вполне объяснимо (см. рис. и значение ОКЗ всех мезокосмов и материнской экосистемы).

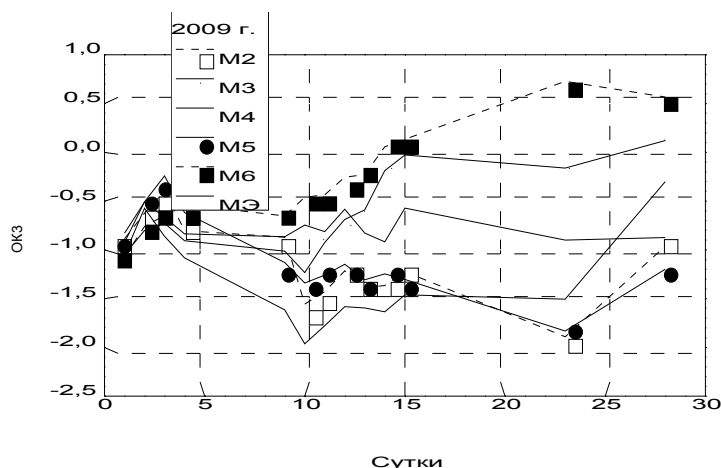


Рис. Зависимость обобщенной координаты ОКЗ от времени для экосистем мезокосмов.

На начальном этапе, в первые сутки эксперимента, экосистемы подверглись существенно различному внешнему воздействию. Биота экосистем различно прореагировала на это воздействие, процессы саморегулирования в каждой экосистеме пошли с различной интенсивностью. Экосистемы 3-го и 6-го мезокосма начала погибать. Экосистемы 2-го, 4-го и 5-го мезокосмов наоборот, восприняли это загрязнение как стимулирующий фактор развития

планктона, что привело к их бурному развитию. Следует отметить поведение экосистемы 4 мезокосма. Интенсивное развитие фитопланктона было отмечено уже на 4-е сутки, достигло максимума на 10 сутки и затем началась медленное затухание развития экосистемы, приведшая к ее угнетению, нарушению экосистемных связей и гибели в заключительной фазе эксперимента после 23 суток. Причина заключается, по-видимому, в истощении питательной базы планктона за счет замкнутости мезокосмов. Причем заметное угнетение наблюдается и у экосистем других мезокосмов, что проявляется в изменении их траекторий в направлении, противоположном развитию тогда, как траектория материнской экосистемы хотя и испытывает незначительные колебания, но даже в заключительной фазе значение ОКЗ остается на уровне начала эксперимента. Пролонгированная нагрузка экосистемы 3-го мезокосма приводит к заметному угнетению развития планктона и приближению траектории этого мезокосма к траектории экосистемы 6-го мезокосма.

Такое поведение экосистем мезокосмов на качественном уровне вполне ожидаемо и укладывается в рамки фундаментальных представлений о развитии экосистем – понимания механизма гомеостаза экосистем, их саморегулирования. Мы считаем, что гомеостатическое плато всех экосистем находится в пределах траектории материнской экосистемы в районе $ОКЗ = -1$ по шкале ОК. Траектория первого мезокосма, не подвергавшегося загрязнению, находится вблизи этого плато. Более сильное загрязнение вызвало положительную обратную связь, невысокое загрязнение – отрицательную. Следует обратить внимание на то, что на заключительной стадии эксперимента экосистемы всех мезокосмов имели тенденцию к «гибели» за счет истощения их питательного ресурса, что свидетельствует о том, что экосистемы мезокосмов конечного объема (порядка 2 м^3) обладают конечным запасом питательных веществ и при большой продолжительности эксперимента неизбежно стремятся к гибели.

Таким образом, в натурном эксперименте по изучению влияния токсических веществ на природные экосистемы показано, что высокие (порядка 50 р/хоз ПДК) разовые или не высокие (около 5 р/хоз ПДК), но пролонгированные нагрузки приводят к нарушению экосистемных связей, ведущих к гибели экосистемы на ранней стадии воздействия токсиканта на водную экосистему.

Невысокие разовые нагрузки стимулируют развитие экосистем, но на заключительной стадии экосистемы мезокосмов гибнут за счет истощения ресурса питательных веществ, причем тем быстрее и сильнее, чем более интенсивный всплеск их развития наблюдается на начальном этапе эксперимента. Время латентного периода достигало от 4 до 9 суток в зависимости от нагрузки мезокосмов, причем однозначной зависимости этого периода от величины нагрузки не отмечено.

Процессы, происходящие в экосистемах мезокосмов, зарегистрированы при изучении поведения дистанционно зарегистрированных спектров коэффициентов яркости восходящего от воды излучения, и в результате представления этих спектров в виде обобщенных координат. Поведение обобщенных координат хорошо объясняется в рамках понимания механизма гомеостаза, характерного для природных экосистем. Следовательно, третью обобщенную координату, ОКЗ, можно рассматривать в качестве интегрального параметра состояния биоты экосистемы. Учитывая высокую оперативность и объективность получения спектрометрической информации внутриводные процессы экономически целесообразно наблюдать с использованием рассмотренного подхода.

Список литературы

- Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика: Классификация и снижение размерности. М.: Финансы и статистика, 1989. - 607 с
- Никаноров А.М., Сухоруков Б.Л. Подobie модельных и материнских экосистем по данным дистанционного мониторинга поверхностных вод//Водные ресурсы. – 2003. – № 3. – С. 328–334.
- Скляренко В. Л., Смирнов Н. П. О применении многомерного анализа в гидрологии //Факторы формирования водных масс и районирование внутренних водоемов. Труды ИБВВ АН СССР. – Л.: Наука. – 1974. – Вып. 26 (29). – С. 180–206.
- Сухоруков Б.Л. Никаноров А.М. Развитие методологии дистанционной спектрометрии пресноводных экосистем//Вестник ЮНЦ РАН.–2005. –№3, С 73–84.
- Трофимчук М.М., Бакаева Е.Н., Сухоруков Б.Л. Фазовые портреты водных объектов при натурном моделировании экосистемных процессов//Вестник ЮНЦ РАН.–2010. –№2, С 28–37.
- Федоров В.Д. Биологический мониторинг: обоснование и опыт организации // Гидробиологический журнал.–1975.–Т.11, №5.–С.5–11.
- Шифрин К.С. Введение в оптику океана. Л.:Гидрометеиздат, 1983.–278с.

ТЕХНОГЕННЫЕ РАДИОНУКЛИДЫ В КОМПОНЕНТАХ ВОДНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ СЕТЕЙ В РАЙОНЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ Р.ЕНИСЕЙ

Е.А. Трофимова, Т.А Зотина, А.Я. Болсуновский

Институт биофизики СО РАН
660036 г. Красноярск, Академгородок, Россия e.trofimova11@yandex.ru

Река Енисей подвергается радиационному загрязнению в результате работы Горно-химического комбината (ГХК) Росатома. Техногенные радионуклиды регистрируются во всех компонентах экосистемы, включая биоту (Болсуновский и др., 2007; Bolsunovsky, Bondareva, 2007; Зотина и др., 2010). Между компонентами трофических сетей происходит постоянный перенос энергии и вещества а, следовательно, возможна миграция радионуклидов от одного трофического уровня к другому. В данной работе оценивалось содержание техногенных радионуклидов в ключевых звеньях трофических сетей р. Енисей в зоне радиационного загрязнения реки. Были исследованы следующие уровни трофической сети: водные растения (как среда обитания бокоплавов и личинок ручейников), зообентос, рыбы-зоофаги (елец, хариус) и рыбы-ихтиофаги (налим, щука).

Для исследования использовали водный мох (*Fontinalis antipyretica* Hedw.); представителей зообентоса: бокоплавов (*Phylolimnogammarus viridis* Dybowski) и личинки ручейников (*Apatania cryptophila* McLachlan); а также четыре вида рыб, представляющих экологические группы зоофагов и ихтиофагов. Из рыб-зоофагов использовались сибирский елец (*Leuciscus leuciscus baicalensis* Dybowski) и сибирский хариус (*Thymallus arcticus* Pallas); из рыб-ихтиофагов – налим (*Lota lota* Linnaeus) и щука (*Esox lucius* Linnaeus).

Пробы биоты отбирали в реке Енисей с августа 2009 по май 2010 г. вблизи ГХК. На одну пробу приходилось до 27 рыб. Биологический анализ рыб проводился по общепринятой методике (Вышегородцев и др., 2002). Возраст рыб составлял от 2+ до 4+ лет. Сырая масса одной особи ельца составляла от 61 до 78 г, хариуса – от 225 до 160 г, налима – 620 г, щуки – 533 г. Полная длина ельца составляла 172 – 202 мм, хариуса – 225 – 248 мм, налима – 350 мм, щуки – 396 мм.

Рыб разделяли на органы и ткани (головы, жабры, кожу с чешуей, плавники со скелетом конечностей, мышцы, осевой скелет и мышечные кости, внутренние органы). Активность радионуклидов в пробах биоты измеряли на гамма-спектрометре со сверхчистым германиевым детектором (Canberra, США). Личинки ручейников измерялись вместе с домиками. Результаты приведены в Бк/кг сухой биомассы для растений и бентоса и в Бк/кг сырой массы – для рыбы. Коэффициенты перехода радионуклидов из пищевых объектов в мышцы и тела рыб рассчитывали как отношение удельной активности радионуклида в сухой массе рыбы к активности в сухой массе кормового объекта.

Во всех пробах биоты зарегистрированы, как природные радионуклиды (^7Be , ^{40}K), так и техногенные. В пробах водного мха зарегистрированы относительно короткоживущие изотопы техногенного происхождения ^{24}Na , ^{46}Sc , ^{51}Cr , ^{54}Mn , $^{58,60}\text{Co}$, ^{59}Fe , ^{65}Zn , ^{131}I , а также долгоживущие изотопы ^{137}Cs , ^{152}Eu и трансурановый элемент ^{239}Np . Наибольшие активности зафиксированы для ^{24}Na – 1738 Бк/кг. Удельная активность ^{51}Cr в пробах достигала 104 Бк/кг, ^{60}Co – 177 Бк/кг, ^{239}Np – 100 Бк/кг, ^{65}Zn – 15 Бк/кг, ^{137}Cs – 37 Бк/кг.

В пробах бокоплава и личинок ручейника – основной кормовой базы для хариуса, регистрировались такие техногенные радионуклиды как ^{51}Cr , ^{60}Co , ^{65}Zn , ^{99}Mo , ^{137}Cs , ^{152}Eu , ^{239}Np . Активности изотопов ^{60}Co (до 1100 Бк/кг), ^{65}Zn (до 185 Бк/кг) и ^{137}Cs (до 154 Бк/кг) в пробах зообентоса были выше, чем в пробах мха.

В телах исследованных видов рыб зарегистрированы такие техногенные радионуклиды как $^{58,60}\text{Co}$, ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{137}Cs . Изотопы ^{60}Co , ^{65}Zn и ^{137}Cs зарегистрированы не только в покровных тканях, но и в костях и мышцах рыб, что может свидетельствовать о трофическом пути поступления этих техногенных радионуклидов в организм рыб. Для всех видов рыб характерна низкая удельная активность радионуклидов (^{60}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{137}Cs) в мышцах. Наиболее значительная удельная активность в пробах мышц отмечалась для ^{65}Zn (1.6 Бк/кг) – елец, и для ^{137}Cs – щука (2.2 Бк/кг), хариус (1.8 Бк/кг). Высокая удельная активность ^{85}Sr регистрировалась в костях и тех частях тел рыб, в состав которых входят костные ткани (головах, плавниках).

Для оценки эффективности перехода радионуклидов с одного трофического уровня на другой были рассчитаны коэффициенты перехода (КП) радионуклидов из пищевых объектов в

мышцы и тела рыб. Значения КП для пищевых пар бокоплав/тела и бокоплав/мышцы хариуса для ^{40}K превышали единицу (1.2 – 1.4), это согласуется с данными, полученными для стабильного калия (Анищенко и др., 2009). КП для техногенных радионуклидов были меньше единицы, самые высокие величины КП получены для цинка (0.06 – 0.3) и цезия (0.2) (Рис.1).

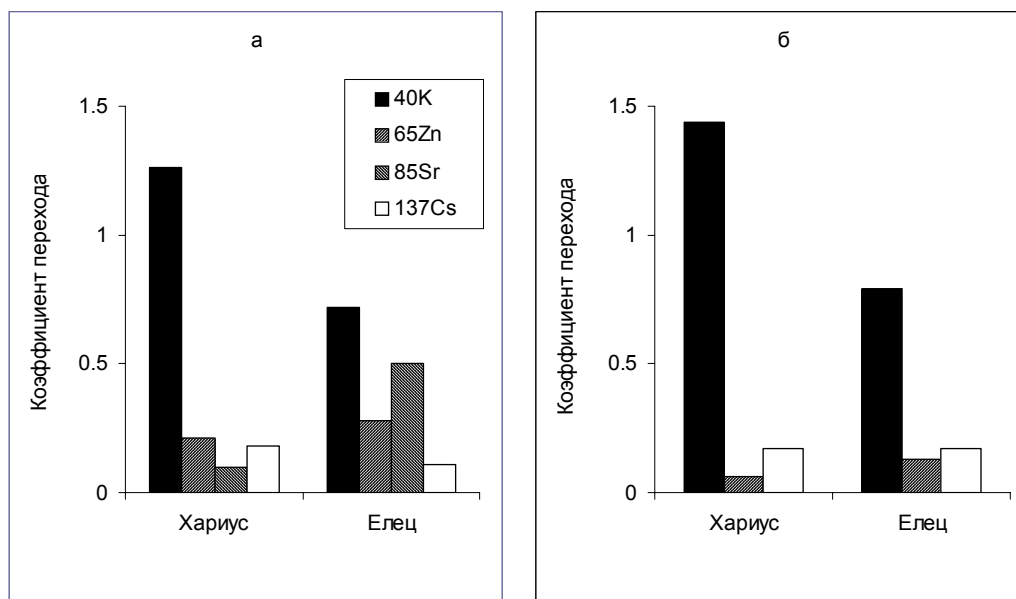


Рис. 1. Коэффициенты перехода радионуклидов из пищевых объектов в тела (а) и мышцы (б) рыб-зоофагов ельца и хариуса.

Максимальные значения КП радионуклидов из тел хариусов и ельцов в мышцы рыб-ихтиофагов (налима, щуки) составили: для природного радионуклида ^{40}K – 0.9, для ^{65}Zn – 0.2 – 0.3, для ^{137}Cs – 1.1 – 2.7 (Рис.2). На основе полученных результатов можно говорить о возможном накоплении ^{137}Cs из биомассы рыб зоофагов (ельца и хариуса) рыбами-ихтиофагами (налимом и щукой), что согласуется с данными других авторов (Рябов, 2004; Зарубин и др., 2010).

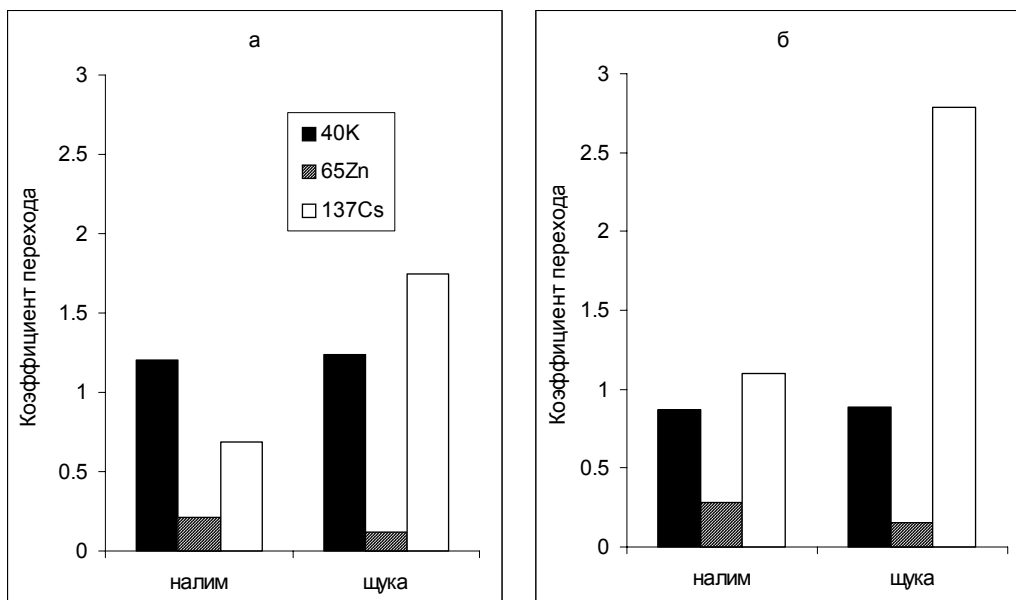


Рис. 2. Коэффициенты перехода радионуклидов из тел рыб-зоофагов хариуса (а) и ельца (б) в мышцы рыб-ихтиофагов налима и щуки.

Таким образом, техногенные радионуклиды зарегистрированы во всех звеньях трофической цепи р. Енисей. В биомассе водного мха зарегистрирован самый большой перечень радионуклидов. По мере продвижения по трофическим уровням перечень радионуклидов в

биомассе гидробионтов сокращается.

Техногенные радионуклиды обнаружены как в покровных тканях, так и во внутренних органах и тканях рыб, что может свидетельствовать о поступлении техногенных изотопов в организм рыб по трофической цепи.

Коэффициент перехода радионуклидов из биомассы бокоплава в организмы рыб, превысил единицу только для естественного радионуклида ^{40}K . Трофический переход техногенных радионуклидов (^{65}Zn , ^{137}Cs , ^{85}Sr) из зообентоса в биомассу рыб-зоофагов был менее эффективным.

КП техногенного радионуклида ^{137}Cs из биомассы рыб-зоофагов в мышцы рыб-ихтиофагов превышал единицу, что свидетельствует о возможности его накопления в данной трофической паре.

Список литературы:

- Анищенко О.В., Гладышев М.И., Кравчук Е.С., Сущик Н.Н., Грибовская И.В. Распределение и миграция металлов в трофических цепях экосистемы реки Енисей в районе г. Красноярск. Водные ресурсы, 2009, 36 (5), с.623 – 632.
- Болсуновский А.Я., Муратова Е.Н., Суковатый А.Г., Пименов А.В., Санжараева Е.А., Зотина Т.А., Седельникова Е.С., Паньков Е.В., Корнилова Е.Г. Радиоэкологический мониторинг реки Енисей и цитогенетические характеристики растения *Elodea Canadensis*. Радиоэкологи, 2007, том 47, №1, с 63 – 73.
- Вышегородцев А.А., Скопцова Г.Н., Чупров С.М., Зуев И.В. Практикум по ихтиологии. Красноярск, 2002, 127 с.
- Зарубин О.Л., Малюк И.А., Костюк В.А. Особенности содержания ^{137}Cs у различных видов рыб Каневского водохранилища на современном этапе. Гидробиологический журнал, 2009, том 45, №5, с. 110 – 116.
- Зотина Т.А., Трофимова Е.А., Каглян А.Е., Болсуновский А.Я., Гудков Д.И. Распределение техногенных радионуклидов из р. Енисей (Россия) и водоёмов зоны отчуждения Чернобыльской АЭС (Украина). Проблемы биогеохимии и геохимической экологии, 2010, №1 (12), с. 91 – 94.
- Рябов И.Н. Радиоэкология рыб водоемов в зоне влияния аварии на чернобыльской АЭС. М: товарищество научных изданий КМК, 2004, 215 с.
- Bolsunovsky A., Bondareva L. Actinides and other radionuclides in sediments and submerged plants of the Yenisei River. J. Alloy. Compd. 2007, v. 444 – 445. p. 495 – 499.

СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ В ОРГАНАХ СЕРОГО КИТА (*ESCHRICHTIUS ROBUSTUS*) ИЗ БЕРИНГОВА МОРЯ

В.Ю. Цыганков¹, М.Д. Боярова¹, А.А. Лукашкина¹, О.Н. Лукьянова²

¹Дальневосточный федеральный университет,

²Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр)

г. Владивосток, Россия, tsig_90@mail.ru

Устойчивость экосистемы – способность переработать определенное количество токсиканта без проявлений интоксикации ее отдельных компонентов и сдвига равновесия в экосистеме. Созданные в результате деятельности человека, хлорорганические загрязняющие вещества нарушают равновесие экосистемы, что в свою очередь угнетает процессы самоочищения.

Большинство галогенсодержащих органических соединений благодаря своей гидрофобности и липофильности способны накапливаться в жировых тканях животных. Как правило, чем выше трофический уровень, тем выше концентрация хлорорганических соединений. В отличие от стойких органических ксенобиотиков, тяжелые металлы существуют в естественной среде в различных концентрациях. Они опасны тем, что способны накапливаться, и образовывать высокотоксичные соединения, и вмешиваться в метаболический цикл живых организмов. Тяжелые металлы и хлорорганические соединения становятся причиной гибели многих видов морских млекопитающих, у которых наблюдаются изменения иммунологического статуса, мутагенные, тератогенные и репродуктивные аномалии.

Цель данной работы состояла в оценке содержания хлорорганических пестицидов и тяжелых металлов в органах серого кита (*Eschrichtius robustus* Lilljeborg, 1861) из Берингова моря.

Материалы и методы. Исследованы образцы органов семи особей серых китов, добытых в сентябре 2010 г. охотниками п. Лорино, Чукотской АО, в Беринговом море (Табл. 1, Рис 1.)

Таблица 1. Образцы органов серого кита, использованные в исследовании

№	Пол	Размер	Возраст	Исследованные органы
1	♂	7,9 м	0,5 лет	Мышцы
2	♂	8,5 м	0,5 лет	Мышцы
3	♂	11 м	7 лет	Мышцы
4	♂	11,3 м	8-9 лет	Мышцы
5	♀	8,5 м	0,5 лет	Мышцы
6	♀	9,1 м	1,5 лет	Мышцы
7	♀	9,6 м	2,5 лет	Мышцы
8	♂	7,9 м	0,5 лет	Печень
9	♂	8,5 м	0,5 лет	Печень
10	♂	11 м	7 лет	Печень
11	♂	11,3 м	8-9 лет	Печень
12	♀	8,5 м	0,5 лет	Печень
13	♀	9,1 м	1,5 лет	Печень
14	♀	9,6 м	2,5 лет	Печень

Международная китобойная комиссия (International Whaling Commission - IWC) предоставила исключительное право добывать серого кита чукотско-калифорнийской популяции коренным жителям Чукотки (Россия) и Аляски (США) для удовлетворения традиционных потребностей и поддержания традиционного уклада жизни.

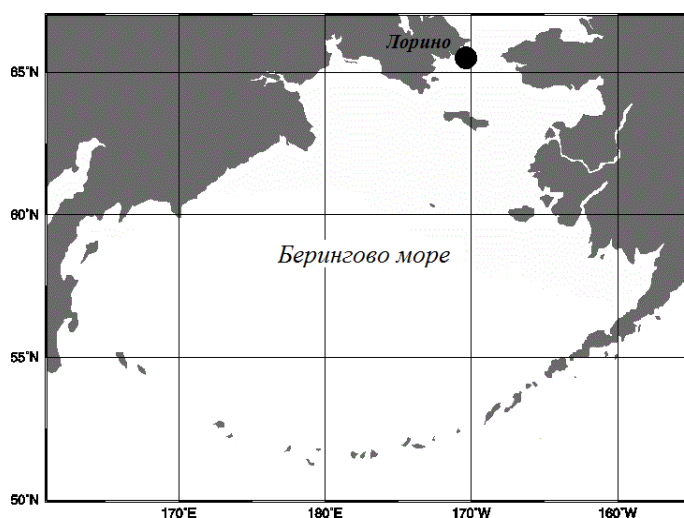


Рис. 1. Карта-схема района исследований. ● – место отбора проб.

Содержание пестицидов определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Shimadzu GC-16A» (Япония) с детектором электронного захвата ECD-15, колонка ККК 25 м × 0,22 мм. Температура инжектора 250 °С, колонки – 210 °С, детектора – 280 °С. Газ-носитель – смесь аргона с метаном, давление на входе – 2 кг·см⁻² Скорость потока – 0,5 см³·мин⁻¹. Извлечение ХОП из органов проводили методом экстракции гексаном, с последующим разрушением жировых компонентов серной кислотой, отделением пестицидов на колонке с силикагелем и концентрированием экстракта (Клисенко и др., 1983).

Массовую концентрацию тяжелых металлов определяли инверсионно-вольтамперметрическим методом. Метод основан на способности элемента электрохимически осаждаться на индикаторном электроде из анализируемого раствора при заданном потенциале предельного диффузионного тока, а затем растворяться в процессе анодной поляризации при определенном потенциале, характерном для данного элемента. Исследования проводились на вольтамперметрическом анализаторе ТА-4 (Россия).

Результаты и обсуждение. Хлорорганические пестициды (ХОП). Пестициды были определены во всех исследованных образцах. Суммарное содержание ХОП в печени, в основном, превышает сумму в мышцах (Рис. 2). Сумма ХОП в мышцах находилась в пределах 11,5 – 140,1, в печени 14,4 – 285,7 нг/г сухого веса.

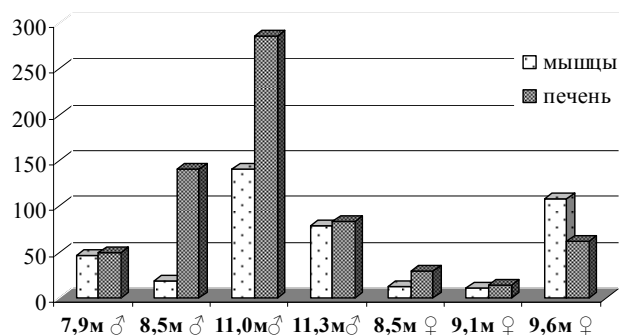


Рис. 2. Суммарная концентрация ХОП в органах серого кита (нг/г сухого веса).

Возрастная аккумуляция выражена не явно, но в целом, можно отметить, что у более крупных взрослых самцов и самок в мышцах и печени сумма ХОП выше, по сравнению с молодыми особями меньшего размера. У самцов сумма ХОП больше, чем у самок.

В мышцах и печени у самцов и самок сумма изомеров ГХЦГ больше, чем ДДТ и его метаболитов (Рис. 3). Концентрация ГХЦГ практически во всех образцах превышает концентрацию ДДТ. Суммарная концентрация ГХЦГ в мышцах и печени варьировала в пределах 4,7 – 118,0 и 12,2 – 184,5 нг/г сухого веса, соответственно. Концентрации ДДТ и его метаболитов в мышцах и печени изменялись в пределах 4,7 – 35,9 и 1,3 – 101,2 нг/г сухого веса, соответственно.

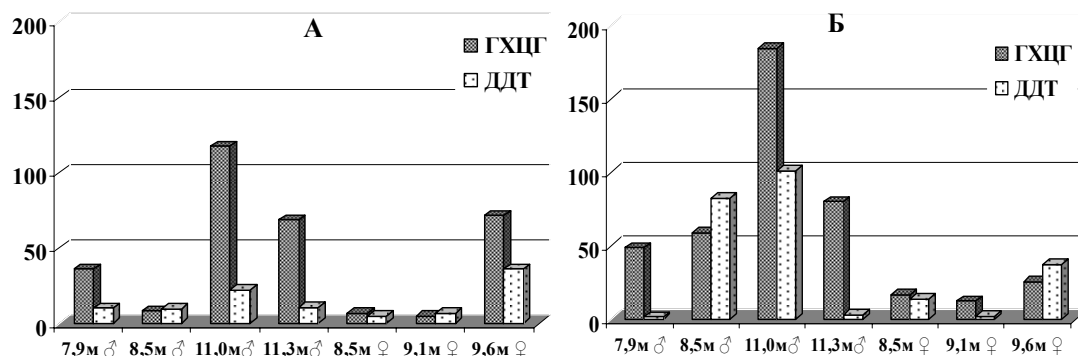


Рис. 3. Суммарные концентрации ДДТ и ГХЦГ в органах серого кита (нг/г сухого веса): А – мышцы, Б – печень.

Общее содержание ХОП в органах серого кита значительно ниже, чем в морских млекопитающих восточного побережья Берингова моря (Krahn et al., 2009), и в органах тюленя из российской зоны Японского моря (Боярова и др., 2010).

Таблица 2. Содержание токсичных элементов (мг/кг сухой массы) в органах серых китов

Пол, размер и возраст	Органы	Элементы			
		Cd	Pb	As	Hg
♂ – 7,9 м, 0,5 лет	Мышцы	0,15	0,34	0,16	н/о
♂ – 8,5 м, 0,5 лет		0,13	0,17	0,14	н/о
♂ – 11 м, 7 лет		0,026	0,21	0,27	н/о
♂ – 11,3 м, 8-9 лет		0,105	0,19	н/о	н/о
♀ – 8,5 м, 0,5 лет		0,0073	0,06	0,29	н/о
♀ – 9,1 м, 1,5 лет		0,35	0,36	0,095	н/о
♀ – 9,6 м, 2,5 лет		0,13	0,17	0,13	н/о
♂ – 7,9 м, 0,5 лет	Печень	0,11	0,18	0,55	н/о
♂ – 8,5 м, 0,5 лет		0,26	0,075	0,14	н/о
♂ – 11,3 м, 8-9 лет		0,7	0,21	0,21	0,12
♀ – 8,5 м, 0,5 лет		0,38	0,26	0,19	н/о
♀ – 9,1 м, 1,5 лет		0,50	0,053	0,02	н/о
♀ – 9,6 м, 2,5 лет		0,67	0,13	0,52	0,0068
Сан ПиН		0,2	1,0	5,0	0,5

Токсичные элементы. Тяжелые металлы (кадмий, свинец, ртуть) и токсичный элемент мышьяк, как и пестициды, были определены во всех исследованных образцах (Табл. 2). Как в мышцах, так и в печени отмечено присутствие кадмия, свинца и мышьяка (Рис. 4). Ртуть была обнаружена в печени только у взрослых самца (8-9 лет) и самки (2,5 лет).

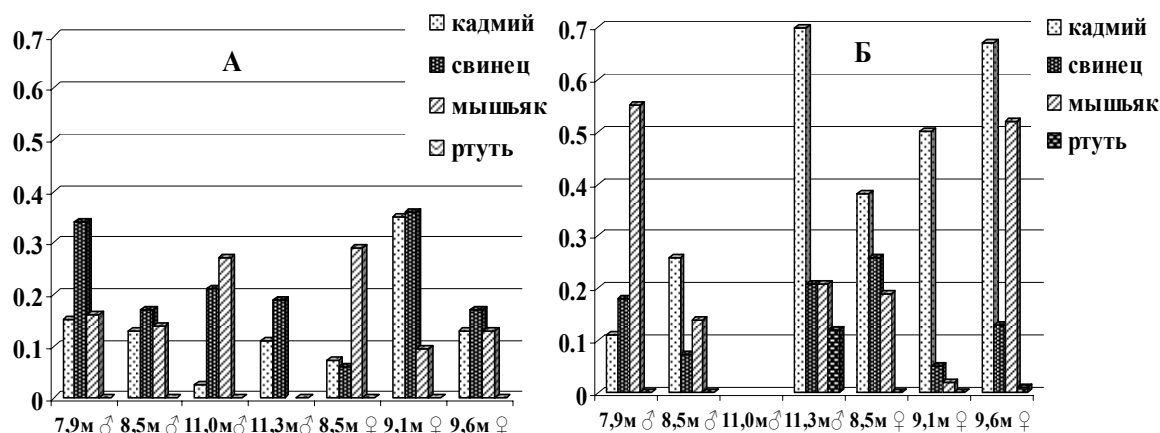


Рис. 4. Содержание тяжелых металлов в органах серого кита (мг/кг сухого веса): А – мышцы, Б – печень.

Максимальное содержание кадмия наблюдалось в печени у самцов и самок, причем его концентрация превышала нормы Сан ПиН РФ в пяти из шести проб, а в мышцах – в одной пробе из семи. Свинец в большой концентрации в основном присутствовал в мышцах.

Таким образом, в органах серого кита чукотско-калифорнийской популяции из западной части Берингова моря обнаружены хлорорганические пестициды и токсичные элементы. Особенности биологии серых китов являются возрастные миграции, киты зимуют и размножаются в теплых лагунах Калифорнийского полуострова, где, питаясь бентосом, могут захватить токсичные вещества. На лето киты уходят нагуливаясь в северную часть Берингова моря и в Чукотское море, где отсутствуют локальные источники загрязнения подобными веществами. Возможной причиной аккумуляции ксенобиотиков и тяжелых металлов может также являться глобальный перенос токсикантов в атмосфере и с морскими течениями.

Список литературы

- Боярова М.Д., Трухин А.М., Лукьянова О.Н. Хлорорганические пестициды ГХЦГ и ДДТ в донных отложениях и биоте северо-западной части Японского моря // Экологические проблемы – взгляд в будущее. Сб. трудов VI науч.- практ. международ. конф. Ростов-на-Дону. ЮФУ. 2010. С. 59-61.
- Клисенко М.А., Мельцер Ф.Р., Новикова К.Ф., Демченко В.Ф., Кофанов В.И. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. М.: «Колос». 1983. 416 с.
- Krahn M.M., Hanson M.B., Baird R.W. et al. Effects of age, sex and reproductive status on persistent organic pollutant concentrations in “Southern Resident” killer whales // Mar. Pollut. Bull. 2009. №58. P. 1522-1529.

БИОХИМИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ НА ДЕЙСТВИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ СЛОЖНЫХ ТЕХНИЧЕСКИХ СМЕСЕЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ НЕФТЕДОБЫЧЕ, ДЛЯ РАКООБРАЗНЫХ

Т.Г. Акатьева

Тюменская государственная сельскохозяйственная академия
625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7, Россия, akatyevat@mail.ru

Добыча и транспорт углеводородного сырья и сопутствующее им нефтяное загрязнение остаются актуальной проблемой во всем мире. Известно (Мазур, 1990; Векилов, 1992; Осипов и др., 1998; Попов и др., 1999), что более 90% аварий нефтепроводов связано с коррозией труб. Если учесть, что на 1 т добытой нефти расходуется до 0,1 % ингибиторов, то получается внушительное количество этих веществ, которые в процессе аварий, сбросов, смывов с территорий попадают в поверхностные водные объекты.

Однако, влияние веществ, сопутствующих нефтедобыче, на состояние гидробионтов остается по-прежнему малоизученным. Как правило, используемые ингибиторы коррозии – это многокомпонентные смеси, в состав которых входят высокотоксичные вещества: аминокамиды, изопропанол, метанол, алкилпиридины, имидазолины, керосин и пр. Указанные компоненты в различных комбинациях оказывают на гидробионтов токсическое воздействие (Булгаков, 1997; Траоре, 2001; Котоу и др., 2001), выражающееся в снижении выживаемости, нарушении эмбрионального развития, физиологических функций, изменении морфометрических показателей беспозвоночных и рыб.

Целью нашей работы являлось изучение сравнительной токсичности ингибиторов, используемых в нефтяной промышленности ранее (около 20 лет) и в настоящее время по отношению к наиболее чувствительному тест - объекту – ветвистоусым рачкам *Daphnia magna* Straus.

В качестве токсикантов были использованы «старые» ингибиторы коррозии (образцы 1 и 2) и «нового поколения» (образцы 3 и 4), имеющие в своем составе, кроме прочих, азотсодержащие вещества:

№ 1 – смесь солей аминокамидов и имидазолинов с жирными кислотами таловых масел – 50 %, керосин – 50 %;

№ 2 – аминокамид жирной кислоты таловых масел и полиэтиленполиамин - 50 %, спирт - 50 %;

№ 3 – соли четвертичных аммониевых оснований, алкилимидазолины, алкилпиридины, метанол;

№ 4 – изопропанол, четвертичные соединения аммония, метанол.

В качестве контроля и приготовления растворов использовали отстоянную водопроводную воду.

Влияние веществ на выживаемость и репродуктивную функцию рачков изучали в острых (4 сут.) и хронических (30 сут.) опытах согласно Методическим указаниям (1998).

Результаты *острых опытов* свидетельствуют о снижении выживаемости рачков в растворах всех изученных смесей. Причем, ингибиторы «современные» обладали большей токсичностью, чем давно используемые. Так, если 100-ная гибель рачков в максимальной концентрации ингибитора 4 отмечалась на первые, в растворах ингибитора 3 – на третьи сутки опыта, то в вариантах опыта 1 и 2 к аналогичному сроку наблюдений погибали лишь отдельные особи (табл. 1).

Таблица 1. Выживаемость *Daphnia magna* ($X \pm m_x$) в растворах ингибиторов коррозии к 4 суткам опыта

Варианты опыта	Концентрации, мг/л				
	Контроль	0.01	0.1	1.0	10.0
1	5.0 ± 0.58	5.0 ± 0.58	5.0 ± 0.58	4.7 ± 0.21	$3.0 \pm 0.26^*$
2	5.0 ± 0.58	5.0 ± 0.58	5.0 ± 0.58	$4.3 \pm 0.07^*$	$1.5 \pm 1.49^*$
3	5.0 ± 0.58	$2.6 \pm 0.58^*$	$2.3 \pm 0.34^*$	$1.3 \pm 0.34^*$	$0.0 \pm 0.58^*$
4	5.0 ± 0.58	$1.3 \pm 0.34^*$	$1.0 \pm 1.00^*$	$0.3 \pm 0.33^{**}$	$0.0 \pm 0.35^{**}$

Примечание: здесь и в таблице 2 * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$

Как свидетельствуют данные таблицы, для образцов 1 и 2 остролетальные концентрации находились в диапазоне 1 – 10 мг/л, для образцов 3 и 4 – 0,01 – 0,1 мг/л.

Аналогичная закономерность сохранялась и при проведении *длительных экспериментов*.

Так, выживаемость дафний напрямую зависела от количества внесенного вещества. В вариантах опыта с веществами 1, 2 и 3 50 % – ная гибель рачков отмечалась к 10 суткам опыта в диапазоне концентраций от 0.1 (образец 3) до 1.0 (образец 1) мг/л. В растворах образца 4 подобный эффект наблюдался в концентрации 0.0001 мг/л. К окончанию срока наблюдений токсическое воздействие всех изученных веществ на дафний усилилось, что проявилось в дальнейшем снижении выживаемости рачков (табл. 2).

Таблица 2. Выживаемость *Daphnia magna* ($X \pm m_x$) в растворах ингибиторов коррозии к 30 суткам опыта

Варианты опыта	Концентрация, мг/л						
	Контроль	0.00001	0.0001	0.001	0.01	0.1	1.0
1	10.0 ± 0.0	-	-	-	5.0 ± 1.0	4.3±0.58**	2.7±0.58**
2	10.0 ± 0.0	-	-	-	9.4±1.16	8.0±1.00	3.4±0.6**
3	10.0 ± 0.0	-	-	4.3±1.16*	1.6±0.58**	0.3±1.0**0	0.0±0.0
4	10.0 ± 0.0	2.7±1.07**	2.0±1.0**	1.3±0.58**	0.0±0.00	-	-

Кроме этого, в вариантах опыта с образцами 1 и 2 изучалось воздействие веществ на выживаемость рачков в ряду поколений. Оказалось, что рачки третьего поколения обладали пониженной резистентностью по отношению к изученным токсикантам, чем материнские особи и рачки второго и третьего поколений. Так, если 100 % – ная гибель рачков исходной культуры отмечалась в концентрации 1.0 мг/л, то рачков третьего поколения – в 0.55 мг/л.

Скорее всего, такое действие всех изученных смесей обусловлено влиянием на дафний входящих в их состав высокотоксичных смесей, таких как керосин, метанол, имидазолины и пр. Известно, например, что нефтяные углеводороды, как липотропные яды, обладают кумулятивной способностью (Щекатурина, 1978), образуют более или менее прочные связи с биосубстратами – липидами, белками, нуклеиновыми кислотами (Миронов, 1985). К тому же, видимо, к этому сроку опыта в популяции у рачков наблюдается истощение регуляторных механизмов.

В тех растворах, где гибели дафний не наблюдалось или гибли менее устойчивые особи, отмечалось нарушение эмбрионального развития рачков: либо преждевременное, либо задержка появления молоди на 1-5 суток. Реальная плодовитость рачков в растворах всех изученных смесей отличалась от таковой в контроле, что проявлялось в снижении общего количества молоди в опытных вариантах по отношению к контролю. Наибольшие отклонения по этому показателю наблюдались в опытных растворах с 3 и 4 веществом, где количество молоди, появившейся за 30 суток опыта, составляло 16 – 23 % по отношению к контролю. В вариантах опыта 1 и 2 эти отличия (в сравнении с контролем) были значительно меньше – 36 – 72 %. Удельная плодовитость контрольных рачков также была выше, чем особей из опытных растворов, в 2.0 – 3.5 раза.

По окончании эксперимента всех дафний (в течение опыта молодь отсаживали в чистую воду) взвешивали, отдельно по каждой концентрации, для определения суммарной массы. При этом прослеживалась закономерность: чем выше содержание ингибитора в растворе, тем ниже суммарная масса рачков.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что ингибиторы коррозии оказывают выраженное токсическое действие на планктонных ракообразных, нарушая показатели как индивидуального развития, так и свойства популяции.

Из всех изученных смесей веществ наиболее токсичными для дафний оказались вещества «нового поколения».

Список литературы

- Булгаков Р.Г. Материалы к гигиенической регламентации в воде водоемов ингибитора коррозии ИКБ – 4 АФ / Р.Г. Булгаков // Эколого – гигиенические проблемы Уральского региона: Материалы докл. научно-практ. конф. – Уфа, 1997. – С. 172 – 175.
- Векилов Э.Х. Основные проблемы при решении природоохранных задач на нефтяных объектах России / Э.Х. Векилов // Защита от коррозии и охрана окружающей среды. – 1992. - № 5. – С. 10 – 14.
- Мазур И.И. Конструктивная надежность и экологическая безопасность трубопроводов /И.И. Мазур. – М.: Недра, 1990.

Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение / Под ред. О.Ф. Филенко, С.А. Соколовой. – М.: ВНИРО, 1998. – 145 с.

Миронов О.Г. Влияние нефти и нефтепродуктов на морские организмы и их сообщества / О.Г. Миронов. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – Т. 4. – 136 с.

Осипов М.Л. и др. Опыт защиты от коррозии нефтепромыслового оборудования в ОАО «Томскнефть» ВНК / М.Л. Осипов, В.А. Кольцов, А.Л. Бушковский // Вестник ВНК. – 1998. - № 1. – С. 96 – 99.

Попов А. На трех китах / А. Попов, А. Соловьянов, М. Фалеев // Нефть России. – 1999. - № 9. – с. 94-101.

Траоре В. Мутагенные соединения в тканях гидробионтов пресноводной (оз. Байкал) и морской (острова Хорное) экосистем / В. Траоре: Автореф. дис...канд. биол. наук. – М., 2001. – 22 с.

Щекатурина Т.Л. Углеводороды антропогенного происхождения в морских организмах / Т.Л. Щекатурина: автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Севастополь, 1978. – 24 с.

Cotou E., Castritsi – Catharios I, Moraitou – Apostolopoulou M. Surfactantbased oil dispersant toxicity to developing nauplii of Artemia: Effects on ATase enzymatic system / E. Cotou, I. Castritsi – Catharios, M. Moraitou – Apostolopoulou // Chemosphere. – 2001. – 42, № 8. – P. 959 – 964.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА РЫБ

Е. В. Барбухо

*Черниговский национальный педагогический университет им. Т. Г. Шевченко
г. Чернигов, Украина, lena-gun@mail.ru*

Проблема загрязнения водоемов пестицидами является сегодня одной из актуальных как в Украине так и за ее пределами. Значительные масштабы использования этих веществ для борьбы с вредителями, зарастанием водоемов увеличили их поступление в водные объекты. Известно, что воздействие стресс-факторов приводит к ослаблению общей резистентности рыб, при этом деятельность компенсаторных систем организма становится не эффективной, что приводит к разбалансированию работы взаимосвязанных органов и их систем. Это угрожает сохранению и воспроизводству рыбных запасов, а также здоровью людей.

Одними из наиболее эффективных препаратов комплексного действия, сглаживающих влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на организм рыб являются пробиотики, использование которых в практике медицины и ветеринарии получило широкую поддержку. Известно, что пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* характеризуются более разнообразной и выраженной антимикробной активностью, чем многие другие микроорганизмы и имеют многофакторное и разнообразное влияние на макроорганизм. Этот эффект, в первую очередь, связан с продукцией бактериями рода *Bacillus* антибиотических веществ. Наиболее продуктивным видом бацилл является *Bacillus subtilis*. Благодаря высокой и разнообразной ферментативной активности бактерии рода *Bacillus*, входящие в состав биопрепаратов-пробиотиков, могут играть существенную роль в стимуляции и обогащении пищеварительной системы хозяина необходимыми ферментами (Слабоспицкая, 1990; Смирнов, 1988) и обеспечивать интенсивную дезинтеграцию компонентов пищи и их активное всасывание через кишечную стенку в кровь. Положительную восстановительную роль играет способность бацилл продуцировать жизненно необходимые аминокислоты и физиологические субстраты, при этом активизируются специфические и неспецифические системы защиты макроорганизма (повышается резистентность). Нормализуется пищеварение, повышается иммунный статус и устойчивость организма к стрессовым факторам.

Такими свойствами в полной мере обладает пробиотический препарат БПС-44 (ТУ У 24.4-00497360-691-2003), произведенный Институтом сельскохозяйственной микробиологии УААН (г. Чернигов). Входящие в состав БПС-44 аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* 44-р попадают в желудочно-кишечный тракт, образуя в нем быстрорастущие колонии, которые интенсивно подавляют и вытесняют патогенные и условно патогенные микроорганизмы.

Изучали возможность использования пробиотика БПС-44 с целью компенсации токсического влияния гербицида раундап для повышения жизнеспособности икры карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) на ранних стадиях онтогенеза.

Экспериментальная работа проводилась на базе Черниговского национального педагогического университета в лаборатории экологической биохимии водных организмов. В качестве объекта исследований использовали икру *Cyprinus carpio* (предоставленную ОАО «Черниговрыбхоз»), которую размещали в 1-литровых аквариумах с отстоянной водопроводной водой. Плотность посадки икры в аквариумах составляла 100 штук. Температура воды колебалась в пределах 18–21.5 °С, содержание кислорода находилось на уровне 7.0–8.2 мг/дм³. В эксперименте использовали водорастворимый гербицид раундап (1.2 г в 100 г воды при 25 °С, плохо растворим в большинстве органических растворителей) — глифосат (N-фосфометилглицин), коэффициент липофильности которого равен: Log P = -2.36±0.64, что указывает на высокую скорость его проникновения в организм. В опытах икру карпа использовали в трех вариантах: 1) контроль; 2) действие 0.05 ПДК (предельно допустимая концентрация) (0.001 мг/дм³), 0.5 ПДК (0.01 мг/дм³), 1 ПДК (0.02 мг/дм³), 2 ПДК (0.04 мг/дм³), 4 ПДК (0.08 мг/дм³), 40 ПДК (0.8 мг/дм³), 400 ПДК (8.0 мг/дм³), 4000 ПДК (80 мг/дм³) раундапа; 3) совместное действие раундапа (всех исследуемых концентраций) с пробиотиком БПС-44, который добавляли в воду (за сутки до внесения раундапа) в количестве 1.25×10^8 КОЕ (колоний образующих единиц) микробных клеток на 1 дм³ воды. Отход икры определяли путем прямого подсчета. Статистическую обработку полученных результатов выполняли при помощи стандартных компьютерных программ. Для подтверждения достоверности различий использовали критерий Стьюдента при уровне значимости $p < 0.05$.

Контроль за количеством мертвых эмбрионов карпа показал (рис. 1), что на этапе дробления бластодиска и образования морулы при концентрации раундапа 0.01 мг/дм³ количество мертвой икры составило 8.5 %, при концентрации 0.02 – 8.9 %, при концентрациях 0.04, 0.08, 0.8, 8.0 и 80 мг/дм³ – 11.3 %, 11.9 %, 14.8 %, 16.7 % и 19.4 % соответственно, тогда как в контроле этот показатель составлял 7.9 %. 100 %-ная гибель эмбрионов на стадии образования глазных бокалов отмечена при концентрации раундапа 80 мг/дм³, что сопоставляется с литературными данными о снижении устойчивости рыб, на ранних этапах эмбрионального развития, в опытах с другими токсикантами, в том числе и гербицидами (Грушко, 1991). Также, на данном этапе развития наблюдали снижение жизнеспособности икры при действии всех других концентраций гербицида, что возможно связано с более длительным временем ее пребывания в токсической среде. В течении 96-ти часового действия раундапа во всех исследуемых концентрациях количество личинок, что вылупились, значительно уменьшилось по сравнению с контрольной группой.

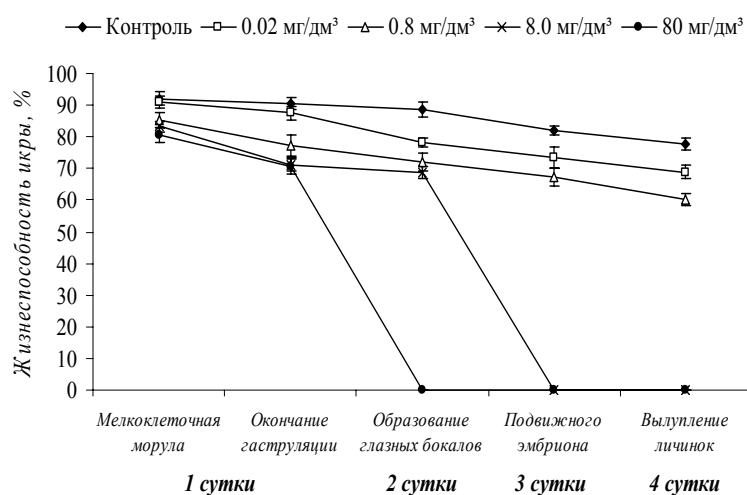


Рис. 1. Влияние раундапа на жизнеспособность икры карпа, % ($M \pm m$; $n = 8$).

Так, положительный эффект применения пробиотика БПС-44, с целью компенсации токсического действия гербицида раундап на ранних этапах развития карпа был явно выражен (Рис. 2). При действии препарата БПС-44 и раундапа в концентрациях 8.0 мг/дм³ и 80.0 мг/дм³ на икру карпа в период развития, а именно от оплодотворения до окончания гаструляции, выживание эмбрионов, в отличие от тех, что поддавались действию только гербицида увеличилось соответственно на 6.8 и 2.3 %, что возможно, объясняется повышением токсикорезистентности защитной внешней оболочки зародыша благодаря деятельности бактерий *Bacillus subtilis*, которая выполняет функцию барьера для проникновения токсических веществ (Скадовский, 1955).

Профилактическое действие исследуемого пробиотического препарата по отношению к глифосату четко проявлялось на стадии образования глазных бокалов, где смертность икры значительно уменьшилась. На стадии подвижного эмбриона отмечали увеличение выживаемости икры в воде с препаратом БПС-44 и концентрациями гербицида от 0.001–80.0 мг/дм³, по сравнению с вариантами опыта где использовали лишь раундап. Это свидетельствует о повышении устойчивости икры к гербицидному загрязнению, благодаря положительному действию бактерий *Bacillus subtilis*. На этапе вылупления личинок отход икры в группах с пробиотиком БПС-44 и концентрациями глифосата 0.001–80 мг/дм³ уменьшился в среднем на 10 %, относительно вариантов опыта где использовали только раундап.

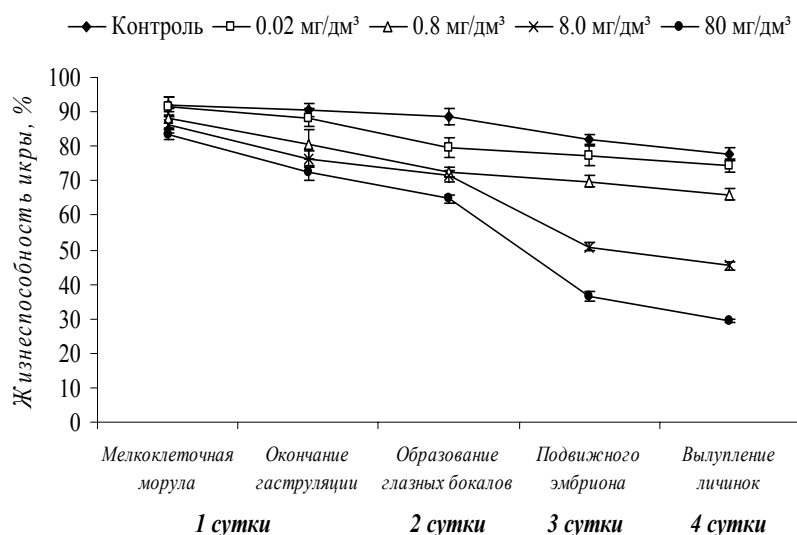


Рис. 2. Совместное действие пробиотического препарата БПС-44 и раундапа на жизнеспособность икры карпа, % ($M \pm m$; $n = 8$).

Таким образом, бактерии *Bacillus subtilis* пробиотического препарата БПС-44 оказывают положительное влияние на процесс эмбриогенеза и последующие этапы развития организма при действии на икру карпа раундапа в концентрациях 0.001–80 мг/дм³.

Полученные нами результаты позволяют говорить о возможности использования бактерий *Bacillus subtilis* для повышения адаптивных возможностей и выживаемости рыб в условиях гербицидного загрязнения водоемов.

Список литературы

- Грушко Я. М. Аккумуляция токсических веществ тканями гидробионтов в водоемах после спуска сточных вод / Грушко Я. М., Кожова О. М., Мамонтова Л. М. // Гидробиологический журнал. — 1991. — **27**, № 4. — С. 80—82.
- Скадовский С. Н. Экологическая физиология водных организмов. — М.: Советская наука, 1955. — 338 с.
- Слабоспицкая А.Т. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состав биопрепаратов / Слабоспицкая А. Т., Крымовская С. С., Резник С. Р. // Микробиологический журнал. — 1990. — **52**, № 2. — С. 9–14.
- Смирнов В. В. Липолитическая активность спорообразующих бактерий, выделенных из различных источников / Смирнов В. В., Слабоспицкая А. Т., Крымовская С. С., Резник С. Р. // Микробиологический журнал — 1988. — **50**, № 2. — С. 6–12.

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ РЫБ

П.А. Гдовский, Н.Н. Ружинская

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
п. Борок, Ярославская обл., Россия, gdov@ibiw.yaroslavl.ru

Ранее нами был разработан способ определения функционального развития обонятельной системы у рыб по активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Суть этого метода состоит в том, что у них с развитием этой сенсорной системы усиливается функциональная роль периферического звена и первого центрального отдела по сравнению с центрами более высокого порядка, о чем

можно судить по соотношению активности АХЭ в первичных и вторичных центрах. Оказалось, что у рыб с хорошо развитым обонянием (макросматы) суммарная активность АХЭ в обонятельной выстилке и луковиче превосходит активность фермента в переднем мозге в 1,2 – 2 раза, а видов – макросматов, напротив, в несколько раз ниже, чем в переднем мозге (1).

Учитывая выше изложенное, а также то-обстоятельство, что обонятельные нейроны являются единственные клеточные элементами во всей нервной системе, которые непосредственно контактируют с водной средой, мы предприняли попытку определить функциональное состояние обонятельной системы у рыб, подверженных действию токсических веществ, по активности АХЭ в обонятельной выстилке, луковиче и переднем мозгу у карпа. В работе использовались вещества различной химической природы: фосдрин – фосфорорганический пестицид, антихолинэстеразным действием; тритон X-100 (TX-100), нарушающий целостность клеточной мембраны; ионы меди, которые относятся к группе тяжелых металлов и характеризуются политропным эффектом, т.е. взаимодействуют со многими группами белков. Несмотря на различные механизмы действия, эти вещества подавляют обонятельную чувствительность у рыб, показателем которой в наших экспериментах служили электрические реакции в обонятельной выстилке табл. 1.

Таблица 1. Влияние фосдрина, детергента и ионов меди на обонятельную чувствительность карпа.

Токсическое вещество, Мг/л	Электроольфактограмма (ЭОГ) в мВ	
	ЭОГ на 10^{-4} М серина	ЭОГ в процентах от контроля
Чистая вода (контроль)	4,3±0,30	100
Фосдрин (10)	2,2±0,25*	51
TX 100 (100)	3,0±0,26*	67
Cu ²⁺ (0,12)	2,1±0,26*	49

* - достоверно отличается от контроля при $p \leq 0,05$

АХЭ определяли после 5 суточного пребывания рыб в сублетальных концентрациях токсиканта. В каждом опыте использовалось по 5 особей. Результаты представлены табл. 2. Как исследовало ожидать, только фосфорорганический пестицид фосдрин, обладающий антихолинэстеразным действием, снижает активность фермента во всех трех отделах обонятельной системы равномерно. Детергент TX-100 и ионы меди снижают АХЭ только в периферическом и первом центральном отделах, нарушая нормальное соотношение активности фермента в выстилке, луковиче и переднем мозге. Причем медь вызывает более сильный эффект. Таки образом, оказалось возможным отдифференцировать истинно анихолинэстеразные вещества от токсикантов, ингибирующий эффект которых является лишь следствием (2).

Таблица 2. Влияние токсических веществ на удельную активность АХЭ в различных отделах обонятельной системы карася.

Токсическое вещество, мг/л	Удельная активность АХЭ в мкМ/г ткани x час		
	Обонятельная выстилка	Обонятельная луковича	Передний мозг
Чистая вода	75±6	714±65	476±43
Фосдрин (10)	23±2*	179±20*	122±10*
TX-100 (100)	26±3*	504±49*	455±43
Cu ²⁺ (0,12)	13±2*	252±23*	406±40

* - достоверно отличается от контроля при $p \leq 0,05$

Итак, полученные результаты показывают, что АХЭ обонятельной системы рыб очень чувствительна к воздействию загрязняющих веществ. Более того этот способ позволяет отдифференцировать действие ФОС от других токсикантов.

Исходя из этого мы определяли уровень токсического загрязнения водной среды в придонных слоях Шексинского плеса Рыбинского водохранилища в районе г. Череповца, используя в качестве биотеста состояние обонятельной системы типичного обитателя придонной фауны – налима. Для контрольных исследований использовали налимов, отловленных в верхней части Шексинского водохранилища. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что у налимов, выловленных в районе Череповца, активность АХЭ обонятельной выстилки примерно в 3,5 раза ниже нормы.

Таблица 3. Удельная активность АХЭ в обонятельной системе налима из водоемов с различной степенью промышленного загрязнения.

Водоем	Удельная активность АХЭ в мкМ/г ткани x час		
	Обонятельная выстилка	Обонятельная луковица	Передний мозг
Шекснинское водохранилище (контроль)	1127±130	133±12	335±35
Рыбинское водохранилище (р-н т. Череповец)	328±27*	105±12	254±24

* Достоверно отличается от контроля при $p \leq 0,05$

Соотношение ферментативной активности в выстилке, луковице и переднем мозгу у контрольных рыб составило 8,5:1:2,5, а у Череповецких – 3:1:2,5 (за единицу принята активность АХЭ в луковице). Эти данные позволяют считать, что обонятельная функция налимов, выловленных р-не Череповца нарушена токсическими веществами, не обладающими антихолинэстеразным действием.

Список литературы.

Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. Вопр. Ихтиологии. Оценка функционального развития обонятельной и зрительной систем рыб по активности ацетилхолинэстеразы // 1990. Т. 30. № С. 305-314.
Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. Ацетилхолинэстераза – биомаркер функционального состояния обонятельной системы рыб // Успехи соврм. Биол. 2007. Т. 127. № 4. С. 396-404.

ОБОНЯНИЕ КАК СЕНСОРНАЯ ОСНОВА ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ РАКООБРАЗНЫХ НА ЗАГРЯЗНЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Н.К. Блинова¹, С.А. Черкашин²

¹Восточноукраинский национальный университет им. В. Даля
93400, г. Северодонецк, Луганская обл., Советский просп. 59а, Украина, blin@sti.lg.ua

²Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4, Россия, cherkashin@tinro.ru

Выживаемость организмов в водной среде обеспечивается при участии комплекса сложных поведенческих реакций, которые формировались в ходе длительной эволюции на основании информации от сенсорных систем. В условиях усиливающегося загрязнения природных вод особое значение приобретает необходимость понимания сущности и причин изменения химической коммуникации животных, возможности оценивать химическое окружение и приспосабливаться к существованию в нем.

На основании собственных и литературных данных проведен анализ влияния загрязняющих веществ на поведение ракообразных, в основе которого лежит обонятельная чувствительность.

Морфологическая и функциональная идентификация органов химического восприятия у ракообразных затруднена в связи с большим многообразием и сложностью распределения хеморецепторов на теле. Однако особенности строения рецепторного аппарата, мозговых центров и поведенческая значимость ответных реакций на химические стимулы позволяют внести определенность относительно сенсорной функции рецепторных образований. Среди систем восприятия химических стимулов у ракообразных можно выделить обонятельную, вкусовую, общее химическое чувство и хеморецепторный отдел висцеральной сенсорной системы. Сигнальное информативное значение имеет система дистантной хеморецепции (обонятельная система). Обонятельная система ракообразных характеризуется упорядоченным строением периферической части с локальным расположением сенсорных щетинок эстетасков на наружном жгуте антеннул; иннервацией эстетасков огромным количеством (до сотни тысяч) биполярных хеморецепторных нейронов; центральным представительство в наиболее крупных и интенсивно развитых нейропилах дейтоцеребрума – парных обонятельных долях. Данный вид чувствительности у ракообразных обеспечивает восприятие и обработку мощного потока информации о химическом окружении животного и определяет многие жизненно важные формы поведения.

Восприятие химических сигналов в водной среде, последующая передача, обработка этой информации в центральной нервной системе, а также формирование ответных физиологических (вегетативных, двигательных) и поведенческих реакций представляют собой цепочку, каждое звено которой подвержено воздействию загрязняющих веществ. Действие даже малых доз загрязняющих веществ может привести к необратимым процессам, выражающимся в нарушении или потере химической чувствительности. Виды нарушений обонятельной функции классифицируются следующим образом 1) anosmia (anosmia) - отсутствие обоняния; 2) hyposmia (hyposmia) – пониженная способность к восприятию одорантов; 3) dysosmia (dysosmia) – ложная обработка обонятельной информации. Наиболее чувствительным и в то же уязвимым звеном хемосенсорной системы является ее периферический отдел, который непосредственно контактирует с химическим окружением. Пороги ответных реакций хеморецепторов существенно ниже, чем пороги конечного результата их стимуляции – поведения. Тем не менее, поведенческие ответы относительно просто регистрируются, интерпретируются и значимы для выживания организмов и популяций.

В поведении ракообразных имеется достаточно широкий спектр реакций на загрязняющие вещества, среди которых наиболее изучены обнаружение, адаптивные защитные реакции, нарушение форм поведения на природные стимулы. Характер ответной поведенческой реакции на поллютанты зависит от происхождения, химической структуры вещества, механизма и продолжительности воздействия, концентрации, пространственно-временной динамики, индивидуальных особенностей и образа жизни животного, а также наличия целого ряда сопутствующих экологических факторов. Ниже приведена краткая характеристика поведенческих ответов ракообразных на загрязняющие вещества в диапазоне сублетальных концентраций, базирующихся на дистантной хеморецепции.

Ориентационно-исследовательское поведение, включающее обнаружение, идентификацию и дискриминацию запаховых веществ. Данный тип реакций обеспечивает ориентацию животных в химическом окружении и создает основу для более сложных программ поведения. Различение химического стимула, оценка качества происходит уже на этапе обонятельной трансдукции, включающей перирецепторные процессы, участие вторичных мессенджеров, активацию ионных каналов. Описаны два пути обонятельной трансдукции в наружном дендрите обонятельных сенсорных нейронов омаров *Panulirus argus* и *Homarus americanus* с участием аденилатциклазного и инозитольного механизмов (McClintock et al., 2006). Смесь одорантов может одновременно активировать оба пути. В идентификации качественных и количественных характеристик воздействующего стимула имеют значение процессы кодирования информации. Заслуживает внимания теория о наличии независимого кодирования характера и интенсивности химического раздражителя (Derby et al., 2001). Независимое кодирование, продемонстрированное для *P. argus*, позволяет обеспечить возможность животным определять сигнальное значение запаха, несмотря на существенные колебания его концентраций в природной среде. Поведенческая дискриминация на стадии обнаружения различных химических веществ практически не выражена, но она становится явной на стадии принятия решения. Концентрация химического раздражителя может определяться длительностью и интенсивностью ответных поведенческих реакций. Однако не всегда данная зависимость имеет место и является прямо пропорциональной. В диапазоне обнаруживаемых, но не оказывающих негативного воздействия на хеморецепцию концентраций, следует ожидать сенсорные ответы на загрязняющие вещества как на одоранты.

Ракообразные способны обнаруживать целый ряд загрязняющих веществ, среди которых нефтяные углеводороды, фенолы, растворимые формы металлов и другие соединения, влияющие непосредственно на химические рецепторы или оказывающие общее раздражающее воздействие. Первым поведенческим актом на химическую стимуляцию у ракообразных является обнаружение, которое сопровождается взмахами и биением антеннул. Голубой краб *Callinectes sapidus*, судя по увеличению скорости колебаний антеннул и активности максиллопод, способен выявлять нафталин в концентрации 10-7 мг/л (Pearson, Olla, 1980). Вероятно, этот краб будет более легко обнаруживать нефть, чем отдельные углеводороды, так как она является комплексом различных соединений, а нафталин стимулирует лишь малое количество хеморецепторов и поэтому имеет больший порог обнаружения. Несмотря на то, что обнаружение запахов различной биологической значимости управляется соответствующими мотивациями, средние уровни обнаруживаемых ракообразными концентраций отдельных загрязняющих и природных запаховых веществ, близки (около 10-7 мг/л). Тестирование пищевых раздражителей показало наличие более привлекающих свойств у комплексных естественных стимулов, имеющих пороги обнаружения на несколько

порядков ниже (Блинова, 2009). Такой эффект можно объяснить тем, что отдельные хемосенсорные нейроны антеннул обладают узкой специфичностью, возбуждаются одними веществами, подавляются другими и совместно формируют паттерн ответа на комплексные раздражители (Derby et al., 2001).

Груминг – это очистка эстетасков от остатков пищи, взвешенных частиц, загрязнений, их механическое «расчесывание». У десятиногих ракообразных груминг антеннул осуществляется их протаскиванием через ротовые придатки. Помимо очистки, во время груминга происходит равномерное распределение секрета эстетасковых тегументальных желез, необходимого для полноценного функционирования эстетасков. Традиционно груминг относят к категории комфортного либо гигиенического поведения. Максимальная частота груминга обычно наблюдается после принятия пищи. Однако есть сведения, что груминг активируется также при стрессе. Стрессоры любой природы, включая воздействие поллютантов, приводят к активации груминга. Данная форма поведения на сегодняшний день является менее изученной, но весьма перспективной в эколого-токсикологических исследованиях. Помимо неспецифической стрессорной активации груминг, возможно, усиливается воздействием загрязняющих веществ, которые способны сорбироваться на поверхности антеннул и сенсорных щетинок (тяжелые металлы, нефтепродукты, поверхностно-активные вещества). При исследовании поведенческих реакций на кратковременное предъявление нафталина в концентрации 4 мг/л у незначительного количества особей *C. sapidus* (12,5% по сравнению с контролем 8,3%) повышалась частота груминга (Pearson, Olla, 1980).

Двигательные реакции и локомоции необходимы для выполнения практически любых приспособительных функций. Химические вещества выступают в роли стимулов, влияющих на регуляцию мышечного тонуса. Начиная с концентрации нафталина 2 мг/л, краб *C. sapidus* начинал демонстрировать локомоторную активность и оборонительные реакции (Pearson, Olla, 1980). Качество воды отражается на многих характеристиках двигательной активности и учет только одной из них не дает адекватного представления о токсичности. Двигательная активность видоспецифична, но обычно оказывается более чувствительным показателем, чем смертность (Лукьяненко и др., 1987; Флеров, 1989). Однако с увеличением продолжительности контакта животных с сублетальными концентрациями многих токсикантов активность возвращается к первоначальному уровню. Локомоции представляют собой интегральную характеристику поведения, и их оценка может основываться на различных показателях, не дающих однозначного представление об уровне активности в целом. Локомоторная активность, как правило, изменяется периодически в зависимости от суточных и других ритмов. Поэтому следует с осторожностью сопоставлять данные по влиянию токсикантов, полученных разными исследователями в разное время суток или года.

Особое место среди адаптивных поведенческих ответов ракообразных, осуществляющихся благодаря хеморецепции, занимают защитные реакции, которые можно разделить на активные (избегание, агрессия) и пассивные (зарывание, затаивание, некоторые формы обороны). Концентрации загрязняющих веществ, вызывающие защитные реакции рассматривают как токсичные. Важнейшая адаптивная реакция на поллютанты – реакция избегания, начальное звено которой связано с хеморецепторами антеннул, так как лишённые антеннул рачки перестают уходить от токсикантов. Выполненные в ТИНРО-центре исследования избегания у мизид *Neomysis mirabilis* и креветок *Pandalus kessleri* тяжелых металлов (медь, цинк), дизельного топлива, фенола показали, что реакция достигала своих максимальных значений обычно на 7–10 мин подачи испытуемых растворов. Эффективность избегания, как правило, возрастает с увеличением концентрации токсикантов, однако с повышением содержания фенола до 5-10 мг/л реакция избегания у мизид и молоди креветок подавляется, вероятно, из-за нарушения хеморецепции. Десятиминутное пребывание мизид в растворе фенола 10 мг/л приводит к потере ими способности избегать другие токсиканты (50 мг/л цинка). С наибольшей вероятностью избегание вызывается веществами, которые животные способны обнаруживать. Тем не менее, большинство загрязняющих веществ в сублетальных концентрациях вызывают реакцию избегания у ракообразных. Как правило, реакция избегания не является специфичной и может проявляться стереотипно на различные виды опасных повреждающих факторов. По физиологической сущности, это первая фаза стресса, реакция «борьба-бегство». Избегание крупными подвижными животными поллютантов смягчает их неблагоприятное воздействие, но зачастую нарушается даже при низких, но токсичных концентрациях многих загрязняющих веществ из-за их наркотических, нервнопаралитических или иных свойств (Черкашин, 2005). При нарушении обонятельной

функции и/или невозможности ухода от стрессора возможно появление выраженных патологических изменений в организме. Реакция избегания имеет адаптивный характер, однако ее формирование приводит к изменению обычного образа жизни, смене мест обитания, что негативно сказывается на существовании популяции.

В присутствии поллютантов могут изменяться поведенческие реакции ракообразных на природные стимулы. Потеря способности ориентироваться в окружающей среде, обнаруживать пищу, отказ от питания, снижение ответов на феромоны – признаки, являющиеся основанием для предположения, что произошли нарушения в системе восприятия химических стимулов. Как правило, нарушения обонятельной чувствительности под воздействием токсических веществ приводят к соответствующим обратимым, либо необратимым изменениям поведенческих функций – торможению, увеличению длительности и снижению интенсивности ответа, полному его блокированию, парадоксальному эффекту. Наиболее изученными, в том числе в эколого-токсикологическом аспекте, являются формы поведения, обеспечивающие гомеостаз (пищевое) и воспроизводство вида (репродуктивное). Обонятельные рецепторы участвуют в обеспечении начальных фаз этих форм поведения – в активном поиске пищи и полового партнера. Длительность поиска пищи омаром *Nephrops norvegicus* увеличилась более чем в два раза по сравнению с контролем после 12-суточной экспозиции в растворах марганца 0.1 и 0.2 mM (Kreng, Rosenqvist, 2006). Способность самцов амфипод *Corophium volutator* обнаруживать феромоны самок существенно снижается при воздействии сублетальных концентраций нафталина в течении 3-х дней (Kreng, 2007).

Следует отметить, что в восприятии дистантных запаховых стимулов, принимают участие не только эстетаски, но и другие сенсорные щетинки, расположенные на антеннулах, теле животного, включающие механорецепторы. Механорецепторы антеннул важны при ориентации в токе воды. Когда суммарный вклад от активации рецепторов является достаточным для достижения порога в центральной нервной системе, возникает ответная поведенческая реакция.

Поведенческая реализация ответов обонятельных рецепторов ракообразных на загрязняющие вещества имеет значение, прежде всего в диапазоне концентраций, которые еще не приводят к выраженным структурным или функциональным нарушениям в организме. Выявление неспецифических и видоспецифичных реакций ракообразных, инициируемых обонянием, как поведенческих маркеров оценки минимальных токсичных концентраций поллютантов является перспективным направлением экологических и токсикологических исследований.

Список литературы

- Блинова Н.К. Чувствительность обонятельных рецепторов травяной креветки к пищевым аттрактантам // Морский екол. журн. 2009. Т. 8, №4. С. 53–58.
- Лукияненко В.И., Черкашин С.А., Кандинский П.А. Поведение молоди рыб и мизид в растворах токсикантов органического происхождения // Гидробиол. журн. 1987. Т. XXIII, №4. С. 64–69.
- Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л., 1989.
- Черкашин С.А. Отдельные аспекты влияния углеводородов нефти на рыб и ракообразных // Вестник ДВО РАН. 2005. № 3. С. 83–91.
- Derby C.D., Steullet P., Horner A.J., Cate H.S. The sensory basis of feeding behaviour in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus* // Mar. Freshwater Res. 2001. Vol. 52. 1339–1350.
- Kreng A-S. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) // Aquatic Toxicology. Vol. 85, № 1. 2007. P. 9–18.
- Kreng A-S., Rosenqvist G. Effects of manganese on chemically induced food search behaviour of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) // Aquatic Toxicology. 2006. Vol. 78, №3. P.284–291.
- McClintock T. S., Ache, B. W., Derby, C. D. Lobster olfactory genomics // Integrative and Comparative Biology. 2006. Vol. 46. P. 940–947.
- Pearson W.H., Olla B.L. Threshold for detection of naphthalene and other behavioural responses by Blue crab, *Callinectes sapidus* // Estuaries. 1980. Vol. 3, № 3. P. 224–229.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТОКСИКАНТЫ, КАК СРЕДСТВО СТИМУЛЯЦИИ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ

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

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
119991 Россия, Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12, Россия, ofilenko@mail.ru

Введение. Явление стимуляции различных функций организма химическими воздействиями (гормезис) давно известно и применяется на практике. В частности, на эффекте гормезиса основана концепция гомеопатического лечения.

Токсический эффект на каждом уровне биологической организации является результатом взаимодействия двух процессов: пассивной составляющей развития поражения и активного ответа системы. Результирующий эффект в каждый конкретный момент может соответствовать разности между уровнями дестабилизирующего воздействия и ответа системы. Общее состояние системы и уровень эффекта определяются преобладанием либо деструктивных процессов, либо компенсаторных реакций. При воздействии токсиканта в малой концентрации первичные деструктивные изменения со временем могут быть не только полностью скомпенсированы, но функция может переходить в состояние повышенной активности, то есть стимулироваться (Филенко, 2001). Предполагается, что при определенных параметрах токсического воздействия, фаза, на которой ответ превышает поражение, может продлиться до конца жизни объекта.

Явление стимуляции неоднократно отмечалось в исследованиях на водных организмах при действии токсикантов и других фактов окружающей среды. Например, у рачков *Ceriodaphnia dubia* наблюдалась стимуляция размножения при воздействии 0.1 – 0.4 мг/л меди (Гама-Флорес и др., 2007), низких концентраций углеводов (Лафлин, Гуард 1981), а также серебра (Кольц и др., 2009). Выявлено стимулирующее действие на репродуктивные характеристики и продолжительность жизни *Chironomus tentans* и *Hyalella azteca* взрывчатых веществ (Стивенс и др., 2002).

Гормезис может наблюдаться при действии практически любых потенциально токсичных веществ. Правильный подбор концентраций химических агентов позволит не только продлевать жизнь гидробионтов, но и увеличивать их суммарную плодовитость за счет продления репродуктивного периода.

Материалы и методы. В опытах мы использовали рачков *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg из лабораторной культуры. Этот стандартный тест-объект обладает коротким циклом развития и удобен для работы в лаборатории. Все эксперименты проводились в соответствии со стандартными методиками (Жмур, 2007).

Для выращивания лабораторной культуры и постановки опытов использовали отстоянную водопроводную «биологизированную» воду. Для этого водопроводную воду последовательно отстаивали и дехлорировали в двух аквариумах в течение двух недель с использованием микрокомпрессоров для принудительной аэрации атмосферным воздухом, а затем добавляли в аквариум с песчаным грунтом, населенный ихтиофауной и высшей водной растительностью. Как показывает наш опыт, такая вода особенно благоприятна для содержания рачков. В качестве корма использовали суспензию зеленых протококковых водорослей (*Chlorella sp.*), выращенных при постоянном освещении интенсивностью 17 мкЭ и принудительной аэрации атмосферным воздухом на среде Тамия. Водоросли добавляли в культуру цериодафний из расчета 0.5 мл суспензии (250-600 млн. кл/мл) на 1 л воды. Один раз в неделю культуры подкармливали суспензией пекарских дрожжей. Исходную культуру *C. affinis* выращивали в люминостате при освещении интенсивностью 11 мкЭ и длине светового дня 12 ч. Культуру пересевали не реже трех раз в неделю.

Эксперименты на цериодафниях проводили в люминостате при тех же условиях. Температурный режим в лаборатории во время проведения опытов колебался в пределах 21-24 °С.

В опыты отбирали молодь рачков в возрасте не старше 24 часов. Чувствительность цериодафний (ЛК₅₀ за 24 часа) к стандартному токсиканту бихромату калия на момент постановки опытов составляла от 1.2 мг/л до 2.1 мг/л, что соответствует требованиям стандартных методик. Эксперименты с *C. affinis* проводили в стеклянных стаканах объемом 100 мл. В опыт отбиралось от 20 до 100 рачков, равномерно распределенных на 10 повторностей. Объем воды в стакане был рассчитан таким образом, чтобы на 1 рачка приходилось 10 мл среды. Смену среды в сосудах

проводили три раза в неделю, через день. Одновременно удаляли родившуюся молодежь и учитывали смертность взрослых животных. Во время смены растворов стенки лабораторной посуды очищали от остатков корма и сорбированных метаболитов. Подкормку рачков суспензией водорослей также осуществляли через день в момент смены среды, концентрация корма в опытных сосудах составляла приблизительно 250-350 тыс. кл/мл. Эксперименты продолжались до момента гибели всех рачков, таким образом, учитывалась полная продолжительность жизни цериодафний.

Исследовали действие на рачков бихромата калия, этилового спирта и соединения с антиоксидантными свойствами SkQ1.

Бихромат калия $K_2Cr_2O_7$ служит токсикантом сравнения и существует обширная база данных по оценкам действия этого соединения на водные организмы в острых и хронических опытах. Эколого – рыбохозяйственная ПДК шестивалентного хрома составляет 0.02 мг/л. Было исследовано действие на продолжительность жизни рачков концентраций бихромата калия от 0.0001 до 0.1 мг Cr/л.

Этиловый спирт C_2H_5OH – вещество, действие которого на водные организмы также исследовано, эколого – рыбохозяйственная ПДК для этанола составляет 0.01 мг/л. В наших опытах было исследовано влияние на продолжительность жизни рачков концентраций этанола 0.02 мг/л и 0.002 мг/л.

Антиоксидант SkQ1 (10-(2',3'-диметилхинонил-6')-децилтрифенилфосфоний: бромид) был синтезирован в Институте физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского. Ранее эффекты этого препарата на водные организмы не исследовались.

При исследовании влияния SkQ1 на продолжительность жизни *C. affinis* использовали водный раствор с различной исходной концентрацией вещества. Испытано действие на продолжительность жизни концентраций SkQ1 0.00003, 0.0003 и 0.003 мг/л.

При обработке результатов опытов учитывали максимальную и среднюю продолжительности жизни, сроки фиксированных величин гибели (LT_{25} , LT_{50} , LT_{75}). Результаты статистически обрабатывали с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Средние значения продолжительности жизни оценивали с учетом доверительного интервала. Для оценки достоверности различий опытных и контрольных данных был использован критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние низких концентрация бихромата калия на продолжительность жизни рачков *Ceriodaphnia affinis*. На первом этапе были выбраны концентрации бихромата 0.01, 0.03 и 0.1 мг Cr/л; в следующей серии экспериментов, исследуемые концентрации были снижены до 0.0001 и 0.001 мг Cr/л.

Наибольшие из испытанных концентраций бихромата калия снижают величины максимальной продолжительности жизни особей с 50 суток в контроле до 25-35 суток в концентрациях 0.03 и 0.1 мг Cr/л. В концентрациях бихромата калия 0.001, 0.01, 0.03 и 0.1 мг Cr/л сроки средней продолжительности жизни снижены по сравнению с контролем. В концентрации 0.0001 мг Cr/л наблюдается увеличение средней продолжительности жизни (108% от контроля). Таким образом, выявляется слабая тенденция к увеличению средней продолжительности жизни под действием низких концентраций бихромата калия. Можно предположить наличие подобной тенденции в диапазоне сверхмалых концентраций других неорганических токсикантов, а также существование диапазона концентраций, вызывающих большую стимуляцию наблюдаемых параметров.

Для установления эффекта низких концентраций веществ органической природы было исследовано влияние на продолжительность жизни рачков этилового спирта (C_2H_5OH). Были выбраны концентрации 0.02 и 0.002 мг/л. Опыты с одними и теми же концентрациями были повторены дважды.

Этиловый спирт в исследованных концентрациях достоверно увеличивал среднюю продолжительность жизни *C. affinis* в различных сериях опытов на 22.4-38% по сравнению с контрольной. Также отмечено увеличение сроков наступления фиксированных величин гибели в наблюдаемой выборке при воздействии этилового спирта в низких концентрациях.

Спирт в исследованных концентрациях вызывал увеличение средней суммарной плодовитости на одну самку на 6-14% по сравнению с контролем.

Основываясь на результатах этой серии опытов, можно говорить о достоверном стимулирующем эффекте в диапазоне малых концентраций этилового спирта. Можно предположить наличие подобной тенденции в диапазоне малых концентраций и других органических токсикантов, а также существование диапазона концентраций этанола, способных вызвать еще большую стимуляцию наблюдаемых параметров.

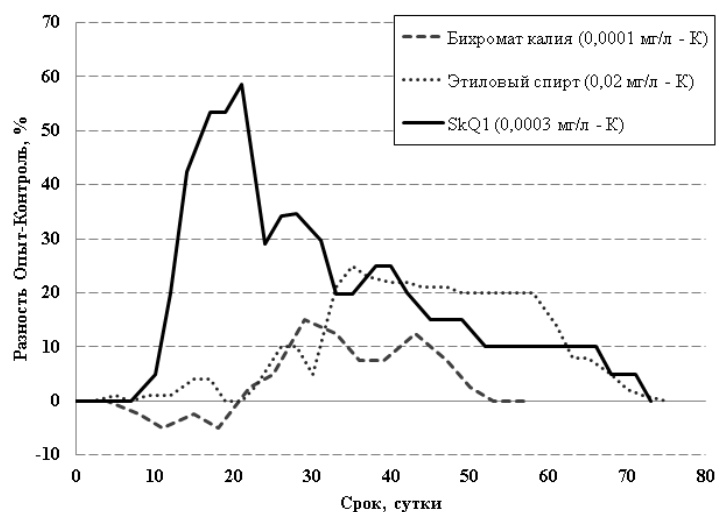


Рис. Влияние низких концентраций потенциальных токсикантов на выживаемость *C.affinis*. Показана разность числа живых рачков в опыте и в контроле в различные сроки испытания.

При действии антиоксиданта SkQ1 в концентрациях 0.00003 и 0.0003 мг/л максимальная продолжительность жизни составляла 71 сут., а при концентрации 0.003 мг/л - 66 сут. В контроле она составила 38 сут.

Средняя продолжительность жизни увеличивалась по сравнению с контролем на 60 – 90%. Наибольший эффект увеличения средней продолжительности жизни, достигавший 190% по сравнению с контролем, имел место при концентрации SkQ1 0.00003 мг/л. Отмечено так же значительное продление сроков наступления фиксированных величин гибели под влиянием SkQ1 во всех концентрациях. В частности, LT_{50} для рачков, подверженных воздействию SkQ1 в концентрации 0.00003 мг/л, увеличивается по сравнению с контролем в два раза.

Влияние антиоксиданта на репродуктивную функцию рачков в концентрациях 0.0003 и 0.003 мг/л выражалось в статистически достоверном увеличении плодовитости. Средняя накопительная плодовитость за весь период жизни одной самки при воздействии исследованных концентраций составляла 193-240% от таковой в контроле (табл.).

Таблица. Суммарная плодовитость на 1 самку за весь срок наблюдения

Концентрация SkQ1	Средняя плодовитость на 1 самку	% от Контроля	t_d
0 (Контроль)	18,8±6,6		
0,00003 мг/л	39,3±12,0	209,6	2,94
0,0003 мг/л	45,1±14,6	240,3	3,22
0,003 мг/л	36,2±8,1	193,1	3,27

Таким образом, антиоксидант SkQ1 во всех исследованных концентрациях не только достоверно увеличивал среднюю и максимальную продолжительности жизни рачков, отодвигает сроки наступления фиксированных величин гибели, но и продляет репродуктивный период, сохраняя способность животных к размножению до конца жизни.

Закключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что даже известные токсичные вещества в некотором диапазоне концентраций могут не угнетать, а стимулировать жизненные функции гидробионтов. Это объясняет, почему вещества, известные, как токсичные, часто называют потенциальными токсикантами. Возможность такого эффекта усложняет прогноз последствий загрязнения водной среды, которое обычно и происходит в относительно низких концентрациях, эффект которых не предсказуем. Экологические последствия стимулирующего эффекта потенциальных токсикантов еще предстоит исследовать.

Вместе с тем, возможность стимуляции при действии малых концентрации приносит новые возможности для регуляции хода биологических процессов с использованием химических средств не только за счет подавления вредоносных организмов, но и путем стимуляции полезной биоты.

Список литературы

- Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: АКВАРОС, 2007. – 56 с.
- Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение./Под ред. О. Ф. Филенко, С. А. Соколовой. - М.: ВНИРО, 1998. - 147 с.
- Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90. – М.: Госкомприрода СССР, 1991. – 48 с.
- Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М.: Медицина, 1960. – 256 с.
- Филенко О. Ф. Динамика эффекта загрязняющих веществ в экотоксикологии // Токсикологический вестник 2001, № 2, с. 2-6.
- Anisimov V. N., Bakeeva L. E., Egormin P. A., Filenko O. F., Isakova E. F., Manskikh V. N., Mikhelson V. M., Panteleeva A. A., Pasyukova E. G., Pilipenko D. I., Piskunova T. S., Popovich I. G., Roshchina N. V., Rybina O. Yu., Saprunova V. B., Samoylova T. A., Semenchenko A. V., Skulachev M. V., Spivak I. M., Tsybul'ko E. A., Tyndyk M. L., Vyssokikh M. Yu., Yurova M. N., Zabezhinsky M. A., Skulachev V. P. Mitochondria-Targeted Plastoquinone Derivatives as Tools to Interrupt Execution of the Aging Program. 5. SkQ1 Prolongs Lifespan and Prevents Development of Traits of Senescence // Biochemistry (Moscow), Volume 73 (2008), Issue 12
- Gama-Flores J.L., Castellanos-Paez M.E., Sarma S.S., Nandini S. Life table demography of *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) exposed to copper at different levels and periods // J Environ Biol. 2007 Jul; 28(3): 691- 698
- Kolts J.M., Boese C.J., and Meyer J.S. Effects of dietborne copper and silver on reproduction by *Ceriodaphnia dubia* // Environmental toxicology and chemistry 2009/ SETAC 28(1): 71-85
- Laughlin, R. B. Jr, J. Ng, H. E. Guard. Hormesis: a response to low environmental concentrations of petroleum hydrocarbons // Science 1981 (211): 705-707
- Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms// U.S. EPA – 2002: 1-275
- Murphy M.P., Smith R.A.J. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations // Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2007, Volume 47: 629-656
- Steevens J. A., Duke B. M., Lotufo G. R., Bridges T. S. Toxicity of the explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyaella azteca*: low-dose hormesis and high-dose mortality // Environmental Toxicology and Chemistry Volume 21, Issue 7 (July 2002) Article: pp. 1475–1482

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИЛЬТРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ *DAPHNIA MAGNA* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ТЕСТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОБУС

Е.Н. Гинатуллина¹, М. Камая²

¹Институт водных проблем АН РУз, 100045, г. Ташкент, ул. Олимлар 49, Узбекистан

²Технический университет Токио, Япония

В процессе данного исследования тестировалось гипотеза, что подавление фильтрационной способности *Daphnia magna* в результате острого токсического стресса можно измерить, используя флуоресцентные нано частицы. Для разработки очень быстрого 30 мин биотеста были использованы безвредные для организмов микробусинки диаметром 0,2μм, которые поглощались в качестве «пищи» молодым (< 24 часов) *D. magna* после воздействия на них серии из концентраций токсиканта. В результате измерений интенсивности флуоресценции на спектрофотометре поглощенных неонатами нано частиц (после гомогенизации дафний) была получена графическая прямая зависимость между логарифмами концентраций нескольких токсичных веществ, таких как ионы металлов хрома, серебра, марганца, кобальта, никеля и цинка и логарифмами интенсивности флуоресцентного излучения. Из уравнения зависимости концентраций токсиканта и измеренной интенсивности флуоресценции получали значение ЭК 50 – эффективные концентрации токсиканта, вызывающие 50 % подавление фильтрационной способности популяции дафний, которая выражалась в единицах флуоресцентного излучения. Одновременно с «флуоресцентными» опытами проводили ЛК 50 летальные острые токсические тесты (24 часа) с токсикантами. Результаты 30 мин (ЭК 50) и 24 ч (ЛК 50) тестов хорошо коррелировали друг с другом.

Введение. Обычно в качестве критерия острой токсичности при биотестировании с использованием в качестве тест-объекта ракообразных используется их летальность, а в качестве критерия хронической токсичности - число и размер вылупившейся молоди, смертность и прочие характеристики.

Острая токсичность - свойство химических веществ проявлять летальное действие на живые организмы и по Н.С.Строганову (1970) она количественно определяется как величина, обратная медианной летальной концентрации: $T = 1/LC50$ (концентрация, вызывающая гибель 50 % неонатов). Хроническое воздействие токсиканта диагностируемое по числу потомства дафнид продолжается от ювенальных стадий до появления третьего поколения, что может занять у такого вида как *D. magna* довольно продолжительное время (до 30 дней). Однако, краткосрочный хронический тест может захватить время до появления первого поколения молоди, что может длиться около двух недель.

В последнее время в качестве характеристик, которые позволяют диагностировать текущее состояние окружающей среды, может также выступать изменяющиеся под действием токсиканта такое физиологическое свойство ракообразных как способность отфильтровывать пищу. Как альтернативу краткосрочному тесту на плодовитость некоторые зарубежные авторы предлагают использовать в качестве эффективного воздействия измерение подавление пищевого поведения ракообразных после токсического стресса. Калоф и Сиблай (1990) подчеркивают, что обычно используемый индекс для выражения токсического влияния окружающей среды основанный на оценке роста популяции ракообразных зависит от того вызывает ли редуцию плодовитости сокращение в количестве потребляемой пищи или же на плодовитость влияет сокращение расходов энергии на метаболические затраты. Вим де Кoen и др. (1997) рассматривая влияние токсиканта на разные аспекты метаболизма у кладоцер доказали, что при токсическом действии наблюдается значительное подавление приема пищи или фильтрационной способности в то время как ферментативная пищеварительная активность подавляется незначительно. Барата и Баирд (2000) нашли что, если доминирующей долей влияния токсиканта на пищевое поведение *D. magna* в результате токсической экспозиции является ее способность сокращать потребление пищи, то её плодовитость уменьшается в первом и следующих поколениях. Ален и др. (1995) разработали чувствительный метод для измерения фильтрационной способности кладоцер. Это метод основан на подсчете клеток водорослей, используемых для кормления кладоцер, до и после их экспозиции в токсиканте (24 ч) и является довольно трудоемким. В то же время Биттон и другие (1995) указывают на возможность использования в качестве индекса для выражения токсического стресса на тест-организм подавление фильтрационной способности у 50% тестируемой популяции дафнид после 6 часов экспозиции в токсиканте. При этом для кормления дафнид использовались водоросли, меченные нетоксическим флуоресцентным веществом (DTAF), а поглощение или не поглощение дафнидами пищи после токсического воздействия определялось в поле эпифлуоресцентного излучения под микроскопом.

Таким образом, разработка дизайна теста при котором измерение подавления пищевой активности *D. magna* можно было бы использовать, как альтернативу хронического теста на плодовитость, но проведенного за более короткое время проведения было целью настоящего исследования.

Материалы и методы. **Условия культивирования *D. magna*.** Для культивирования использовали отстоянную в течение 7 суток, аэрируемую воздухом и с добавлением селениума водопроводную воду, которая менялась каждые 4 дня, на пятый. Дафнии содержались в 1 л кристаллизаторах в инкубаторах при температуре $\sim 20 \pm 1^\circ$ по Цельсию. Кормили дафний ежедневно, используя порошок хлореллы (Chlorella Ind. Co., Ltd) – 5 мг/л, а как пищевую добавку – 5 г/л - один раз при смене воды.

Приготовление химических веществ. Серия из пяти различных концентраций токсиканта были приготовлены в соответствии с формулой: $a_5 = a_1 \times R^{n-1}$. В качестве токсических веществ использовали соли следующих металлов: хрома - $K_2Cr_2O_7$, серебра – $AgCl$, марганца - $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, кобальта - $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ и никеля - $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Для разведения токсикантов, флуоресцентных бус и контроля использовали воду, приготовленную в соответствии с JIS K 0029, 1992: $NaHCO_3$ - 51.8g/L, KCl – 4.6 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 235.2g/L, $MgSO_4$ – 98.6 g/L.

Экспериментальный дизайн. Во всех экспериментах использовалась молодь (<24 часов от роду) полученная от одной партеногенетической самки дафнии, начиная с третьего поколения. LC 50 концентрации определялись после 24 часов выдерживания молоди дафний в токсиканте. Для опытов использовались 20 мл стаканчики, каждый из которых наполняли 10 мл необходимым

раствором токсиканта или чистым JIS K 0029 раствором в случае контроля. В каждый стаканчик помещали по 10 дафний, общее число стаканчиков вместе с контролем было 6. Определенные значения концентраций ЛС 50 использовались как a_1 -концентрация для вычисления серии из 5 разведений в опытах по определению ЭК 50 концентраций. В опытах с флуоресцентными микробусами молодь дафний отделяли от материнской культуры и выдерживали в чистом растворе JIS K 0029 за 3 часа перед постановкой ЭК 50 тестов во избежание ошибки воздействия на интенсивность флуоресценции порошка хлореллы или кормовых дрожжей, которой питались до эксперимента молодь дафний. Затем молодь дафний выдерживали в течение 30 мин в токсиканте, а после экспозиции промывали дистиллятом, используя для этого специальное металлическое ситечко диаметром 8 мм, а после этого помещали дафний на 5 мин в раствор флуоресцентных микробус. Оптимальное время поглощение молодью дафний раствора флуоресцентных бус и наполнения их кишечника – 5 мин определили с помощью флуоресцентного микроскопа SZX 16 Olympus Co. Попытки определить оптимальное время выдержки молодежи дафний во флуоресцентном растворе (от 5 до 40 мин) экспериментальным путем не дали определенного результата. Использовались голубые флуоресцентные микробусы диаметром 0,2 μm (F8805, Molecular Probes Co), с исходной концентрацией $2,23 \times 10^{10}$ бусинок на мл. Спектр излучения для измерения флуоресценции был: для E_x -365, а для E_m -415 нанометров. Концентрацию флуоресцентного раствора для опытов подобрали экспериментальным путем. Она составила $4,55 \times 10^{12}$ бусинок на мл. После 5 мин выдержки во флуоресцентном растворе, молодь дафний промывалась тщательно бидистиллятом, во избежании налипания микробусинок на внешние покровы раковинки или на конечности дафний. Затем молодь переносили в 1,5 мл микротубы и гомогенизировали при помощи Aziwan гомогенизатор-223А. После этого измеряли интенсивность флуоресцентного свечения в границах длины волн от 315 до 415, используя спектрофотометр - RF 5300 рс. Опыты для определения ЛС 50 и ЭК 50 концентраций проводили в двух повторностях для контроля и для каждой из 5-ти концентраций токсиканта.

Математическая обработка результатов. Проведены небольшие математические преобразования: для того чтобы найти концентрацию токсиканта, которая вызывала 50% снижение фильтрационной активности дафний, или на 50% снижала величину флуоресцентной интенсивности (ЭК 50). Для этого на линии абсцисс отложили десятичные логарифмы концентраций $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, а на оси ординат – логарифмы значений $(I_0 - I_c)/I_c$, где I_0 - интенсивность флуоресценции, измеренная в контрольной пробе, а I_c - в пробах с концентраций токсиканта (рис.1). Прямая зависимости между концентрациями бихромата калия и интенсивностью флуоресценции пересекает ось абсцисс в точке, которая соответствует искомому значению ЭК 50.

Результаты. В наших первоначальных опытах с классическим токсикантом при использовании концентраций 1, 2, 4, 8 и 15 мг/л была получена графическая зависимость между интенсивностью поглощения дафниями флуоресцентных частиц из раствора и концентрациями бихромата калия. Кратковременное 30 мин воздействие данного токсиканта, взятого в концентрациях на один-два порядка выше летальных концентраций, подавляло способность дафний отфильтровывать частички и намечало присутствие функциональной связи (рис.1).

В результате проведения экспериментов с $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ мы получили значения для ЭК 50, которые лежали в границах от 3,5-7,0 мг/л (среднее - 4,1). В дальнейшем для таких тестов были использованы ионы некоторых других металлов. Данные для показателей ЭК 50 и острого летального опыта ЛК 50 приведены в таблице 1.

Таблица 1 Концентрации солей (ионов) токсических металлов хрома, серебра, марганца, кобальта и никеля для ЛК 50 и ЭК 50 тестов

Ионы токсикантов (металлов)	Концентрация (мг/л)	
	30 мин ЭК 50	24ч ЛК 50
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	4.11	0.77
Ag^+	1.57×10^{-3}	8.83×10^{-4}
Mn^{2+}	357.2	42.76
Co^{2+}	96.70	10.40
Ni^{2+}	44.60	2.69

Таким образом, в процессе данных токсических экспериментов были выявлены соли некоторых металлов, которые оказывают на *D. magna* влияние, подавляя их способность к фильтрации, а также корреляция между показателями ЕК 50 (30 мин) и ЛК 50 (24 ч) показанные на рис.2.

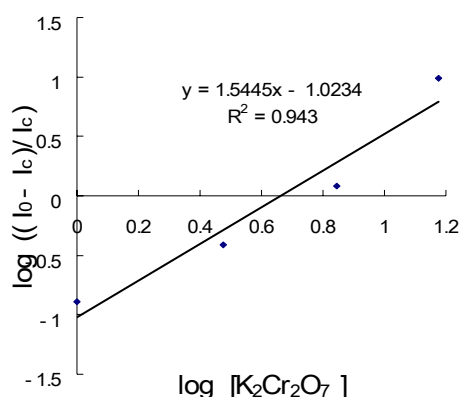


Рис. 1 Зависимость между $\log (K_2Cr_2O_7)$ and $\log (I_0 - I_c)/I_c$

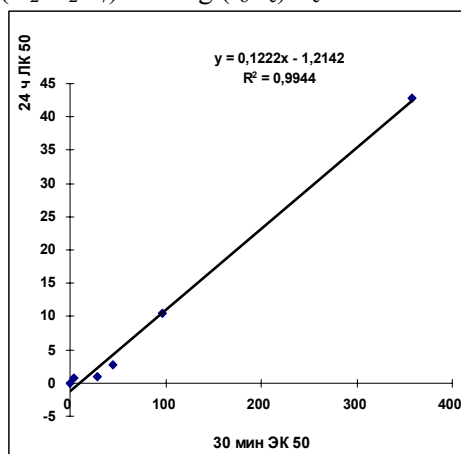


Рис.2 Корреляция между летальными ЛК 50 (24ч) и эффективными ЭК 50 (30 мин) концентрациями.

Обсуждение. Острые эксперименты с неонатами *D. magna* когда в качестве токсикантов использовались металлы, влияющие на подавление фильтрующей функции проводились в лаборатории Технического университета Токио с 2000 г. Первоначально подавление способности поглощения клеток *Chlorella vulgaris* измерялась как величина абсорбции (при длине волны - 686 нм). Величина абсорбции измерялась непрерывно в течение 24 часов, а молодь дафний находилась в растворах из серий концентраций бихромата калия или другого металла вместе с хлореллой. Концентрации токсикантов ЭК 50 в этих опытах были на том же уровне, что и концентрации ЛК 50 (24 ч). Второй этап подобных экспериментов был проделан с использованием флуоресцентной субстанции DTAf (5, 4, 6-dichlorotriazin-2-yl amino fluorescent), которая связывалась с клетками *Chlorella vulgaris* или клетками кормовых дрожжей. При этом, подавление фильтрационной способности у молоди дафний, измерялось как интенсивность флуоресценции. Таким образом, проведенные эксперименты показывали возможность использования в качестве острого токсического критерия подавление фильтрационной способности *D. magna*.

Использование фильтрационной способности дафнии взамен летальности являлось преимуществом данных тестов. Недостатком тестов являлось то, что они занимали такое же продолжительное время как ЛК 50 тесты. Клетки *Chlorella vulgaris*, находящиеся в растворе токсиканта, могли изменять его воздействие на дафний, а DTAf не всегда удачно прикреплялся к клеточной оболочке водорослей или кормовых дрожжей. Кроме того, в данных экспериментах концентрация пищевых частиц (клеток *Chlorella vulgaris* или кормовых дрожжей) увеличивалась пропорционально времени экспозиции в токсиканте.

В последних наших острых опытах молодь *D. magna* экспонировалась в нетоксическом флуоресцентном растворе микробус. Выбор микробус в качестве наполняющей кишечника дафний субстанции был обоснован простотой использования последних, их нетоксичностью, а также подходящим наноразмером и быстрой прохождением через пищевой тракт дафний. Рассматривая механизм фильтрации у дафний Танака (2004) показал, что вторая, третья и четвертая пара ножек у *D. magna* функционируют подобно помпе вызывая поток который направляет частички пищи к пищевому желобку. Частички очень эффективно отделяются от воды благодаря фильтрующим волоскам: некоторые из них сразу поступают в пищевой желобок, другие залипают на основаниях или ответвлениях фильтрующего аппарата и затем отскребаются в сторону к желобку иглообразной структурой типа экзоподита второй пары ног, а оттуда выталкиваются эндоподитом этой же пары ног и затем переправляются к мандибулам. В свою очередь Портер и др. (1983) установили, что *D. magna* может поглощать не только пищевые, но и искусственные частички, которые меньше по размерам, чем расстояние между фильтрующими волосками дафний. Таким образом, используя непищевые частички, мы получали «искусственную» замену клеткам водорослей, дрожжей или бактерий, с которыми возникали технические сложности при подсчете или других измерительных процедурах. Облегчить процедуру измерения фильтрационной способности означает получить хорошую возможность использовать в качестве критерия острой токсичности более чувствительный, чем летальность молоди признак. И проследить воздействие на популяционный уровень (вследствие сокращения поступающих в организм дафний питательных веществ происходит воздействие на популяцию на уровне сокращения плодовитости).

Кроме того, речь идет о сокращении времени таких острых экспериментов с 24 ч до 6-8 ч, чтобы успеть провести тесты в течение одного рабочего дня. Первоначально мы выбрали экспозицию в токсиканте в течение 30 мин (концентрации токсикантов превышали ЛК в 3-10 раз), чтобы существенно сократить время тестирования. В дальнейшем, убедившись, что концентрации ЭК 50 – 30 мин и ЛК 50 - 24 ч многих тестируемых металлов имеют хорошую корреляцию, нами планируется использовать для острых тестов с флуоресцентными частичками такие же концентрации токсиканта, как и в летальных опытах, увеличивая время экспозиции до 6 часов, чтобы сравнить чувствительность опытов по подавлению фильтрационной способности и ЛК 50 опытов.

Список литературы

- Строганов Н.С. Методики определения токсичности водной среды// Методики биологических исследований по водной токсикологии. – М.: Наука, 1971. – С. 14-60.
- Allen Y., Calow P., Baird D.J. A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Journal of Environment Chemistry* 14 (1995) 1625-1630.
- Barata C., Baird D.J. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Journal of Aquatic Toxicology* 48 (2000) 195-209.
- Bitton G., Rhodes K., Koopman B., Cornejo M. Short-term toxicity assay based on daphnid feeding behavior. *Water Environment Research* 67 (1995) 290-293.
- De Coen W. M., Janssen C.R. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. *Hydrobiologia* 367 (1997) 199-209.
- Calow P., Sibly R.M. A physiological basis of population processes: Ecotoxicological implications. *Functional Ecology* 4 (1990) 283-288.
- Porter K.G., Feig Y.S., Vetter E.F. Morphology, flow regimes, and filtering rates of *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, and *Bosmina* fed natural bacteria, *Oecologia* 58 (1983) 156-163.
- Tanaka Y. Direct observation on zooplankton feeding mechanisms. *Japan Plankton Gakkaiho* 51 (2004) 151-154.

РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТАЛЛ-ДЕПОНИРУЮЩЕЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ФУНКЦИЙ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ *ANODONTA CYGNEA* В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Л.Л. Гнатишина, Г.И. Фальфушинская, Я.В. Бажура, О.Б.Столяр

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка,
НИЛ сравнительной биохимии и молекулярной биологии,
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь, Украина, Oksana.Stolyar@gmail.com

Ключевые слова: двустворчатый моллюск, металлотioneины, антиоксидантная защита, тяжелые металлы, экотоксичность

Для пресноводных систем Западной Украины характерно комплексное загрязнение вследствие спонтанной хозяйственной деятельности и неудовлетворительного состояния водоочистительных сооружений. Поэтому представляет интерес изучить способность биомаркеров специфических видов загрязнения реагировать на сайт- и сезон-зависимые отличия в условиях существования. Двустворчатые моллюски относятся к наиболее популярным биоиндикаторным организмам, поскольку они могут легко отражать историю загрязнения определенной среды вследствие накопления токсичных веществ. Металлотioneины (МТ) являются низкомолекулярными, обогащенными цистеином белками с исключительным потенциалом координации тяжелых металлов (в физиологических условиях цинка, меди и кадмия) (Vasák, 2005). Однако благодаря способности разнообразных факторов индуцировать экспрессию этих белков у рыб, их МТ принято считать более биомаркером общего стресса, чем специфическим маркером токсичности тяжелых металлов. Вместе с тем, опыт изучения МТ у двустворчатых моллюсков, преимущественно морских, подтверждает первоочередное значение их МТ в качестве специфического маркера загрязнения тяжелыми металлами (Viarengo et al., 2007). В предыдущих наших работах было показано, что в условиях комплексного загрязнения ослабляется способность гидробионтов аккумулировать некоторые тяжелые металлы (Falfushynska et al., 2009b; 2010). Поэтому накопление фактического материала, касающегося металл-депонирующих свойств (МТ-Me) и антиоксидантного потенциала (МТ-SH) МТ пресноводных моллюсков из водоемов с разным уровнем загрязнения будет содействовать прояснению возможности использования этого популярного биомаркера.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на территории Украины в 2009 г. в мае, июле и сентябре на особях пресноводного двустворчатого моллюска беззубки лебединой *Anodonta cygnea* L. с длиной раковины 8.0 см и массой 50-60 г. Были выбраны три местности для отбора экземпляров: условно чистая (I, 49°49' с.ш., 25°23' в.д.) выше г. Тернополь на р. Серет, смешанного муниципального и аграрного загрязнения на р. Ничлава (B, 48°48' с.ш., 26°00' в.д.) ниже г. Борщев, и пруд-охладитель Хмельницкой АЭС (N, 50°18'18" с.ш. 26°38'42" в.д.). Экземпляры моллюсков доставляли в лабораторию в аэрированной воде из естественного водоема и исследовали не более чем через 24 ч после отбора. Все процедуры по отбору и обработке тканей проводили на холоде. Для исследования отбирали ткань жабр.

МТ выделяли путем двухступенчатой хроматографии на сефадексе G-50 и ДЕАЕ-целлюлозе термостабильного экстракта, полученного из 10%-ного гомогената ткани в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 8.0 с добавлением 10 мМ 2-меркаптоэтанола ("Sigma") и фенилметилсульфонилфторида (0.1 мМ, "Sigma") как было описано ранее (Falfushynska et al., 2009a). Регистрировали УФ-спектры форм МТ. Определяли содержание металлов в ткани и формах МТ после сжигания образцов в перегнанной азотной кислоте в соотношении 1:5 (масса:объем). Содержание цинка и меди измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре С-115, кадмия – на спектрофотометре S-600 и выражали в мкг на г сырой массы ткани. Содержание МТ в ткани определяли по количеству SH-групп (МТ-SH) и по общему содержанию металлов (МТ-Me) (Falfushynska et al., 2010). Активность супероксиддисмутазы (СОД) [КФ 1.15.1.1] (Mn-СОД и Cu,Zn-СОД) определяли по скорости восстановления нитротетразолия синего в присутствии феназинметасульфата и НАДН. Образование супероксид анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) в растворимой фазе гомогената измеряли по степени восстановления цитохрома *c* и выражали в нмоль восстановленного цитохрома *c* /мг растворимого белка/мин. Содержание белка в ткани определяли по методу Лоури и др. (1951). Детальное описание этих методов содержится в нашей предыдущей работе (Falfushynska et al., 2010).

Результаты измерений в гомогенатах ткани представлены в виде $M \pm m$ для 6 животных, а в хроматографических фракциях – $M \pm m$ для трех измерений в пробе объединенных навесок от пяти

животных каждой группы. Для статистической обработки данных использовали компьютерные программы Statistica v 7.0 и Exel для Windows-2000.

Результаты и обсуждение. При гель-распределительной хроматографии термостабильных белков моллюсков (рис. 1 А) были идентифицированы две формы МТ с разной молекулярной массой, МТ20 и МТ10, из которых МТ20 принято считать формой, экспрессия которой индуцируется в условиях токсической среды (Viarengo et al., 2007). Присутствие изоформы МТ20 у моллюсков групп N (весной) и В (весной и осенью) подтверждает наличие таких условий в этих местностях. Согласно особенностей УФ-спектров МТ, можно предполагать повышенное содержание кадмия в МТ20 у моллюсков N-группы весной и В-группы – весной и осенью.

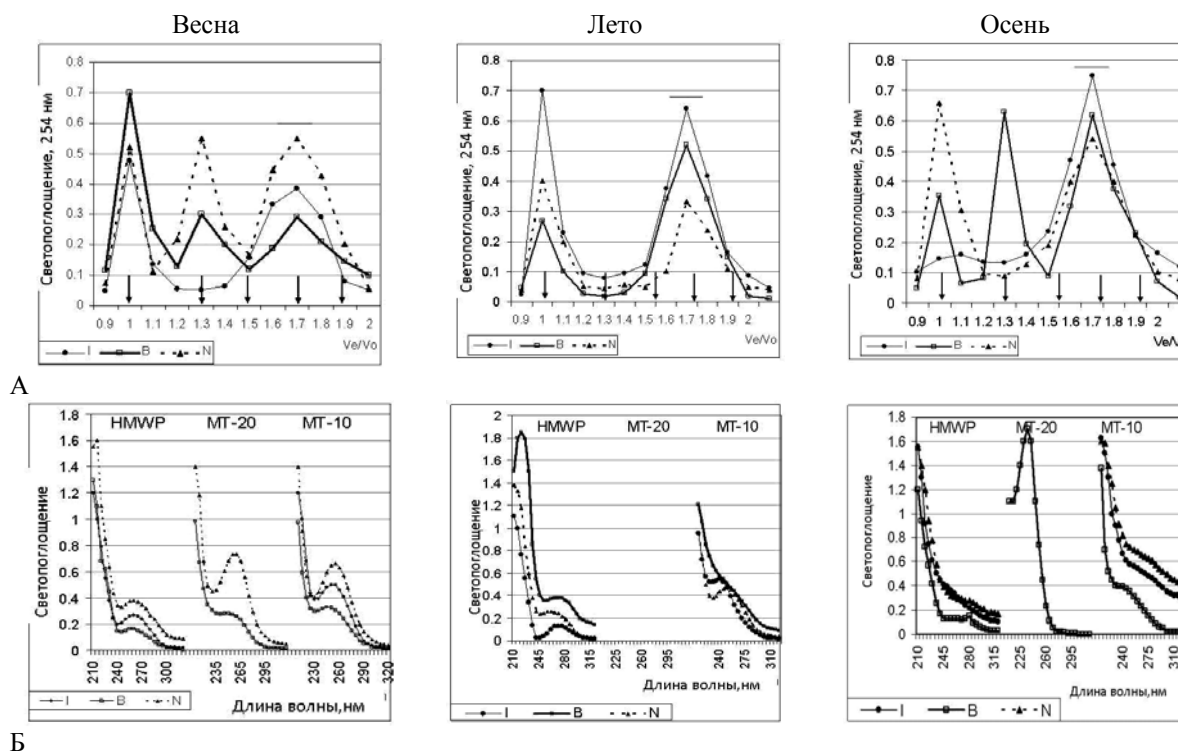


Рис. 1. Профили элюции термостабильного экстракта (А) и УФ-спектры полученных белков (Б) (HMWP – высокомолекулярные термостабильные белки) жабр двустворчатого моллюска при хроматографии на сефадексе G-50 в зависимости от сезона. Горизонтальной линией выделена металлотионеин-содержащая фракция, стрелками указано объем элюции маркеров: 1.0 V_e/V_o – 25.8 кДа, 1.3 V_e/V_o – 17.0 кДа, 1.5 V_e/V_o – 12.3 кДа, 1.7 V_e/V_o – 8.4 кДа, 0.96 V_e/V_o – 3.4 кДа; V_e – объем элюции, V_o – внешний объем геля.

Результаты ионно-обменной хроматографии фракции МТ10 (рис. 2) показали наличие основных форм МТ-1, МТ-2 и промежуточной МТ-2а, которые элюируются соответственно при 0.24, 0.30, и 0.35 М NaCl. Главной формой МТ во всех исследованных группах моллюсков является МТ-1. Наличие формы МТ-2а не имеет системного характера в зависимости от зоны отбора и сезона, что не дает оснований для рекомендации этого показателя для оценки состояния моллюсков.

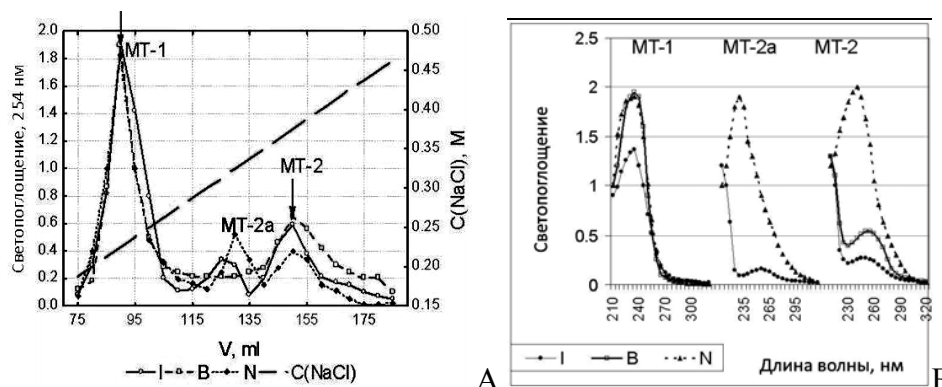
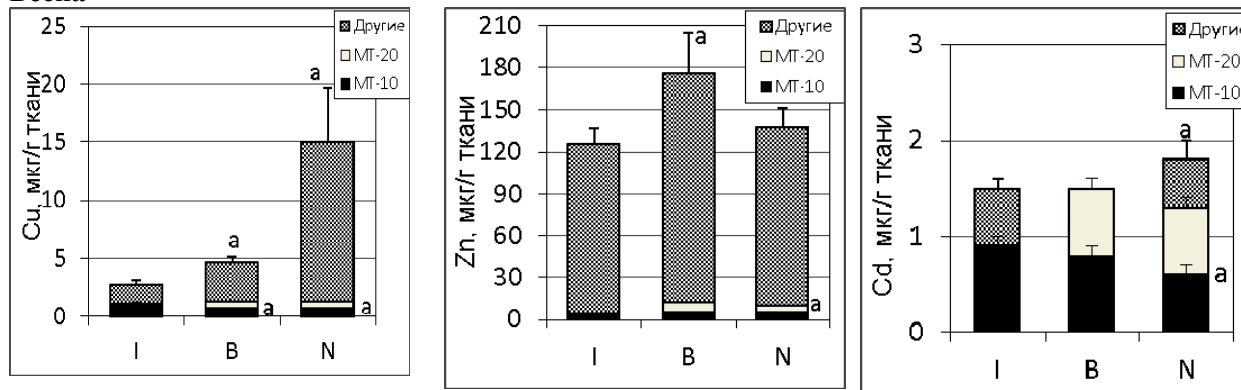


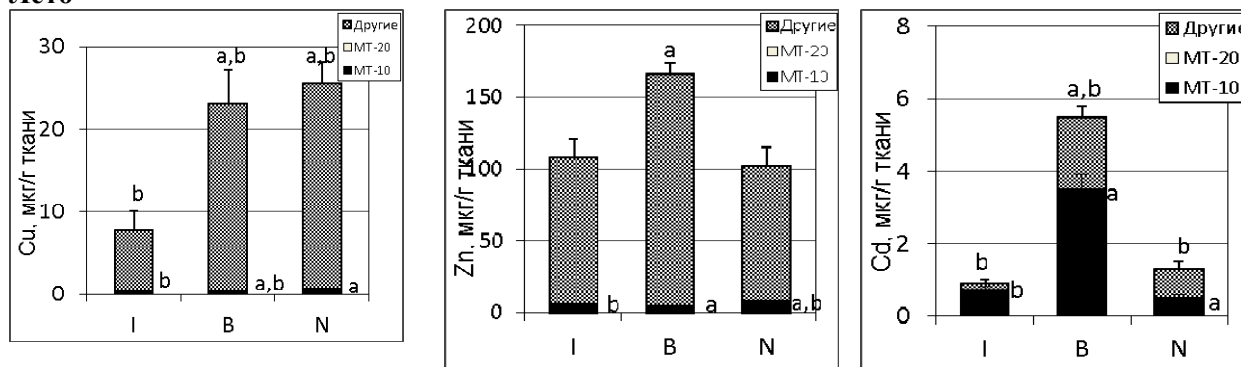
Рис. 2. Профили элюции (А) и УФ-спектры (Б) металлотионеинов жабр двустворчатого моллюска, полученных при ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе в линейном градиенте NaCl в 0.01М трис-HCl буфере, pH 8.0 в весенний период. Стрелками указаны объемы выхода МТ-1 и МТ-2 стандартного раствора металлотионеина II кролика.

Анализ распределения металлов между МТ и другими клеточными мишенями (рис. 3.) свидетельствует о высоком содержании металлов в несвязанной с МТ форме у моллюсков групп из относительно неблагополучных территорий: меди в группах В и, особенно, N; цинка и кадмия – в группе В. Вместе с тем, МТ наиболее эффективно из трех металлов связывают избыток кадмия, что подтверждает прогноз на основании УФ-спектров, и его содержание в МТ10 в В-группе летом достигает 3.5 мкг/г ткани.

Весна



Лето



Осень

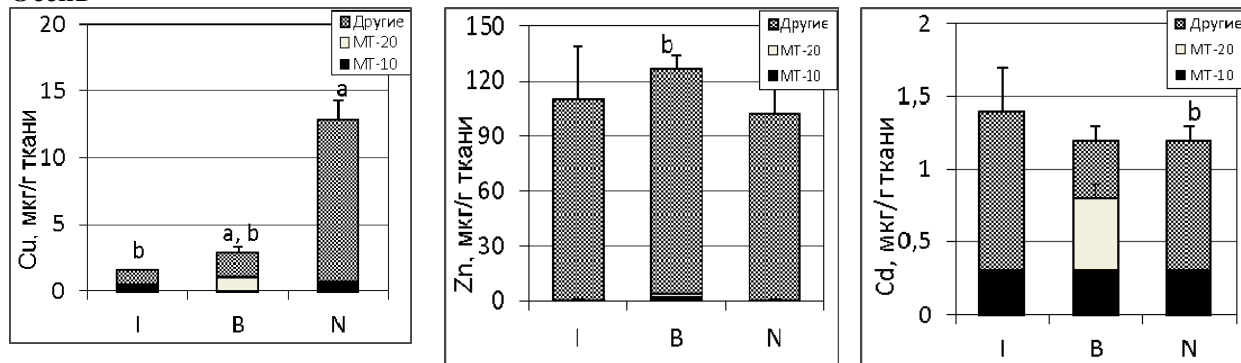


Рис. 3. Распределение металлов (Cu, Zn, Cd) между формами металлотионеинов и другими компонентами в жабрах моллюсков из трех местностей, $M \pm m$, $n=6$. Примечание: тут и далее ^a – отличие от I-группы достоверно, ^b – разница по группе между сезонами по сравнению с весной достоверна, $P < 0.05$.

Содержание МТ-SH во всех группах имеет одинаковую сезонную динамику (рис. 4), однако летом оно значительно выше в группах В и N, а осенью в группе N, чем в группе I. Сезонная динамика и междугрупповые отличия МТ-Me имеют другой характер, причем лишь весной наблюдается соответствие между уровнем МТ-SH и МТ-Me, а в дальнейшем, особенно летом, проявляется низкая эффективность металл-депонирующей функции МТ на фоне активации их антиоксидантного потенциала, особенно в группах В и N.

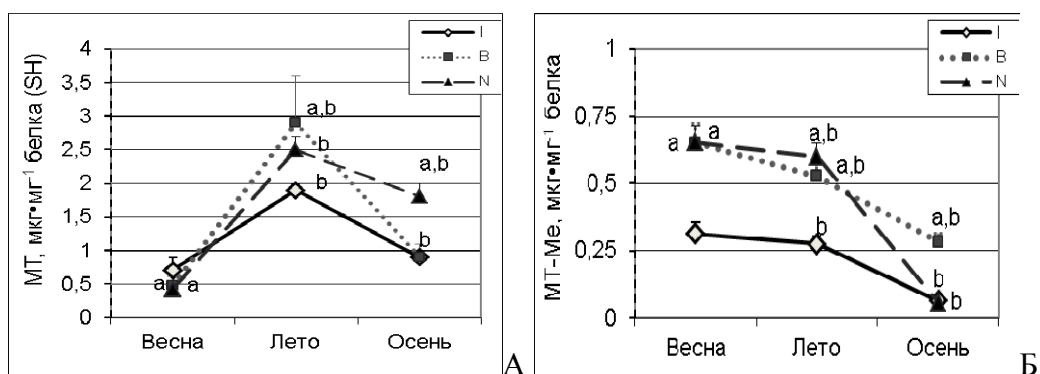


Рис. 4. Общее содержание (MT-SH) (А) и общая металл-депонирующая способность (MT-Me) (Б) металлотионеинов в жабрах моллюсков из трех местностей, $M \pm m$, $n=6$.

Определение характеристик системы антиоксидантной защиты (рис. 5) показало их значительные сезонные изменения в группах В и N. Их динамика специфична для каждой группы. При этом активность СОД и образование супероксид-аниона относительно сбалансированы, то есть высшим темпам образования супероксид-аниона соответствует и большая активность СОД, летом особенно митохондриальной Mn-СОД, а осенью – цитоплазматической формы Cu,Zn-СОД. Таким образом, несмотря на существенные колебания этих показателей, можно оценить их состояние как соответствующее диапазону адаптивных изменений.

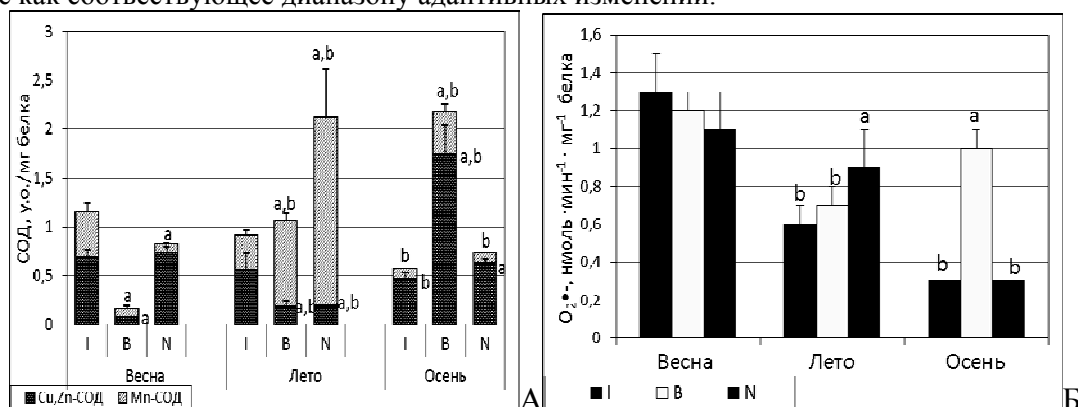


Рис. 5. Распределение форм супероксиддисмутазы (Mn-СОД и Cu,Zn-СОД) (А) и образование супероксид анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) (Б) в жабрах моллюска *Anodonta cygnea* из трех зон (I, B, N-группы).

В конечном итоге, локальные особенности химического загрязнения и теплового режима существенно влияют на металл-депонирующую функцию металлотионеинов пресноводного двустворчатого моллюска. При этом, в условиях комплексного воздействия неблагоприятных факторов металлотионеины выступают больше как объект этого влияния, чем как субъект детоксикации биологически доступных форм тяжелых металлов. Возможное участие металлотионеинов в антиоксидантной защите может содействовать ее успешной реализации.

Работа выполнена при поддержке МОНМС Украины (Международные проекты М/13-2009, М/25-2009, Ф29/321-2009).

Список литературы

- Falfushynska H. Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine / H. Falfushynska, O. Stolyar // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2009a. – Vol. 72 (5). – P. 1425–1432.
- Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis* / L. Vergani, M. Grattarola, E. Grasselli [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2007. – Vol. 465, N 1. – P. 247–253.
- Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister basin (Ukraine) / H. I. Falfushynska, L. Delahaut, O.B. Stolyar [et al.] // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2009b. – Vol. 57, N 1. – P. 86–95.
- The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms / A. Viarengo, D. Lowe, C. Bolognesi [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology.* – 2007. – Vol. 146 C (3). – P. 281–300.
- Vasák M. Advances in metallothionein structure and functions / M. Vasák // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2005. – Vol. 19, N 1. – P. 13–17.
- Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country / H. I. Falfushynska, L. L. Gnatyshyna, A. Farkas [et al.] // *Chemosphere.* – 2010. – Vol. 81. – P. 1342–1351.

РЕАКЦИИ РЫБ НА ТОКСИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА В ЗОНЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР У ГРАНИЦ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

В.К. Голованов

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

Область «взаимоотношений» температуры, важного экологического фактора водной среды, и токсических веществ нашла свое отражение в большом количестве полевых и экспериментальных исследований, а также во многих научных публикациях.

Как известно, температура определяет эффективность роста и питания, особенности поведения и распределения рыб и, в конечном счете, их продуктивность. Температурный диапазон жизнедеятельности тепло- и холодолюбивых видов рыб простирается от 0 до 40–44°C, однако в зависимости от степени эвритермности или stenотермности каждого вида амплитуда диапазона колеблется от 8–15 до 30–45°C. Учитывая возможные климатические тренды (потепление или похолодание), увеличение зон «термального загрязнения» пресных и морских вод от АЭС, ГРЭС и крупных промышленных объектов, а также возникновение природных климатических аномалий (например, жаркое лето 2010 г. в России и ряде других стран), исследование термоадаптационных особенностей рыб, а также влияния загрязняющих веществ на процессы их жизнедеятельности в зоне высоких температур становится все более актуальным.

Верхние температурные летальные границы – пессимум – для карповых и окуневых видов расположены на уровне 35–43°C, осетровых – несколько ниже, а лососевых и сиговых – на уровне ~ 30°C. Соответственно, оптимальные температурные области жизнедеятельности для перечисленных групп видов располагаются в интервалах температур: 23–30, 20–24 и 13–19°C (Голованов, 2010; Голованов и др., 1997). Таким образом, зона высоких температур для таких важных промысловых групп видов как карповые и окуневые, с одной стороны, и лососевые и сиговые, с другой, расположена в диапазоне температур от 30°C и выше (в первом случае) и 20°C и выше – во втором.

Даже общие представления о том, каким образом различные токсиканты – аммиак, органические вещества, тяжелые металлы, цианиды, хлор и другие влияют на жизнедеятельность рыб в оптимальном диапазоне жизнедеятельности и у температурных границ выживаемости, различаются и в настоящее время не дают возможности сформулировать четкие выводы (Лукьяненко, 1967; Алабастер, Ллойд, 1984; Materna, 2001).

В связи с вышесказанным цель работы состояла в кратком анализе и систематизации информации, характеризующей реакции рыб на токсические вещества, в особенности в зоне высоких температур у границ жизнедеятельности.

Соотношение оптимальных температур развития, роста и питания с верхними летальными температурами у молоди рыб приведено в таблице. Приведены данные по 6 видам рыб – лещу *Abramis brama* (L.), плотве *Rutilus rutilus* (L.), сазану (карпу) *Cyprinus carpio* (L.), серебряному карасю *Carassius auratus* (L.), речному окуню *Perca fluviatilis* L. и радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. Зона температур эколого-физиологического оптимума определялась по значениям окончательно избираемых температур, определенных в градиентных температурных условиях, в которых рыбы самопроизвольно выбирают оптимум (Голованов, 2010; Голованов и др., 1997). Верхние границы жизнедеятельности определялись двумя методами. Первым – методом критического термического максимума (КТМ), с использованием скорости нагрева 4°C/ч в летний и зимний сезоны года. Значения КТМ определяли по критерию потери равновесия, перевороту тела рыбы на бок или кверху брюшком (Голованов, Смирнов, 2007). И вторым – методом хронического летального максимума (ХЛМ), с использованием скорости нагрева 1°C/сут летом и зимой. В данном случае достигались максимально возможные конечные значения верхних летальных температур (ВЛТ) (Голованов, Смирнов, 2007). Судя по значениям ВЛТ молоди рыб в таблице 1, верхний температурный уровень границы жизнедеятельности определяется скоростью нагрева. При скорости 4°C/ч он несколько ниже, при самой медленной – выше. При этом значения КТМ в летний сезон, как правило, выше аналогичных показателей зимой. Характерно, что у более взрослых особей значения ВЛТ на 2–10°C ниже в сравнении с сеголетками и годовиками рыб (Голованов, Смирнов, 2007). Обращает на себя внимание и тот факт, что для холодолюбивого вида

– радужной форели – показатели КТМ и ХЛМ существенно ниже аналогичных для карповых и окуневых видов.

Таблица. Соотношение оптимальных (окончательно избираемых) и верхних летальных температур у молоди некоторых видов рыб из различных семейств.

Вид	Окончательно избираемые температуры, °С	Верхние летальные температуры			
		Критический термический максимум, нагрев 4°С/ч		Хронический летальный максимум, нагрев 1°С/сут	
		Лето	Зима	Лето	Зима
Лещ	27	33–34	29–30	36–37	36–37
Плотва	23–26	32	23	35–36	35–36
Карп	29–31	37	26	39–40	37–38
Серебряный карась	27–28	38	28	38–38	37–38
Речной окунь	25–26	33–34	24–25	35	34–35
Радужная форель	14–17	28.5–30.5	~27	26.5–28.5	26–27

Общие зависимости «взаимоотношений» температуры и токсических веществ приблизительно таковы. В загрязненных водах влияние повышенной температуры зависит от вида и концентрации загрязняющего вещества. В общем случае повышение температуры уменьшает период выживания рыб при летальной концентрации токсиканта. Однако его пороговая концентрация может и не уменьшаться при высоких температурах. Она может оставаться неизменной или даже возрастать, т.е. с увеличением температуры токсичность может даже понижаться. Так, было показано, что температуры ниже 15°С могут увеличивать время выживания радужной форели при острых летальных концентрациях Zn, уменьшая при этом его летальное пороговое значение. Сходные данные получены при воздействии Cu на данный вид, а также на серебряного карася (в диапазоне температур от 14 до 27°С), хотя на других 6 видах североамериканских рыб особых различий не обнаружено. В случае реакции на Cd характерно увеличение его токсичности с повышением температуры (Алабастер, Ллойд, 1984). Сходные результаты отмечены и при воздействии токсикантов неорганической природы, например, фенола. Существует мнение, что увеличение температуры на 10°С существенно сокращает среднее время выживания рыб в растворах токсиканта. Очевидно, это связано с увеличением интенсивности обмена и проницаемости тканей у рыб в области высоких температур, которая для каждого конкретного вида будет другой. Свой вклад в реакцию рыб на токсические вещества вносит и сезон года, летний или зимний (Лукьяненко, 1967), а также их физиолого-биохимический и иммунологический статус. В общем виде, изменение температуры в заданном направлении может увеличивать, уменьшать или не вызывать изменений в токсичности в зависимости от токсиканта, видовой специфики, а также конструктивных особенностей экспериментальной установки (Sprague, 1985).

В одном из обзоров приводятся сведения о влиянии ряда токсических веществ, таких как аммиак, органические вещества, тяжелые металлы, цианиды и хлор, при различных изменениях температуры среды (Materna, 2001). Радужная форель более чувствительна к аммиаку при низких температурах (в опытах при 3 и 14°С, 5 и 18°С, 12 и 19°С), аналогичный тренд характерен и для некоторых теплолюбивых видов рыб. В отношении органических веществ, в частности полихлорированных бифенилов (ПХБ) и других, известно, что большая токсичность наблюдается при низких температурах в случае ПХБ, в то же время при воздействии фосфорорганических соединений наблюдается противоположная реакция (Rattner, Heath, 1995). Особенно подчеркивается роль температуры в аккумуляции тяжелых металлов у рыб. Токсичность ртути, например, увеличивается в диапазоне температур для ряда рыб. Увеличение или уменьшение температуры существенно модифицирует токсичность Zn, Cu, Cd и Ni. Повышение температуры существенно уменьшает резистентность и время выживания у молоди лососевых при действии цианидов. В отношении хлора известно, что он более токсичен при высоких температурах (Materna, 2001).

Обычно действие токсиканта проверяют, выдерживая рыб в растворах то или иное время при разных значениях температуры. Существует и другой способ оценки влияния токсиканта, когда рыб нагревают с той или иной скоростью, одновременно оценивая уровень, при котором наступает или потеря равновесия, или гибель. Применение данной методики (КТМ или ХЛМ) позволит получить дополнительную информацию о совместном воздействии температуры и токсиканта. Хорошо известны факты, свидетельствующие о роли температуры как стрессора (по скорости ее изменения) при токсическом воздействии, а также о значении осцилляции в устойчивости рыб к загрязняющим веществам. Ниже приведены примеры, характеризующие КТМ тепло- и холодолюбивых видов рыб при воздействии различных загрязняющих веществ.

Экспозиция в растворах Ni 1.5 мг/л у радужной форели *Salmo gairdneri* Richardson существенно понижала значения КТМ (по критерию потери равновесия, при скорости нагрева 6°C/ч и температуре акклимации 8°C) – с 27.4 до 20.3°C. Примерно аналогичны результаты опыта при экспозиции с хлором (0.06 мг/л), понижение значений КТМ составило 4.7°C, с 27.2 до 22.5°C. В 4 разных сериях опытов с кижучем *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) при экспозиции в растворах Ni 4.5–16.0 мг/л уровень КТМ (при температуре акклимации 15°C) понижался с 28.4–28.9°C на 0.3–3.0°C (Becker, Wolford, 1980).

Обстоятельное исследование было проведено на 4 видах австралийских пресноводных рыб – серебряном окуне *Bidyanus bidyanus*, меланотении серебристой *Melanotaenia duboulayi*, гипсэлеотрисе *Hypseleotris klunzingeri* и радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Patra, Chapman, Lim, Gehrke, 2007). Предварительно в течение 10–14 суток рыб выдерживали в растворах эндосульфана 0.3–1.0 мкг/л, хлорпирифоса 3.5–5 мкг/л и фенола 5 мг/л при температуре акклимации 20°C. У всех видов показано понижение КТМ (по критерию потери равновесия, при скорости нагрева 48°C/ч). Падение уровня КТМ составило для серебряного окуня, меланотении серебристой, гипсэлеотриса и радужной форели при воздействии эндосульфана 2.8, 4.1, 3.0 и 4.8°C, хлорпирифоса 3.8, 2.5, 4.2 и 5.8°C и фенола 0.3, 0.0, 0.0 и 0.7°C соответственно. Таким образом, наименьшее падение уровня КТМ отмечено в случае экспозиции с фенолом.

Выдерживание канального сомика *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) в растворах нитрита от 0 до 1.4 мг NO₂ /л приводило к постепенному понижению уровня КТМ (по критерию потери равновесия, при скорости нагрева 18°C/ч и температуре акклимации 20°C) с 38.0 (контроль) до 35.8°C (Wattenpaugh et al., 1985). Еще большее падение уровня КТМ – на 6°C у данного вида отмечено при воздействии Se (Wattenpaugh, Beitinger, 1985).

Экспозиция к токсичным растворам Cd понижала КТМ (по критерию потери равновесия, при скорости нагрева 18°C/ч и температуре акклимации 20°C) у красного нотрописа *Notropis lutrensis* (Baird et Girard) и тупонозого толстоголова *Pimephales promelas* Rafinesque на 2.3–4.4 и 4.2–5.7°C соответственно (Carrier, Beitinger, 1988).

Детальные опыты по определению токсичности фенола и его влиянию на уровень значений КТМ (по критерию потери равновесия, при скорости нагрева 60°C/ч и температуре акклимации 23°C) у необычной кампостомы *Camptostoma anomalum* (Rafinesque) показали следующее. При концентрациях токсиканта от 6 до 8 мг/л значения КТМ практически не отличались, при концентрации 10 мг/л уровень КТМ понизился с 35.5–35.3°C до 34.7°C, но особенно резко падение термоустойчивости проявилось при содержании рыб в растворе фенола с концентрацией 12 мг/л. В данном случае показатели КТМ снизились до 32.9°C (Chagnon, Hlohowskyj, 1989).

Приведенные данные указывают на то, что те или иные концентрации токсикантов в растворах приводят в большинстве случаев к понижению уровня верхних летальных температур, определенных методом КТМ (по критерию потери равновесия). Известно, что в температурах 34–38°C даже у теплолюбивого серебряного карася развивается тепловой шок, который является генотоксичным и вызывает увеличение частоты хромосомных aberrаций в метафазе, а также приводит к однопочечным повреждениям ДНК (Anitha et al., 2000). Понижение верхней температурной границы жизнедеятельности в естественных условиях только усугубляет возможность рыб нормально функционировать. Вопрос механизмов действия различных токсикантов на рыб в высоких и низких температурах не является предметом обсуждения в данной работе, тем не менее, приведенная выше информация будет полезна при рассмотрении данного вопроса в дальнейшем. Кроме того, критерий КТМ четко показывает, насколько изменяется (чаще – понижается) тот предел температур, который практически переносит особь, подвергшаяся выдержке в токсической среде. Накопление информации о верхних летальных температурах у рыб, подвергшихся токсическому воздействию, позволит также внести вклад в

оценку отношений между химическими составляющими окружающей среды и естественными стрессорами (Holmstrup, Bindesbol, Oosting et al., 2010).

Таким образом, в случае, когда повышение температуры с той или иной скоростью, приводит к существенному понижению КТМ, происходит сужение температурного диапазона жизнедеятельности в его верхней части. Рыбы в таком случае «предрасположены» погибать в тех температурах, в которых они при прочих нормальных условиях продолжали бы расти, питаться и развиваться. Такие ситуации вполне возможны, например, в районах сброса подогретых вод АЭС, ГРЭС и крупных промышленных предприятий. Дальнейшее изучение «взаимоотношений» температуры и токсических веществ у рыб позволит в ряде случаев прогнозировать возможные негативные эффекты или предотвращать их. С другой стороны, методики по определению верхних летальных температур в разных их модификациях позволят оценить экологически опасные уровни воздействия токсикантов.

Список литературы.

- Алабастр Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 384 с.
- Голованов В.К. Термоадаптации – критерии поведения и распределения рыб в естественной и экспериментальной среде // Матер. докл. IV Всеросс. конф. с междунар. участием «Поведение рыб». Борок. М: АКВАРОС, 2010. С. 43–49.
- Голованов В.К., Свирский А.М., Извеков Е.И. Температурные требования рыб Рыбинского водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное состояние рыбных запасов Рыбинского водохранилища. Ярославль: Изд-во ЯрГТУ, 1997. С. 92–123.
- Голованов В.К., Смирнов А.К. Влияние скорости нагрева на термоустойчивость карпа *Cyprinus carpio* в различные сезоны года // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 4. С. 555–561.
- Лукьяненко В.И. Токсикология рыб. М.: Изд-во «Пищ. промышленность», 1967. 216 с.
- Anitha B., Chandra N., Gopinath P.M. et al. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*) // Mutat. Res. Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen. 2000. V. 469. № 1. P. 1–8.
- Becker C.D., Wolford M.G. Thermal resistance of juvenile Salmonids sublethally exposed to nickel determined by the critical thermal maximum method // Environ. Pollut. 1980. V. 21. № 3. P. 181–189.
- Carrier R., Beitinger T.L. Reduction in thermal tolerance of *Notropis lutrensis* and *Pimephales promelas* exposed to cadmium // Water Res. 1988. V. 22. № 4. P. 511–515.
- Changon N., Hlohowskyj I. Effects of phenol exposure on the thermal tolerance ability of the central stoneroller minnow // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1989. V. 42. № 4. P. 614–619.
- Holmstrup M., Bindesbol A-M., Oosting G.J. et al. Interactions between effects of environmental chemicals and nature stressors: a review // Science of the total environment. 2010. V. 408. P. 3746–3762.
- Materna E. Temperature interaction. Issue paper 4. Prepared as a part of EPA Region 10 temperature water Quality criteria guidance development project // US Environmental protection agency/ EPA-910-D-01-004 / 2001. May. 33 p.
- Patra W.R., Chapman J.C., Lim R.P., Gehrke P.C. The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes // Environ. Toxicol. Chem. 2007. V. 26. № 7. P. 1454–1459.
- Rattner B.A., Heath A.G. Environmental factors affecting contaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates // Handbook of ecotoxicology. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. P. 519–535.
- Sprague J.B. Factors that modify toxicity // Fundamentals of aquatic toxicology. Washington, DC: Hemisphere Publishing, 1985. P. 123–163.
- Wattenpaugh D.E., Beitinger T.L. Se exposure and temperature tolerance of fathead minnows, *Pimephales promelas* // J. Therm. Biol. 1985. V. 10. № 2. P. 83–86.
- Wattenpaugh D.E., Beitinger T.L., Huey D.W. Temperature tolerance of nitrite-exposed channel catfish // Trans. Am. Fish. Soc. 1985. V. 114. № 2. P. 274–278.

ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАП НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ РЫБ И ИХ КОРМОВЫХ ОБЪЕКТОВ

И.Л. Голованова, А.И. Аминов

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

Среди антропогенных факторов, влияющих на функционирование водных экосистем, важная роль принадлежит ксенобиотикам, количество которых увеличивается с ростом уровня антропогенного загрязнения. Одним из представителей таких веществ является высокотехнологичный системный гербицид глифосат. На основе изопропиламиновой соли

глифосата создано много гербицидов, самый известный из которых Раундап. С середины 70-х годов прошлого века он широко используется в сельском хозяйстве, в домашних садах, на промышленных и коммерческих землях для борьбы с однолетними и многолетними сорняками (Сох, 2004). Действующее вещество Раундапа проникает через листья и другие зеленые части растения и переносится по всем органам, блокируя синтез ароматических кислот. В мировой практике Раундап применяется перед уборкой рапса, подсолнечника, проса, сои, риса. Зерно обработанных культур используется без ограничений для производства кормов, продуктов питания и в пивоварении. «Раундап – один из самых безопасных в мире гербицидов. Он не накапливается в воде и не токсичен для водных организмов, не действует на растения, полностью погруженные в воду». Так рекламировала свой продукт компания-производитель гербицида «Монсанто» США.

Однако за последние годы накопилось большое количество сведений о токсичности Раундапа для живых организмов, а Европейский Союз признал глифосат опасным для окружающей среды и токсичным для водных организмов. Установлено, что Раундап в концентрациях 0.004–10 мг/л снижает устойчивость растений к болезням (Сох, 2004), а также показатели продуктивности и линейные размеры ветвистых рачков (Папченкова и др., 2009), оказывает влияние на размножение и развитие моллюсков (Tate et al., 1997), вызывает нарушения морфологических и биохимических показателей у рыб (Жиденко, 2008; Папченкова и др., 2009), оказывает токсический эффект на рыб и общетоксический эффект на человека (Сох, 2004). Но, несмотря на это, производство Раундапа не остановлено, и он по-прежнему широко используется в странах Восточной Европы.

Период полураспада глифосата в почве составляет от 3-х дней до года, в воде – от 12 до 60 дней, в донных отложениях – до 120 дней (Сох, 1998). Поскольку гербициды применяются не только для уничтожения сорной растительности на посевах сельскохозяйственных культур, но и для борьбы с зарастанием водохранилищ, прудов и каналов, а также в коллекторно-дренажных системах оросительного земледелия, попадая в организм гидробионтов они могут вызывать нарушения жизнедеятельности и пластического обмена. Наряду с важнейшими абиотическими факторами – температурой и pH, ксенобиотики, поступающие в водоемы, могут изменять активность пищеварительных ферментов и многочисленных лизосомальных гидролаз животных. Изучение характеристик указанных ферментов представляет значительный интерес, поскольку они могут принимать участие в пищеварении у рыб и обеспечивать аутодеградацию собственных тканей. В то же время, влияние гербицида Раундап на гидролиз углеводов, играющих важную роль в энергетическом и пластическом обмене, у водных животных практически не изучено.

В связи с вышесказанным цель работы состояла в изучении *in vitro* влияния гербицида Раундап на амилолитическую активность в кишечнике молоди рыб, а также в целом организме беспозвоночных животных и молоди рыб при различных значениях температуры и pH.

Ферментативную активность определяли в суммарных гомогенатах слизистой оболочки кишечника, кишечного содержимого (химуса) или всего организма, используя 6–25 экз. рыб каждого вида и от 10 до нескольких десятков экз. беспозвоночных животных. Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20) оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969) при температуре 0, 10 и 20°C и pH 5, 7.4 и 8.3. Активность ферментов определяли в 5 повторностях и выражали в мкмоль/г·мин. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при $p = 0.05$.

Для приготовления растворов токсиканта использовали коммерческий препарат гербицида с торговым названием "Раундап" (произведен и расфасован ЗАО фирма "Август", Россия), представляющий собой 36%-ный водный раствор глифосата. Выбор тестируемых концентраций 0.1–50.0 мг/л был обусловлен установленными значениями ПДК для воды рыбохозяйственных водоемов (0.001 мг/л), а также значениями 96-ч LC_{50} Раундапа для рыб и беспозвоночных (от 86 до 168 мг/л) (Smith, Oehme, 1992; Папченкова и др., 2009).

Данные по влиянию Раундапа на амилолитическую активность в слизистой оболочке и химусе кишечника молоди рыб при стандартных значениях температуры 20°C и pH 7.4 представлены в табл. 1.

При действии Раундапа на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника молоди рыб в ряде случаев отмечен четкий концентрационно-зависимый эффект. Уровень амилолитической активности у карпа снижается на 15–27%, у тюльки на 13–23%, у щуки на

11–17% от контроля во всем диапазоне исследованных концентраций. У молоди плотвы достоверное снижение амилалитической активности на 17–26% отмечено при концентрациях 25 и 50 мкг/л, у окуня – на 28% от контроля лишь при наибольшей исследованной концентрации Раундапа. Таким образом, гербицид оказывает тормозящий эффект на уровень амилалитической активности в кишечнике исследованных видов рыб, при этом у молоди карпа и тюльки негативное влияние Раундапа отмечено в более широком диапазоне концентраций.

Таблица 1. Амилалитическая активность в слизистой оболочке и химусе кишечника рыб

Объект	Амилалитическая активность, мкмоль/г·мин					
	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Слизистая оболочка кишечника						
Тюлька	11.7 ± 0.3 ^a	10.3 ± 0.3 ^b	10.3 ± 0.5 ^b	9.47 ± 0.6 ^b	9.20 ± 0.5 ^b	9.07 ± 0.5 ^b
Плотва	57.2 ± 1.6 ^a	56.4 ± 3.5 ^a	52.4 ± 3.2 ^{a,b}	52.9 ± 1.1 ^{a,b}	42.1 ± 1.9 ^b	47.2 ± 1.5 ^{b,b}
Карп	228.8 ± 2.0 ^a	193.6 ± 3.9 ^b	179.2 ± 4.8 ^{b,b}	176.8 ± 8.6 ^{b,b}	173.6 ± 7.9 ^b	166.4 ± 4.7 ^b
Окунь	34.4 ± 1.2 ^{a,b}	37.6 ± 2.1 ^a	32.5 ± 2.6 ^{a,b}	31.2 ± 3.0 ^{a,b,b}	28.4 ± 3.1 ^{b,b}	24.8 ± 2.1 ^b
Щука	0.89 ± 0.02 ^a	0.79 ± 0.02 ^b	0.78 ± 0.02 ^b	0.77 ± 0.03 ^b	0.74 ± 0.03 ^b	0.74 ± 0.01 ^b
Химус						
Тюлька	1.4 ± 0.3 ^a	1.3 ± 0.2 ^{a,b}	1.7 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.01 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.1 ^b
Плотва	85.6 ± 3.9 ^{a,b}	74.4 ± 4.3 ^a	89.0 ± 7.8 ^{a,b}	89.6 ± 6.3 ^{a,b}	97.6 ± 8.5 ^b	95.2 ± 5.6 ^b
Карп	183.2 ± 2.7 ^a	158.4 ± 3.3 ^b	153.6 ± 3.7 ^b	140.0 ± 3.4 ^b	136.0 ± 5.5 ^b	139.2 ± 1.5 ^b
Окунь	57.6 ± 4.7 ^a	65.6 ± 2.3 ^a	57.6 ± 4.5 ^a	64.0 ± 7.0 ^a	58.8 ± 3.9 ^a	59.2 ± 6.6 ^a
Щука	1.0 ± 0.02 ^a	1.1 ± 0.04 ^a	1.1 ± 0.02 ^a	1.0 ± 0.02 ^a	1.0 ± 0.02 ^a	1.0 ± 0.1 ^a

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 разные надстрочные индексы указывают на статистически достоверные различия между показателями в строке (ANOVA, LSD-test), $p < 0.05$.

Активность гликозидаз химуса во всем диапазоне концентраций Раундапа снижается лишь у карпа (на 14–24% от контроля). Величина тормозящего эффекта возрастает по мере увеличения концентрации токсиканта. У тюльки достоверное снижение амилалитической активности на 40% от контроля отмечено лишь при максимальной концентрации Раундапа. У плотвы амилалитическая активность повышалась на 11–14% при концентрациях гербицида 25 и 50 мкг/л. У щуки и окуня достоверного влияния Раундапа на активность гликозидаз химуса не выявлено.

Разнонаправленные эффекты действия органических ксенобиотиков на активность ферментов, гидролизующих полисахарид крахмал, были отмечены и ранее в экспериментах на молоди плотвы (Голованова, Таликина, 2006). Необходимо отметить, что если активность ферментов слизистой оболочки кишечника обусловлена преимущественно мембранными ферментами (мальтаза, сахараза) кишечника рыб и частично адсорбированной α -амилазой, то активность ферментов химуса – как панкреатическими ферментами (α -амилаза) рыб, так и ферментами тканей жертвы и энтеральной микробиоты. Различия в величине и направленности эффектов могут быть обусловлены как большей адаптационной пластичностью панкреатической α -амилазы, по сравнению с собственно кишечными ферментами, так и различиями характеристик ферментов, функционирующих в составе слизистой и химуса.

Данные по влиянию Раундапа на амилалитическую активность в целом организме кормовых объектов рыб (температура 20°C, pH 7.4) представлены в табл. 2.

В целом организме беспозвоночных животных отмечены разнонаправленные эффекты: максимальное снижение амилалитической активности на 30% от контроля наблюдается в тканях рачкового зоопланктона, максимальное повышение на 21% – у прудовика. У дрейссены более низкие концентрации Раундапа 0.1 и 1 мкг/л вызывают достоверное снижение амилалитической активности на 12–14%, в то время как более высокие (25–50 мкг/л) – увеличение на 14–20% от контроля. У хирономид показано снижение ферментативной активности на 7–9% от контроля.

В целом организме молоди рыб в присутствии Раундапа также отмечены разнонаправленные эффекты. Амилалитическая активность у щуки и плотвы повышается на 19–46% от контроля при концентрациях Раундапа 10–50 мкг/л. У других исследованных видов

достоверного влияния Раундапа на амилалитическую активность не установлено. В то же время у молоди карповых, извлеченных из желудка щуки (реальная жертва на I стадии пищеварения, покровы тела и плавники частично разрушены) с ростом концентрации Раундапа тормозящий эффект усиливается от 19 до 32% от контроля. При этом необходимо отметить, что в целом организме беспозвоночных животных и молоди рыб функционируют не только ферменты пищеварительного тракта, но и многочисленных лизосомальных гликозидаз всех органов и тканей, характеристики которых могут значительно различаться.

Таблица 2. Амилалитическая активность в целом организме беспозвоночных животных и молоди рыб

Объект	Амилалитическая активность, мкмоль/г·мин					
	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Беспозвоночные животные						
Зоопланктон	$1.3 \pm 0.1^{a,b}$	$1.1 \pm 0.2^{a,b}$	$1.3 \pm 0.2^{a,b}$	1.6 ± 0.1^b	0.9 ± 0.04^b	0.9 ± 0.1^b
Хирономиды	6.0 ± 0.1^a	5.9 ± 0.1^a	$5.8 \pm 0.1^{a,b}$	$5.6 \pm 0.1^{b,b}$	$5.6 \pm 0.1^{b,b}$	5.4 ± 0.1^b
Дрейссена	2.9 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^b	2.5 ± 0.1^b	$3.1 \pm 0.1^{a,\Gamma}$	3.5 ± 0.1^b	$3.3 \pm 0.1^{b,\Gamma}$
Прудовик	7.9 ± 0.3^a	7.4 ± 0.2^a	$7.6 \pm 0.1^{a,b}$	8.3 ± 0.2^b	9.1 ± 0.2^b	9.6 ± 0.3^b
Молодь рыб						
Тюлька	0.5 ± 0.03^a	0.5 ± 0.03^a	0.5 ± 0.03^a	0.5 ± 0.02^a	0.5 ± 0.03^a	0.5 ± 0.02^a
Плотва	9.1 ± 0.3^a	$10.0 \pm 0.7^{a,b}$	$10.2 \pm 0.5^{a,b}$	10.8 ± 0.5^b	11.4 ± 0.8^b	11.1 ± 0.4^b
Окунь	$4.1 \pm 0.1^{a,b}$	$3.8 \pm 0.3^{a,b}$	$4.3 \pm 0.2^{a,b}$	3.5 ± 0.5^a	$4.3 \pm 0.4^{a,b}$	4.5 ± 0.4^b
Щука	3.9 ± 0.2^a	4.1 ± 0.1^a	4.1 ± 0.2^a	5.4 ± 0.2^b	5.5 ± 0.3^b	5.7 ± 0.3^b
Карповые	$8.2 \pm 0.3^{a,b}$	$8.2 \pm 0.3^{a,b}$	$8.4 \pm 0.1^{a,b}$	8.8 ± 0.3^b	$8.2 \pm 0.1^{a,b}$	7.7 ± 0.1^a
Карповые*	8.3 ± 0.1^a	6.7 ± 0.3^b	6.4 ± 0.4^b	6.4 ± 0.3^b	6.1 ± 0.6^b	5.6 ± 0.4^b

Примечание. * – молодь карповых видов рыб, извлеченных из желудка щуки (реальная жертва)

В состав Раундапа кроме изопропиламиновой соли глифосата входит поверхностно активное вещество полиоксиэтиленамин, на долю которого может приходиться некоторая часть токсичности Раундапа. В то же время известно, что токсичность глифосата, главным образом, вызвана его кислотностью (Сох, 2004). Поскольку значения температуры и pH в естественных водоемах и пищеварительном тракте рыб варьируют, изучали эффекты Раундапа при различных значениях pH и температуры.

Влияние Раундапа на уровень амилалитической активности в слизистой оболочке кишечника молоди рыб при различных значениях температуры и pH представлены на рис.

При температуре 20°C и pH 7,4 тормозящий эффект Раундапа на амилалитическую активность слизистой оболочки кишечника карпа составил 20%, тюльки – 37% от контроля. У окуня достоверного влияния Раундапа не отмечено. Тормозящий эффект Раундапа у карпа увеличивается в зоне кислых значений pH в 1.5 – 2 раза, особенно при низкой температуре. У окуня снижение pH не влияет на эффект Раундапа, у тюльки уменьшает его при 20°C и увеличивает при более низкой температуре. Снижение температуры при pH 7.4 нивелирует тормозящий эффект Раундапа у всех исследованных видов.

Максимальное снижение амилалитической активности отмечено при комплексном действии температуры 0°C, pH 5 и в присутствии Раундапа: у окуня на 72%, у карпа на 95%, у тюльки на 98%. При этом если у окуня эффект обусловлен в основном совместным действием температуры и pH, то у тюльки и карпа статистически достоверно усиление эффекта отмечено при действии трех факторов ($p < 0.0001$).

Эффект Раундапа на амилалитическую активность зоопланктона, дрейссены и хирономид при температуре 20°C и pH 7.4 не превышает 10% от контроля. У зоопланктона тормозящий эффект Раундапа усиливается в 2–3 раза при смещении pH в кислую сторону и нивелируются при снижении температуры. У хирономид и дрейссены тормозящий эффект гербицида проявляется лишь в зоне кислых значений pH. При щелочных значениях pH активность гликозидаз у дрейссены в присутствии Раундапа увеличивается. Наибольшее снижение амилалитической

активности у всех беспозвоночных животных отмечено у при комплексном действии температуры 0°C, pH 5 и в присутствии Раундапа: у хирономид на 29%, у дрейссены на 65%, у зоопланктона на 88% от контроля. Однако в значительной мере эти эффекты обусловлены совместным действием низкой температуры и pH

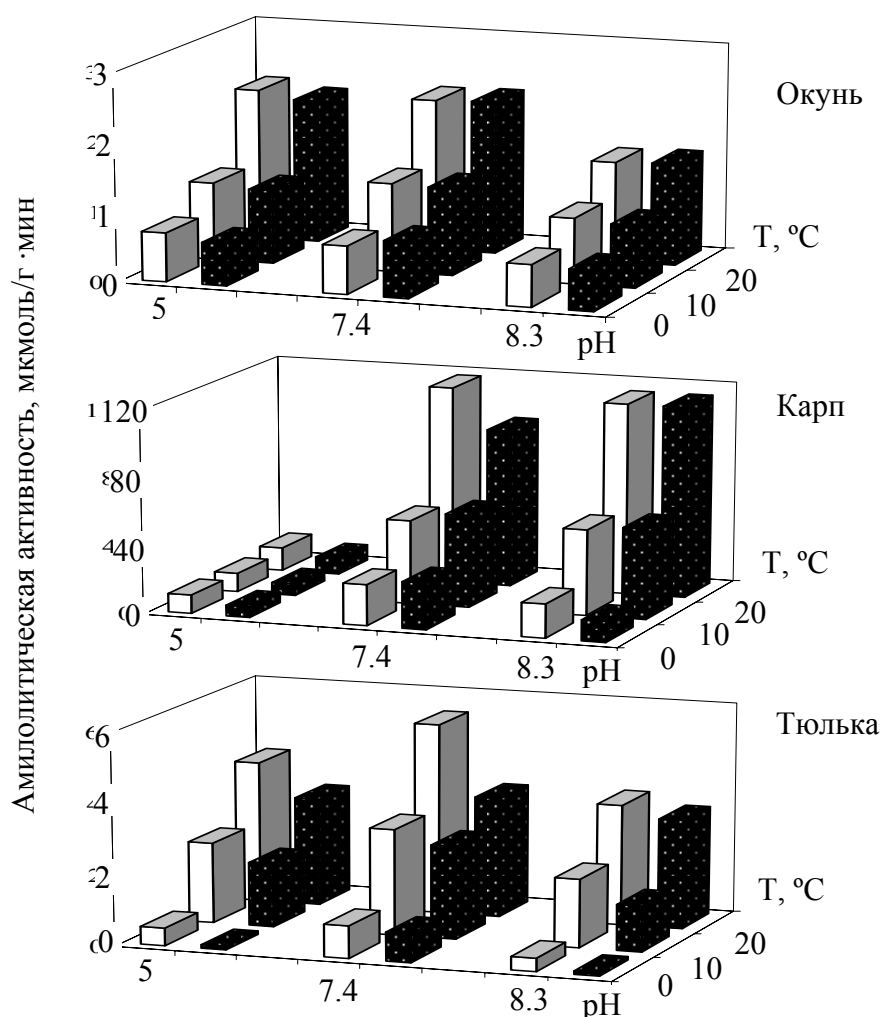


Рисунок. Уровень амилолитической активности в слизистой оболочке кишечника рыб (окунь, карп, тюлька) при различных значениях температуры и pH.; □–контроль, ■–Раундап (25 мкг/л).

При температуре 20°C и pH 7.4 Раундап снижает амилолитическую активность в организме окуня на 16%, у молоди карповых – увеличивает на 11%. Снижение pH до 5 уменьшает амилолитическую активность у молоди карповых на 24% от контроля, в то время как у в тканях окуня снижение pH не влияет на величину эффекта. Снижение температуры от 20°C до 0°C у молоди карповых увеличивает стимулирующий эффект Раундапа на 55%, а у окуня практически не изменяет его. Как и у беспозвоночных животных, наибольшее снижение ферментативной активности отмечено при температуре 0°C и pH 5 в присутствии Раундапа: на 97 и 54% у молоди карповых и окуня соответственно. Однако, этот эффект обусловлен главным образом совместным действием pH и температуры.

Таким образом, впервые исследована амилолитическая активность в слизистой оболочке и содержимом кишечника, а также в тканях молоди рыб и беспозвоночных животных при действии Раундапа в широком диапазоне концентраций 0.1–50 мкг/л. Установлено, что Раундап в концентрации в 10 раз меньшей ПДК может снижать активность гликозидаз у молоди рыб и беспозвоночных животных. При этом он оказывает большие эффекты на гликозидазы слизистой оболочки кишечника молоди рыб, по сравнению с ферментами химуса. Максимальное торможение амилолитической активности показано в кишечнике карпа, в питании которого углеводы играют большую роль по сравнению с другими исследованными видами. При

совместном действии низкой температуры, кислых рН в присутствии Раундапа (25 мкг/л) амилазная активность в слизистой оболочке кишечника и целом организме молоди рыб снижается в большей степени (на 80–98%) по сравнению с беспозвоночными животными (29–88%). Однако в большинстве случаев тормозящий эффект при действии 3-х факторов в основном обусловлен совместным действием температуры и рН. Изучение физиолого-биохимических показателей гидробионтов при действии Раундапа *in vitro* позволяет не только расширить представления о токсичности этого гербицида, но и выявить негативные эффекты до появления видимых отклонений от нормы.

Список литературы.

- Голованова И.Л., Таликина М.Г. Влияние низких концентраций хлорофоса в период раннего индивидуального развития на пищеварительные карбогидразы сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* // Вопросы ихтиол. 2006. Т. 46. № 3. С. 412–416.
- Жиденко А.А. Динамика гематологических показателей молоди карпа под действием гербицидов // Гидробиол. журн. 2008. Т. 44. № 3. С. 80–88.
- Папченкова Г.А., Голованова И.Л., Ушакова Н.В. Репродуктивные показатели, размеры и активность гидролаз у *Daphnia magna* в ряду поколений при действии гербицида Раундап // Биология внутренних вод. 2009. № 3. С. 105–110.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука. 1969. С. 192–196.
- Cox C. Glyphosate // J. of pesticide reform. 2004. V. 24. № 4. P. 10–15.
- Smith E.A., Oehme F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: A literature review // Vet. Hum. Toxicology. 1992. V. 34. № 6. P. 531–543.

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ НА МОДЕЛЬНЫЕ ТОКСИКАНТЫ

А.В. Гудимов

ММБИ КНЦ РАН, Мурманск, 183010, Владимирская, 17, Россия, alexgud@mail.ru

Традиционная оценка токсичности, основанная на тестах по определению летальной концентрации ($ЛК_{50}$) демонстрирует сравнительную степень опасности веществ в остром или длительном (при определении ПДК) эксперименте, но далека от реальной картины действия загрязнения. Обычно, быстрое разбавление исходного выброса загрязнения в природных условиях определяет основную экспозицию организмов в низких и очень низких сублетальных концентрациях. Поэтому анализ сублетальных эффектов (близких к летальным, но не вызывающих гибели в коротком опыте) загрязнения в значительно большей мере отвечает задаче оценки влияния фактического загрязнения (особенно, хронического). Тем более, что в природных условиях организм, находясь в менее токсичной или слабозагрязненной воде значительно большее время, чем в опыте, может получить летальную или повреждающую дозу за счет аккумуляции токсиканта из водной среды и при «безопасной» его концентрации.

Основной целью работы было исследование возможностей применения физиологических (скорость потребления кислорода - СПК, интенсивность фильтрации, - СФ, параметры кардиоактивности, – частота сердечных сокращений – ЧСС, и их амплитуда) и поведенческих (параметры движения створок: УРС, - уровень раскрытия створок; амплитуда и аддукция) реакций для обнаружения сублетальных воздействий токсикантов средствами оперативной биоиндикации в непрерывном (он-лайн) режиме биомониторинга.

Определение диапазона и шкалы изменчивости реакций организмов на токсическое загрязнение проводилось на основе группы модельных токсикантов, различных по типу, составу и воздействию, включающих как простые вещества (монотоксиканты), так и комплексные: аммиак, соли тяжелых металлов, детергент, дизтопливо, буровые растворы и их компоненты и др. Был выполнен ряд экспериментов на морских двустворчатых моллюсках (мидия, модиолус, гребешок, мия, кардиум) в контролируемых, полуприродных (естественный проток) и природных условиях. Большая часть экспериментов выполнена в аквариальной ММБИ КНЦ РАН в п. Дальние Зеленцы (Восточный Мурман). Обобщаемые результаты охватывают период с 1985 по 2011 гг.

Обнаруженная общая неспецифичность поведенческих и физиологических реакций на стресс (токсический или естественно-экологический) проявлялась в однотипных изменениях регистрируемой функции, с волнообразным переходным процессом и стабилизацией ее на новом повышенном или пониженном уровне. Следовательно, ни значительное падение ЧСС, СПК или СФ, ни уменьшение УРС вплоть до видимого закрытия створок не могут являться сами по себе признаками именно токсического стресса. Значение имеет степень этих изменений относительно их варьирования в норме. Важен диапазон варьирования, продолжительность и устойчивость изменений параметров, а также наличие некоторых специфических черт реагирования на токсические воздействия. Все это проявляется в общем характере (паттерне) колебаний регистрируемых параметров, имеющем ясные отличия у опытных и интактных животных. Поэтому неспециалисту-практику на основании лишь одного статистически определяемого параметра («стресс-индекса») не представляется возможным достоверно и надежно обнаружить наличие токсического воздействия (присутствие в воде токсикантов).

Результаты биотестирования – основа шкалы оперативной биоиндикации. Однако, для применения оперативной биоиндикации в природной среде результатов лабораторного биотестирования недостаточно, нужны полевые испытания. В противном случае, как и в традиционном биомониторинге, сохраняется значительный риск принять естественную изменчивость показателей/параметров за вызванную загрязнением. Например, нами было установлено, что периоды длительного закрытия створок с резким понижением СПК и СФ, остановками сердца и брадикардией, возникают не только при токсическом стрессе, но при нормальных изменениях факторов среды, в естественных условиях обитания видов.

В технологии оперативного биомониторинга и биоиндикации первостепенное значение имеет скорость реагирования, - она ориентирована на первоначальную реакцию организма, служащую отправной точкой для генерации сигнала о значимых изменениях среды. Поэтому большое значение в оперативном биомониторинге имеет выбор регистрируемых показателей и их параметров. Следует избегать параметров с излишней чувствительностью к колебаниям факторов, высокой изменчивостью и динамичностью (нестабильностью), как и с повышенной инертностью реагирования.

Поведение моллюсков и его параметры соответствовали этим требованиям «золотой середины», обладая достаточной чувствительностью и стабильностью при небольшой инертности к изменениям факторов среды. В проведенных экспериментах первые достоверные изменения параметров поведения, как и скорости фильтрации, были обнаружены при концентрациях от 5-10 ПДК, а потребления кислорода и кардиоактивности - от 50-100 ПДК и выше (в лабораторных условиях). Кроме того, особое значение поведения в том, что оно представляет собой целостную реакцию всего организма, а не одной его системы.

Итак, значительные изменения кардиоактивности или уровня раскрытия створок еще не являются сами по себе свидетельством токсического стресса (как, очевидно, представляется разработчикам и пользователям «модных» биосенсорных систем на станциях «Водоканала» С.Петербурга, Екатеринбурга и Москвы). Выявление токсического стресса в он-лайн режиме – пока еще дело непростое, технологически (методически) незавершенное, является предметом исследований специалиста – экофизиолога и определяется его квалификацией, опытом биотестирования и, в конечном итоге, разработанной им технологией биоиндикации стрессовых воздействий.

Надежность оперативного контроля качества воды базируется на исключении ошибок типа «ложной тревоги». Для этого необходимо знать характер («шаблон» или pattern) функции в норме и при патологии и производить биоиндикацию не по 1, а по комплексу параметров активности, включая поведенческие и/или физиологические реакции.

«Биоэлектронные» или «автоматизированные» системы «биосигнализации», начавшие применяться в РФ для контроля качества водопроводной воды (на раках и моллюсках) упрощенно-примитивны в своих экологических подходах и крайне далеки от эффективности реального он-лайн биотестирования воды или биомониторинга. Без привлечения специалистов-экологов они представляют пока лишь некие заявки на он-лайн биомониторинг: его потенциальные прообразы, структурно-технические модели, - еще не наполненные экологическим смыслом и реальным значением в обеспечении безопасности водоснабжения.

Он-лайн биомониторинг (синонимы: оперативный биомониторинг, биомониторинг в реальном времени, автоматический биомониторинг...) – это принципиально новая, эмерджентная (зарождающаяся) технология, экотехнология. Она еще нигде не существует в готовом виде, а только разрабатывается, испытывается и ее успех определяется не техникой (вариантов которой много), а технологией, т.е. знанием объекта и предмета исследования.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОБИОНТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ

Т.П. Денисова

ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирская государственная академия образования»,
664035, г. Иркутск, ул. Полевая, 32; Россия, denis_tp@inbox.ru

Введение системы испытаний генотоксикантов, циркулирующих в природной среде, выбор и апробация наиболее чувствительных объектов для регистрации токсичности, мутагенности и оценки их популяционной опасности становится одним из основных направлений в области теоретической и прикладной экологии и гигиены. Трудно представить себе универсальную модель, с помощью которой можно ответить на весь комплекс сложных вопросов при оценке качества природной среды в условиях антропогенного воздействия, в том числе определить отдаленные эффекты действия. Для этого токсикогенетика предлагает системы тестирования, включающие модели, специально разработанные для изучения поставленных задач. С их помощью можно в короткий срок получать информацию о генотоксических эффектах, индуцированных антропогенными факторами, и в определенных пределах экстраполировать её на организмы, обитающие в естественных условиях, в том числе и на человека.

Накопленный опыт экспериментальных исследований по определению токсикогенетической активности классических мутагенов и токсикантов нашел отражение в разработанном нами способе, который предоставляет возможность комплексно, на основе количественных показателей, оценивать уровень генотоксически активных веществ, циркулирующих в природных водоемах. При этом объектом исследований являются дафнии – типичные гидробионты, с хорошо изученной биологией и широко используемые в токсикологии.

В ходе экспериментов учитывают токсические и мутагенные эффекты, индуцируемые исследуемыми агентами. Токсическое действие определяется по гибели и плодовитости гидробионтов F_0 , подвергавшихся воздействию анализируемого фактора. Нетоксичными считаются такие агенты, которые достоверно не снижают жизнеспособность тестовой культуры в опыте по сравнению с контролем ($P > 0,05$).

Генетическая активность оценивается по способности антропогенных загрязнителей индуцировать три вида мутационных повреждений в популяции *D. magna* Str. При определении мутагенной активности учитываются индуцированные и спонтанно возникшие мутации у тестовой культуры. Степень выраженности мутагенной активности исследуемых агентов и специфичность их действия определяется по величине специально разработанных коэффициентов.

Предлагаемый способ является достаточно чувствительным, обеспечивает высокую воспроизводимость экспериментов, прост и недорог в применении и позволяет проследить за изменениями в популяции гидробионтов в ряду поколений. Кроме того, важной особенностью данного способа является то, что он работает в широком диапазоне концентраций химических веществ и обеспечивает возможность получения надежной информации о токсико-генетической активности исследуемых агентов. Наша разработка предоставляет возможность по результатам одного эксперимента одновременно судить о токсических и генетических свойствах изучаемых веществ и определять уровень опасности ксенобиотиков, циркулирующих в водной среде.

Точкой практического приложения разработанного метода были выбраны сточные воды одного из предприятий целлюлозно-бумажной промышленности, прошедшие полный технологический цикл очистки и непосредственно сбрасываемые в природный водоем, и сточные воды с этапа отбеливания целлюлозы перед их спуском в общий коллектор сточной воды предприятия.

Исследования показали, что сточные воды, прошедшие все этапы очистки, достоверно снижают жизнеспособность *D. magna* Str. по сравнению с контролем (таблица 1). Кроме того, под влиянием сточных вод изменяется уровень плодовитости *D. magna* Str. в сторону её повышения в 1.4 раза по сравнению с контролем ($P < 0,05$).

В контрольных вариантах у *D. magna* Str. были обнаружены мутационные повреждения, снижающие уровень жизнеспособности тест-культуры в F_2 .

В опытных вариантах, в которых культура *D. magna* Str. подвергалась воздействию очищенных сточных вод ОАО «ЦБК» были обнаружены мутационные поражения аналогичного характера.

Таблица 1. Токсикогенетическая активность очищенных неразбавленных сточных вод ОАО «ЦКК»

Показатели генотоксичного действия		Экспозиция, час	
		24.0	96.0
Токсичность	коэффициент 1	2.6	25.0
	коэффициент 2	1.4	-
мутагенность		13.5	-
Специфичность мутагенного действия		индукция морфологических и сублетальных мутаций	-
Степень выраженности эффекта действия		умеренно токсичный со средней мутагенностью	чрезвычайно токсичный
Лимитирующий показатель вредности		мутагенность	токсичность

Однако, частота сублетальных мутаций у *D. magna* Str. в F_2 опытных вариантах превышала контрольный уровень в 7.2 раза ($P < 0.05$). Плодовитость *D. magna* Str. F_2 в опытном варианте была ниже контрольного значения и составляла всего 0,6 от спонтанного уровня ($P < 0.05$), что связано с реализацией летальных мутаций. В то же время, действие очищенных сточных вод приводило к появлению в популяции *D. magna* Str. морфологических мутантов. Их частота превышала спонтанный уровень мутирования в 83 раза.

Уровень генотоксичности увеличивается от длительности воздействия исследуемых агентов на *D. magna* Str. В связи с чем, анализируемые сточные воды при экспозиции 96 час оцениваются как чрезвычайно токсичные.

В соответствии с критериями, принятыми в способе, очищенные сточные воды следует охарактеризовать как умеренно токсичные со средней мутагенной активностью в случае их воздействия на тест-объект при экспозиции 24 часа, при экспозиции 96 час – как чрезвычайно токсичные. При этом лимитирующим показателем вредности в первом случае является мутагенность, а во втором – токсичность.

Специфичность мутагенного действия очищенных сточных вод в отношении *D. magna* Str. выражается в увеличении частоты появления морфологических мутантов, тогда как сублетальные и летальные мутации они индуцируют незначительно по сравнению с контролем.

Дополнительно были проведены исследования по изучению изменения токсикогенетической активности очищенных сточных в зависимости от степени их разбавления.

Продемонстрировано, что генотоксичность определяется степенью разбавления сточных вод ($P < 0.05$). Однако при их разбавлении в 2 раза (1:1), величина гибели и плодовитости выживших самок в F_0 существенно не отличалась от таковой в опытах с неразбавленными сточными водами. И только при разбавлении воды в 100 раз определяемые показатели токсичности достоверно значимо отличались от полученных в опытах с менее разбавленными сточными водами и не отличались от контрольного значения ($P > 0.05$). Этот факт свидетельствует об эффективности разбавления сточной воды для снижения ее токсических свойств при экспозиции 24,0 и 96,0 часов.

Установлена прямая зависимость мутагенности сточных вод от степени их разбавления. Вместе с тем, несмотря на снижение суммарной мутагенной активности при разбавлении сточных вод, их способность индуцировать морфологические мутации остается высокой.

Сопоставляя величину токсичного и мутагенного действия сточных вод, прошедших все этапы очистки на предприятиях ЦБП, в зависимости от степени их разбавления, можно прийти к заключению: чем выше токсичность разбавленных сточных вод, тем чаще в популяции *D. magna* Str. появляются индуцированные сублетальные мутанты. Но при этом обнаруживается интересная особенность, которая проявляется в том, что если разбавленные сточные воды не обладают токсичностью, то мутагенность, хотя и слабая, всё же еще сохраняется. Вследствие этого лимитирующим показателем вредности следует признать мутагенность. Принимая во внимание допустимую степень генотоксической активности, по-видимому следует считать безопасными только сточные воды, разбавленные более чем в 100 раз.

Сточные воды, сформированные на стадии отбеливания целлюлозы, определяются как наиболее загрязненные органическими и минеральными веществами. В связи с этим в задачу наших исследований входило определение токсико-генетической активности сточных вод, образующихся после этапа отбеливания и поступающих в основной коллектор того же целлюлозно-бумажного комбината.

Уровни токсической активности сточных вод отбельного цеха представлены в таблице 2. Под действием сточных вод отбельного цеха погибло до 80,0 % опытных дафний. У выживших особей обнаруживали значительную стимуляцию плодовитости. Разбавление сточных вод отбельного цеха в два раза не снижало их токсичности ни по одному из показателей. И только стократное разбавление этих сточных вод оказалось не токсичным для *D.magna Str.* в F_2 .

Таблица 2. Уровень токсикогенетической активности сточных вод отбельного цеха

Показатели генотоксичного действия		Степень разведения сточной воды				
		1:0	1:1	1:10	1:20	1:100
токсичность	коэффициент 1	26.7	30.0	2.0	1.7	1.3
	коэффициент 2	3.5	3.9	1.9	1.5	1.1
мутагенность		8.6	8.6	7.3	6.8	6.8
Специфичность мутагенного действия		индукция сублетальных и морфологических мутаций		индукция сублетальных мутаций	индукция летальных мутаций	
Степень выраженности эффекта действия		чрезвычайно токсичные со слабой мутагенностью		умереннотоксичные со слабой мутагенностью		слабомутагенное
Лимитирующий показатель вредности		мутагенность				

Сточные воды с этапа отбеливания целлюлозы проявляли генетическую активность в отношении тест-объекта ($P < 0,05$). Частота появления сублетальных мутаций в опытных вариантах с неразбавленными сточными водами и с разбавлениями от 1:1 до 1:10 достоверно выше контрольного значения. Во всех опытных вариантах обнаруживаются летальные мутанты. Морфологические мутации индуцировались неразбавленными и мало разбавленными (1:1) сточными водами с этапа отбеливания целлюлозы. Таким образом, по способности индуцировать генетические нарушения в наследственном аппарате гидробионтов сточные воды отбельного цеха следует рассматривать как слабые мутагены.

Заканчивая свою статью, хочу подчеркнуть, что разработанный нами способ хорошо зарекомендовал себя не только при изучении разных вариантов сточных вод, но и при исследовании отдельных химических компонентов, а также природных вод, подвергающихся постоянному антропогенному воздействию. Способ дает возможность оценивать уровень токсической и мутагенной активности промышленных загрязнителей, циркулирующих в водной среде, по комплексу количественных показателей; предложены критерии, позволяющие характеризовать уровень токсико-генетической активности исследуемых загрязнителей, позволяющие ранжировать их по уровню выраженности эффекта действия, выделяя специфичность повреждающего действия в отношении тест-объекта.

Вместе с тем, рассматриваемый в токсикогенетический метод исследования ни в коей мере не претендует на универсальность. Однако, экспериментальные данные, полученные на его основе, позволяют сформулировать и реализовать принцип этапного планирования работ, а также возможность определения объема генотоксического тестирования в системе токсиколого-гигиенических исследований.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В ПЕЧЕНИ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ АКВАТОРИЙ

И.И. Дорохова

Институт биологии южных морей, г. Севастополь, Украина, mirenri@bk.ru

В настоящее время вопросы старения гидробионтов являются одними из наиболее актуальных. Негативное влияние среды усугубляет угасающие процессы стареющих организмов, приводит к преждевременному истощению защитных и запасных резервов более молодых особей, тем самым ускоряя процессы наступления старости или даже смерти.

Известно, что показатели белкового обмена для рыб более информативны нежели липидного, а печень является важным органом, отвечающим не только за детоксикацию ксенобиотиков, но и за поддержание многих функций организма, обеспечивающих его нормальное функционирование. В связи с этим целью данного исследования является изучение возрастной динамики активности аминотрансфераз в печени массовых черноморских видов рыб, обитающих в двух акваториях с различным уровнем антропогенной нагрузки.

Материалом исследования служила печень 4 видов черноморских рыб скорпены (*Scorpaena porcus* (L.)), султанки (*Mullus barbatus* (Essipov)), спикары (*Spicara flexuosa* (Rafinesque)), ставриды средиземноморской (*Trachurus mediterraneus* (Staindachner)). Рыб отлавливали в двух бухтах в районе Севастополя с различным экологическим статусом. Наиболее загрязненной по качеству воды, грунтов и гидробионтов является б. Александровская (Кузьминова, 2010; Скуратовская 2009). Рыб подвергали стандартному биологическому анализу. Гомогенат печени готовили на холоду с добавлением 3 мл физиологического раствора, центрифугировали и использовали супернатант для дальнейших исследований. Активность аминотрансфераз устанавливали по методу Райтмана-Френкеля, а концентрацию белка в пробе - по методу Лоури (Чиркин, 2002). Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

Данные об активности аминотрансфераз в печени морского ерша разных возрастов из б. Карантинная и Александровская представлены на рисунке 1.

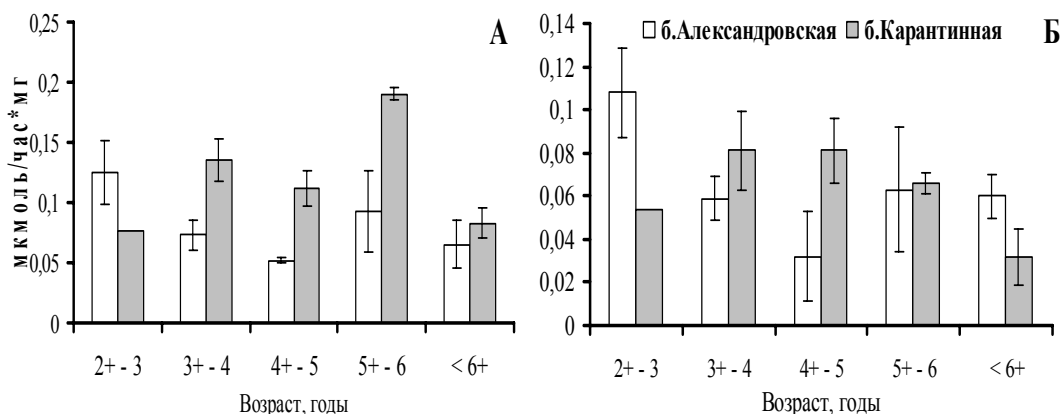


Рис. 1. Активность аминотрансфераз в печени морского ерша разных возрастных групп, обитающего в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки (А – активность АлАт, Б – активность АсАт).

Для рыб в возрасте от 3+ до 6 лет установлен в два раза более высокий уровень активности АлАт в печени особей из б. Карантинная ($p < 0,05$). Для АсАт выявлена аналогичная тенденция. Наиболее выражены изменения в группе 4+ - 5 лет. У рыб более старшей возрастной группы отмечена иная закономерность: активность АлАт по-прежнему выше у ерша из б. Карантинная, в то время как активность АсАт достоверно возрастает у рыб из б. Александровская ($p < 0,05$).

На рисунке 2 представлены данные об активности аминотрансфераз в печени разновозрастных особей султанки из двух исследуемых бухт.

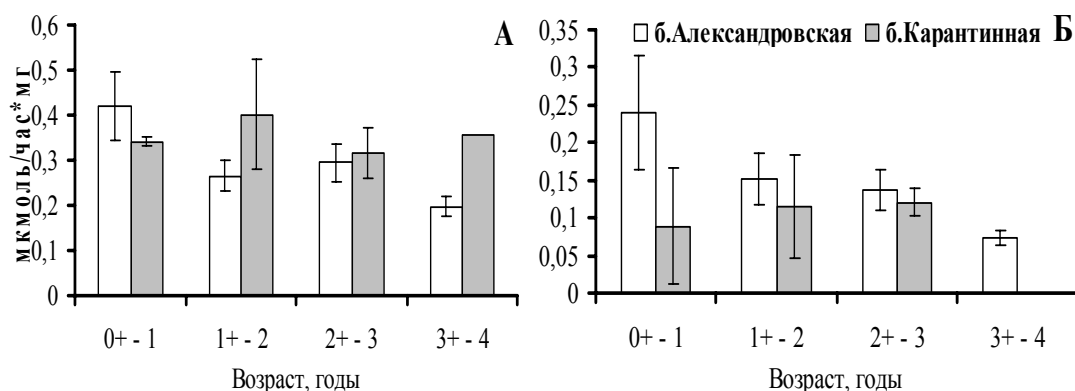


Рис. 2. Активность аминотрансфераз в печени султанки разных возрастных групп, обитающей в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки (А – активность АлАт, Б – активность АсАт).

Достоверных отличий активности аминотрансфераз в печени рыб из двух бухт не установлено ни для одной из исследованных возрастных групп. Однако следует отметить, что уровень активности АлАт в печени разновозрастных рыб был выше в б. Карантинная, в то время как активность АсАт - в б. Александровская.

Данные об изменении активности аминотрансфераз в печени спикары разных возрастов из бухт с различным антропогенным прессингом представлены на рисунке 3.

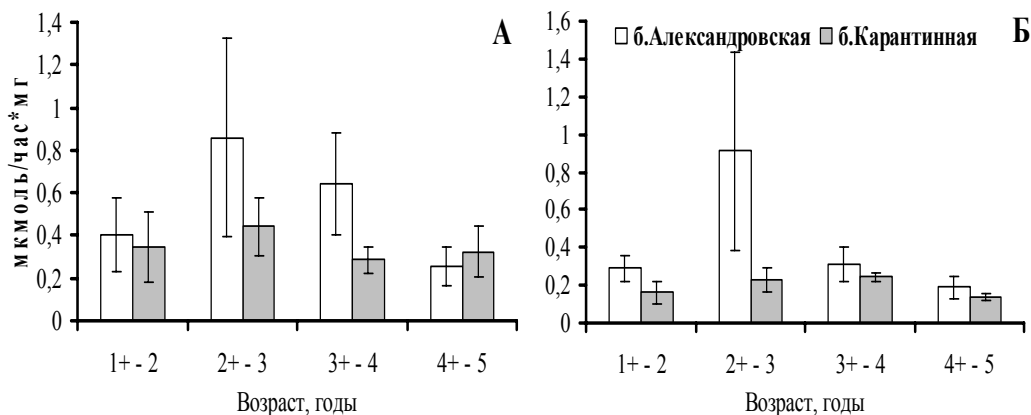


Рис. 3. Активность аминотрансфераз в печени спикары разных возрастных групп, обитающей в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки (А – активность АлАт, Б – активность АсАт).

Для всех исследованных возрастных групп (исключение 4+ - 5 лет для АлАт) установлен более высокий уровень активности аминотрансфераз в печени рыб в б. Александровская. Различия достоверны для АлАт в возрастной группе 3+ - 4 и АсАт в группе 2+ - 3 года ($p < 0,05$). Выявлено также, что показатели активности обои ферментов у рыб из в б. Александровская варьируют значительно сильнее, нежели в б. Карантинная в пределах одновозрастных групп.

На рис. 4 представлены возрастные изменения активности аминотрансфераз в печени ставриды.

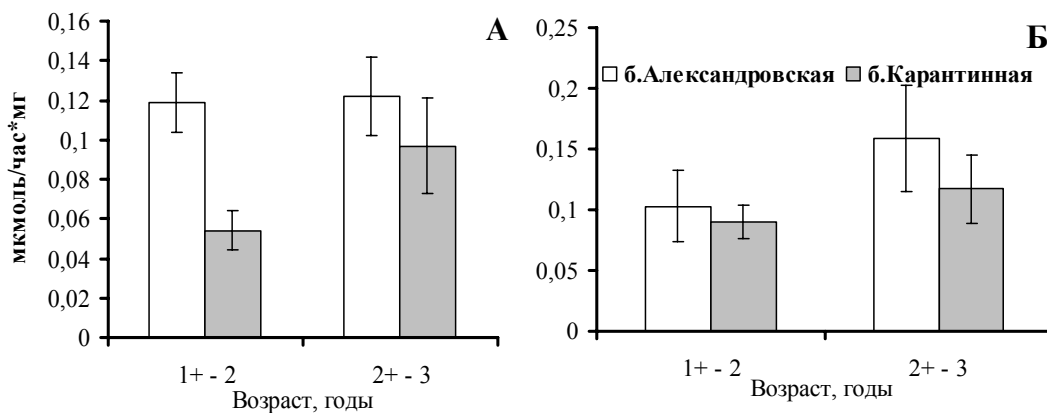


Рис. 4. Активность аминотрансфераз в печени ставриды разных возрастных групп, обитающей в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки (А – активность АлАт, Б – активность АсАт).

Для двух исследованных возрастных групп ставриды отмечен более высокий уровень активности АлАт и АсАт в б. Александровская. Особенно выражено увеличение активности АлАт в б. Александровская для особей из группы 1+ - 2 года. Активность АлАт в печени рыб из данного района более чем вдвое выше таковой у рыб из б. Карантинная. В то же время значения активности АсАт в печени рыб из двух районов близки.

Значения коэффициента де Ритиса в печени черноморских рыб из б. Карантинная и Александровская меняются не однозначно (рис. 5). Так для морского ерша характер возрастных изменений данного показателя практически одинаков, хотя у рыб из б. Карантинной коэффициент де Ритиса выше такового у рыб из б. Александровская для всех возрастных групп.

В обеих бухтах отмечено увеличение коэффициент де Ритиса у рыб группы 3+ - 4, что, по-видимому, связано с половым созреванием и модификацией функционирования печени, реорганизацией белкового обмена, и. как следствие, изменением активности аминотрансфераз.

Затем отмечается спад значения коэффициента де Ритиса и последующее возрастание у старших возрастных групп в обоих исследуемых районах.

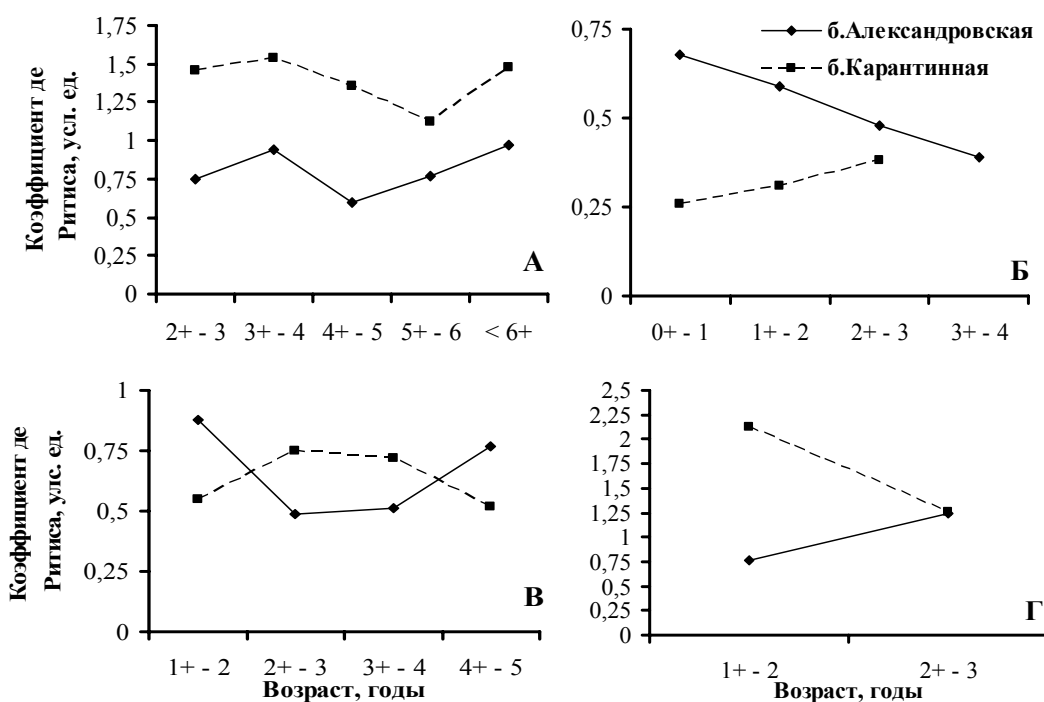


Рис. 5. Коэффициент де Ритиса в печени черноморских рыб разных возрастных групп, обитающих в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки (А – морской ерш, Б – султанка, В – спикара, Г - ставрида).

Максимальное значение коэффициента де Ритиса у спикары из б. Александровская установлено для младшей возрастной группы, и затем данный показатель снижается с возрастом. У рыб из б. Карантинная обнаружена обратная тенденция: минимальные значения у особей младшей возрастной группы и последующее возрастание у более взрослых. В отличие от морского ерша коэффициент де Ритиса выше у рыб из б. Александровская.

Интересная динамика коэффициента де Ритиса установлена для спикары и, как и в случае с султанкой, она характеризуется противоположными изменениями в двух районах исследования. В б. Александровской у младшевозрастных рыб данный показатель максимален, затем у рыб 2-4 лет его значения снижаются, а у более взрослых снова возрастают. В б. Карантинная, напротив, минимальные значения у самых молодых и самых старых рыб, у 2-4-летних особей установлено возрастание коэффициента де Ритиса.

Спикара – вид, обладающий способностью менять пол в возрасте 3-4 лет (Салехова, 1979), возможно характер полученных изменений коэффициента де Ритиса связан с различиями в прохождении данного процесса в двух исследуемых районах. Известно, что не только естественные причины могут приводить к смене пола у рыб. В морской среде существует множество так называемых *hormonal disruptors* – гормональных химических соединений, источниками которых могут быть как растения (фитоэстрогены), так и вещества антропогенного происхождения (синтетические стероиды, ПХБ, пестициды), которые могут индуцировать процессы синтеза женских гормонов в организмах самцов или сами выполнять их роль (Харрис, 2010, Чеунг, 2008).

С другой стороны, гипоксия также оказывает влияние на половой состав популяций. Так, при концентрации кислорода $1,5 \pm 0,1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ (в норме $5,8 \pm 0,1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) после 90 дней инкубации 54% генотипических самок китайской медяки *Oryzias latipes* имели развивающиеся семенники и 77% проявляли фенотипические признаки самцов (Чеунг, 2008).

Как и у предыдущих 2-х видов в печени ставриды установлено противоположное изменение исследуемого показателя с возрастом. Однако в отличие от султанки коэффициент де Ритиса возрастает у более взрослых особей из б. Александровская и снижается у рыб из б. Карантинная. Следует отметить, что у ставриды из группы 1+ - 2 года из б. Карантинная значения коэффициента де Ритиса в 3 раза выше такового у рыб из б. Александровская, а у особей группы 2+ - 3 показатели в обеих бухтах становятся практически равны.

Полученные результаты показали видовую специфичность возрастных изменений активности аминотрансфераз в печени 4х видов черноморских рыб. Но наряду с возрастом существенный вклад в функционирование печени на всех жизненных этапах оказывает антропогенное воздействие. По-видимому, наиболее уязвимыми оказываются молодые особи (особенно придонно-пелагических и пелагических видов), с возрастом же наблюдается некоторая адаптация к негативным факторам, однако с другой стороны происходит снижение интенсивности всех биологических процессов, в том числе и процессов трансаминирования.

Таким образом, изучение влияния антропогенной нагрузки на некоторые биохимические показатели печени у разновозрастных рыб позволило установить следующее:

1. В печени донного вида (морского ерша) уровень активности аминотрансфераз выше у рыб из б. Карантинная, для придонного (султанки) – АлАт в б. Карантинная, а АсАт в б. Александровская, а для придонно-пелагического и пелагического (спикары и ставриды) – выше в б. Александровская.

2. Возрастные изменения активности аминотрансфераз в печени морского ерша из двух районов неоднозначны. В печени спикары и султанки в б. Александровская отмечено снижение активности обоих ферментов и АсАТ в печени спикары из б. Карантинная. У ставриды установлено возрастание активности АлАт у более взрослых особей из б. Карантинная.

3. Коэффициент де Ритиса в печени скорпены имеет одинаковую тенденцию изменений с возрастом, хотя у рыб из б. Карантинная он выше такового у особей из б. Александровская. В печени султанки и ставриды выявлена общая закономерность изменений коэффициента де Ритиса: между молодыми особями из двух бухт обнаружены значительные различия, однако у более старых возрастных групп наблюдается сближение значений данного показателя. У спикары из двух районов коэффициент де Ритиса меняется разнонаправленно.

Список литературы.

Кузьмина Н.С. Популяционные, морфофизиологические и биохимические показатели спикары *Spicara flexuosa* (Rafinesque) в современный период /Матер. V Муждунар. научно-практ. конф. «Человек и животные» (г. Астрахань, 14-16 мая 2010 г.) / сост.: М.В. Лозовская. – Астрахань: Астраханский государственный университет, издательский дом «Астраханский университет», 2010. – 195 с.

Лакин Г.Ф. Биометрия. / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – С. 352.

Практикум по биохимии: Учеб. пособие / А.А. Чиркин. – Мн.: Новое Знание, 2002. – 512 с. - (Медицинское образование).

Салехова Л.П. 1979. Смаридовые рыбы морей средиземноморского бассейна. Киев: Наукова думка. - 172 с.

Скуратовская Е.Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.04 / Скуратовская Екатирина Николаевна. – Севастополь, 2009. – 148 с.

The Consequences of Feminisation in Breeding Groups of Wild Fish. Catherine A. Harris, Patrick B. Hamilton, Tamsin J. Runnalls, Veronica Vinciotti, Alan Henshaw, Dave Hodgson, Tobias S. Coe, Susan Jobling, Charles R. Tyler, John P. Sumpter. Environmental Health Perspectives 2010; ePub ahead of print. doi:10.1289/ehp.1002555
Cheung Hin Ying. Effects of hypoxia on sex determination and differentiation in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) / Thesis (M.Phil.) - City University of Hong Kong, 2008.

ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАДМИЯ НА НЕКОТОРЫЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГОЛЫЦА УСАТОГО

Е.А. Заботкина¹, Е.А.Флерова²

¹ГУ РАН Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН,
152742, пос. Борок Некоузского р-на Ярославской обл., Россия; zabel@ibiw.yaroslavl.ru;

²ФГОУ ВПО Ярославская государственная сельскохозяйственная академия,
Ярославль, Россия; katarinum@mail.ru

Кадмий относят к одним из наиболее токсичных для рыб тяжелых металлов, содержание которого в природных пресных водах варьирует от 0.1 до 10 мг/л, в загрязненных - до 50 мг/л. ПДК металла для водоемов питьевого водоснабжения в России составляет 1 мкг/л, для рыбохозяйственных водоемов - 5 мкг/л. Ввиду высокой опасности этого элемента допустимая концентрация кадмия в рыбопродуктах, установленная в России - 0,1 мкг/кг (Моисеенко и др., 2006). Он легко связывается осадками, в результате чего его концентрация в воде за четверо суток

может снижаться на 80-90%, легко поглощается из илов и накапливается в теле бентических организмов, которые в свою очередь являются кормовой базой для многих рыб (Линник, Искра, 1997). Кадмий накапливается в тканях рыб в следующем порядке почка >печень >жабры и вызывает изменение поведенческих реакций, снижение темпа роста и уменьшение массы тела, относительной массы селезенки и почек, размеров печени и уровня гликогена в ней как у молоди, так и у взрослых рыб, а так же ингибирование отдельных процессов (Заботкина, Лапирова, 2003).

Кадмий вызывает заметные гематологические аномалии клеток красной крови: появление пенистых клеток, вакуолизацию и усиление базофильной зернистости цитоплазмы эритроцитов, повреждение клеточных мембран, обособление хроматина и вытеснение ядра из клеток, подавляет фагоцитарную реакцию лейкоцитов (Заботкина, Лапирова, 2003).

Цель данной работы – изучить влияние сублетальной концентрации кадмия на морфофизиологические и гематологические характеристики гольца усатого.

Эксперимент проводили на половозрелых особях, которых после акклимации по 20 особей содержали в 50 литровых аэрируемых пластиковых аквариумах при ежедневном кормлении. Концентрацию токсиканта (50 мкг/дм³ (0.002 от LC₅₀)) в опытной группе поддерживали на постоянном уровне сменой воды раз в 2 дня. Контрольную группу рыб содержали в отстоянной водопроводной воде. Отбор проб проводили через 7, 14, 21 и 28 сут.

Анализ соотношения лейкоцитов и эритроцитов проводили на мазках периферической крови и мазках-отпечатках почки, селезенки и печени, которые приготавливали по стандартной методике, окрашивали по Романовскому – Гимза и просматривали под световым микроскопом Keyence VMX-1000E. Подсчитывали 200 клеток белой крови, выделяя следующие типы: гемоцитобласты, лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги, миелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы.

Для анализа отклонения в гематологических параметрах высчитывали индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ):
$$ИСЛ = \frac{\text{Гранулоциты}}{\text{Агранулоциты}}$$
 (Житенева и др., 2004).

Оценивали генотоксичность кадмия по микроядерному тесту и влияние его на способность нейтрофилов гольца к фагоцитозу по НСТ-тесту (Заботкина, 2007).

Результаты исследования показали, что данная концентрация ионов кадмия оказала влияние на некоторые показатели клеток как красной, так и белой крови. Не обнаружено достоверного изменения в относительном содержании тромбоцитов периферической крови, соотношении эритроцитов различной стадии зрелости, количестве амитозов и безъядерных клеток. Вместе с тем, количество микроядер в эритроцитах крови к концу эксперимента увеличилось в 3.5 раза с 2.6 до 8.5‰.

Соотношение лейкоцитов в крови и органах изменялось сходным образом (Рис. 1).

В первую очередь это выразилось в лимфопении и нейтрофилии. Рис. 1 показывает, что у гольца на всех сроках экспозиции произошло достоверное снижение доли лимфоцитов и увеличение таковых макрофагов и гранулоцитов. Под действием токсиканта увеличилась доля гемоцитобластов и несколько уменьшилась доля незрелых форм нейтрофилов. Доля плазматических клеток в почках в течение всего эксперимента была выше контрольных значений.

Для количественной оценки степени отклонения гематологических параметров использовали индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ, Табл.). Из таблицы видно, что через 7 сут наиболее сильно ИСЛ изменялся в периферической крови и печени (в 2.5 и 4 раза соответственно), тогда как в почках и селезенке он повышался в 1.5 – 2 раза. На 14 сут опыта ИСЛ оставался на прежнем уровне в крови и селезенке, в головном и туловищном отделе почек изменялся разнонаправлено, тогда как в печени двукратно снижался. К 28 сут экспозиции ИСЛ снизился во всех органах, но оставался выше контрольного уровня.

Таблица. Индекс сдвига лейкоцитов в периферической крови и органах под влиянием ионов кадмия

Орган		Периферическая кровь	Головной отдел почек	Туловищный отдел почек	Селезенка	Печень
Срок экспозиции						
Контроль		0.13	0.65	0.67	0.12	0.11
Опыт	7 сут.	0.31	0.93	0.97	0.24	0.46
	14 сут.	0.32	0.86	1.12	0.22	0.24
	21 сут.	0.26	0.89	0.90	0.20	0.16
	28 сут.	0.22	0.81	0.83	0.16	0.19

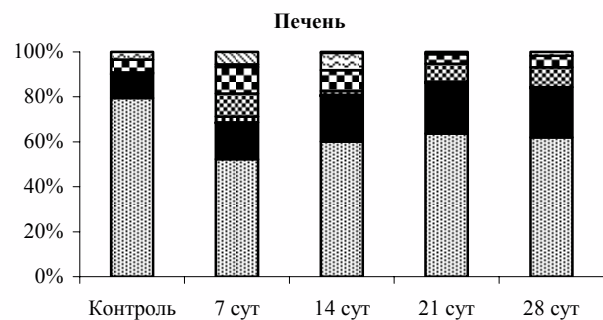
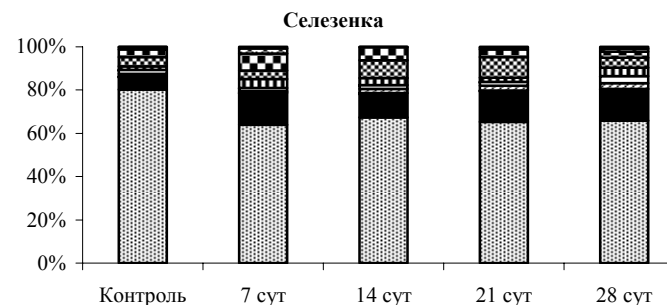
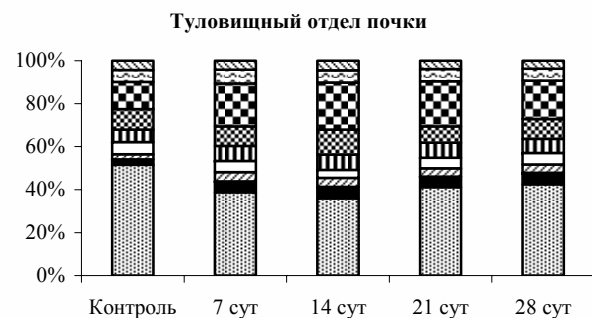
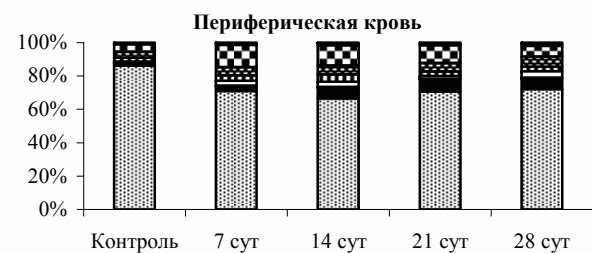


Рис. 1. Изменение лейкограмм периферической крови, почек, селезенки и печени гольца под действием ионов кадмия

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов гольца по результатам НСТ-теста показало, что данная концентрация ионов кадмия оказала достоверное стимулирующее влияние как на долю клеток, способных поглощать частицы, так и на способность клеток к производству активных форм кислорода (Рис. 2).

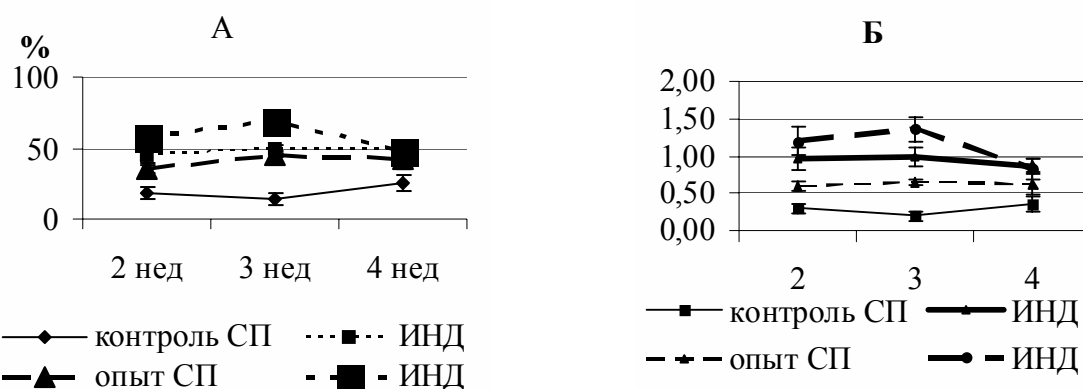


Рис. 2. Изменение физиологических показателей нейтрофилов периферической крови гольца по данным НСТ-теста. А - доля активированных нейтрофилов (ДАН, %); Б – индекс активности нейтрофилов (ИАН, усл. ед.). По оси X указаны сроки отбора проб.

Таким образом, сублетальная концентрация ионов кадмия оказала генотоксичное влияние на клетки красной крови, а также неспецифическое токсическое действие на лимфо-миелоидную ткань органов гольца. Колебания соотношения лейкоцитов в органах и периферической крови, по-видимому, могут быть связаны с перераспределением клеток между органами и кровью и свидетельствуют об изменении темпов кроветворения и направленности процессов клеточной дифференцировки в сторону усиления миелопоэза и подавления лимфопоэза при хроническом действии токсикантов. Следует отметить, что изменение соотношения лейкоцитов, выявленное в данном исследовании, ранее было показано при действии различных по химической природе токсикантов на многие виды рыб (Заботкина, Лапирова, 2003). Увеличение ИСЛ относительно контроля в течение эксперимента свидетельствует об усилении гранулопоэза в органах, и, скорее всего, связано с развитием воспалительной реакции под действием ионов кадмия. Увеличение доли моноцитов/макрофагов как в крови, так и в органах позволяет предположить усиление утилизационных процессов в тканях и также подтверждает присутствие воспалительных процессов в органах.

Полученные результаты позволяют также сделать вывод о высокой чувствительности гольца к действию ионов кадмия и использовании его как индикаторного вида при биоиндикации загрязнений.

Список литературы

- Житенева Л. Д., Макаров Э. В., Рудницкая О. А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). Ростов н/Д: "Эверест", 2004. 312 с.
- Заботкина Е. А. Особенности функциональной активности лейкоцитов периферической крови костистых рыб // Мат-лы докл. Всеросс. научно-практической конф. «Проблемы иммунол., патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2». 2007. С. 23-27.
- Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние тяжелых металлов на иммуно-физиологический статус рыб (обзор) // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123, № 4. С. 411-418.
- Линник П.Н., Искра И.В. Кадмий в поверхностных водах: содержание, формы нахождения, токсическое действие// Гидробиологический журнал. 1997. Т. 33, № 6. С. 72-87.
- Моисеенко Т. И., Кудрявцева Л. П., Гашкина Н.А. Рассеянные элементы в поверхностных водах суши: технофильность, биоаккумуляция и экотоксикология / Институт водных проблем РАН.- М.: Наука, 2006. 261 с

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИТОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД

Д.В. Зейферт, Д.Т. Габбасова, Е.Ф.Гареева, Л.Г. Цыбина

ГОУ ВПО филиал Уфимского государственного нефтяного технического университета в г.
Стерлитамаке, 453118 Стерлитамак, пр. Октября, 2, Россия, dseifert@mail.ru

В экологическом мониторинге поверхностных вод в пространственном и временном разрешениях фиксируется динамика анализируемых показателей. В то же время число веществ-загрязнителей, способных влиять на экологическое состояние биоты, превысило миллион наименований, и ежегодно синтезируется свыше четверти миллиона новых веществ (Булгаков, 2003). Обеспечение адекватного осуществления мониторинговых исследований требует проведения анализа большого количества проб сложного химического состава на содержание тех или иных анализируемых компонентов. С развитием аналитической химии и выявлением новых факторов воздействия данный процесс становится все более затратным. На практике часты случаи, когда необходимое аналитическое оборудование недоступно. Необходимость отыскать оптимальное соотношение между массой анализов различных объектов как важного фактора обеспечения качества жизни человека и в то же время уменьшить экономические проблемы, связанные с этим, привела к развитию тест-методов химического анализа, включающих биологические тест-методы (биотестирование) (Золотов, 1993; Евгеньев, 1999). Кроме того, в результате преобразований в природной среде происходит синтез новых соединений, которые могут быть токсичнее исходных ингредиентов. Примерами таких веществ могут быть метилртуть, соединения тяжелых металлов с детергентами, пестицидами и т.д. Вредное действие физических, химических и других факторов при их комбинировании может ослабляться (антагонизм) или усиливаться (синергизм). Изолированного действия не существует, есть лишь совместное действие всего комплекса факторов (Маячкина, Чугунова, 2009).

В литературе метод биотестирования критикуется как плохо воспроизводимый и недостоверный, что, по мнению ряда авторов делает его непригодным для оценки окружающей среды, так как результаты исследований часто имеют значительный разброс (до 35%) при воспроизведении в разных лабораториях (основы экогеологии..., 2004). Действительно, высокая внутривидовая вариабельность живых организмов, играя важнейшую роль в межвидовых отношениях и выживаемости видов, является при проведении биотестирования существенной проблемой, требуя жестко контролируемых по температуре, фотопериоду и другим параметрам условий.

В биотестировании четко разграничиваются два подхода. С одной стороны в качестве тест-объекта используются организмы – обитатели тестируемых природных сред. С другой стороны используется ограниченное число универсальных биоиндикаторов (биосенсоров).

При токсикологической оценке окружающей среды широко используется фитотестирование (Обоснование класса..., 2007; Method Guidance..., 2000). В гигиеническом нормировании фитотоксичность отхода оценивается по биологическому действию его водного экстракта на интенсивность прорастания корней овса. Методика оценки общей токсичности стоков Агентства по охране окружающей среды (США) допускает использование различных тест-объектов, наряду с фитотестированием, и в качестве показателя токсичности описывается изменения анализируемого параметра при разных уровнях разведения тестируемого раствора (см рис. 1). Кресс-салат (*Lepidium sativum*) является из наиболее часто применяемых тест-объектов, используемых для биотестирования вод, донных отложений, почв, природных и техногенных субстратов, радиационного воздействия, воздействия синтезируемых химических веществ и их смесей (Зейферт, 2010). Нами предложена методика биотестирования поверхностных вод и стоков с использованием следующих параметров кресс-салата: всхожесть семян (VCH, в %), средняя длина проростков (L, в мм), средний сухой вес проростков (W, в мг). Исследования проводили по следующей методике: использовали неразбавленные воды и их растворы в двукратном, четырехкратном, восьмикратном и шестнадцатикратном разбавлениях в трех повторностях. Продолжительность опыта составляла семь дней. Проведенные исследования показали, что значимость данных параметров для разных сред может существенно меняться.

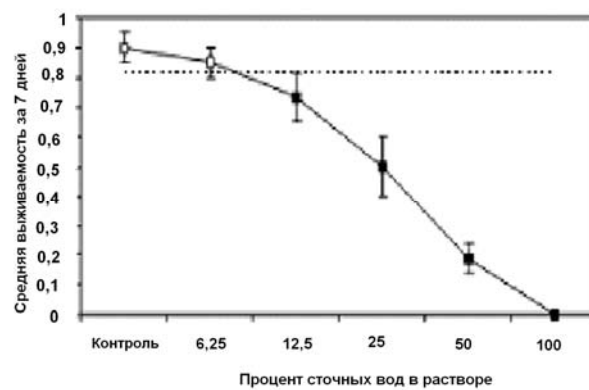


Рис. 1. Пример идеального изменения показателя тест-объекта при разведении тестируемого раствора [по: Method Guidance..., 2000]

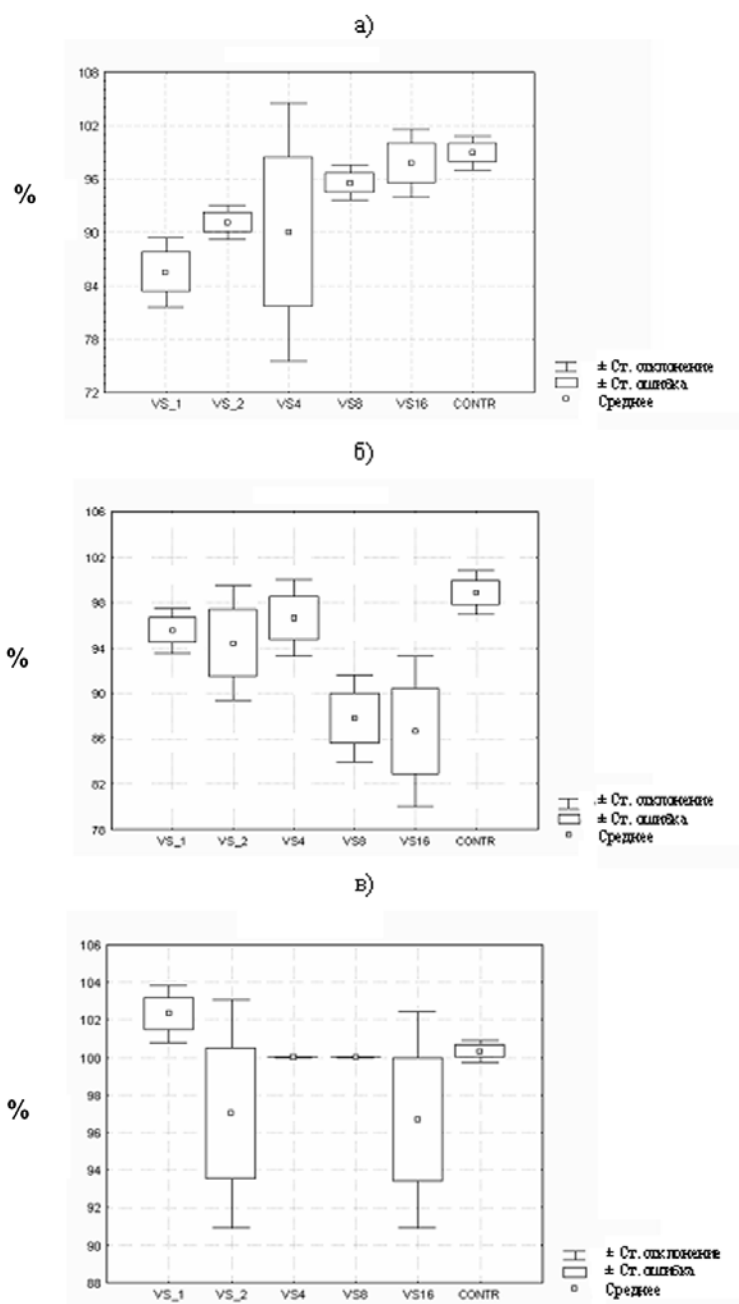


Рис. 2. Примеры различных типов изменения в схожести.

На рисунке 2 показаны три типа изменений в схожести при возрастании разбавления:

а) всхожесть достоверно возрастает при разбавлении. Примером такой зависимости является; б) всхожесть достоверно снижается при разбавлении. Такой характер зависимости наблюдается при фитотестировании эвтрофицированных сточных вод (Зейферт, 2010);

в) всхожесть при разбавлении не меняется. Подобный тип зависимости указывает, что данные тестируемые среды являются наименее токсичными.

В таблице 1 показан характер соотношения используемых параметров фитотоксичности для речной воды. При всех разбавлениях на среднюю длину проростков в речной воде достоверно положительно влияет содержание азота аммонийного (стимулирующий токсикологический эффект), что отражает последствия эвтрофикации вод.

Таблица 1. Зависимости между исследованными показателями фитотоксичности для речной воды

а) Матрица коэффициентов корреляции средней длины проростков при разных разбавлениях

	L ₁	L ₂	L ₄	L ₈	L ₁₆
L ₁	-	0,72*	0,77*	0,83*	0,73*
L ₂	0,72*	-	0,77*	0,63*	0,42
L ₄	0,77*	0,77*	-	0,66*	0,44
L ₈	0,83*	0,63*	0,66*	-	0,73*
L ₁₆	0,73*	0,42	0,44	0,73*	-

б) Матрица коэффициентов корреляции среднего веса проростков при разных разбавлениях

	W ₁	W ₂	W ₄	W ₈	W ₁₆
W ₁	-	0,20	0,40	0,72*	0,64*
W ₂	0,20	-	0,56*	0,18	0,43
W ₄	0,40	0,56*	-	0,42	0,78*
W ₈	0,72*	0,18	0,42	-	0,57*
W ₁₆	0,64*	0,43	0,78*	0,57*	-

в) Матрица коэффициентов корреляции всхожести проростков при разных разбавлениях

	VCH ₁	VCH ₂	VCH ₄	VCH ₈	VCH ₁₆
VCH ₁	-	0,03	0,49*	0,20	-0,10
VCH ₂	0,03	-	-0,01	-0,27	-0,27
VCH ₄	0,49*	-0,01	-	0,27	-0,05
VCH ₈	0,20	-0,27	0,27	-	0,20
VCH ₁₆	-0,10	-0,27	-0,05	0,20	-

На рисунке 3 приведены примеры изменений средней длины проростков при возрастании разбавления.

Фиксируются два типа изменений в средней длине проростков при возрастании разбавления:

а) средняя длина проростков достоверно возрастает при разбавлении;

б) средняя длина проростков при разбавлении не меняется.

Показано, средняя длина проростков у всех тестируемых сортов кресс-салата достоверно возрастает при снижении концентрации, несмотря на различия в средней длине проростков при разных концентрациях, (Зейферт и др., 2010).

Анализ динамики токсичности сточных вод ОАО «Стерлитамакский нефтехимический завод» показал перспективность подобного подхода (Зейферт, 2009). Результаты экологического нормирования уровня загрязнения среднего течения р. Белой (Зейферт и др., 1991) показывают соответствие результатам биотестирования.

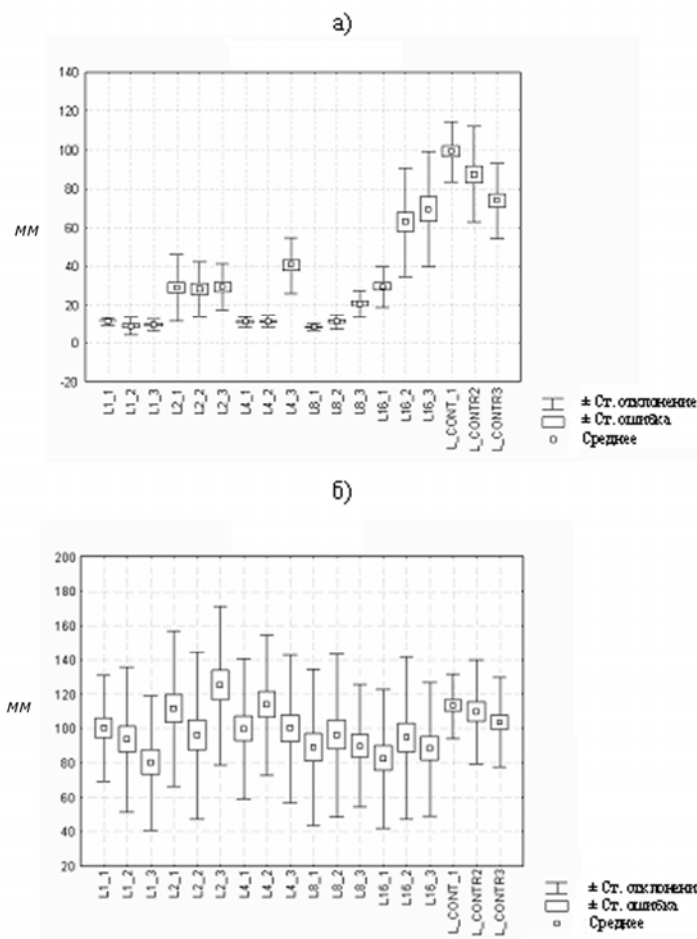


Рис. 3. Примеры различных типов изменения средней длины.

Список литературы

- Булгаков Н.Г. Контроль природной среды как совокупность методов биоиндикации, экологической диагностики и нормирования // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов: Обзорная информация. ВИНТИ. 2003. № 4. С. 33–70.
- Евгеньев М. И. Тест-методы и экология // Соросовский образовательный журнал, 1999. - № 11. - с. 29-34.
- Зейферт Д.В. Связь экологической токсичности сточных вод промышленных предприятий с их химическим составом // Экологические нормы, правила, информация, 2009. -№ 9. – с. 40-44.
- Зейферт Д.В. Использование кресс-салата как тест объекта при оценке токсичности природных и сточных вод Стерлитамакского промузла // Башкирский экологический вестник, 2010.- №2, - с. 39-50.
- Зейферт Д.В., Петров С.С., Рудаков К.М. Экологические модификации фитоценозов высших водных растений в среднем течении р. Белой под воздействием антропогенного загрязнения // Экологические модификации и критерии экологического нормирования. Л.: Гидрометеиздат, 1991. - с. 198-212.
- Зейферт Д.В., Цыбина Л.Г., Халикова Р.Ю. Оценка различий в чувствительности различных сортов кресс-салата к действию ионов кадмия // Экологические нормы, правила, информация, 2010. -№ 9. – с. 30-31.
- Золотов Ю.А. Аналитическая химия: логика развития в 50-90-е годы // Журнал аналитической химии, 1993.- Т. 48. - № 7. – с. 1116-1126.
- Маячкина, Н.В. Чугунова М.В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, Сер. Биол., 2009, № 1. -с. 84–93.
- МР 2.1.7.2297-07 Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности.
- Основы экогеологии, биоиндикации и биотестирования водных экосистем: Учеб. пособие. / Под ред. В.В. Куриленко. СПб.: Изд-во СПбГУ. 2004. 448 с.
- Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136) // United States Environmental Protection Agency, 2000.

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РЫБ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ХИМИЧЕСКИМИ И ФИЗИЧЕСКИМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ

Ю.Г. Изюмов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
п. Борок Некоузского р-на Ярославской обл., Россия, izum@ibiw.yaroslavl.ru*

Изучая внутривидовую и межвидовую морфологическую изменчивость рыб, мы обнаруживаем только ту её часть, которая реализуется в данных условиях обитания. Причины этого состоят в канализованности онтогенеза и отсеивании отбором всего лишнего и неподходящего для данной ситуации. Некоторую часть скрытой изменчивости можно обнаружить, изучая популяции, живущие в антропогенно загрязнённых условиях (Яколев, 1991, Изюмов и др. 1998, Чеботарева, Изюмов, 2001). Однако, и в этих случаях часть изменчивости останется скрытой по причинам, приведённым выше. Просто иными будут траектории развития и иное направление примет вектор отбора. Мы полагаем, что обнаружить значительную часть скрытой изменчивости можно в эксперименте, воздействуя различными агентами на ранние этапы развития. При этом воздействие должно быть как можно более мягким, не приводящим к гибели большей части подопытного материала. После воздействия подопытный материал следует содержать в возможно более «тепличных» условиях, чтобы отбор оставил большинство особей с реализованной изменчивостью. В данном сообщении приведены некоторые результаты, полученные при соблюдении перечисленных условий. На рис. приводятся распределения по числу позвонков у плотвы из природных популяций и полученное экспериментально. В опыте икра плотвы из локальной популяции Рыбинского водохранилища инкубировалась в растворе хлорофоса концентрации $1 \cdot 10^{-12}$ мол/л. Видно, что экспериментально полученное распределение (3) шире не только распределения для Рыбинского водохранилища в целом (1), но и шире видовой нормы реакции (2).

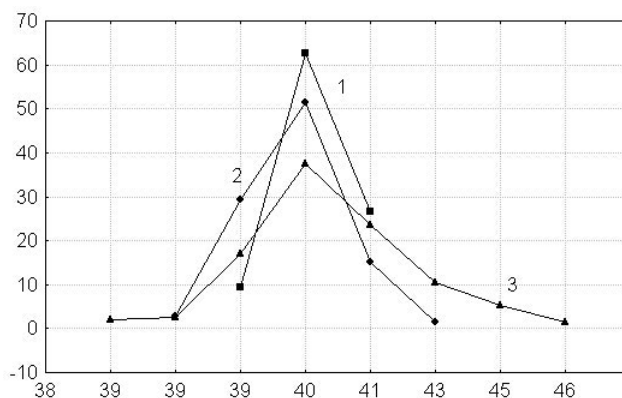


Рис. Распределения числа позвонков у плотвы в природе и эксперименте. 1 - плотва Рыбинского водохранилища; 2 - плотва в ареале; 3 - данные эксперимента

Можно полагать, что плотва обладает значительным запасом изменчивости по данному признаку. Поскольку изменчивость по числу позвонков у рыб имеет отчётливо адаптивный характер, мы вправе ожидать от плотвы большого адаптационного потенциала. Не все рыбы из изученных нами в природе и опыте демонстрируют столь же широкий спектр потенциальной изменчивости, как плотва. Например, у леща нам не удалось в опытах с химическими и физическими воздействиями получить результаты, аналогичные полученным на плотве. Возможно, этот вид более консервативен, чем плотва или адаптируется иными способами.

Приведённые данные относятся к «чистым» представителям видов, когда изменчивость не осложнена гибридизацией. В природе, однако, не редки случаи гибридизации рыб, но обнаружить вклад гибридизации в изменчивость популяций удаётся не всегда. Подтверждением этого могут служить результаты экспериментов, приведённые ниже. На нерестилище Рыбинского водохранилища в разгар нереста леща были взяты текущие самка и самец. По внешним таксономическим признакам оба производителя в точности соответствовали диагнозу леща. Затем, на экспериментальной базе, икра самки была осеменена спермой самца и разделена на 3 части для последующей инкубации. Первая часть икры инкубировалась в естественной речной воде с pH 8.0

– 8.2, вторая в речной воде с рН, доведённым до 7.0, третья – в воде с рН 5.5. Полученных личинок высадили в пруды, где они росли до осени, затем у сеголеток проанализировали изменчивость морфологических признаков. Результаты приведены в таблицах. По данным таблицы 1 можно сказать, что инкубация икры в кислой среде привела к снижению числа лучей в плавниках и числа позвонков, а инкубация в нейтральной среде понизила только число позвонков.

Таблица 1. Число лучей в спинном (D) и анальном (A) плавниках, число позвонков (Vert) в у сеголеток в вариантах опыта

pH	D	A	Vert	n
8.0 – 8.2	9.00±0.03	25.29±0.14	43.64±0.08	59
7.0	8.98± 0.02	25.63± 0.16	43.23± 0.07	60
5.5	8.76± 0.06	24.70± 0.22	43.40± 0.12	50

Другой признак – изменчивость формулы глоточных зубов показал более разительные результаты (табл.2). Половина сеголеток третьей группы имела двурядные глоточные зубы, причём у многих формула глоточных зубов в точности повторяла характерную для густеры (2.5-5.2), а не для леща. По нашим наблюдениям, в популяциях леща особи с двурядными глоточными зубами встречаются практически повсеместно, но не в таком количестве, как в нашем эксперименте и никогда не имеют глоточные зубы формулы 2.5-5.2.

Таблица 2. Встречаемость (%%) рыб с различной формулой глоточных зубов в вариантах опыта

pH	Формула глоточных зубов					
	5-5	5-5.1	1.5-5.1	2.5-5.1	1.5-5.2	2.5-5.2
8.0 – 8.2	98.3	1.7	-	-	-	-
7.0	100,0	-	-	-	-	-
5.5	48.0	2.0	2.0	6.0	12.0	30.0

Кроме того, многомерный анализ изменчивости групп показал, что сеголетки групп 1 и 2 представляют собой гомогенные множества, в то время как сеголетки группы 3 делятся на 3 подгруппы. Средние значения признаков этих подгрупп приведены в таблице 3. В этой же таблице даны средние значения этих же признаков для леща и густеры Рыбинского водохранилища. Сеголетки подгруппы 1 отличаются от остальных меньшей длиной (l), а по счётным признакам явно тяготеют к видовым признакам густеры. Сеголетки подгруппы 2 крупнее и не отличимы по счётным признакам не отличимы от леща. Наконец, рыбы третьей подгруппы занимают промежуточное положение между двумя первыми. Понятно, что не следует трактовать результаты данного эксперимента как получение густеры из леща путём закисления. Вероятно, один из использованных нами производителей представлял собой гибрид густеры с лещём или леща с густерой в каком-либо поколении. В обычных условиях не происходит реализации всей потенциальной изменчивости такого сочетания геномов. Однако, при смещении условий развития за пределы оптимума значительная часть её реализуется.

Таблица 3. Значения признаков в подгруппах группы 3, леща и густеры

Признак	Подгруппа, вид				
	1	2	3	Лещ	Густера
l	35.7± 07	50.2±0.6	46.18±1.4	-	-
D	8.00	9.00	9.00±0.07	9,03±0,02	8,02±0,04
A	22.63±0.15	25.91±0.19	25.00±0.27	25,11±0,08	21,25±0,22
Vert	42.72±0.15	43.88±0.12	43.43± 0.23	43,88±0,04	40,79±0,17
Глоточные зубы	2.5-5.2	5-5	2.5-5.2, 5-5.1, 1.5-5.1, 2.5-5.1, 1.5-5.2, 5-5	5-5, 5-5.1, 1.5-5.1	2.5-5.2, 2.5-5.1, 1.5-5.2

В целом, мы считаем, что предложенный подход экспериментального изучения потенциальной изменчивости видов, гибридов и популяций может быть использован при составлении эволюционного прогноза состояния антропогенно изменяемых экосистем.

Список литературы.

Изымов Ю.Г., Таликина М.Г., Касьянов А.Н., Касьянова Н.В., Папченкова Г.А. Антропогенная микроэволюция плотвы Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища// Вопросы ихтиологии. 1998. № 5. с. 704-708.

Чеботарева Ю.В., Изымов Ю.Г. Морфологическая изменчивость, флуктуирующая асимметрия и частота микроядер в эритроцитах периферической крови у серебряного карася *Carassius auratus gibelio* (Bloch) (Cyprinidae, Cypriniiformes) из пруда-отстойника бытовых стоков// Вопросы ихтиологии. 2001 № 2. с. 283 -285.

Яковлев В.Н. "Индустриальная раса" плотвы // Зоологический журнал. 1992. № 6. с. 81-85.

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У РЫБ ИЗ ЭСТУАРНОЙ ЗОНЫ РЕКИ РАЗДОЛЬНАЯ (ПРИМОРСКИЙ КРАЙ)

С.А. Ирейкина, О.Н. Лукьянова

*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр),
Владивосток, Россия, ir_lana@live.ru*

Существование и жизнедеятельность водных организмов, в том числе и рыб, в большой степени зависят от качества среды обитания. Если в открытых районах морей и океанов условия достаточно стабильны, то в прибрежных и эстуарных зонах они подвержены значительным колебаниям. Рыбы испытывают воздействие меняющейся внешней среды на протяжении всего онтогенеза. За последние десятилетия к обычным воздействиям на рыб, таким как изменения температуры, растворенного кислорода, pH и др., добавились токсичные вещества – нефть и продукты ее переработки, пестициды, детергенты, тяжелые металлы, органические соединения сточных вод и др. Рыбы широко используются в современных программах мониторинга, поскольку они, как и другие водные организмы, чувствительны к нарушению химического состава среды. Особенности физиологии и биохимии питания и дыхания рыб делают их удобными объектами исследований, позволяющими установить степень влияния на организм различных факторов, в том числе токсикантов. Рыбы интегрируют неблагоприятные эффекты комплекса различных воздействий, имеют достаточно большие размеры и продолжительность жизни, обладают резистентностью к сублетальным концентрациям загрязняющих веществ и, следовательно, могут быть использованы для прогноза различного рода воздействий на водные экосистемы и здоровье человека, употребляющего эту рыбу в пищу (Кашулин и др., 1999).

Река Раздольная, впадающая в залив Петра Великого Японского моря, имеет важное промышленное и сельскохозяйственное значение для южного Приморья. В реке постоянно ведется промысловый и любительский лов рыбы. При впадении в море река образует широкий, протяженный эстуарий (примерно 25 км). Большую экологическую опасность представляет загрязнение речных вод из-за хозяйственной деятельности, в том числе на территории Китая, где Раздольная берет начало. Вследствие замедления скоростей течения и приливных явлений в устье реки создаются условия для задержки и накопления загрязняющих веществ.

Эколого-биохимическая изменчивость основных систематических групп гидробионтов определяет их разную чувствительность к действию неблагоприятных факторов. Важно выбрать из каждого таксона наиболее чувствительные и распространенные виды, занимающие определенные и значимые для водоема экологические ниши. Это заключение основано на результатах многих исследователей о вариабельности содержания в органах рыб липидов, аминокислот, активности ферментов и пр. (Высоцкая и др., 2000). Сравнение близких и далеких по филогении видов, обитающих в сходных экологических условиях, может оказаться полезным для понимания причин, вызывающих вариабельность биохимических показателей. На формирование биохимического статуса и метаболизма любого организма влияют как генетические особенности таксона, к которому относится вид, так и специфические биохимические адаптации данного вида к конкретным условиям среды. Различить оба компонента и понять их роль в обеспечении

биохимической чувствительности и устойчивости организма к факторам внешней среды можно, используя именно сравнительно-биохимический подход.

Для оценки метаболических изменений у организмов в условиях загрязнения были использованы типичные представители эстуарной ихтиофауны - пиленгас *Liza haematocheila*, мелкочешуйная красноперка *Tribolodon brandtii*, серебряный карась *Carassius auratus gibelio*, лобан *Mugil japonicus* и амурский сазан *Cyprinus haematopterus*. Рыбы были выловлены в мае-июне 2009 г. в эстуарии реки Раздольная. Все эти виды нерестятся в летний период, питаются обрастаниями, детритом, донными беспозвоночными.

Определение молекулярных биомаркеров окислительного стресса у эстуарных рыб зал. Петра Великого ранее не проводилось. Действие неблагоприятных факторов различной природы, в том числе загрязняющих веществ, вызывает развитие в клетках животных неспецифической ответной реакции, связанной с биотрансформацией токсикантов и нейтрализацией свободных радикалов. В качестве молекулярных биомаркеров воздействия загрязнения у рыб были определены: активность фермента 2-й фазы биотрансформации глутатион-S-трансферазы (GST), активность антиоксидантного фермента каталазы, а также уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и концентрация восстановленного глутатиона (GSH). Для анализа использовали печень – орган, где происходят основные процессы детоксикации и биотрансформации органических поллютантов. Образцы гомогенизировали и центрифугировали. Супернатант использовали для спектрофотометрического определения содержания белка и других параметров по биохимическим методикам, описанным нами ранее (Алешко, Лукьянова, 2008).

Свободные радикалы в небольшом количестве образуются в ходе различных метаболических процессов, при окислении и биотрансформации многих эндогенных соединений – стероидных гормонов, простагландинов, витаминов, лейкотриенов и т.д. Поддержанием окислительного равновесия в клетках занимается антиоксидантная система, важным компонентом которой является трипептид глутатион.

Глутатион участвует в защитных реакциях клеток, так как обладает антиоксидантными свойствами и участвует в реакциях конъюгации при биотрансформации. В печени рыб из эстуария р. Раздольной наибольшее содержание глутатиона выявлено у сазана – 18 мкг/мг белка. У карася и красноперки его содержание было сходным – в среднем 4-5 мкг/мг белка. У лобана и пиленгаса содержание этого трипептида было значительно ниже – 2 и 1.8 мкг/мг белка соответственно (рис. 1). Диапазон значений в целом соответствует уровню глутатиона, обнаруженному нами ранее в печени морского вида - полосатой камбалы из Амурского залива. Повышенное содержание глутатиона у сазана может быть связано с большей зависимостью от кислорода особей данного вида и более активным протеканием окислительных процессов.

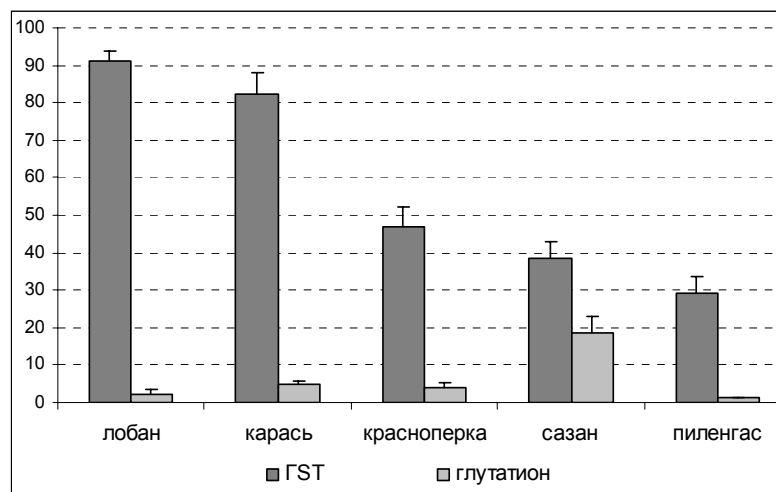


Рис. 1. Активность глутатион-S-трансферазы и уровень восстановленного глутатиона в печени рыб из эстуария реки Раздольная (N = 5). Единицы измерения: GST – нмоль/мин/мг белка; глутатион – мкг GSH/мг белка.

Глутатион, наряду с несколькими ферментами, образует глутатионовую систему, которая является мощным механизмом защиты организма от окислительного стресса. Эта система

включает ряд ферментов, в том числе глутатион-S-трансферазу. GST катализирует биотрансформацию гидрофобных субстратов за счет сульфгидрильных групп внутриклеточного глутатиона. В норме, используя глутатион в качестве промежуточного субстрата, фермент осуществляет перевод гидрофобных эндогенных стероидоподобных соединений в гидрофильные, которые затем подвергаются экскреции.

Базовый уровень GST у рыб значительно варьирует, особенности эстуарных видов пока не описаны. У рыб из эстуария р. Раздольной активность фермента была максимальной у лобана - 90, у карася 80, у красноперки и сазана 45 и 39 соответственно, у пиленгаса 30 нмоль/мин/мг белка (рис. 1). Но в целом обнаруженный нами диапазон значений соответствует литературным данным по костистым рыбам и нашим данным по полосатой камбале. Установленные значения активности GST можно считать базовыми для эстуарных рыб в умеренной климатической зоне Дальнего Востока России. Стоит отметить, что родственные и, соответственно, сходные по биологии и экологии виды значительно различаются между собой по величине биохимических показателей. Так, лобан и пиленгас, относящиеся к семейству кефалевых, имели одинаково низкий уровень глутатиона, однако активность GST у лобана была почти в три раза выше. У карася, как и у лобана, наблюдалась сравнительно высокая активность GST и при этом низкий уровень GSH. Как правило, это свидетельствует об активной работе фермента и расходовании промежуточного субстрата в процессе биотрансформации ксенобиотиков или эндогенных веществ (Shehan et al., 2001). У сазана, напротив, низкая активность GST при высоком содержании глутатиона говорит о стабильном антиоксидантном потенциале и успешной адаптации к химическому окружению. У красноперки, которая также относится к семейству карповых, но, в отличие и карася и сазана, является полупроходным видом, отмечена средняя активность фермента и невысокий уровень глутатиона.

Фермент каталаза является важным компонентом антиоксидантной системы и расщепляет перекись водорода, обладающую сильными токсическими свойствами. Активность каталазы существенно различается у представителей различных систематических групп, у аэробов и анаэробов. В эстуариях, где часто возникает дефицит кислорода, активность этого фермента должна постоянно поддерживаться на определенном уровне, для предотвращения окислительного стресса и нарушения гомеостаза. Активность этого фермента повышается при умеренном загрязнении и ингибируется высокими концентрациями поллютантов. В эстуарии реки Раздольная активность каталазы была сходной у рыб семейства карповых – красноперки, сазана и карася (в среднем 16 ед.акт./мг белка), и несколько понижена у кефалевых – лобана и пиленгаса (11-13 ед.акт./мг белка) (рис. 2).

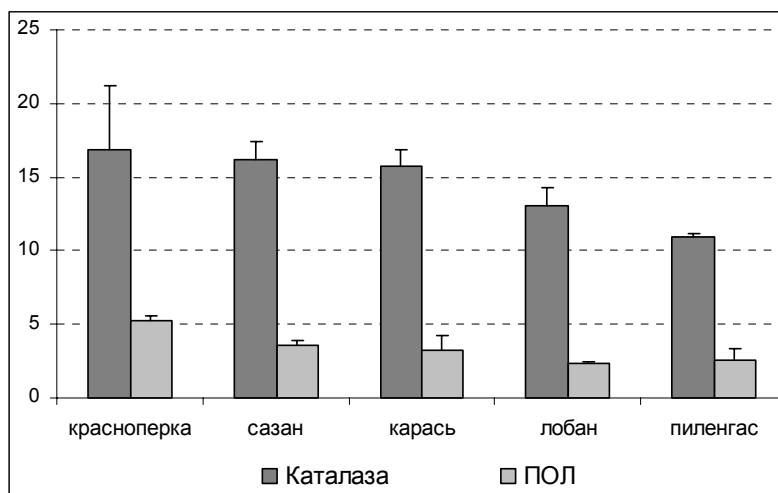


Рис. 2. Активность каталазы и уровень перекисного окисления липидов в печени рыб из эстуария реки Раздольная (N = 5). Единицы измерения: каталаза – ед.акт./мг белка; ПОЛ – нмоль МДА/мг белка.

Перекисное окисление липидов является интегрирующим показателем, по которому можно судить о степени развития окислительного стресса в организме. В первую очередь этот показатель отражает состояние липидов мембран. Как правило, при действии повреждающих факторов, в том числе токсикантов различной природы, содержание в клетках малонового диальдегида (МДА) –

конечного продукта процессов ПОЛ, увеличивается. Следует ожидать, что высокое содержание МДА будет у животных в неблагоприятных условиях. Уровень ПОЛ у разных видов рыб из эстуария реки Раздольная достоверно не различался, однако, как и активность каталазы, был более высоким у карповых (3.2 – 5.3), и несколько ниже у кефалевых - в среднем 2.5 нмоль МДА/мг белка (рис. 2).

Приспособляемость рыб к постоянно меняющейся среде – сложный и многогранный процесс. Уровень окислительного метаболизма рыб и связанных с ним биохимических параметров зависит от многих факторов. Изменения активности молекулярных биомаркеров не всегда предполагают ухудшение состояния особей, как считалось ранее. В современных исследованиях биомаркеры являются в первую очередь инструментом прогнозирования состояния биоты под влиянием тех или иных факторов среды. В эстуарных зонах, при постоянных флуктуациях значений основных экологических факторов, водные организмы существуют в условиях хронического стресса. На этом фоне дополнительным лимитирующим фактором выступает антропогенное воздействие. Вызванное этим напряженное функционирование антиоксидантных защитных систем и усиление процессов ПОЛ постепенно может привести к патологическим изменениям, снижающим репродуктивный потенциал и выживаемость организмов.

Для пяти видов рыб, жизненный цикл которых на определенных этапах онтогенеза связан с эстуариями, установлены базовые значения некоторых параметров окислительного стресса, которые могут быть использованы для мониторинга функционального состояния промысловых видов в умеренной климатической зоне Дальнего Востока России. Все виды потенциально могут служить индикаторами в биохимических исследованиях, поскольку имеют стабильно высокую активность молекулярных биомаркеров в печени. В соответствии с принципом доступности для сбора, в качестве оптимального организма-монитора для дальнейших исследований рекомендован пиленгас, который обитает практически во всех эстуариях залива Петра Великого как в осенний, так и в весенне-летний период.

Список литературы

- Алешко С.А., Лукьянова О.Н. Сезонные изменения некоторых параметров биотрансформации и антиоксидантной системы в печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива Японского моря // Биол. моря, 2008. № 2. С. 148-151.
- Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.А. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: Кол. науч. центр РАН. 1999. 142 с.
- Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М., Наука: 2004. 216 с.
- Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily // Biochem. J., 2001. V. 360. P. 1-16.

ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЗАЩИТНЫЕ РЕФЛЕКСЫ У МОЛЛЮСКОВ (СРАВНИТЕЛЬНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)

Н.Н. Камардин, В.А. Любимцев, Е.Л. Корниенко, Г.П. Удалова

Учреждение Российской Академии наук Санкт-Петербургский
Научно-исследовательский Центр экологической безопасности РАН
197110, Санкт-Петербург, ул. Корпусная, д.18, Россия, nik-kamardin@yandex.ru

Введение. Малоподвижные, мягкотелые водные моллюски приобрели в ходе эволюции формы поведения, защищающие их как от хищников, так и от неблагоприятных факторов окружающей среды. Элементы защитного поведения проявляются у разных видов моллюсков уже в первые дни жизни, что указывает на их наследственно детерминированную, безусловнорефлекторную природу. Несмотря на важное значение защитных реакций их репертуар у моллюсков довольно ограничен. Возникающие в ответ на внешние воздействия защитные рефлексy имеют различные пороги и длительность. На сильные химические, токсические воздействия у примитивных в эволюционном плане *Lamellibranchia* важнейшей защитной реакцией является замыкание створок, которое может сохраняться от нескольких часов до суток. В этих случаях в организме моллюска развивается сильная асфиксия, которая приводит к снижению уровня аэробных обменных процессов, накоплению метаболитов и, как следствие, к брадикардии (Curtis et al., 2001).

Высказывается предположение о том, что брадикардия у *Mytilus edulis* не есть результат прямого действия токсиканта (например Cu^{2+}) на миокард и нервно-мышечные синапсы сердца, а опосредуется пока ещё неизвестным нейрогормональным механизмом, включающим возбуждение холинергической части рефлекторной дуги, что и оказывает тормозное влияние на частоту сердечных сокращений (Curtis et al., 2001). Спонтанные или вызванные экспериментально изменением солёности закрытия створок у мидий длились 2 - 3 минут, а брадикардия развивалась 20-30 минут после закрытия. При возвращении первоначальной солёности воды, открытие створок (3-4 мин) сопровождалось восстановлением ЧСС (Curtis et al., 2001, Холодкевич и др., 2008). По современным представлениям, воздействие токсикантов (Cu^{2+}) на гидробионтов предпочтительнее исследовать методом стандартного тестирования, где важной характеристикой физиологической ответной реакции является время восстановления сердечной активности до фонового уровня (Холодкевич и др., 2011).

Для более прогрессивных в эволюционном плане брюхоногих моллюсков характерна защитная реакция втягивания тела в раковину. У большинства видов современных брюхоногих моллюсков (Neogastropoda), имеющих оперкулум, изоляция от внешней среды происходит благодаря сокращению мышц-аддукторов, которые с силой втягивают в раковину туловище и ногу с приросшей к ней крышечкой. При этом оперкулум, соответствующий форме устья раковины, плотно закупоривает моллюска, практически изолируя мантийную полость, жабры и осфрадий от внешней среды. Возможны общие нейрофизиологические механизмы с замыкательным рефлексом у двухстворчатых. Если для Lamellibranchia временные характеристики этой реакции ЧСС при закрытии и открытии створок известны, то для Gastropoda такие данные практически отсутствуют.

Целью настоящей работы было сравнение кардиоактивности при реализации защитного рефлекса изоляции, вызванного осмохимическим воздействием у двухстворчатых моллюсков рода *Mytilus* (по данным литературы) и переднежаберного брюхоного моллюска *Littorina littorea* и влиянием на него тяжёлых металлов (меди).

Объекты и методы исследования. Объектами нашего исследования были переднежаберные моллюски *Littorina littorea*, собранные на сублиторали Чупинской губы Кандалакшского залива Белого моря. Животные акклиматизировались в лабораторных условиях в искусственной морской воде с солёностью 26.0‰, при постоянной температуре $11.0 \pm 0.3^\circ \text{C}$. Затем моллюскам приклеивали на раковину датчики для записи кардиоактивности и помещали 7 литорин в 30 л экспериментальный аквариум, снабженный системами активной циркуляции и аэрации воды. Периодически воду проверяли на солёность и содержание продуктов азотистого обмена. Солёность контролировали рефрактометром TI-SAT28 (TransInstruments, USA) с автоматической компенсацией температуры измеряемого раствора. Обе группы животных содержали при искусственном световом режиме 12С:12Т. Время защитного рефлекса измерялось секундомером.

Кардиоактивность регистрировали неинвазивно с помощью оригинального семиканального волоконно-оптического фотоплетизмографа, соединённого с компьютером через аналого-цифровой преобразователь. Специально созданная программа “VarPuls” позволяла проводить в автоматическом режиме математическую обработку ЧСС, а также визуализировать её одновременно у 7 моллюсков и измерять текущую среднюю величину ЧСС в реальном времени. Характеристики кардиоактивности затем обрабатывали статистически с помощью программы Prisma 3.0. Для усреднённых значений ЧСС (фоновых и после тестирования гипоосмотической морской водой) вычисляли среднее квадратичное отклонение; строили гистограммы изменения ЧСС. Определяли достоверность отличия непарных средних по критерию t-Стьюдента при $p \leq 0.05$.

В начале эксперимента прослеживали изменения кардиоактивности и поведения моллюсков при воздействии на них разбавленной на 50 % морской воды, к которой они были адаптированы. Тест продолжался в течение 40 минут, а затем солёность воды восстанавливали. Далее изучали эффект хронического воздействия Cu^{2+} , добавляя в аквариум раствор CuSO_4 . При этом суммарная концентрация меди в аквариуме составила 50.0 мкг/дм^3 (около 10 ПДК в применении к пресной воде), что было заметно ниже летальной величины, но несколько выше имеющейся в естественных условиях обитания этих моллюсков. Такая концентрация меди может встречаться в загрязнённых природных биотопах, не вызывая гибели или существенных изменений поведения животных. Хроническое воздействие меди длилось 3 суток.

В серии острых опытов на литоринах осуществляли токсическое воздействие CuSO_4 (100.00 мкг/дм^3) или разбавленной на 50 % морской водой, при аппликации 1.0 мл раствора в течение 1 мин непосредственно в мантийную полость.

Результаты. 1. Исследование кардиоактивности *Littorina littorea* при гипоосмотическом тесте и при хроническом воздействии CuSO_4 .

У литорины проведение указанного гипоосмотического теста вызывало защитную поведенческую реакцию (втягивание головы и ноги моллюска в раковину). Замыкание раковины за счёт сокращения мышц-аддукторов происходило в течение 2-3 минут, однако при этом ЧСС снижалась только через 25-30 минут (рис.1). Сердечная активность иногда могла не выявляться. Такая акардия может вызываться либо сильным тормозным рефлекторным воздействием на сердечную мышцу, либо смещением сердца из области чувствительности сенсора (рис.1,Б).

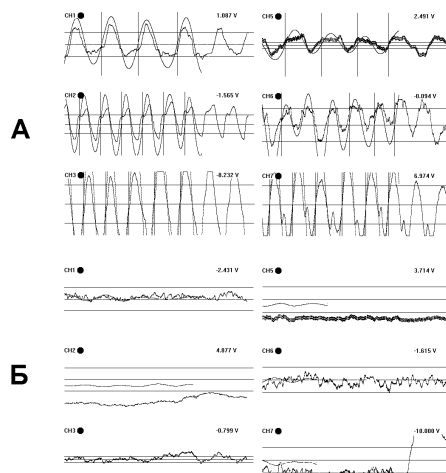


Рис.1. Скрин-копия одновременной регистрации кардиоактивности у 6 литорин до воздействия (А) и на 40^{ой} минуте гипоосмотического теста (Б). СН 1 - СН 6 – номера моллюсков.

Проявление указанной реакции в тесте имело свои особенности у разных моллюсков, что зависело, по-видимому, от их функционального состояния. Наиболее отчётливо отличалось от общей картины поведение одной из литорин. Этот моллюск в опреснённой воде остался прикрепленным к стеклу аквариума (т.е. не закрылся крышечкой), а лишь прижал края раковины к стеклу, как это делают моллюски-блюдечки, лишённые оперкулула. В этом случае сохранялся контакт части тела, ноги и осфрадия литорины с опресненной водой. ЧСС у этой литорины снизилась только на 50% по сравнению с исходной величиной, т.е. в значительно меньшей степени, чем у остальных литорин, которые полностью закрывали устье, изолируясь от внешней среды.

Проведение гипоосмотического теста у литорин, находившихся перед этим 3 дня в воде с раствором CuSO_4 с концентрацией 50.0 мкг/дм^3 , вызвало достоверное увеличение у всех моллюсков времени восстановления ЧСС до 44.4 ± 3.9 мин. Это было выше ($p \leq 0.05$), чем при проведении теста в отсутствии токсиканта - 26.6 ± 3.8 мин (рис.2).

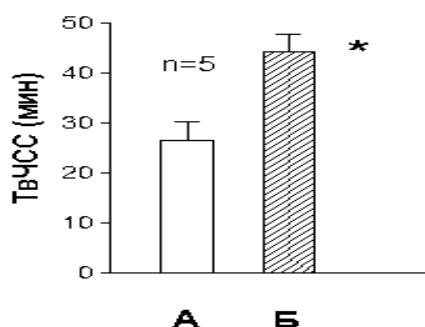


Рис.2. Гистограмма времени восстановления ЧСС (ТвЧСС) в норме(А) и после 3^х-суточной экспозиции 5 литорин в морской воде с 50.0 мкг/дм^3 CuSO_4 (Б). — среднее квадратичное отклонение. *- достоверные отличия непарных средних при $p \leq 0.05$. n – число использованных для анализа моллюсков.

2. Значение осфрадия как первичного хеморецептивного звена защитного рефлекса у моллюска *Littorina littorea*.

В острых опытах при контрольной инъекции в мантийную полость литорин обычной

морской воды не обнаружилось ни закрытия устья, ни существенного изменения кардиоактивности. Инъекция в течение минуты в мантийную полость разбавленной на 50% морской воды так же не вызвала защитного рефлекса. Очевидно, что для его запуска у литорины одной кратковременной осмотической стимуляции осфрадия было недостаточно для закрытия раковины. Однако, выявлялось снижение ЧСС примерно на 20% в течение 20 мин. Затем наблюдалась тенденция к её постепенному восстановлению (рис.3,А). Хотя уменьшение ЧСС составляло всего 2-3 уд/мин, направление кардиореакции на инъекцию гипоосмотический морской воды совпало с таковым для кардиореакции при защитной реакции, вызванной в ответ на замену морской воды в аквариуме на разбавленную (рис.3, А). Очевидно, что в последнем случае гипоосмотическая среда воздействует на большую рецепторную поверхность (осфрадий + вся поверхность тела), приводя к генерализованному возбуждению и развитию комплекса поведенческих и физиологических реакций (закрытие устья раковины, изоляцию тела моллюска, развитие брадикардии). В экспериментах с инъекцией в мантийную полость раствора CuSO_4 в концентрации 100,0 мкг/л обнаружили возрастание ЧСС на 4-5 уд/мин, которое могло продолжаться более часа (рис. 3, Б).

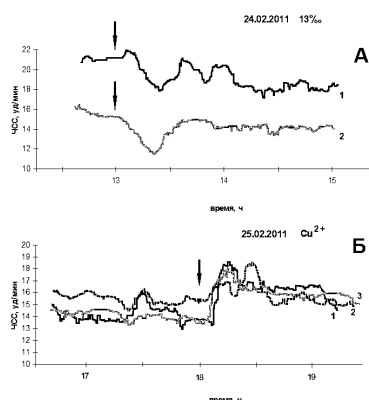


Рис.3. Оригинальные кривые изменения кардиоактивности у литорин 1-2 и при инъекции в мантийную полость литорины 1.0 мл 50 % морской воды (А) и у литорин 1-2 и 3 при инъекции 1.0 мл CuSO_4 100.0 мкг/дм³ на морской воде.

Обсуждение. У водных моллюсков защитное поведение реализуется главным образом в виде изоляции тела от внешних воздействий (закрытие створок или устья оперкулумом). В этом состоянии нарушается жаберное дыхание, развивается комплекс функциональных изменений, включающий асфиксию, гиперкапнию, снижение аэробных обменных реакций, накопление метаболитов и, как следствие, развивающуюся брадикардию (Curtis et al., 2001.). По нашим и литературным данным, при реализации защитного рефлекса для мидий и для литорин снижение ЧСС длится одинаковое время - 25-30 минут (Curtis et al., 2001, Холодкевич и др, 2008). По нашим данным у литорин можно наблюдать кратковременную потерю кардиосигнала (акардию), что отмечалось ранее на других моллюсках. Не всегда это можно объяснить смещением сердца из-под области чувствительности сенсора, вызванным сокращением тела литорины, как это происходит, например, у сифонарий (Marshall, Peter, Chown, 2004). Так, было показано, что у *Mytilus edulis* при прямой инъекции в мантийную полость раствора меди ЧСС могла уменьшаться и при незакрытой раковине (из-за вставленного между створками катетера). При этом ЧСС превышала на 20% величину ЧСС у моллюсков с закрытыми раковинами. После удаления висцерального ганглия указанные изменения ЧСС не обнаруживались (Curtis, et al., 2001). При инъекции с помощью катетера в мантийную полость литорин, морской воды, разбавленной на 50%, мы наблюдали кратковременное снижение ЧСС на 20% от исходного уровня у незакрывшихся моллюсков. Существенно более длительное (40-мин) воздействие гипоосмотической морской воды, как правило, вызывало у литорин защитный рефлекс и снижение ЧСС. Снижение ЧСС на 50% наблюдалось даже у того моллюска, у которого устье раковины оставалось при этом воздействии не закрытым. Следовательно, для возникновения брадикардии не всегда обязательна изоляция тела моллюска от внешней среды и накопление метаболитов. Пусковым стимулом для этого может служить возбуждение разнообразных осмо- и хемосенсорных рецепторов и главного из них - мультисенсорного осфрадиального органа, воспринимающего широкий спектр физико-химических стимулов внешней среды (в том числе и токсических) и передающего

соответствующую электрическую импульсацию в ЦНС (Kamardin et al., 1999). В свою очередь, из ЦНС направляются эфферентные влияния, воздействующие соответствующим образом на кардиоактивность. Кроме наших данных в литературе имеются указания на роль осфрадия в холинергической регуляции ЧСС при токсических воздействиях (Curtis et al., 2001). Возможно наличие у моллюсков единого нейрофизиологического механизма замыкания защитного рефлекса. Об этом свидетельствует однонаправленное изменение (удлинения) времени восстановления ЧСС в опытах по влиянию трёхсуточной экспозиции как литорин, так мидий в морской воде, содержащей раствор CuSO_4 (Холодкевич и др., 2011). Изменение ЧСС и времени её восстановления по сравнению с контролем, можно объяснить влиянием ионов меди (как и некоторых других тяжёлых металлов) на биоэлектрические свойства рецепторных клеток осфрадия, а также и непосредственным их воздействием на нейроны и синаптические контакты в ЦНС моллюсков. Основанием для такого предположения служат данные о негативном влиянии HgCl_2 (10-20 мкМ/дм³) на электровозбудимые Ca^{2+} входные токи ганглиозных клеток и выходные электровозбудимые K^+ токи сенсорных клеток осфрадия прудовика, а также частичное ингибирование трехминутным воздействием ионов Cu^{2+} суммарного рецепторного потенциала осфрадиальной поверхности живородки. Кроме того, это подтверждается влиянием ионов Cd^{2+} на импульсную активность рецепторных клеток осфрадия прудовика (Kamardin et al., 1999, Камардин, Ноздрачев, 2004). В препаратах изолированной ЦНС лёгочных моллюсков обнаружены и идентифицированы нейроны, в которых при действии ТМ и различных медиаторов меняется не только импульсная активность, но также Na^+ и K^+ мембранные токи (Szucs et al. 1994). Некоторые из исследованных клеток ЦНС, возможно, являются важными регуляторными элементами кардиореспираторной системы моллюсков и могут реагировать на изменение осмотического давления гемолимфы.

Импульсация, возникающая в ответ на разнообразные химические воздействия в осфрадии и других периферических нервных структурах, вызывает в ассоциативных и эффекторных образованиях ЦНС импульсацию, направленную к мышечной и висцеральной системам моллюсков, в том числе и к исследуемой нами кардиосистеме. При реализации защитного рефлекса снижение ЧСС можно рассматривать, как необходимость в условиях асфиксии экономить кислород и энергию для поддержания кардиоактивности. При внешнем химическом воздействии у литорин от периферических рецепторов возникает не только пусковая импульсация, вызывающая закрытие устья, но, по-видимому, и дальнейшая тоническая импульсация направляющаяся в ЦНС, необходимая для сохранения активности мотонейронов мышц – аддукторов и изменений ЧСС. Прерывание этой импульсации нарушает эти процессы. Так, при удалении висцерального ганглия у мидии не наблюдалось эффекта угнетения ЧСС при воздействии Cu^{2+} (Curtis et al., 2001). Кроме того, экстирпация осфрадия у литорины нивелировала кардиореакцию в ответ на инъекцию в мантийную полость раствора CdCl_2 в концентрации 5,0 мг/дм³ (Камардин и др., 2010).

Анализируя в сравнительном аспекте собственные и имеющиеся в литературе данные, можно высказать предположение о том, что у моллюсков простейший нейрональный механизм безусловного защитного рефлекса формировался структурно и функционально сходным образом. Последующая его эволюция при сохранении общей схемы механизма этого рефлекса направлялась на формирование для каждой таксономической группы специфических особенностей защитного поведения (способа изоляции тела от внешней среды, особенности нейрогормональной регуляции и т.д.). В частности, это проявляется в сходной скорости реакции замыкания раковины и длительности последующей брадикардии у примитивных Lamellibranchia и современных Neogastropoda.

Работа выполнена при поддержке средств грантов РФФИ № 08-04-92424-Bonus, РФФИ № 10-05-00875_a.

Список литературы.

- Камардин Н.Н., Ноздрачёв А.Д. Осфрадиальные сенсорные системы моллюсков. 2004. Изд-во СПб.ун-та. 172 с.
- Холодкевич С.В., Кузнецова Т.В., Иванов А.В., Любимцев В.А., Халатов А.Н., Куракин А.С., Корниенко Е.Л., Трусевич В.В., Гнубкин В.Ф. Автоматическая система биомониторинга на основе одновременного анализа кардиоактивности и движения створок моллюсков // Нефть и газ арктического шельфа. Матер. междунар. конф. Мурманск. 2008. С.312-320.
- Curtis T.M., Williamson R., Deplidge M.H. The mode of action of copper on the cardiac physiology of the

blue mussel, *Mytilus edulus* // Aquatic Toxicology. 2001. V.52, P. 29-38.

Kamardin N.N., Szucs A., S-Rozsa K. Influence of HgCl₂ on the osphradial multisensory system of *Lymnaea stagnalis* L // Acta Biol. Hung. 1999. Vol. 50. №1-3. P. 99-116.

Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Trusevich V.V., Kuznetsova T.V. New physiological biomarkers for express indication of aquatic ecosystems on the base of adaptive capacities assessment of bivalves using standard test-stimuli. SETAC 21 Annual Meeting. Abstract book, 2011 http://www.setac.eu/embed/Milan/AM11_abstract_book.pdf/p. 191-192

Marshall D. J., Peter R., Chown S.L. Regulated bradycardia in the pulmonate lampet *Siphonaria* (Gastropoda: Mollusca) during pollutant exposure implication for biomarker studies // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2004. V. 139, P.309-316.

Szucs A., Salónki J., S-Rozsa K. Effects of chronic exposure to cadmium – or lead-enriched environments on ionic currents of identified neurons in *Lymnaea stagnalis* L.// Cellular and Molecular Neurobiology. 1994. Vol.14.№6. P.769-780.

РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ МОРСКИХ ВОД НЕФТЬЮ

В.И.Капков, Е.В.Шошина¹

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

¹Мурманский государственный технический университет, Россия, chelena45@mail.ru

В общей проблеме антропогенного загрязнения морской среды ведущее место занимают нефть и нефтепродукты. Количество нефтяных углеводородов в морских экосистемах существенно больше, чем ежегодно образующихся в результате фотосинтеза и составляет десятки миллионов тонн. При этом около половины нефти сбрасывается в море с суши из-за потерь у причалов, с нефтеперерабатывающих предприятий и буровых платформ, а также выноса береговыми стоками.

Нефть разливается пленкой по поверхности моря, нарушая газовый и тепловой обмен с атмосферой и вызывая гибель организмов нейстона. При аварийных разливах легкие фракции нефти с температурой кипения до 300°C испаряются со поверхности моря в течение нескольких дней. Другие компоненты нефти, включая ароматические соединения, частично растворяются в воде, а также подвергаются фотоокислению. Причем в процессе фотоокисления изменяются физико-химические свойства нефти, что способствует ее дальнейшему растворению в воде, увеличивая токсичность для гидробионтов. Важнейший момент в распределении нефти в морской воде является ее эмульгирование с образованием эмульсий двух типов: «нефть в воде» и «вода в нефти», последняя с содержанием нефти 50-80% образует в морской воде устойчивый «шоколадный мусс». В морской воде биodeградация микроорганизмами углеводородов нефти наиболее эффективно происходит в случае эмульсии нефти в воде, а не вода в нефти. Многие окисляющие углеводороды нефти микроорганизмы (бактерии, грибы, простейшие) выделяют в окружающую среду биосюфрактанты, которые способствуют разрушению трудно растворимых компонентов нефти. После физико-химического окисления в воде остаются смолистые комки, внутри которых может находиться сырая нефть. Эти образования представляют собой стойкие к микробному окислению компоненты нефти. Ароматические углеводороды нефти, включая бензапирен, являются опасными канцерогенами и в морской среде разрушаются в тысячи раз медленнее моноксигенных соединений. Анаэробная биodeградация углеводородов нефти происходит с низкой скоростью и в основном микроорганизмами в процессах нитратредукции и метаногенеза (Smith, 1968).

Несмотря на наличие общей схемы последовательной трансформации нефти в море скорость ее разрушения в зависимости от сочетания экологических факторов заметно отличается как и изменяются биоцидные свойства углеводородов нефти. В этой связи установление нормативных показателей допустимого уровня загрязнения морских экосистем нефтью должны осуществляться с учетом абиотических и биотических факторов. За допустимый уровень содержания нефти в морских прибрежных экосистемах необходимо принять такой, который бы обеспечивал нормальную структуру как самой экосистемы, так и сопредельных экосистем, включая береговые территории, и, особенно, переходную зону – литораль с характерной тенденцией краевого эффекта. Совершенно очевидно, что предельно допустимые концентрации нефти в морской среде должны устанавливаться с учетом конкретных экологических факторов и не могут быть

одинаковыми для всех экосистем. Следует отметить также, что при проведении биологического мониторинга загрязнения морских вод нефтью все еще не разработаны единый подход и унифицированные показатели состояния биотической компоненты экосистемы. Существующие методы биотестирования нефтяного загрязнения в краткосрочных и хронических экспериментах по сути представляют собой «рыбную пробу».

В последние годы неоднократно предпринимались попытки усовершенствования и разработки новых подходов использования гидробионтов как биологических маркеров загрязнения морских экосистем. Концепция использования биологических маркеров как индикаторов и мониторов токсичности среды занимает центральное место в оценке экологических последствий загрязнения водных экосистем. Биологические маркеры позволяют выбрать наиболее информативные и пригодные для целей биологического мониторинга тест-организмы. В результате действие токсического вещества интегрируется в ответных реакциях гидробионтов, отражая кумулятивный эффект. Широкое использование гидробионтов в качестве биомаркеров особенно перспективно в мониторинге прибрежных морских экосистем, наиболее подверженных антропогенному прессу (Капков, 2003).

При загрязнении нефтью морской литорали наиболее уязвимыми оказываются гидробионты, обитающие на разделе фаз и, в первую очередь, организмы нейстона и бентоса. В качестве организмов-мониторов в таких исследованиях обычно используются: бурые и красные водоросли, моллюски и ракообразные. При этом ранее отмечалась высокая устойчивость бурых водорослей и моллюсков к нефтяному загрязнению. Устойчивость фукусовых водорослей возможно обеспечивается включением углеводов нефти в метаболизм, а также наличием на поверхности таллома окисляющих нефть бактерий. Наиболее чувствительными к нефтяному загрязнению, как полагают, оказываются водоросли в репродуктивный период и на ранних стадиях развития (Воскобойников, 2006).

Произрастая в экстремальных условиях литорали (обсыхание таллома во время отливов, резкие зимние колебания температуры, потребление фитофагами и т.д.) фукусовые водоросли в процессе эволюции выработали и приобрели различные морфологические и физиологические приспособления и генетически закрепленные жизненные стратегии. Талломы фукусов покрыты плотной кутикулой, которая предохраняет растение от механических повреждений и препятствует потере воды во время отливов. На талломах фукусов доминируют диатомовые водоросли-эпифиты: *Achnanthes brevipes*, *Cocconeis scutellum*, *Hyalodiscus scoticus*, *Tabularia fasciculata*, которые вероятно также вносят существенный вклад в биодеградацию адсорбированной на базибионтах нефти.

В то же время по нашим наблюдениям в некоторых бухтах Мурманского побережья Баренцева моря, загрязненных нефтепродуктами, происходят серьезные нарушения видовой и возрастной структуры бентосного сообщества. Видовая структура фитоценоза, как было показано, четко отражает уровень функционирования и степень угнетения сообщества. Так, в акватории Мурманского порта, загрязненного нефтепродуктами, в фитоценозе литорали доминировали 4 вида бентосных водорослей с проективным покрытием 15%. В менее загрязненной бухте Девкина Заводь губы Печенга, доминировали 6 видов с проективным покрытием 50-70%. В то же время в незагрязненной Дальнезеленецкой бухте на литорали доминировали 12 видов водорослей с проективным покрытием 85-90%.

В популяции *Fucus vesiculosus*, вида - эдификатора верхней литорали бухт загрязненных нефтепродуктами практически отсутствовали растения первых лет жизни. Такие изменение возрастной структуры доминирующего вида свидетельствует о нарушении воспроизводства, поскольку возобновление популяции у фукусов происходит половым путем и молодые проростки развиваются практически только из зигот. Фукусы приступают к размножению в возрасте 4-х лет, хотя первые рецептакулы обнаруживаются и более молодых растений. Количество фертильных особей в популяции фукусов в период размножения составляет у *Fucus vesiculosus* -22%, *F. distichus* – 50% и *F. serratus* – 29%, а соотношение женских и мужских особей у первых двух видов в верхней литорали обычно 60:40. Развитие органов размножения у фукусов в Баренцевом море длится 9-12 месяцев. Причем у *F. vesiculosus* и *F. distichus* рецептакулы закладываются осенью, а у *F. serratus*, у которого более сжатые сроки формирования органов размножения – весной (Shoshina et al., 1996).

Формирование гаметангиев начинается в январе и заканчивается после завершения развития рецептакулов. Массовый выход гамет наблюдается в июне, гаметы высвобождаются только днем на больших приливах. Антерозоиды выходят наружу в форме пакета покрытого оболочкой. Пакет яйцеклеток покрыт двумя оболочками: мезо- и эндохитоном. Оплодотворение происходит в воде

только после освобождения антерозоидов и яйцеклеток от оболочек в течение первых двух часов. На этой стадии жизненного цикла водоросли особенно подвержены действию загрязняющих веществ. Даже на относительно чистых участках литорали у *Fucus distichus*, плодовитость которого 15 млн. яйцеклеток на 1 м² субстрата, после выхода из оогония оплодотворяются приблизительно 30% яйцеклеток, из которых лишь десятки зигот оседают на дно и всего 10-12% из числа осевших зигот дают ювенильные проростки, которые выедаются животными – гаммарусами и моллюсками (Chapman, 1995).

При загрязнении морской среды в качестве мониторов часто используются двусторчатые моллюски, которые образуют обширные банки и являются мощными биофильтрами прибрежных экосистем. Важным этапом в формировании биоценоза литорали и поддержании видовой и возрастной структуры является пополнение сообщества за счет молоди, включая нерест, постэмбриональное развитие и оседание личинок на субстрат. В прибрежной зоне морей обитает несколько десятков беспозвоночных, в жизненном цикле которых имеются личиночные стадии развития.

Среди литоральных и сублиторальных видов встречаются в основном организмы с пелагическими личинками, значительную часть времен и обитающие в гипонейстоне (*Littorina littorea*, *Macoma balthica*, *Mytilus edulis*), существенно меньше бентосных личинок, развивающихся в защищенных кладках на дне (*Littorina obtusa*) и еще меньше личинок, развивающихся внутри материнского организма (*Littorina saxatilis*). По достижении определенного размера пелагические личинки опускаются на дно, а бентосные выходят из кладок или материнского организма наружу. Оседание пелагических личинок происходит вдали от поселений популяций взрослых особей и последующее совмещение осуществляется пассивно за счет приливно-отливных и ветровых течений. Продолжительность личиночной стадии у литоральных беспозвоночных длится от 3-х до 6-ти недель. У *M. edulis* личинки обнаруживаются в толще воды дважды за сезон с интервалом в один месяц и их развития длительное время происходит в поверхностном слое моря. Продолжительность их личиночной стадии роста около 4-х недель, причем процесс оседания личинок на дно длится 15 суток. Пелагические и бентосные личинки гидробионтов имеют разные жизненные стратегии и на них действуют разные комбинации экологических факторов. Оседающие пелагические личинки особенно чувствительны к изменяющимся условиям среды, причем их смертность в 2,5 раза выше в момент оседания, чем у уже осевших и в 5 раз выше, чем у бентосных личинок (Бурковский и др., 1998).

Ранние стадии онтогенеза гидробионтов, как отмечалось выше, оказываются наиболее уязвимым звеном в развитии литорального сообщества. Высокая толерантность по отношению к нефти используемых традиционно в качестве индикаторов взрослых гидробионтов обусловлена тем, что их биомониторные характеристики не всегда показательны для данного загрязняющего вещества. Попытки привнести в прикладную экологию классические объекты и методы биотестирования не всегда дают ожидаемый результат. В этой связи необходимо разработать принципиально новые подходы к оценке реальной опасности загрязнения морской среды нефтью. В экспериментах «in situ» следует использовать биомониторы с коротким циклом развития с целью определения в ряду поколений экологических последствий нефтяного загрязнения. При решении задачи сохранения наиболее ценных объектов промысла необходимо определить наиболее чувствительные к загрязнителю стадии в жизненном цикле гидробионтов для установления отдаленных последствий антропогенного загрязнения морских экосистем.

Список литературы

- Бурковский И.В., Столяров А.П., Удалов А.А. Личинки как фактор формирования сообщества илисто-песчаной литорали Белого моря // Зоол. журнал, 1998, том 77, № 11, с.1229-1241.
- Воскобойников Г.М. Механизмы адаптации, регуляции роста и перспективы использования макрофитов Баренцева моря. Автореферат дисс. докт. биол. наук. Мурманск, 2006. 52 с.
- Капков В.И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем. Автореферат дисс. докт. биол. наук. Москва, 2003. 48 с.
- Shoshina E.V., Makarov V.N., Voskoboinikov G.M. Hoek C. Growth and reproductive phenology of nine intertidal algae on the Murman Coast of the Barents Sea // Bot. Marina, 1996, v.39. p.83-93.
- Chapman F.R. Functional ecology of fucoid algae: twenty-three years of progress // Phycologia, 1995, v.34 (1), P. 1-32.
- Smith J. "Torrey Canyon" pollution and marine life. A rapport by the Plymouth laboratory of Marine Biological Association of the United Kingdom. Cambridge Univer. Press, 1968. 196 p.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ЭКСПРЕСС - МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ

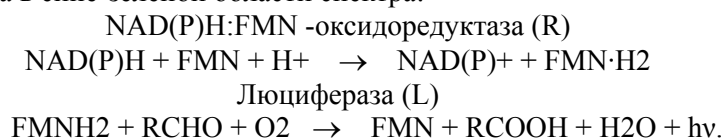
В.А. Кратасюк^{1,2}, Е.Н. Есимбекова^{1,2}

¹Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет,
660041, г. Красноярск, пр. Свободный 79, россия, VKratasyuk@gmail.com

²Институт биофизики СО РАН, 660036, г. Красноярск, Академгородок, Россия,
esimbekova_en@mail.ru

Современный подход, широко используемый в экологическом мониторинге, опирается на методы, требующие специализированных лабораторий с высококвалифицированным персоналом и дорогостоящим оборудованием. Для этих целей используются химический анализ и биотестирование. Биотесты показывают токсичность среды по реакции живых организмов (Жмур, 1997), однако использование живых организмов делает биотесты длительными и сложными из-за необходимости поддерживать постоянство характеристик живых культур и организмов.

Замена в биотестах живых организмов на ферментативные препараты позволяет преодолеть нестабильность и получить надежные результаты. Так, к существенному улучшению характеристик биолюминесцентного теста привело использование в качестве тест-объекта ферментов светящихся бактерий (Кратасюк и др., 2001). Основным принцип ферментативного биотестирования – обнаружение токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на параметры биолюминесценции биферментной системы, одним из продуктов которых является излучение света в сине-зеленой области спектра:



Растворимые (лиофилизированные) препараты ферментов L и R являются высокочувствительными к действию токсических веществ, а метод анализа токсичности среды с использованием ферментов отличается экспрессностью (Ветрова и др., 2007). Однако по сравнению с биотестом на светящихся бактериях анализ стал более сложным. При проведении тестирования необходимо смешивание пяти компонентов в определенных концентрациях и количествах в процессе одиночного измерения. Кроме того, растворы ферментов быстро инактивировались, и требовалось их хранение при температуре 4-8⁰С, что затрудняло проведение анализов в полевых условиях. Этим недостатком не имеет реагент «Энзимолум», содержащий совместно иммобилизованные в крахмальный носитель NADH:FMN-оксидоредуктазу, люциферазу и их субстраты (Кратасюк, Есимбекова, 2005). Применение иммобилизованного реагента позволяет существенно сократить время, необходимое для проведения анализа. Действительно, в состав реагента включены все необходимые для анализа компоненты - ферменты и их субстраты, активность реагента сохраняется в течение длительного времени без обеспечения специальных условий хранения, реагент характеризуется устойчивостью к изменениям физико-химических факторов среды, в том числе pH, ионной силы, температуры (Есимбекова и др., 2009). Использование реагента «Энзимолум» должно привести к улучшению характеристик ферментативного биолюминесцентного анализа, а именно увеличению точности анализа и упрощению процедуры измерения.

Целью работы является создание высокочувствительного экспрессного биолюминесцентного метода анализа токсичности природных и сточных вод, основанного на применении многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимолум».

Методика. В работе использовали лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов, произведенные в лаборатории нанобиотехнологии и бактериальной биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон лиофилизованного препарата КРАБ (комплект реактивов аналитической биолюминесценции) содержал 0.5 мг люциферазы (L) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и 0.18 ед. активности NADH:FMN-оксидоредуктазы (R) ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*). В работе использовали следующие реактивы: NADH, NAD⁺, FMN («Serva», Германия), тетрадеканаль («Merck», Германия); картофельный крахмал, гидрохинон, монофенол, пирокатехин, бензохинон, нафтохинон («Sigma», США), тимохинон («Aldrich»,

Германия), толухинон («Fluka», Германия); соли металлов (CuSO_4 , CdSO_4 , CoCl_2 , CrCl_2) марки ЧДА. Образцы исследуемых соединений растворяли в дистиллированной воде. Слаборастворимые в воде вещества предварительно разводили в этаноле. Для приготовления растворов ферментов и субстратов использовали 0.05 М калий- фосфатный буфер pH 6.8.

Процедура получения иммобилизованного многокомпонентного реагента «Энзимолюм» заключалась в следующем. 10 мл 3 % суспензии крахмала нагревали до полного растворения, охлаждали до температуры 25°C , последовательно вносили ферменты – люциферазу, NADH:FMN-оксидоредуктазу, а так же их субстраты – NADH и тетрадеканаль, интенсивно перемешивали. Далее, с использованием автоматической станции пробоподготовки («Eppendorf», Германия) дозировали полученную смесь на лавсановую пленку и высушивали при 4°C . Многокомпонентный иммобилизованный реагент «Энзимолюм» представляет собой высушенный диск диаметром 6 мм, сухой вес 1.5 ± 0.2 мг.

При тестировании в качестве контроля измеряли максимум интенсивности свечения I_k реагента «Энзимолюм» при добавлении к нему 300 мкл дистиллированной воды и 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Затем в отдельной кювете измеряли максимум интенсивности свечения I_o в присутствии 300 мкл анализируемого образца. При биотестировании с использованием растворимых ферментов реакционная смесь для измерения I_k содержала 300 мкл 0.05 М калий-фосфатного буфера pH 6.8; 5 мкл раствора КРАБа; 50 мкл 0.0025 % раствора тетрадеканала; 10 мкл 0.5 мМ раствора FMN; 100 мкл 0.4 мМ раствора NADH. После достижения I_k в кювету добавляли 50 мкл анализируемого образца воды или раствора анализируемого вещества заданной концентрации и измеряли I_o .

Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения $(I_o/I_k) \cdot 100$ %. При проведении анализов токсичности сточных и очищенных вод ООО «Енисейский целлюлозно-бумажный комбинат» г. Красноярск рассчитывали коэффициент токсичности (КТ) образцов воды по формуле: $\text{КТ} = [(I_k - I_o) / I_k] \cdot 100$ %. Исследуемые образцы сточных вод поступали из цеха очистки промышленных стоков ООО «Енисейский ЦБК». Характеристики образцов, любезно предоставленные сотрудниками химической лаборатории комбината, представлены в таблице 1, где проба № 1 – поступающая в цех сточная вода, проба № 2 – сточная вода после механической очистки, проба № 3 – очищенная вода на выходе из очистных сооружений.

Таблица 1. Результаты химического анализа сточной и очищенной воды лаборатории цеха очистки промышленных стоков ООО «Енисейский Целлюлозно-бумажный комбинат»

№	Определяемый компонент	Ед. изм	Результат измерений		
			Проба №1	Проба №2	Проба №3
1	pH	ед.pH	6.5	6.2	3.3
2	ХПК	мг/дм ³	3000	2200	2000
3	Взвешенные вещества	мг/дм ³	300	74	51
4	Аммоний ион	мг/дм ³	66	53	48
5	Нитриты	мг/дм ³	<0.02	<0.02	<0.02
6	Нитраты	мг/дм ³	6.2	0.1	0.1

Критерием токсичности воды было снижение на 20 % и более максимальной интенсивности свечения реагента «Энзимолюм» при добавлении анализируемого образца воды, по сравнению с интенсивностью свечения в контрольной пробе. Качество воды устанавливали на основе ее токсикологических характеристик через величину биологически безопасного разбавления согласно таблице 2.

Таблица 2. Соответствие кратности разбавления тестируемой пробы воды и токсикологических характеристик качества тестируемой воды

№	Кратность разбавления тестируемой пробы воды	Токсикологические характеристики качества тестируемой воды
1	1	Нетоксичная
2	2	слаботоксичная
3	от 3 до 10	токсичная
4	от 11 до 50	сильнотоксичная
5	> 50	гипертоксичная

Измерения проводили на биолюминометре Lumat LB 9507 фирмы «Berthold Technologies» (Германия). Измерения каждой экспериментальной точки проводили не менее чем в пяти параллельных измерениях.

Результаты и их обсуждение. В качестве модельных поллютантов выбраны ряды фенолов, хинонов и солей тяжелых металлов, так как среди сточных вод промышленных предприятий они занимают одно из первых мест по распространенности и вредному воздействию на водоемы и их обитателей. Ранее было показано, что, в присутствии фенолов, хинонов и солей металлов изменяются такие параметры реакции биолюминесценции, катализируемой биферментной системой L+R, как интенсивность свечения и время выхода свечения на максимум и предложены механизмы такого влияния (Кудряшева и др. 1994).

Так как чувствительности биолюминесцентной биферментной системы L+R недостаточно для тестирования фенолов и хинонов на уровне ПДК (Кудряшева и др. 1994), необходимо было найти пути увеличения чувствительности анализа. В отличие от тестов на живых организмах это можно было сделать путем варьирования условий проведения тестирования. В работе были исследованы следующие способы увеличения чувствительности реагента «Энзимолум» к действию поллютантов: варьирование состава иммобилизованного реагента, изменение соотношения объемов реакционной смеси и анализируемого образца, изменение порядка добавления компонентов биферментной системы и анализируемого образца, введение дополнительной процедуры инкубации реагента в анализируемом образце воды, выбор контрольного раствора для проведения биотестирования.

Была исследована зависимость чувствительности NADH:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы, иммобилизованных в крахмальный гель совместно с субстратами NADH и тетрадеканалем, к действию бензохинона и CuSO_4 в зависимости от концентраций компонентов в составе иммобилизованного реагента. Показано, что уменьшение содержания какого-либо из компонентов в составе иммобилизованного реагента приводит к повышению чувствительности реагента «Энзимолум» к действию токсических веществ. Этот эффект можно объяснить тем, что для биферментной системы созданы условия нестационарности благодаря содержанию в составе реагента ненасыщающей концентрации одного из субстратов (NADH). Действительно, максимальная чувствительность биферментной системы к действию бензохинона и CuSO_4 наблюдается в том случае, когда содержание NADH в диске составляло 0,1 мМ, т.е. при концентрации NADH в 1,3 раза ниже концентрации, соответствующей константе Михаэлиса для этого субстрата (Есимбекова и др., 2009).

Для предотвращения инактивации ферментов, сохранения их активности при использовании и хранении в состав многокомпонентного реагента «Энзимолум» вводили стабилизаторы ферментов различного механизма действия, в том числе, стабилизаторы SH-групп ферментов (ДТТ или меркаптоэтанол), а также бычий сывороточный альбумин (БСА). Внесение в состав иммобилизованного реагента добавок, стабилизирующих ферменты, приводит к увеличению активности биферментной системы L+R, повышению стабильности иммобилизованных ферментов при хранении, но снижает чувствительность реагента к токсическим веществам.

Было показано, что дополнительная инкубация реагента в анализируемом растворе приводит к увеличению чувствительности иммобилизованного реагента к сульфату меди, при этом чувствительность к бензохинону не изменяется (рис.1). Инкубацию многокомпонентного реагента с контрольным или анализируемым раствором поллютанта проводили в течение 30–900 с, затем запускали реакцию раствором FMN и измеряли I_k и I_o , соответственно. Ингибирование ферментов раствором сульфата меди возрастало с увеличением времени инкубирования и максимально при инкубации реагента в течение 300 с. Дальнейшее увеличение времени инкубации невозможно, так как существенно снижается активность иммобилизованного реагента даже при добавлении контрольного раствора. Таким образом, были найдены условия биотестирования водных растворов с использованием реагента «Энзимолум», обеспечивающие максимальную чувствительность реагента к действию токсических веществ.

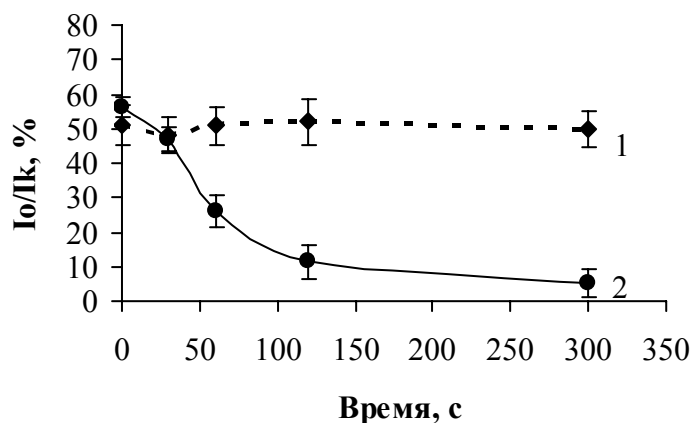


Рис. 1. Зависимость остаточной интенсивности свечения реагента «Энзимолум» от времени инкубации реагента с раствором бензохинона (1), CuSO₄ (2).

Далее проводили сравнение чувствительности растворимой и многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы L+R к действию модельных токсикантов. Эффективность воздействия поллютантов на биoluminesцентную систему оценивали по параметру EC₅₀, который соответствует концентрации действующего вещества при ингибировании биoluminesценции на 50%. Значения EC₅₀ были определены для различных классов органических поллютантов (табл. 3). Степень влияния исследуемых веществ на интенсивность свечения растворимой и иммобилизованной биферментной системы L+R на всем исследуемом диапазоне концентраций различалась. Наибольшую чувствительность к действию фенолов и хинонов показали иммобилизованные ферменты: 0,002 мг/л для пирокатехина, 0,02 мг/л для гидрохинона, 0,01 мг/л для бензохинона, 0,05 мг/л для толухинона, что соответствует или ниже ПДК. Наименьшая чувствительность реагента отмечена для солей тяжелых металлов (за исключением CuSO₄). Из таблицы 3 видно, что чувствительность растворимой биферментной системы L+R к исследуемым загрязнителям выше по сравнению с иммобилизованным реагентом. Но, так как практически для всех изученных веществ, иммобилизованный реагент позволяет проводить измерения на уровне или даже ниже ПДК, то иммобилизованный реагент может быть использован при биотестировании природных и сточных вод.

Таблица 3. Действие рядов поллютантов на растворимую и иммобилизованную совместно с субстратами биферментную систему NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза.

Класс вещества	Действующее вещество	ПДК, мг/л	EC ₅₀ , мг/л	
			Растворимые L+R	«Энзимолум»
Хиноны	Бензохинон	0.1	0.05	0.01
	Нафтохинон	0.25	0.003	0.003
	Тимохинон		0.005	0.03
	Толухинон		0.01	0.05
Фенолы	Гидрохинон	0.2	0.03	0.02
	Монофенол	0.001	1128	1410
	Пирокатехин	0.1	2.2	0.002
Соли	CuSO ₄	1	0.2	0.002
	CdSO ₄	0.001	310	0.08
	CoCl ₂	0.1	40	0.1
	CrCl ₂	0.05	500	2.1

Методика проведения биотестирования с использованием иммобилизованного реагента «Энзимолум» была апробирована при анализе сточных вод ООО «Енисейский целлюлозно-бумажный комбинат» г. Красноярск. Исследуемые образцы воды различались по основным физико-химическим показателям (см. табл. 1). Проводили исследование показаний биотестирования при использовании для приготовления разведений анализируемого образца

дистиллированной воды или фосфатного буфера. Согласно результатам биотестирования пробы № 1 и 2 были признаны гипертоксичными, проба № 3 – токсичной. Также показано, что токсичность проб уменьшается в ряду проба 1 > проба 2 > проба 3, что соответствует изменению химических характеристик анализируемых проб. Этот эксперимент подтвердил целесообразность и эффективность использования в биотестах иммобилизованного реагента вместо растворимой биферментной системы L+R.

Таким образом, разработан биолуминесцентный метод для экспресс-контроля состояния окружающей среды промышленных районов. Метод может также использоваться для контроля залповых вредных выбросов предприятий, для оценки эффективности работы очистных сооружений, а также для оценки экологической опасности предприятий и отдельных районов. Метод пригоден для использования как в лабораторных, так и в полевых условиях. Применение иммобилизованных препаратов, включающих помимо ферментов также субстраты биферментной системы, позволяет максимально упростить процедуру проведения анализов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0766), Министерства образования и науки РФ и Американского фонда гражданских исследований и развития (гранты № 2.2.2.2/5309 и RUX0-002-KR-06/BP4M02), Российской Академии наук (Программа «Молекулярная и клеточная биология», грант № 6.2), а также Президента РФ (грант НШ 1 64987.2010.4).

Список литературы

- Есимбекова Е.Н., Торгашина И.Г., Кратасюк В.А. Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза//Биохимия, 2009. Т.74, Вып. 6. С. 853-859.
- Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России /М.: Меж. дом сотрудничества, 1997. 148 с.
- Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н. Способ получения иммобилизованного многокомпонентного реагента для биолуминесцентного анализа. Патент РФ. 2005. № 2252963.
- Кудряшева Н.С., Шалаева Е.В., Задорожная Е.Н., Кратасюк В.А., Стом Д.И., Балаян А.Э. Закономерности ингибирования бактериальной биолуминесценции *in vitro* хинонами и фенолами - компонентами сточных вод // Биофизика, 1994. Т. 39, N 3. С. 455-464.
- Kratasyuk, V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichek E.B., Kuznetsov A.M., Ivanova E.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems // Chemosphere, 2001. V.42, N 8. P. 909-915.
- Vetrova E., Esimbekova E., Remmel N., Kotova S., Beloskov N., Kratasyuk V., Gitelson I. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water // Luminescence, 2007. V.22, N 3. P. 206 – 214.

ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП В РАСТВОРАХ СУЛЬФАТА МЕДИ

Е.Г. Крылова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН
152742 п. Борок, Ярославская обл., Россия, panova@ibiw.yaroslavl.ru*

С ростом антропогенного воздействия на природную среду вопрос о накоплении тяжелых металлов (ТМ) в различных звеньях водных экосистем приобретает все большее значение. Прогрессирующее загрязнение медью заметно повысило в последние годы интерес ученых к механизмам ее токсического действия (Крэмер и др., 2007). Выяснение механизмов выживания и адаптации растений через анализ изменчивости начальных этапов онтогенеза приобретает определенную актуальность.

Медь относится к эссенциальным элементам, которые в следовых количествах являются незаменимыми микроэлементами, а при концентрациях, превышающих физиологические потребности растений, проявляют токсические свойства (Клеменс, 2006). ПДК меди для рыбохозяйственных водоемов составляют $1 \cdot 10^{-3}$ мг/л (Перечень..., 1995). Cu участвует в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях, но для большинства высших растений граница толерантности к ней составляет 10^{-6} моль Cu^{2+} /л. Считается, что повреждающее действие Cu связано с нарушением мембранных барьеров клетки. Под действием ее избытка снижается уровень биосинтеза хлорофилла у высших растений, изменяется белковый состав хлоропластов, ингибируется транспорт электронов по фотосинтетической цепи. При подавлении

дыхания ингибируется ферментативный аппарат. Особенно восприимчивы к избытку меди молодые ткани и органы (Демидчик и др., 2001). Вопросы, касающиеся влияния меди на рост и развитие водных растений, освещены в литературе недостаточно (Лапиров и др., 2006; Лапиров, 2008; Крылова, 2010).

Целью нашей работы было изучение влияния сульфата меди на прорастание семян и начальные этапы развития проростков водных растений разных экологических групп: рдеста гребенчатого (*Potamogeton pectinatus* L.) - гидрофита; поручейника широколистного (*Sium latifolium* L.) и частухи подорожниковой (*Alisma plantago-aquatica* L.) - гелофитов; камыша лесного (*Scirpus sylvaticus* L.) - гигрофита.

Семена собирали в августе-сентябре 2008 г. в Ярославской обл. на мелководье и увлажненных побережьях малой реки Латки, затем, после холодной влажной стратификации в течение 4-5 месяцев, по 25 семян проращивали в люминостае в чашках Петри при температуре 20-25° С на фильтровальной бумаге, смоченной растворами $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 мг/л. Концентрации рассчитаны на ион меди Cu^{2+} , готовились на дистиллированной воде, диапазон подобран по рекомендации специалистов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Высокие концентрации использовали для выявления предела токсичности меди для прорастания семян (т.е., той концентрации, при превышении которой семена не прорастают). Повторность опытов трехкратная, освещенность 3200 лк, фотопериод 9/15. Контроль - дистиллированная вода. Длительность экспериментов составляла 15 дней. Определяли лабораторную всхожесть – долю проросших семян в конце эксперимента от их общего числа в % и проводили наблюдения за развитием проростков: определяли время позеленения семядолей, появления семядольных листьев, длину листьев и корней и время их отмирания. Статистическая обработка данных проводилась с помощью описательной статистики. Данные представлены в виде средних и их стандартных отклонений.

Влияние сульфата меди на прорастание семян. Семена рдеста гребенчатого прорастали дружно - на 2-е–3-е сутки. Количество проросших семян статистически достоверно зависело от концентрации металла ($r = -0,47$, $p < 0,05$, $n = 24$). Лабораторная всхожесть была выше контрольной при концентрациях 1, 25 и 50 мг/л. Данные по динамике прорастания семян показали, что основная их часть прорастает к 8-м суткам (рис.). При этом следует отметить, что быстрее, чем в контроле семена прорастали на растворах сульфата меди только при концентрации 1 мг/л. В целом процент прорастания низкий, но предела токсичности сульфата меди для прорастания семян при используемых концентрациях не выявлено.

Семена частухи подорожниковой прорастали дружно во всех вариантах на 2-е–3-е сутки. Количество проросших семян статистически достоверно зависело от концентрации металла ($r = -0,63$, $p < 0,05$, $n = 24$). Лабораторная всхожесть была немного выше контрольной при концентрациях 1 и 25 мг/л. Данные по динамике прорастания семян показали, что основная их часть проросла уже к 4-м суткам, а сходным с контрольным процесс прорастания был только при концентрации 1 мг/л (рис.). Концентрации сульфата меди 50-500 мг/л угнетали процесс прорастания, однако предела токсичности для него не выявлено.

Семена поручейника широколистного прорастали раньше в контроле и при концентрациях 1-25 мг/л, позже – при 50-100 мг/л и не прорастали при 250 и 500 мг/л. Количество проросших семян статистически достоверно зависело от концентрации металла ($r = -0,71$, $p < 0,05$, $n = 24$). Лабораторная всхожесть была близка контрольной при концентрациях 1-25 мг/л. Данные по динамике прорастания семян показали, что основная их часть прорастает к 10-м суткам (рис.). При этом концентрации меди 10 и 25 мг/л на 5-е - 8-е сутки стимулировали прорастание семян, концентрации 50 и 100 мг/л угнетали этот процесс. Установлен предел токсичности меди для прорастания семян этого вида – между 100 и 250 мг/л.

Семена камыша лесного прорастали дружно в контроле и при концентрациях 1–25 мг/л, при концентрациях 50-500 мг/л семена не проросли. Количество проросших семян статистически достоверно зависело от концентрации металла ($r = -0,61$, $p < 0,05$, $n = 24$). Лабораторная всхожесть была близка контрольной при концентрациях 1 и 10 мг/л. Концентрация меди 1 мг/л стимулировала процесс прорастания, а концентрация 25 мг/л угнетала его. Данные по динамике прорастания семян показали, что основная масса семян проросла к 9-м суткам (рис.). Установлен предел токсичности меди для прорастания семян этого вида – между 25 и 50 мг/л.

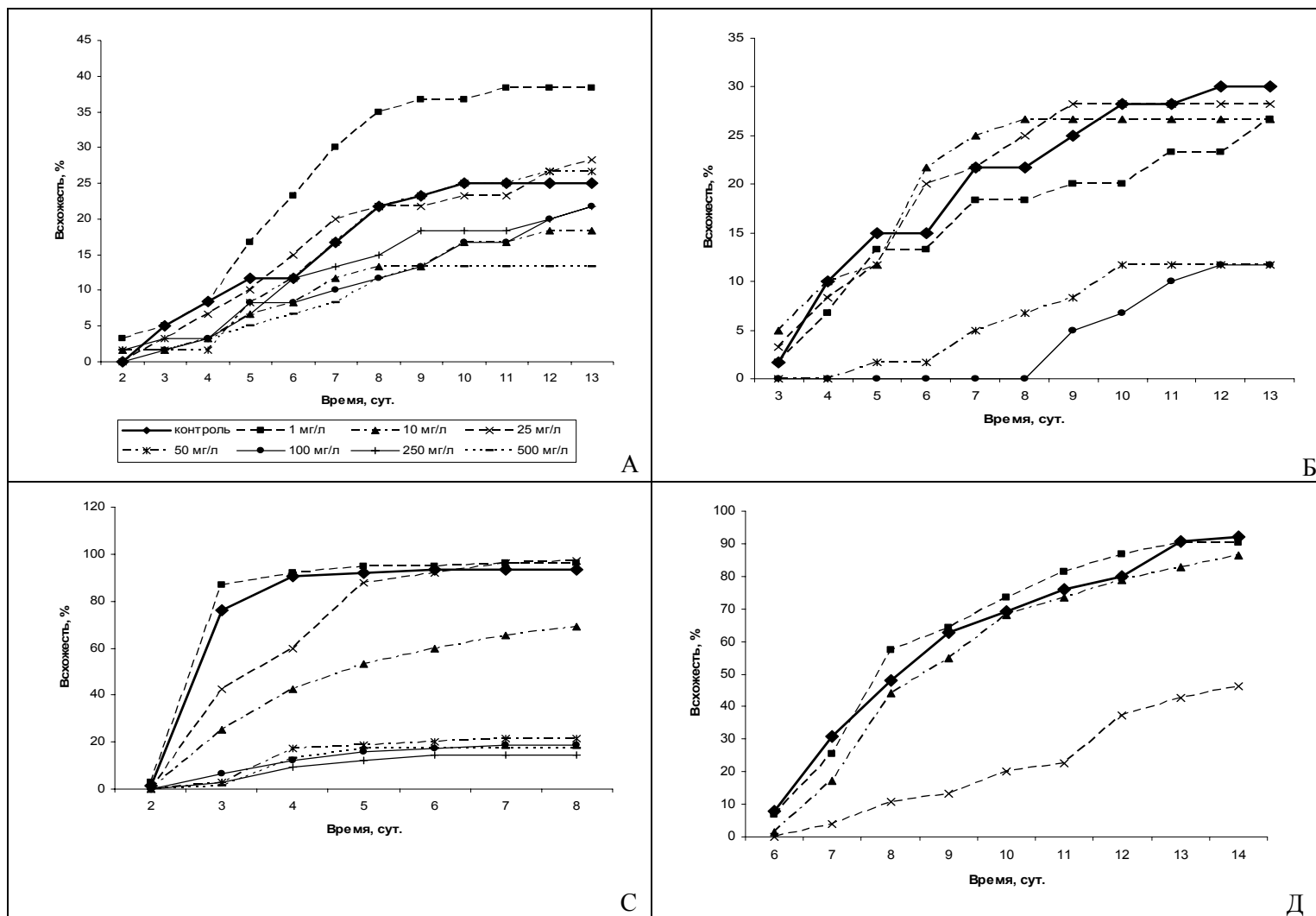


Рис. Динамика прорастания семян *Potamogeton pectinatus* (А), *Sium latifolium* (Б), *Alisma plantago-aquatica* (В) и *Scirpus sylvaticus* (Д). По оси абсцисс – Время, сут., по оси ординат – всхожесть, %.

Таким образом, была установлена закономерность влияния сульфата меди разных концентраций на прорастание семян исследуемых видов в зависимости от их экологической группы. Для гидрофита и гелофитов наблюдали стимулирующее воздействие низких концентраций сульфата меди. Предел токсичности (250–500 мг/л) у этих групп видов обнаружили только поручейника широколистного, который относят к переходной группе гелогидрофитов. У гидрофита предел токсичности установлен между 25 и 50 мг/л сульфата меди. Наряду с экологическими условиями произрастания сыграли роль малые размеры семян и особенности строения их оболочки. Медь, обладая средней степенью поглощения, вызывает нарушение мембранных барьеров клетки, что и послужило причиной значительного токсического эффекта.

Влияние сульфата меди на развитие проростков. Проростки рдеста гребенчатого быстрее развивались при концентрациях меди 1 и 10 мг/л, чем в контроле и при концентрациях 25 и 50 мг/л (табл.).

Таблица. Основные показатели прорастания семян и развития проростков под влиянием Cu

Таблица. Основные показатели прорастания семян и развития проростков под влиянием Cu							
Концентрация металла, мг/л	Лag-время	Позеленение семядолей	Появление семядольных листьев	Длина, мм		Отмирание листьев и корней, сут	Лабораторная всхожесть, %
	сут.			листьв	корней		
Рдест гребенчатый							
Контроль	3	4	6	8-10	4-6	нет	25±8,7
1	2	3	5	12-14	4-6	нет	38,3±7,6
10	2	3	5	8-10	3-5	9	18,3±2,9
25	3	4	6	8-10	3-5	8	28,3±10,4
50	2	4	6	6-8	2-4	8	26,7±17,5
100	3	4	7	6-8	1-3	8	21,7±5,8
250	2	нет	нет	0	0	7	21,7±7,6
500	2	нет	нет	0	0	7	13,3±2,9
Поручейник широколистный							
Контроль	3	5	8	6	5-6	нет	30,0±5,8
1	3	5	8	6-7	5-6	нет	26,7±4,4
10	3	5	8	7-8	6-7	нет	26,7±6,7
25	3	5	8	7-8	6-7	нет	28,3±3,3
50	5	8	нет	0	0-1	13	11,7±2,9
100	9	нет	нет	0	0-1	11	11,7±7,3
250	нет	нет	нет	0	0	-	0
500	нет	нет	нет	0	0	-	0
Частуха подорожниковая							
Контроль	2	3	4	8-10	6-8	нет	93,3±8,3
1	2	3	4	10-12	6-8	нет	96,0±4,0
10	3	3	5	8-10	4-6	9	69,3±25,7
25	3	3	5	6-8	2-4	9	97,3±2,3
50	3	3	нет	0	0	8	21,3±14,0
100	3	5	нет	0	0	7	18,7±18,9
250	3	5	нет	0	0	7	14,7±12,8
500	3	5	нет	0	0	6	17,3±12,8
Камыш лесной							
Контроль	6	7	9	8-10	6-7	нет	92,0±8,0
1	6	7	9	12-14	7-9	нет	90,4±4,8
10	6	7	9	5-7	3-5	нет	86,4±4,8
25	7	9	12	5-7	3-5	нет	46,4±23,5
50	нет	нет	нет	0	0	-	0
100	нет	нет	нет	0	0	-	0
250	нет	нет	нет	0	0	-	0
500	нет	нет	нет	0	0	-	0

При этом в варианте с концентрацией 1 мг/л наблюдали увеличение длины листьев и интенсивности их окраски. В вариантах с концентрациями 250 и 500 мг/л у проросших семян дальнейшего развития не наблюдалось, а на 7-й день проростки в них начали отмирать. На 8-й–9-й дни некроз затронул варианты с концентрациями 10–100 мг/л и усиливался с увеличением концентрации меди. Нормально развивались проростки только при концентрации 1 мг/л.

Проростки частухи подорожниковой хорошо развивались при концентрациях меди 1–25 мг/л (табл.). При этом в варианте с концентрацией 1 мг/л, как и у рдеста, наблюдали увеличение длины листьев и интенсивности их окраски. При концентрациях 50–500 мг/л семядоли позеленели, но уже на 6-й–8-й дни начали отмирать. На 9-й день некроз затронул и варианты с концентрациями 10–25 мг/л. Нормально развивались проростки только при концентрации 1 мг/л.

Проростки поручейника широколистного в вариантах с концентрациями 1–25 мг/л развивались быстро – на 2-е сутки они достигли значительных размеров с семядольными листьями и корнями, в последних двух вариантах больших размеров, чем в контроле (табл.). При концентрации 50 мг/л семядольные листья не развивались, ингибировалось развитие корней, при концентрации 100 мг/л наблюдали только проклевывание корешком зародыша покровов семени. В вариантах с концентрациями 250 и 500 мг/л проросших семян не было. В дальнейшем при концентрации 100 мг/л проростки начали отмирать. В варианте с концентрацией 25 мг/л изменялась интенсивность окраски листьев, а при 50 мг/л наблюдался частичный некроз листьев и корней. Нормальное развитие продолжалось в вариантах с концентрациями 1 и 10 мг/л.

Проростки камыша лесного при развитии в контроле и в варианте с концентрацией 1 мг/л были одинаковы и больших размеров, чем в вариантах с концентрациями 10 и 25 мг/л. При концентрациях 1–10 мг/л образовывались семядольные листья, имелись хорошо развитые корни (табл.). При концентрациях 10 и 25 мг/л длина листьев и корней значительно уменьшалась. В вариантах с концентрациями 50–500 мг/л проросших семян не было. В конце эксперимента нормально развивались проростки только при концентрации 1 мг/л, и они были больших размеров, чем в контроле.

Таким образом, более устойчивыми к действию солей меди оказались проростки поручейника широколистного, что подтверждает мнение о том, что сила ингибирования формирования проростков ТМ зависит от вида растения (Лапиров, 2008). При этом концентрация 1 мг/л у проростков всех видов вызывала увеличение размеров листьев и усиление их окраски, что подтверждает мнение об активации низкими концентрациями меди биосинтеза хлорофилла. А.Г. Лапиров (2008) в работе с частухой подорожниковой показал, что Cu в концентрациях 0.01–1 мг/л стимулирует ростовые процессы и увеличивает морфометрические показатели проростков. Подобный эффект низких концентраций меди, возможно, связан с активацией клеточного деления и увеличением размеров клеток. При более высоких концентрациях наблюдали побурение семядолей, связанное с нарушением фотоморфогенеза, а в дальнейшем и некроз кончиков корней и листьев. Однако концентрации, его вызывающие, оказались более высокими для проростков поручейника широколистного и камыша лесного, что, возможно, объясняется экологией видов. Присутствие тяжелых металлов в воде изменяет ее фракционный состав в сторону повышения количества связанной воды, что приводит к увеличению водоудерживающей способности тканей и снижению интенсивности транспирации (Тарабрин, 1980). А нарушение водного баланса при высоких концентрациях ТМ является одной из причин их токсичности для растений, что, по-видимому, сильнее сказывается на гидрофитах и гелофитах.

Список литературы.

- Демидчик В.В., Соколик А. И., Юрин В.М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи совр. биологии 2001. Т. 121, № 5. С. 511–525.
- Крылова Е. Г. Токсичность солей никеля и меди для семян и проростков рдеста гребенчатого (*Potamogeton pectinatus* L.), частухи подорожниковой (*Alisma plantago-aquatica* L.), поручейника широколистного (*Sium latifolium* L.) и ситника скученного (*Juncus conglomerates* L.) // Токсикологический вестник. 2010. №1. С.41–44.
- Лапиров А.Г., Микрякова Т.Ф. Влияние меди на формирование проростков частухи подорожниковой (*Alisma plantago-aquatica* L.) // Биология внутренних вод 2006. № 4. С. 72–76.
- Лапиров А.Г. Влияние некоторых тяжелых металлов на прорастание семян и развитие проростков *Alisma plantago-aquatica* (*Alismataceae*) и *Bidens tripartita* (*Asteraceae*) // Раст. ресурсы. 2008. Вып.4. С. 98–106.
- Перечень предельно допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней воздействия вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов 1995. М.: Мединор, 220 с.

Тарабрин В.П. Физиология устойчивости древесных растений в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Микроэлементы в окружающей среде. Киев: Наукова думка. 1980. С.17-21.
Clemens S. Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants // Biochemistry. 2006. V.88. P. 1707-1719.
Kramer U., Talke I., Hanikenne M. Transition Metal Transport // FEBS Lett. 2007. V. 581. P. 2263-2272.

КАСПИЙСКИЙ ТЮЛЕНЬ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

В.В. Кузнецов

*Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГУП «КаспНИРХ»)
414056, г. Астрахань, ул. Савушкина, 1, Россия, wasil2@mail.ru*

Россия занимает первое место в мире по добыче нефти и газа и является одной из крупнейших стран-экспортеров нефти. За границу идет более 1/3 добываемого сырья, так как отрасль, наращивая поставки, стремится максимально использовать благоприятную конъюнктуру мирового рынка. По прогнозам экспертов, высокие цены на нефть сохранятся еще несколько лет. Вовлечение Каспийского моря, в частности его северной части, в общую добычу углеводородов требует от России нового подхода к мониторингу биоресурсов в Северном Каспии. Загрязнение морской среды нефтью, ее углеводородами и нефтепродуктами – существенный фактор антропогенного воздействия на экосистемы внутренних морей, который становится особенно значимым при разработке и промышленной эксплуатации морских месторождений нефти и газа. Исследование нефтяных загрязняющих веществ наиболее актуально для Каспийского моря, где речные выносы, интенсивная разработка и транспортировка углеводородного топлива относятся к потенциальным источникам углеводородного загрязнения водоема (Немировская и др., 2006).

В Каспийском море обитает единственный представитель ледовой формы морских млекопитающих – каспийский тюлень (*Phoca caspica*). Его миграции приурочены к распределению кормовых организмов и проходят весной и осенью с севера на юг и обратно. Размножение происходит зимой на льдах Северного Каспия. В летний период в этой части моря остаются для нагула больные и ослабленные особи, что делает Северный Каспий для каспийского тюленя особенно значимым для существования своей популяции. В 2010 г. российская нефтяная компания «Лукойл» начала промышленную добычу нефти на месторождении им. Ю. Корчагина, расположенного в 180 км от Астрахани на глубине 11-13 м (рисунок 1). Запасы дорогостоящего шельфового проекта оцениваются в 570 миллионов баррелей нефтяного эквивалента, на пике добычи в 2011-2012 гг. он сможет давать 2,5 миллиона тонн нефти в год или около 2,5% добычи компании. Это первое из 6 месторождений «Лукойла» на Северном Каспии. Как сообщает РИА «Новости», в 2015 г. компания планирует начать добычу на крупнейшем из них – месторождении им. В. Филановского, добыча которого ожидается на уровне 10,5 миллионов тонн нефти в год.

Весной после распаления льда тюлени концентрируются на акватории Северного Каспия. Их нагул начинается в этом районе во время подхода высоких концентраций обыкновенной кильки и сельдевых видов рыб. Истощенным и ослабленным особям весной после зимовки необходимо восстановить энергетические силы для продолжения трофических миграций на юг. Они образуют смешанные концентрации, состоящие из нескольких физиологических групп: самки, участвовавшие в размножении, яловые самки, половозрелые самцы и приплод. К ним также можно отнести и тюленей, которые постоянно свой нагул и осуществляют в Северном Каспии. Это больные и ослабленные особи, обладающие высокой степенью заражения болезнетворной микрофлорой, они могут погибать летом от естественных причин.

В весенний период (апрель–май), с 2004 по 2010 гг., оценка численности смешанных концентраций тюленей в Северном Каспии, в российской части акватории моря проводилась методом судового маршрутного учета. Такие маршрутные учеты с использованием морских судов успешно применяются в Белом море для определения численности морского зайца и кольчатой нерпы (Елисеева, 2006). Каспийский тюлень, как и все морские млекопитающие, для дыхания использует атмосферный кислород. Эта его особенность выныривать и находиться некоторое время на поверхности акватории моря позволяет исследователю (учетчику) осуществлять его количественный учет. Основой судового маршрутного учета является визуальное определение объекта, зарегистрированного во время учета.

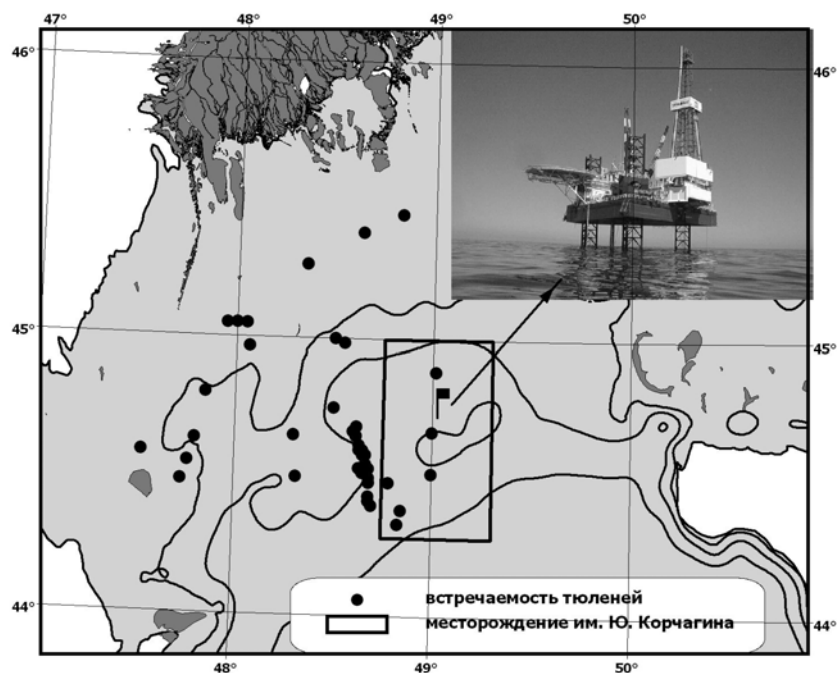


Рис. 1. Встречаемость тюленей весной 2010 г. в Северном Каспии, экз.

Маршрутный учет осуществлялся на научных морских судах ФГУП «КаспНИРХ» во время комплексных траловых съемок. Визуальные наблюдения проводились в течение светового дня. Во время маршрута отмечались координаты движения судна, вынырнувших тюленей, их количество и дистанция от наблюдаемого объекта (тюленя) до линии движения судна. В период движения судна определяется протяженность (км) всех дневных маршрутов. Рассчитывается эффективная ширина (км) учетной полосы и средняя плотность (экз./км²) на данном участке акватории моря. Для уменьшения систематической ошибки оценки недоучета, ширина учетной полосы определяется как средняя дальность обнаружения тюленей (Челинцев, 2010). Также определяется частота встречаемости каспийского тюленя, которая выражается в количестве особей, приходящих на 100 км маршрута.

За весь период исследований с 2004 по 2010 гг. было обследовано 7179 км, учтено 526 экз. каспийского тюленя. В разные годы общая протяженность маршрутного учета колебалась от 190 до 1873 км. Ширина учетной полосы составляла от 60 до 100 м. Минимальное количество тюленей отмечалось в 2004 г. – 13 экз., максимальное число особей наблюдалось в 2005 г. – 170 экз. Плотность (экз./км²) распределения тюленей на акватории Северного Каспия на протяжении последних 7 лет колебалась от 0,64 до 0,91 экз./км² (рисунок 2).

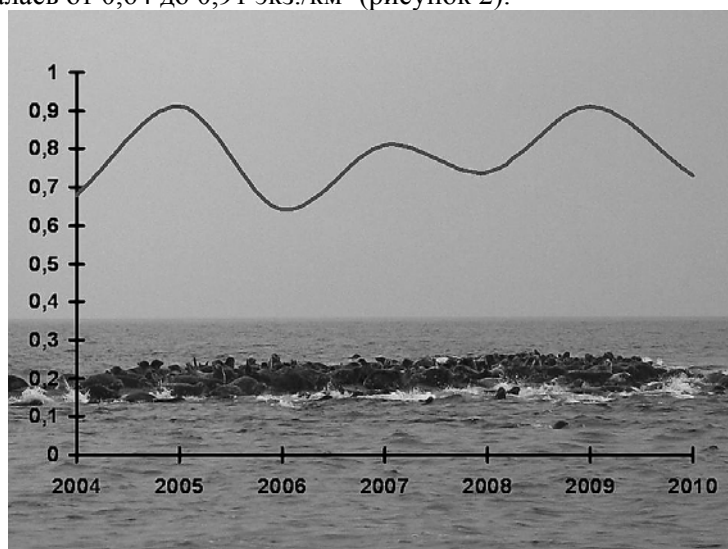


Рис. 2. Плотность тюленей весной в Северном Каспии, экз./км²

Доля тюленей в российской части Северного Каспия в разные годы колебалась от 9 до 34%. До 2007 г. среднегодовая изменчивость плотности распределения тюленей составляла 30%. В период с 2007 по 2010 гг. этот показатель снизился в 1,8 раза, что говорит об улучшении условий существования популяции каспийского тюленя.

В осенний период половозрелые особи мигрируют в Северный из Среднего и Южного Каспия, где проводится их основной нагул. На льдах Северного Каспия осуществляется их размножение, лактация, спаривание и линька. В октябре – ноябре в местах предзимних концентраций тюленей в северной части моря производился их отлов для полного биологического анализа. Воспроизводительная способность популяции определялась по наличию эмбриона у беременных самок. Яловость половозрелых самок обусловлена несколькими основными причинами: низкая доля половозрелых самцов в популяции, увеличение возраста наступления физической зрелости и преждевременные роды в период их нагула. Изучение структуры половозрелого стада позволяет регистрировать негативные или положительные изменения, происходящие в популяции и прогнозировать их состояние в последующие годы. В последние годы в структуре также отмечаются положительные тенденции роста численности популяции. Увеличивается, хотя и незначительно, доля половозрелых самцов. В межгодовой динамике снижается относительное количество яловых самок (таблица 1). В то же время в 2009-2010 гг. отмечается увеличение возраста наступления физической зрелости у половозрелых самок с 8-10 до 12-15 лет, что вызвано неблагоприятными условиями среды в период роста и развития молодых особей.

Таблица 1. Структура половозрелых особей в популяции каспийского тюленя, %

Годы	Половозрелые самки		Половозрелые самцы
	беременные	яловые	
2004	82	7	11
2005	43	29	28
2006	35	60	5
2007	58	31	11
2008	71	14	15
2009	50	10	40
2010	55	23	22
Среднее	56	25	19

В 2010 г. в районе о. Малый Жемчужный проводилось изучение погибших особей от естественных причин. У мертвых тюленей, имеющих разную степень разложения, определяли половую и возрастную структуру. Они принадлежали разным возрастным группам: от 1 до 16 лет. Среди них доминировали (50%) особи в возрасте 14–16 лет. В соотношении полов доля самцов составляла 83%. Самцы в популяции каспийского тюленя больше подвержены, чем самки воздействию неблагоприятных факторов. Это может быть связано с тем, что они совершают более протяженные трофические миграции. По многолетним данным, по мере старения у взрослых особей доля самцов снижается с 46% в возрастной группе 8-10 лет до 20% среди особей 21-30 лет, что является неблагоприятным фактором в популяции тюленя.

Каспийский тюлень замыкает трофическую цепь в экосистеме Каспийского моря. С 1995 г. количество анчоусовидной кильки в пищевом рационе каспийского тюленя уменьшилось в 3 раза. В 2003 г. продолжалась тенденция снижения запасов основных кормовых объектов тюленя, пелагических морских рыб, обеспечивающих его нагул в Среднем и Южном Каспии. Снижение подтверждается низкоурожайным поколением и падением суточных промысловых уловов (Хураськин и др., 2004). Депрессивное состояние в последние годы основной популяционный корм, представленный анчоусовидной килькой, в последние годы замещается другими пищевыми объектами, запасы которых в достаточной степени удовлетворяют пищевые потребности популяции каспийского тюленя. К ним относятся такие пелагические кормовые организмы, как обыкновенная килька, атерина, кефаль и сельдевые виды рыб.

Величина массы тела и толщины подкожного жира являются интегральными показателями состояния накормленности в популяции тюленей (Петров, Смирнова, 2007). Они характеризуют условия нагула в летний период на акватории Среднего и Южного Каспия. По этим данным можно дать оценку условиям предшествующего нагула (рисунок 3).

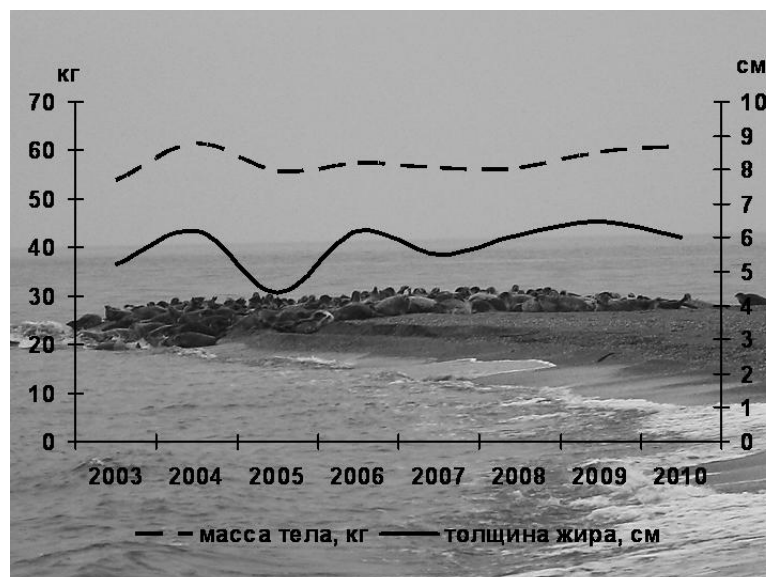


Рис. 3. Многолетняя динамика массы тела и упитанности половозрелых особей

Условия нагула тюленей в 2005 г. относятся к неблагоприятным. Оптимальная накормленность особей отмечалась в 2004, 2006 и 2009 гг. До 2009 г. кормовые условия в основных районах нагула и средняя плотность тюленей весной в Северном Каспии имели обратно пропорциональную зависимость. Это связано с депрессивным состоянием кормовой базы и высокой степенью конкурентной борьбы за пищу и территорию. Пищевые ресурсы ограничивали рост численности популяции тюленей. В 2009 г. увеличение их плотности не повлияло на их упитанность и сопровождалось ростом толщины подкожного жира, что может свидетельствовать об увеличении запасов некоторых кормовых организмов (обыкновенная килька) в Каспийском бассейне.

Проведенные мониторинговые исследования ФГУП «КаспНИРХ» с 2003 по 2010 гг. по оценке состояния популяции каспийского тюленя свидетельствуют об отсутствии серьезного влияния со стороны нефтяных разработок в российской части Северного Каспия. На протяжении многих веков популяция каспийского тюленя выработала защитные механизмы в регуляции своей численности. Недостаток в структуре половозрелых самцов регулируется увеличением их доли (67%) в приплоде 2009 г. Биологические показатели морского зверя в межгодовой динамике свидетельствуют о стабильных параметрах существования популяции каспийского тюленя.

Следует отметить, что тюлени особенно уязвимы к разливам нефти из-за плотности размещения, постоянного пребывания в воде и влияния на теплоизоляцию меха. Попытка имитировать влияние разливов нефти на популяцию тюленей на Аляске показала, что относительно небольшая часть (4%) от общего количества погибает при «чрезвычайных обстоятельствах», вызванных разливами нефти. Ежегодная естественная гибель (16% самок и 29% самцов) плюс гибель в результате попадания в ставные сети (2% самок и 3% самцов) сокращают численность тюленя (Алберс, 1990). Поэтому нефтяные компании, разрабатывающие углеводородное сырье на акватории Северного Каспия, должны резко увеличить свою обеспокоенность о единственном представителе морских млекопитающих в Каспийском бассейне. Это может выражаться как в дальневосточном регионе, так и введением в своем штате должности «специалиста по морским млекопитающим», создании реабилитационного центра на акватории моря для больных (летних) тюленей по опыту с серым тюленем в Ленинградской области (Алексеев, Андриевская, 2010). К мерам по сохранению каспийского тюленя следует включить проведение ежемесячного судового маршрутного учета живых и мертвых особей в районе месторождения и акватории моря, прилегающей к данному месторождению; авиаучета лактирующих самок и приплода в ледовый период; создание на мелководных банках небольших песчаных отмелей для отдыха тюленей и проведение противовирусной вакцинации больных и ослабленных (летних) особей, являющихся источником заражения патогенной микрофлорой для здоровых особей во время их миграций с юга. Это поможет избежать «конфликта» интересов между каспийским тюленем и добычей нефти со стороны человека, позволит мирное их сосуществование между собой.

Список литературы

- Немировская И.А., Бреховских В.Ф., Казмирук В.Д. Алифатические и полиароматические углеводороды в донных осадках устьевого взморья р. Волги // Водные ресурсы. – 2006. – Т. 33. – № 3. – С. 300-310.
- Елисеева Е.А. Ластоногие губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря в летне-осенний нагульный период // Тез. докл. 7 науч. сессии морской биол. станции Санкт-Петербургского госуниверситета. – СПб, 2006. – С. 83–84.
- Челинцев Н.Г. Методика расчета численности белух (*Delphinapterus leucas*) по данным авиаучетов // Морские млекопитающие Голарктики : сб. науч. докладов по материалам 6 Междун. конф. – Калининград, 2010. – С. 609–615.
- Хураськин Л.С., Захарова Н.А., Кузнецов В.В., Хорошко В.И. Новые данные по мониторингу каспийского тюленя (*Phoca caspica*) // Морские млекопитающие Голарктики : сб. науч. докладов по материалам III Междун. конф. – М., 2004. – С. 568–573.
- Петров Е.А., Смирнова О.Г. Возможные причины негативных явлений и состояние популяции нерпы оз. Байкал // Проблемы изучения, сохранения и восстановления водных биологических ресурсов в XXI веке: Сб. науч. тр. – Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, 2007. – С. 84-87.
- Алберс, П. А. Разливы нефти и окружающая среда. – М.: Мир, 1990. – 311 с.
- Алексеев В.А., Андриевская Е.М. Опыт проведения работ по реабилитации щенков серого тюленя (*Halichoerus grypus*), балтийской (*Pusa hispida botnica*) и ладожской нерпы (*Pusa hispida ladogensis*) в 2007-2009 гг. // Морские млекопитающие Голарктики: сб. науч. докладов по материалам 6 Междун. конф. – Калининград, 2010. – С. 30–33.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДЫ НА ОСНОВЕ БИОМАРКЕРОВ ПОВЕДЕНИЯ И КАРДИОАКТИВНОСТИ БРЮХОНОГОГО МОЛЛЮСКА *ROMACEA* SP.

Т.В. Кузнецова, Д.Л. Богданова, С.В. Холодкевич

Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН,
Санкт-Петербург. Корпусная ул., д.18, Россия, kuznetsova_tv@bk.ru

Водные экосистемы, будучи конечным звеном миграции загрязняющих веществ, могут служить индикаторами современной экологической ситуации, складывающейся на примыкающих к ним территориях под воздействием природных и техногенных процессов. Современный экологический подход к определению совокупности признаков, характеризующих качество водной среды, включает оценку ее пригодности для обитания в ней гидробионтов. При этом поведенческие и физиологические характеристики видов-биоиндикаторов могут быть использованы как биомаркеры для оценки качества, токсичности среды с учетом ее абиотических характеристик. Биотестирование представляет собой один из приемов исследования в водной токсикологии, который используют для определения степени повреждающего действия химических веществ, потенциально опасных для гидробионтов, в контролируемых экспериментальных лабораторных или полевых условиях путем регистрации изменений биологически значимых показателей (тест-функций) исследуемых тест-объектов, с последующей оценкой их состояния в соответствии с выбранным критерием токсичности (Флеров, 1983; Крайнюкова, 1986). Таким образом, тест-объект выступает в роли “прибора”, выявляющего интегральный биологический эффект комплекса неблагоприятных экологических факторов, в том числе и химической природы.

Целью работы являлась разработка и апробация нового физиологического метода оценки токсичности воды с использованием брюхоногих моллюсков в качестве тест-организмов.

Материалы и методы исследования. Объектом настоящего исследования являлся брюхоногий моллюск ампулярия – *Romacea* sp., часто используемый в биотестировании пресных вод, например, с помощью методики ПРМ-ТЕСТА (Зайцева, 1997), в которой изменение спектра поведения моллюска используется для оценок токсичности воды. Возраст моллюсков из лабораторной культуры, полученной методом близкородственного скрещивания, был около 6-8 месяцев. Для оценки адаптационно-компенсаторных возможностей тест-организмов в норме и при токсическом воздействии ионов тяжелого металла (меди) нами применялась методика математического анализа сердечного ритма. Сердечный ритм регистрировался неинвазивно с помощью оригинального волоконно-оптического метода, разработанного в НИЦЭБ РАН

(Холодкабеля позволяла моллюскам свободно перемещаться по всему аквариуму, не изменяя спектр их естественноевеч и др., 2007; Kholodkevich et al., 2007).

Длина и гибкость волоконно-оптического го поведения. Для регистрации спектра поведенческих реакций использовался аквариум объемом 3л (24·12·7,5см), оборудованный нагревателем воды, аэратором и биофильтром. В одном наблюдении использовали одну улитку. Время каждого наблюдения составляло 1 ч. Время между отсаживанием улитки в экспериментальный аквариум и началом регистрации составляло не менее 15 мин. Все наблюдения проводились в период с 15 до 18 ч дня.

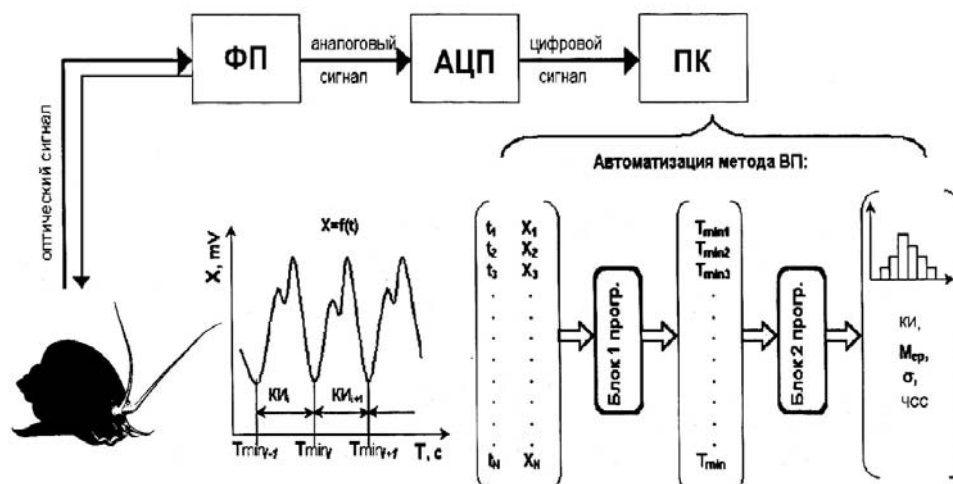


Рис. Блок-схема установки и методика обработки данных.

Обозначения: ФП – фотоплетизмограф, АЦП – аналого-цифровой преобразователь, ПК – персональный компьютер, KI – кардиоинтервалы, σ – среднееквадратичное отклонение в выборке из 50 KI, ЧСС – частота сердечных сокращений.

В ходе визуальных наблюдений поведенческих реакций в контрольной среде последовательно регистрировали все четко выраженные поведенческие акты (время активной локомоции, количество остановок, совершенные дыхательные движения (вдохи и выдохи), дефекация, жевательные движения (количество жевательных движений считалось за 1 мин). Для каждой улитки проводили три повторности. Результаты повторностей затем усреднялись. После проведения трех наблюдений улитку возвращали в аквариум с контрольной водой.

Количественными показателями изменения функционального состояния животного в настоящей работе являлась частота сердечных сокращений. Регистрацию фоновой кардиоактивности улитки проводили непрерывно в течение 3-х суток в реальном времени. Обработка полученных данных (расчет межимпульсных интервалов, средней ЧСС в выборке из 50 кардиоинтервалов, СКО выборки) осуществлялась программно (Kholodkevich et al., 2007). Регистрацию кардиоактивности улиток проводили одновременно с регистрацией поведенческих актов.

В первой серии опытов для каждого моллюска проводили кратковременное (1 ч) воздействие 0.20 мг/л медного купороса (50 ПДК Cu^{2+} для пресных водоемов) путем прибавления в экспериментальный аквариум маточного раствора медного купороса.

Рассматривали кратковременное (1ч) воздействие токсиканта (первая серия опытов) и длительное (5 суток) воздействие ионов меди на тест-объект. Различия считали достоверными, если вероятность ошибки была меньше 0,05.

Визуально регистрировали поведенческие акты и наличие или отсутствие парадоксальных реакций (парадоксальное дыхание, изменение характера локомоции).

Во второй серии опытов проводили длительное (5 суток) воздействие токсиканта, после чего повторно регистрировали поведение животного и его кардиоактивность как и в первой серии опытов.

Результаты исследования и их обсуждение. На рис. 2 приведены данные по изменению основных поведенческих реакций моллюсков при 1-часовом воздействии меди. Измерялись следующие поведенческие биомаркеры: $V_{\text{лок}}$ – средняя скорость передвижения, $t_{\text{акт.лок.}}$ – процент локомоций от общего времени наблюдения, $N_{\text{жев}}$ – количество жевательных движений, $N_{\text{ост}}$ – количество остановок за время наблюдения, Дыхательные акты – демонстрация сифона, «прокачка» кислорода, «пузыри».

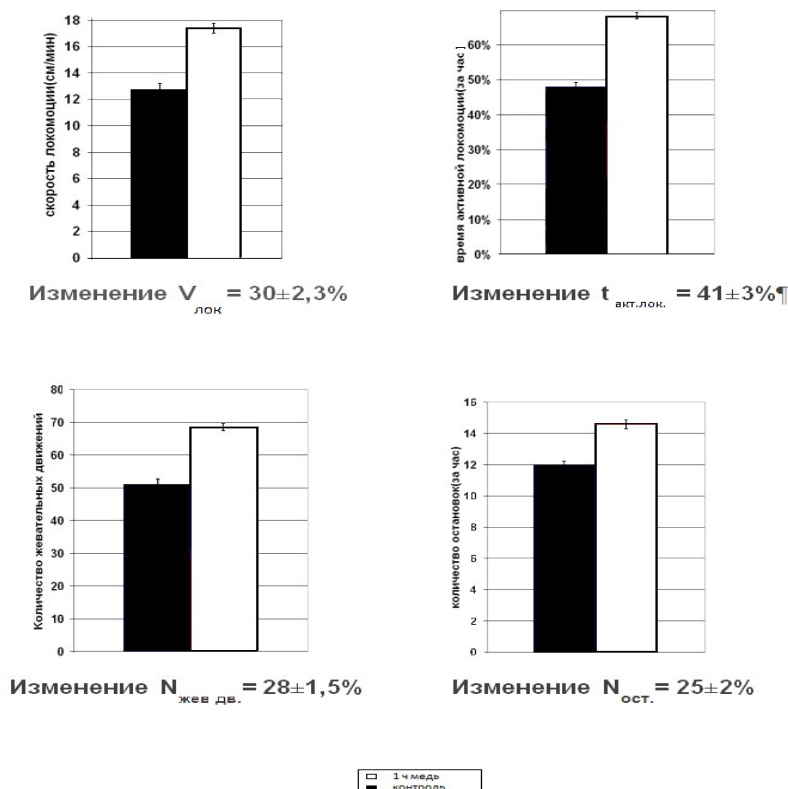


Рис. 2. Изменение характеристик поведенческих актов (в %) в контрольной (темная колонка) и токсической (светлая колонка) средах при кратковременном воздействии

Для каждого животного выявляли характерные изменения фотоплетизмограммы при совершении улиткой определенных поведенческих актов в норме и при действии токсической среды. Значение показателя фиксировалось на всей протяженности совершения поведенческого акта, во время каждого наблюдения. Затем вычислялось среднее значение по каждому показателю для каждого поведенческого акта, среди 3-х наблюдений в контрольной воде по каждому из 7 животных.

При хроническом воздействии меди (5 суток) наблюдалось общее снижение двигательной активности и переход на защитно-оборонительное поведение. Среди дыхательных актов отмечено увеличение незавершенных (сифон вытянут, но не отмечено прокачивающих движений), т.е. парадоксальных дыхательных актов.

Из актов защитно-оборонительного поведения отмечено, что вся двигательная активность у животного замедлена. Втягивание в раковину происходит медленнее, либо вовсе остается незавершенным. В этом случае часть мягких тканей остается снаружи раковины. Акты как питания, так и дефекации у моллюска отсутствуют.

По показателю кардиоактивности (средней ЧСС) при 5 сутках воздействия выявлено значимое изменение показателей для всех экспериментальных животных (рис.3-6).

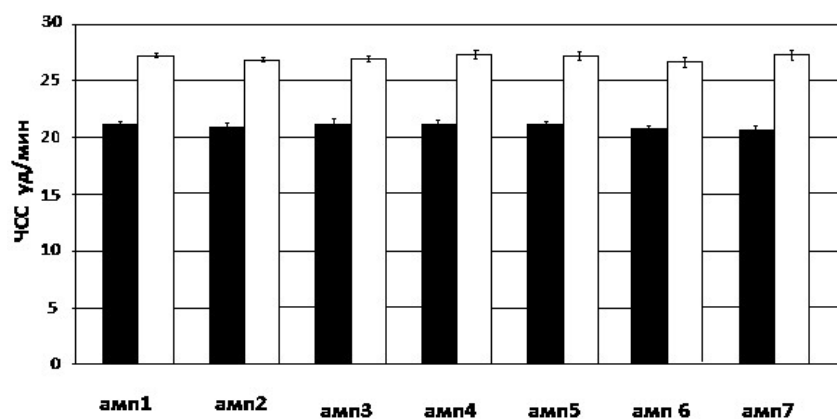


Рис. 3. Изменение ЧСС моллюсков в отсутствии локомоторной активности в контрольной (темные столбики) и токсической (светлые) средах при хроническом воздействии меди. Здесь и далее по оси абсцисс – обозначены порядковые номера тест-объектов от 1 до 7. По оси ординат – значение частоты сердечных сокращений в уд/мин.

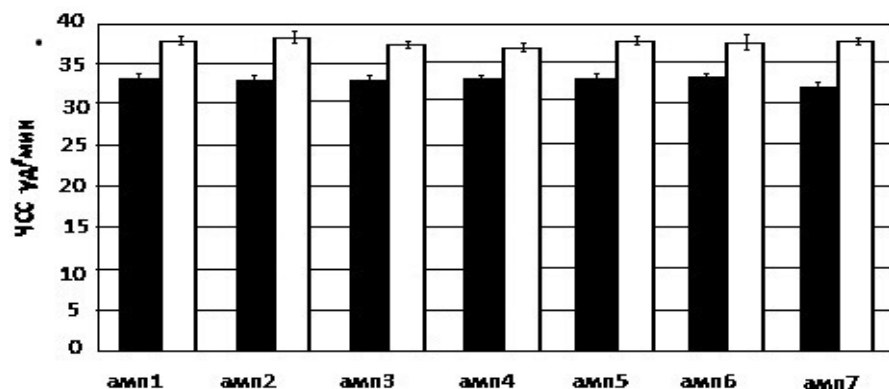


Рис. 4. Изменение ЧСС моллюсков при активной локомоции.

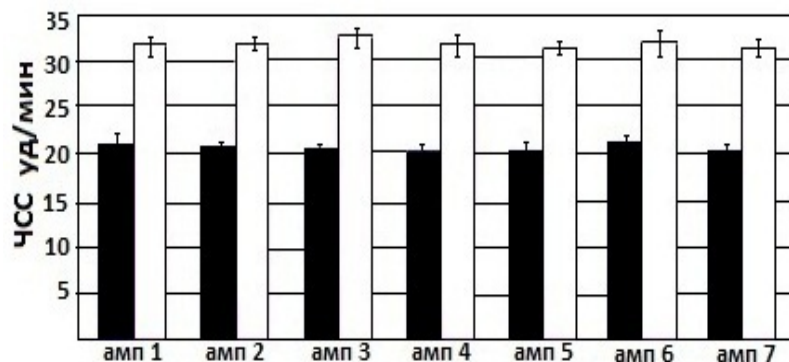


Рис. 5. Изменение ЧСС при совершении дыхательных движений

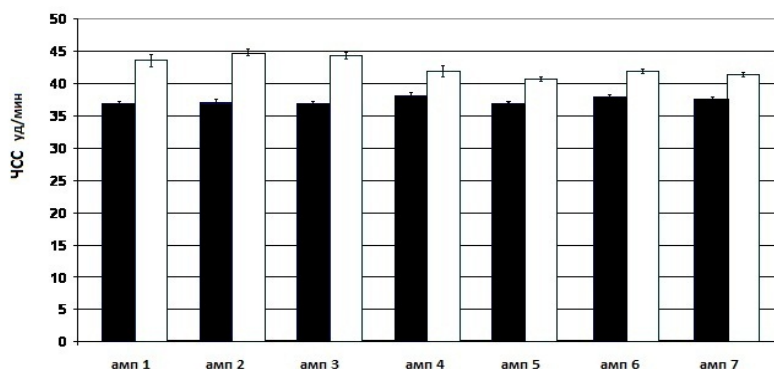


Рис. 6. Изменения ЧСС при стрессорном воздействии (хэндлинг) в контрольной и токсической средах.

После 5 суток воздействия 50 ПДК Cu^{2+} вектор поведенческих реакций меняется с ориентировочно-поискового на защитно-оборонительное, характеризующиеся снижением времени и скорости активной локомоции, наличием парадоксального дыхания, отсутствием пищевого поведения. Анализ изменения ЧСС моллюска при таком воздействии выявил увеличение вариабельности кардиоритма с чередованием в кардиоритме участков временной тахикардии, сменяющейся брадикардией.

Таким образом, на примере моллюска *Potamocorbula aspera* в настоящем исследовании показано, что поведенческие реакции брюхоногих моллюсков в совокупности с их характеристиками кардиоактивности, могут рассматриваться как перспективные биомаркеры для оценки биологически значимого изменения их среды обитания.

Список литературы.

- Зайцева О.В. Экспресс-способ биотестирования пресных вод "Поведенческие реакции моллюсков" ("ПРМ-ТЕСТ") // Бюлл. изобретений. 1997. № 17. Патент № 2082167. МПК: G01N33/18.
- Крайнюкова А.Н., Ульянова Н.П., Лысенко И.Е. Токсикологический контроль и нормирование сброса сточных вод на основе биотестирования // Экологические, технические и организационные основы охраны вод. Харьков. 1986. С. 147-151.
- Флеров Б.А. Механизмы приспособления водных животных к токсическим веществам / В кн.: Реакции гидробионтов на загрязнение. М.: Наука, 1983. С. 30-34.
- Kholodkevich S.V., Fedotov V.P., Ivanov A.V., Kuznetsova T.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L. Fiber-optic remote biosensor systems for permanent biological monitoring of the surface waters quality and bottom sediments in the real time <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2007/I/1-2007.pdf>. 15 p.
- Холодкевич С. В., Иванов А. В., Корниенко Е. Л., Куракин А. С. Способ биологического мониторинга окружающей среды (варианты) и система для его осуществления // Бюл. Изобретений, 2007, №29. Патент РФ № 2308720 С1, МПК G01N 33/18 (2006.01); G01N 21/17 (2006.01).

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ РТУТИ В КОРМЕ РЫБ НА ПРОЦЕССЫ ЭКЗОТРОФИИ У КАРПА

В.В. Кузьмина, В.Т. Комов, В.А. Гремячих, П.В. Русанова, А.В. Гладков

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

В последние десятилетия во внутренних водоёмах европейской части России в связи залповыми сбросами предприятий и смывом с поверхности земли дождевой и талой водой значительно увеличивается концентрация тяжелых металлов. По уровню токсичности лидирующее положение среди них занимает ртуть (Hg), поступающая в организм гидробионтов преимущественно по пищевым цепям (Немова, 2005). Сведения о влиянии ртути на процессы экзотрофии (поиск и поглощение пищи, пищеварение и всасывание) у рыб в значительной мере фрагментарны. Под воздействием сублетальных концентраций ртути у фундулюса *Fundulus heterolitus* L. происходит уменьшение частоты охотничьих бросков (Weis, Khan, 1990).

Установлено значительное снижение активности ряда пищеварительных гидролаз слизистой оболочки кишечника мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* Bloch и змееголова *Channa punctatus* Bloch под воздействием неорганических соединений металла (см. Кузьмина, 2008). При поступлении с пищей более токсичных органических соединений ртути (MeHg) отмечено достоверное снижение активности ферментов, осуществляющих гидролиз углеводных компонентов корма в кишечнике у некоторых видов пресноводных рыб (Голованова и др., 2008; Голованова, Комов, 2005).

Цель работы – изучение влияния метилртути, поступающей с кормом, на ее содержание в мышечной ткани, пищевое поведение, а также активность ферментов, обеспечивающих гидролиз белковых и углеводных компонентов пищи в кишечнике карпа.

Материал и методы. Работа проведена в течение 2009-2010 гг. Объект исследования – карп *Cyprinus carpio* L. в возрасте 0+. Рыбы в начале октября 2009 г. были перевезены из пруда экспериментальной базы «Сунога» ИБВВ РАН в лабораторное помещение. В течение месяца рыб содержали в проточном 200 л аквариуме. Рыб кормили два раза в неделю желированным кормом с преобладанием белковых компонентов (17.3 % белка, 1.7% жира и 0.1 % углеводов в расчете на сырую массу) *ad libitum*. Затем рыб пересадили в четыре 30 л непроточных аквариума с принудительной аэрацией: два – с контрольными, два – с опытными группами животных (в два по 30 и в два по 5 экз.). Температура воды в аквариумах поддерживалась на уровне $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Начиная с ноября рыб кормили два раза в неделю тем же кормом (5% от массы тела). При этом в корм опытных групп рыб вносили фарш из мышечной ткани серой цапли *Ardea cinerea*, содержащий Hg в концентрации 0.66 мг/кг сырой массы, контрольных групп – фарш из мышц минтая *Theragra chalcogramma*, содержащий Hg в концентрации 0.014 мг/кг. Ежемесячно в течение полугода определяли содержание Hg в мышцах рыб, взятых в районе спинного плавника, и уровень активности пищеварительных гидролаз, обеспечивающих гидролиз углеводных и белковых компонентов пищи. Пробы отбирали одновременно у 5 экз. рыб из опытной группы и у 5 экз. рыб из контрольной группы.

Для получения ферментативно-активных препаратов у рыб вскрывали брюшную полость, изымали и помещали на ледяную баню висцеральные органы. Кишечник очищали от жира, разрезали вдоль, извлекали содержимое и специальным скребком снимали слизистую оболочку переднего отдела кишечника. Слизистую тщательно перемешивали. Затем отбирали требуемое для приготовления исходного гомогената количество материала. Навески тканей гомогенизировали с раствором Рингера для холоднокровных животных (103 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 0.45 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄, pH 7.4) при температуре 0-4° С. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом, полученный гомогенат (1:9) разводили охлажденным раствором Рингера (конечное разведение – 400 раз при определении амилолитической активности (АА) и 100 раз при определении протеолитической активности (ПА). АА (суммарная активность α -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) определяли при помощи метода Нельсона в модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой (1969). ПА (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина по методу Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. Для определения АА в качестве субстрата использовали 1% раствор растворимого крахмала (pH 7.4), ПА – 1% раствор казеина (pH 7.4). Инкубацию гомогената и субстрата осуществляли при температуре 20°С в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество глюкозы или тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/г·мин.

Через 6 мес. от начала эксперимента рыб, питавшихся в тех же условиях, использовали для опытов по изучению влияния ртути на пищевое поведение рыб. Для моделирования бентосного типа питания рыб помещали в камеру из прозрачного оргстекла с перфорациями (стартовый отсек), размером 10 x 5 x 6 см, которую устанавливали у задней стенки аквариума. Передняя стенка камеры могла подниматься. У противоположной стенки аквариума помещали корм (30 экз. замороженных личинок хирономид *Chironomus sp.*, средней массой 7.5 мг). Когда передняя стенка камеры поднималась, рыбы могли выходить из камеры для поиска и потребления корма. Регистрировали три параметра – время нахождения рыб в стартовом отсеке после подъема передней стенки камеры (t_1), время, необходимое для достижения рыбами корма – латентное время питания, величина которого обратно пропорциональна скорости пищевой реакции (t_2); и

рацион (R). В последнем случае учитывали количество съеденных личинок хирономид за 3 мин наблюдения.

Определение массовой концентрации общей Hg в образцах мышечной ткани проводили в двух повторностях методом беспламенной атомной абсорбции на анализаторе ртути РА-915+ и приставке ПИРО-915+ с использованием программного обеспечения RA915P (ООО "ЛЮМЕКС", Санкт-Петербург). Точность аналитических методов измерения контролировали с использованием сертифицированного биологического материала DORM-2 и DOLT-2 (Институт химии окружающей среды, Оттава, Канада).

Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office' 95, приложение Excel). Степень различия между средними арифметическими рассчитывали с помощью критерия Стьюдента при $p \leq 0.05$.

Результаты. Влияние ртути, содержащейся в пище рыб, на динамику ее накопления в мышцах карпа. Масса рыб в течение эксперимента статистически значимо возрастала - в контрольной группе от 3.1 ± 0.2 до 6.9 ± 0.06 г, в опытной – от 3.9 ± 0.3 до 6.1 ± 0.1 г, не различаясь при этом достоверно. Содержание Hg в мышечной ткани рыб, получавших корм с низким содержанием металла, на протяжении полугода фактически не менялось, с высоким – увеличивалось ежемесячно, достоверно превышая таковое для рыб контрольной группы (Табл. 1). Начиная с 4-го месяца, содержание ртути в мышцах рыб из опытной группы значимо превышало аналогичные показатели на первые три месяца эксперимента.

Таблица 1. Влияние ртути, содержащейся в пище, на динамику ее накопления в мышцах и уровень активности пищеварительных гидролаз в кишечнике карпа

Продолжительность эксперимента, мес.	Содержание ртути, мг/кг сырой массы		Протеиназы, мкмоль/г·мин		Гликозидазы мкмоль/г·мин	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	0.25 ± 0.02	0.80 ± 0.05	1.47 ± 0.03	1.07 ± 0.02	4.53 ± 0.10	4.96 ± 0.10
2	0.25 ± 0.04	0.83 ± 0.04	$1.66 \pm 0.05^*$	1.27 ± 0.10	$5.81 \pm 0.10^*$	5.07 ± 0.06
3	0.25 ± 0.02	0.85 ± 0.05	1.60 ± 0.05	$1.66 \pm 0.07^*$	$6.78 \pm 0.06^*$	$5.87 \pm 0.30^*$
4	0.26 ± 0.02	$1.04 \pm 0.06^*$	1.64 ± 0.07	$1.68 \pm 0.06^*$	$6.89 \pm 0.06^*$	$6.10 \pm 0.11^*$
5	0.22 ± 0.02	$1.19 \pm 0.04^*$	$1.86 \pm 0.16^*$	$1.96 \pm 0.12^*$	$6.21 \pm 0.28^*$	$6.55 \pm 0.25^*$
6	0.23 ± 0.02	$1.24 \pm 0.07^*$	$1.87 \pm 0.13^*$	$2.38 \pm 0.04^*$	4.96 ± 0.17	5.13 ± 0.17

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения показателя, достоверно отличающиеся от контрольных по месяцам, звездочкой – от полученных на начало наблюдений (1-й мес.).

Влияние ртути, содержащейся в пище рыб, на динамику активности пищеварительных гидролаз слизистой оболочки кишечника карпа. Уровень ПА слизистой оболочки кишечника у рыб контрольной группы через 1 мес. после начала эксперимента увеличивался на 13% и оставался на этом уровне в течение 3 и 4-го мес. В последующие 2 мес. активность протеиназ снова возрастала на 13%. Уровень ПА слизистой оболочки кишечника у рыб опытной группы в течение первых 2-х мес. достоверно снижался по сравнению с таковым контрольных особей на 27 и 23.5% соответственно. На протяжении 3-5-го мес. различия в показателях между контрольной и опытной группами животных исчезали. Через 6 мес. отмечено достоверное превышение значений ПА по сравнению с контролем (на 27%).

Уровень АА последовательно увеличивается у рыб контрольной группы вплоть до 4-го мес., у рыб опытной группы – до 5 мес. эксперимента. Затем отмечено снижение показателя. При этом уровень АА у рыб опытной группы через 1 мес. после начала опыта оказывается достоверно более высоким (на 10%), через 2 мес. – более низким (на 13%) по сравнению с таковым контрольных особей. В последующие сроки различия между опытом и контролем уменьшаются, однако через 4 мес. отмечены достоверно меньшие значения ферментативной активности у рыб из опытной группы по сравнению с таковой рыб контрольной группы (на 11%).

Влияние ртути, содержащейся в пище рыб, на динамику двигательных реакций и рациона карпа. Под влиянием тренинга время выхода рыб из камеры и прохождения ими расстояния от камеры до корма последовательно уменьшалось, количество потребленного корма, напротив, увеличивалось (Табл. 2). Так, величина t_1 за время тренинга у рыб контрольной группы достоверно снизилась в 2.7 раза, у рыб опытной группы – в 2.2 раза. Величина t_2 у рыб контрольной группы уменьшалась в 4.3 раза, у рыб опытной группы - в 2.9 раза. Значения R у рыб контрольной группы увеличились в 1.5 раза, у рыб опытной группы - в 1.3 раза. При этом показатели t_1 и t_2 , характеризующие двигательную активность рыб из опытной группы, будучи в течение всего периода тренинга ниже контрольных, не всегда отличались от них достоверно. Величины рациона, напротив, в течение всего опыта были достоверно выше у рыб, получавших в составе корма ртуть в более высокой концентрации.

Таблица 2. Влияние ртути, содержащейся в пище рыб, на динамику двигательных реакций и рациона карпа

Время, ч	t_1		t_2		R	
	К	О	К	О	К	О
1	4.4 ± 0.6	2.6 ± 0.5	26.4 ± 3.4	15.2 ± 4.1	16.5 ± 1.6	23.2 ± 1.6
24	3.9 ± 1.2	2.5 ± 0.3	12.2 ± 2.4	9.4 ± 1.1	20.5 ± 2.3	26.5 ± 1.5
48	4.0 ± 1.3	2.0 ± 0.4	11.2 ± 2.5	7.4 ± 1.2	20.2 ± 1.6	28.3 ± 0.9
72	2.7 ± 0.4	2.1 ± 0.5	12.2 ± 1.3	9.7 ± 2.1	22.5 ± 1.7	29.2 ± 0.5
120	2.9 ± 0.3	2.1 ± 0.5	8.7 ± 1.2	7.6 ± 1.3	25.3 ± 1.1	29.2 ± 0.5
144	2.5 ± 0.3	1.7 ± 0.2	9.1 ± 1.6	4.9 ± 0.7	25.2 ± 1.7	30.0 ± 0.0
168	2.2 ± 0.3	1.4 ± 0.2	6.7 ± 0.6	4.6 ± 0.9	23.5 ± 1.6	29.2 ± 0.5
192	2.0 ± 0.4	1.7 ± 0.3	7.0 ± 0.7	5.0 ± 0.7	25.7 ± 1.2	29.5 ± 0.5
216	1.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2	6.2 ± 0.5	5.3 ± 0.8	24.8 ± 1.3	30.0 ± 0.0

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения показателя, достоверно отличающиеся от контрольных. К – контроль, О – опыт.

Обсуждение результатов. Важно отметить, что к моменту начала эксперимента содержание Hg в мышцах карпа было близко таковому у других представителей пресноводных костистых рыб Центральной и Северо-Западной части России (Комов и др., 2004). У рыб, получавших с кормом повышенное содержание Hg, уже через 1 мес. от начала эксперимента концентрация металла в мышечной ткани была выше существующих ПДК не только для «мирных», но и для хищных рыб - 0.3 и 0.5 мг/кг соответственно (Комов и др., 2004; Гремячих и др., 2006; Гремячих, Комов, 2008). С учётом ранее полученных результатов (Голованова и др., 2008; Голованова, Комов, 2005), можно было ожидать закономерного уменьшения уровня активности исследованных ферментов. Однако этот эффект наблюдали только в первый месяц эксперимента. В конце опыта наблюдалась тенденция увеличения активности ферментов обеих цепей. Выявлено достоверное увеличение активности протеиназ (на 4 и 5-й мес. наблюдения) и гликозидаз (на протяжении 4-х мес. наблюдения). Ранее при длительном действии высоких концентраций ртути, поступающей в органической форме в составе пищи, было отмечено снижение активности ферментов, осуществляющих гидролиз углеводных компонентов корма у карпа (Голованова, Комов, 2003). При исследовании гидролиза углеводов в кишечнике молоди окуня *Perca fluviatilis* с разным содержанием ртути в мышечной ткани были установлены изменения активности гликозидаз, а также их кинетических характеристик (Голованова, Комов, 2005). В наших опытах активность гликозидаз при постоянном поступлении высокой дозы Hg снижалась лишь на 2 и 4-й мес. наблюдения. В то же время активность протеиназ достоверно снижалась только в начале эксперимента. При этом в обоих случаях отмечалась одна и та же тенденция – постепенная смена ингибиторного эффекта на стимулирующий.

Принято считать, что тяжелые металлы негативно влияют на пищевое поведение рыб (Кузьмина, 2008). Однако нами выявлено улучшение всех исследованных характеристик у рыб опытной группы, систематически получавших с кормом большее количество Hg по сравнению с контролем. В литературе есть сведения об отсутствии негативного эффекта ТМ на рыб (Gale et al., 2003). Этот факт, по всей вероятности, обусловлен тем, что пролонгированное поступление ТМ в пищеварительный тракт рыб вызывает активацию всех известных механизмов их детоксикации.

Кроме того, Hg в результате недостаточного количества поступающих в кровь утилизонов (сигнальных молекул, информирующих «пищевой центр» о состоянии сытости, в том числе аминокислот и глюкозы) модифицирует работу регуляторных систем организма. Последнее может быть вызвано негативным влиянием ионов Hg^{2+} как на пищеварительные, так и на транспортные процессы в кишечнике рыб. Поскольку к моменту начала поведенческих опытов негативный эффект Hg на активность пищеварительных ферментов отсутствовал, по всей вероятности, этот феномен был вызван блокированием транспортных каналов путем замещения ионов Ca^{2+} ионами Hg^{2+} . Также возможно блокирование ионами Hg^{2+} интероцепторов, в частности хеморецепторов, расположенных в эпителии кишечника и выполняющих ту же функцию, что и утилизоны (Кузьмина, 2005).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при наличии ртути в пище, увеличение ее концентрации в мышцах рыб более интенсивно происходит в течение 1-го мес. эксперимента. В последующем темпы ее накопления снижаются. Наличие в корме Hg улучшает все исследованные характеристики пищевого поведения карпа, что может быть обусловлено влиянием ионов Hg^{2+} как на транспортные процессы, так и на хеморецепторы, расположенные в эпителии кишечника рыб. Содержание ртути в пище в концентрациях, встречающихся в организме потенциальных объектов питания, может модифицировать активность пищеварительных гидролаз и, следовательно, эффективность процессов пищеварения. Вопреки традиционному представлению о негативном действии ТМ на процессы экзотрофии у рыб, возможен и стимулирующий эффект. Характер эффекта в значительной мере является функцией времени.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-00075).

Список литературы

- Голованова И.Л., Комов В.Т. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // Вопросы ихтиологии. 2005. Т. 45. № 5. С. 695-701.
- Голованова И.Л., Комов В.Т., Гремячих В.А. Гидролиз углеводов в кишечнике плотвы *Rutilus rutilus* (L.) при различном накоплении ртути в организме // Биология внутр. вод. 2008. № 3. С. 102-108.
- Гремячих В.А., Гребенюк Л.П., Комов В.Т. и др. Накопление ртути и ее тератогенное действие на личинок *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) // Биология внутр. вод. 2006. № 1. С. 99-107.
- Гремячих В.А., Комов В.Т. Особенности накопления ртути в мышцах окуня // Состояние экосистемы озера Неро в XXI веке. Изд. «Наука». 2008. С. 263-275.
- Комов В.Т., Степанова И.К., Гремячих В.А. Содержание ртути в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России: причины интенсивного накопления и оценка негативного эффекта на состояние здоровья людей // Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: ИБВВ РАН. 2004. С. 99-123.
- Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука. 2005. 300 с.
- Кузьмина В.В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. Борок: Изд. ООО «Принтхаус». 2008. 276 с.
- Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука. 2005. 164 с.
- Gale S. A., Smith S. V., Lim R. P., Jeffree R. A., Petocz P. Insights into the mechanisms of copper tolerance of a population of black-banded rainbowfish (*Melanotaenia nigrans*) (Richardson) exposed to mine leachate, using $^{64/67}Cu$ // Aquat. Toxicol. 2003. V. 62. N 2. P. 135-153.
- Weis J. S., Khan A. A. Effects of mercury on the feeding behavior of the mummichog, *Fundulus heterolitus* from a polluted habitat // Mar. Environ. Res. 1990. V. 30. N 4. P. 243-249.

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЧЕРНОМОРСКОЙ СТАВРИДЫ *TRACHURUS MEDITERRANEUS*, ОТЛОВЛЕННОЙ В БУХТАХ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Н.С. Кузьмина

Институт биологии южных морей НАН Украины - ИнБЮМ
99006, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, Украина, kunast@rambler.ru

Средиземноморская (черноморская) ставрида (*Trachurus mediterraneus* Staindachner, 1868) относится к рыбам с выраженной флуктуацией численности. Размеры улова этого вида в Черном море зависят от антропогенного фактора (загрязнения химической природы и перелова), а также биологического загрязнения (вселение гребневика мнемииопсиса).

Несмотря на увеличение доли икры и личинок ставриды с 2000 – 2001 гг. в ихтиопланктонных ловах в районе Севастополя, повышение индекса потребления ими пищи, а

также доминирование *T. mediterraneus* в уловах взрослых рыб, стадо ставриды, все еще не восстановилось, что выражалось в его омоложении и продолжающемся снижении уловов.

В связи с этим, представлялось интересным провести анализ морфофизиологических и биохимических показателей ставриды, отловленной в акваториях с разной степенью антропогенной нагрузки, с целью изучения кратковременного комплексного загрязнения на вид-мигрант.

Материалы и методы. Экземпляры ставриды средиземноморской *Trachurus mediterraneus* отловлены в севастопольских бухтах (б. Карантинная, б. Александровская) с 2007 по 2010 гг. с помощью донных ловушек. Измеряли размеры рыб, массу рыбы и массу тушки, определяли пол, стадию зрелости и массу половых желез, селезенки и печени. Гонадосоматический индекс (ГСИ) и индекс селезенки (ИС) рассчитывали, используя массу сомы. Возраст определяли по отолитам.

Анализ и расчет активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, пероксидазы, глутатионредуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы (GST) в печени, гонадах и селезенке проводили по ранее описанным методам (Руднева, 2000), определение концентрации малых циркулирующих иммунокомплексов (ЦИК) – согласно (Кузьминова, 2010; Чиркин, 2002).

Сравнительный анализ морфофизиологических и биохимических показателей проводили для рыб, отловленных в бухтах Карантинная и Александровская. С целью выявления ответных реакций ставриды на состояние двух бухт руководствовались сведениями о загрязнении воды, грунтов и рыб из бухт Карантинной и Александровской (Миронов, 2003; Скуратовская, 2009). На основании этих литературных данных считаем, что б. Карантинная менее загрязнена, чем б. Александровская.

Результаты исследований обработаны статистически и выражены в форме $M \pm m$.

Результаты и обсуждение. В связи с тем, что морфофизиологические показатели рыб, в частности ставриды, зависят от сезона, пола и возраста особей (Кузьминова, 2006), мы рассчитали ИС и ГСИ для наиболее массовых групп рыб – 0- +1, 1+ - 2, 2+ - 3 годовалых самок и самцов.

Ранее нами было показано, что связи между величинами индекса печени ставриды, отловленной в бухтах г. Севастополя, и уровнем загрязнения этих акваторий, нет (Кузьминова, 2006).

Несмотря на отсутствие достоверных отличий между величинами ИС *T. mediterraneus* из разных бухт (кроме 3-х годовалых самцов), в большинстве случаев отмечено снижение этого показателя у особей из б. Александровская (рис. 1). Такие же результаты получены и по параметру ГСИ (рис. 2). Достоверными являются величины ГСИ 1 и 3-х годовалых самок ставриды из двух акваторий ($p \leq 0,05$).

При сравнении изученных индексов у особей одного пола разного возраста достоверных отличий не выявлено.

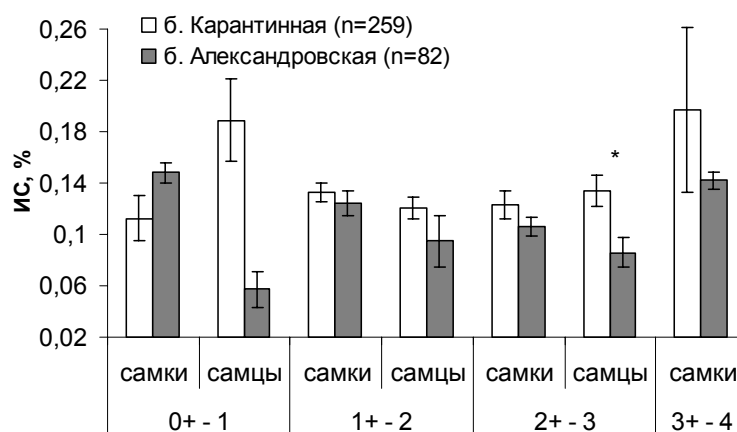


Рис. 1. Индекс селезенки черноморской ставриды, отловленной в бухтах с разным уровнем загрязнения. * - достоверные отличия величин ИС особей одного пола из двух бухт.

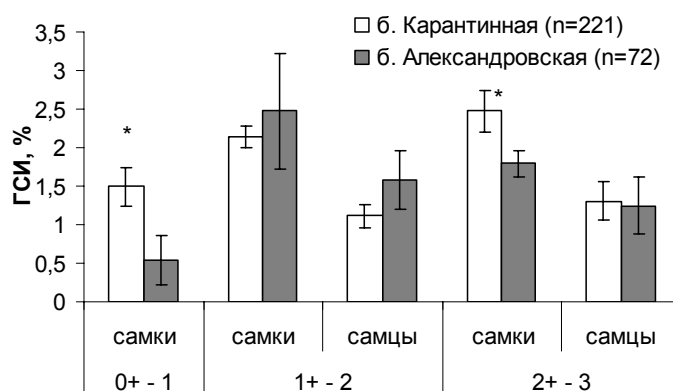


Рис. 2. Гонадосоматический индекс черноморской ставриды, отловленной в бухтах с разным уровнем загрязнения. * - достоверные отличия величин ИС особей одного пола из двух бухт.

На основании ранее проведенных исследований показано, что параметры ИС и ГСИ являются весьма чувствительными как при оценке долговременного действия загрязнения, так и при краткосрочном влиянии токсикантов (Кузьминова, 2008; Кузьминова, Питерова, 2008; Кузьминова, Скуратовская, 2008; Kuz'minova et al., 2011). Интересно, что в случае с видом с высокой плавательной активностью и/или видом-мигрантом (как в нашей работе) ИС и ГСИ оказались достаточно информативными при характеристике первичной реакции организма при заходе рыб в более загрязненную бухту. Снижение данных индексов согласуется с аналогичными результатами, проведенными ранее на других массовых видах черноморских рыб при действии хронического загрязнения и закисления (Кузьминова, 2008; Кузьминова, Питерова, 2008; Кузьминова, Скуратовская, 2008; Kuz'minova et al., 2011).

Таблица. Биохимические характеристики черноморской ставриды из бухт г. Севастополя

фермент	ткань	б. Карантинная	N	б. Александровская	N
каталаза,	печень	0.596±0.134	5	1.087±0.767	6
мг H ₂ O ₂ /	селезенка	0.313±0.063	10	0.582±0.168	6
мг белка / мин	гонады	0.111±0.027*	13	0.369±0.103	9
пероксидаза,	печень	0.675±0.461	5	0.223±0.094	5
опт. ед. /	селезенка	32.187±25.947	10	0.431±0.283	6
мг белка / мин	гонады	0.073±0.034	11	0.28±0.135	9
ГР,	печень	8.131±1.792	6	16.623±7.846	6
нмоль НАДФН /	селезенка	9.876±3.778	10	9.26±2.969	6
мг белка / мин	гонады	9.258±2.714	11	14.406±3.338	9
GST,	печень	44.472±13.032	5	127.582±114.75	6
нмоль конъюгата /	селезенка	82.333±60.43	8	125.752±33.719	4
мг белка / мин	гонады	69.704±37.435	4	87.826±23.172	8
СОД, усл. ед. /	печень	941.173±478.51	6	467.014±143.54	4
мг белка / мин	селезенка	279.4±114.065	6	367.653±106.547	4
	гонады	109.535±48.985	5	375.047±96.56	6
ЦИК, ед.опт.плот.	сыворотка	709.482±119.49	29	453.3±170.71	12

Примечание: * - различия достоверны

Более чувствительные параметры к изменению условий обитания – биохимические показатели рыб. Предварительные исследования крови ставриды не показали связи между активностью ферментов и полом, а также возрастом рыб, аналогичные данные были получены и для органов морского ерша (Кузьминова, Скуратовская, 2008; Скуратовская, 2009). На основании этого, мы не дифференцировали рыб по этим характеристикам. Активность антиоксидантных ферментов в органах ставриды, отловленной из более загрязненной акватории, была в большинстве случаев выше, чем таковая у рыб из слабо загрязненной бухты (табл.), хотя достоверными являются только отличия в активности фермента каталазы в гонадах ставриды из двух бухт. Несмотря на то, что ставрида – вид с хорошей плавательной активностью, такая реакция свидетельствует, вероятно, о том, что из-за высокой скорости метаболизма, даже в

органах происходит быстрая индукция адаптивных реакций. Ранее было показано, что в эритроцитах крови *T. mediterraneus* активность этих же ферментов была близкой у рыб из двух акваторий, с небольшим преобладанием величин у особей из б. Карантинная (Скуратовская, 2009). В нашем исследовании величины активности пероксидазы и ГР в главном кроветворном органе, как впрочем и концентрация ЦИК в сыворотке крови ставриды, отловленной в более чистой акватории, были повышены, что было показано нами и для спикары (Кузьминова и др., 2010). Эти результаты могут являться следствием фазности реакций реагирования при комплексном загрязнении прибрежной зоны г. Севастополя или могут быть объяснены компенсаторным эффектом (Кузьминова, Сторож, 2008). Действие сбросов хозяйственно-бытовых сточных вод в б. Карантинной во время пребывания и отлова рыб также могло вызвать как накопление ЦИК, так и повышенный синтез антиоксидантных ферментов в крови в ответ на усиление свободнорадикальных процессов. Такая неоднозначная картина для вида-мигранта, объясняется не только экологическими особенностями вида и тканевой специфичностью реагирования, но, видимо, связана и с близостью районов исследования, и с общим улучшением экологической ситуации в них.

Выводы. Анализ индексов внутренних органов и некоторых биохимических показателей ставриды в большинстве случаев не показал достоверных отличий у рыб, отловленных в двух близлежащих районах, отличающихся уровнем антропогенной нагрузки. Вместе с тем, установили типичную адаптивную реакцию организма рыб в ответ на пребывание в загрязненной среде: снижение индексов селезенки и гонад, а также увеличение активности антиоксидантных ферментов в гонадах и главных иммунокомпетентных органах (печени и селезенке).

Список литературы

- Кузьминова Н.С. Индекс печени черноморской ставриды как индикатор ее физиологического состояния // Риб. госп-во України. 2006. № 2(43). С. 36–38.
- Кузьминова Н.С. Видовые, сезонные, половые отличия индекса селезенки некоторых видов черноморских рыб и его подверженность антропогенному фактору // Вестник зоологии. – 2008. Т. 42. № 2. С. 135 – 142.
- Кузьминова Н.С., Сторож Н.В. Оценка токсического нефтяного загрязнения морской среды с помощью биохимических параметров рыб // Современные проблемы морской инженерной экологии (изыскания, ОВОС, социально-экономические аспекты): Материалы междунар. науч. конф. (Ростов-на-Дону, 9-11 июня 2008 г.). Ростов-н-Д., 2008. С. 132 – 135.
- Кузьминова Н.С., Питерова Т.О. Свертываемость крови и индексы иммунокомпетентных органов черноморских рыб в норме и при закислении среды // Риб. госп-во України. 2008. № 5 (58). С.57 - 59.
- Кузьминова Н.С., Скуратовская Е.Н. Половые и возрастные особенности устойчивости морского ерша *Scorpaena porcus* L. по отношению к антропогенному фактору // Системы контроля окружающей среды. Средства, информационные технологии и мониторинг: Сб. науч. трудов. Севастополь, 2008. С. 414 – 420.
- Кузьминова Н.С. Концентрация малых циркулирующих иммунокомплексов в сыворотке крови некоторых видов черноморских рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Матер. III Междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов 22 июня-26 июня 2010 г. – Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 2010. С. 96–98.
- Кузьминова Н.С., Лебедь Д.А., Завьялов А.В. Популяционные, морфофизиологические и биохимические показатели спикары *Spicara flexuosa* (Rafinesque) в современный период // Человек и животные: матер. V Междунар. научно-практ. конф. (г. Астрахань, 14 – 16 мая 2010 г.). Астрахань, 2010. С.71–77.
- Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алемов С.В. Санитарно-биологические аспекты экологии севастопольских бухт в XX веке. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. 185 с.
- Скуратовская Е.Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. Одесса, 2009. 148 с.
- Чиркин А.А. Практикум по биохимии: учеб. пособ. Минск: Новое знание, 2002. 512 с.
- Kuz'minova N., Rudneva I., Salekhova L., Shevchenko N., Oven L. State of Black Scorpion fish (*Scorpaena porcus* L., 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998 - 2008 // Turkish J. of Fisheries and Aquatic Sciences. 2011. 11. P. 101 – 111.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМИКИ В ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ

Н.В. Кулева

*Санкт-Петербургский государственный университет
г. С-Петербург, Университетская наб.7/9, Россия, kuleva@mail.ru*

Одним из перспективных направлений в методах контроля загрязнения водной среды является наблюдение за реакцией биологических объектов. Экоотоксикологическими моделями могут служить бактерии, одноклеточные организмы, примитивные ракообразные и другие гидробионты, в том числе личинки насекомых, моллюски и рыбы. Биохимический и клеточный ответ организма на неблагоприятные условия окружающей среды является самым быстрым и чувствительным биомаркером ее состояния. Он позволяет установить ранние повреждения организма при действии токсикантов, продемонстрировать зависимость доза–эффект и выявить адаптационные механизмы, включающиеся на самых ранних этапах развития токсикоза (Еропкин, Кулева, 2008).

Кроме известных биомаркеров токсичности, таких как стрессорные белки, антиоксидантные ферменты и ферменты биотрансформации ксенобиотиков, в мониторинге окружающей среды, оценке степени риска применения различных химических соединений могут быть использованы новые молекулярные биомаркеры, которые были выявлены при развитии протеомного подхода. Количество публикаций, касающихся применения протеомики в экоотоксикологии, увеличилось с 2000 по 2008 год в 10 раз. Подходы, основывающиеся на протеомике, позволяют охарактеризовать ответ организма на неблагоприятные условия среды гораздо полнее, чем использование отдельных биомаркеров или их наборов. (Monsinjon, Knigge, 2007).

Примером использования протеомного подхода в водной экоотоксикологии может служить изучение профилей экспрессии белков у двустворчатых моллюсков (*Chamaelea gallina*), экспонированных с 4-мя модельными загрязнителями среды (Rodriguez-Ortega et al., 2003). Двустворчатые моллюски очень часто используются в качестве биоиндикаторного организма в водных экосистемах. Это обусловлено их способностью аккумулировать загрязняющие вещества, их сидячим образом жизни, фильтрующим типом питания и повсеместным распространением. В качестве модельных загрязнителей исследовали следующие вещества:

- (1) Ароклор 1254, смесь полихлорированных бифенилов, которые у позвоночных индуцируют цитохром P450 и вызывают оксидативный стресс,
- (2) Cu(II) – металл с переходной валентностью, интенсифицирующий оксидативный стресс
- (3) Трибутилтин (TBT), содержащее олово органическое соединение, применяющееся для борьбы с обрастанием моллюсками днищ кораблей.
- (4) As(III), токсичный металлоид, блокирующий SH-группы и ускоряющий окислительный стресс.

Полученные из моллюсков, экспонированных с поллютантами и контрольных, белковые фракции цитозоля клеток были разделены с помощью двухмерного электрофореза, белковые пятна на электрофореграмме окрашены серебрением и среди них были выделены те, интенсивность которых изменялась под действием токсиканта. Затем некоторые из этих пятен были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF-MS и использования баз данных MASCOT, SEQUEST и др.

В работе были идентифицированы пятна, принадлежащие четырем белкам: тропомиозину, актину и его укороченному аналогу, а также легкой цепи миозина. Естественно, что помимо идентифицированных белковых пятен на электрофореграммах было обнаружено множество других измененных по интенсивности пятен, которые не были подвергнуты анализу, но которые, несомненно, несут важную информацию о механизме действия изучаемых агентов. В моллюсках, экспонированных с Ароклором или Cu(II), экспрессия актина уменьшается, в то время как экспрессия актиноподобного укороченного белка увеличивается. Противоположные по знаку изменения индуцируются двумя другими загрязнителями: с TBT и As(III) экспрессия актина усиливается, а укороченного актиноподобного белка уменьшается, соответственно.

Представленные данные касаются лишь 4 белков и были предназначены, прежде всего, для того, чтобы продемонстрировать значение протеомного подхода для обнаружения новых молекулярных биомаркеров. То, что в качестве биомаркеров загрязнения среды идентифицированы исключительно цитоскелетные белки, отражает их значительное содержание в клетках, их превалирование в базах данных для моллюсков и их роль как главных мишеней вызываемого поллютантами окислительного стресса.

Для идентификации белков на электрофореграммах были разработаны десятки методов, особое значение среди которых приобрели иммуноблоттинг и микросеквенирование. Применение иммуноблоттинга возможно лишь в том случае, если имеются соответствующие антитела. Универсальным методом для идентификации белков является масс-спектрометрический анализ. С его помощью можно не только идентифицировать белки-мишени действия токсиканта, но и выявить соответствующие пост-трансляционные модификации. Возможность с помощью протеомики исследовать различные модификации белков, вызванные загрязняющими агентами, служит основой для еще одного ее применения в водной токсикологии. Модификации белков также могут быть биомаркерами загрязнения. Среди посттрансляционных модификаций различают ковалентные (например, фосфорилирование), образование аддуктов с химическими веществами и окислительно-восстановительные.

В работе ирландских авторов (McDonagh, Sheehan, 2006b) исследованы карбонилирование, глутатионилирование и убиквитинирование белков мидий под влиянием загрязнителей и факторов окислительного стресса. Показаны различные профили модификации белков, увеличение числа окисленных белков, а также увеличение общего уровня окисления белков жабр мидий, собранных на загрязненном участке. Интересно, что главной мишенью для окисления среди белков жабр оказался актин.

В нашей работе, проведенной на беломорской мидии *Mytilus edulis* в Морском аквариальном комплексе СПбГУ, было показано, что экспозиция с ионами меди приводит к карбонилированию актина ноги мидии, сопровождающемуся образованием сшивок между мономерами актина и уменьшением скорости скольжения актиновых нитей в тесте "подвижность in vitro" (Vikhoreva et al., 2009).

Таким образом, протеомика все больше используется в экотоксикологических исследованиях. Почти две трети такого рода исследований относятся к водной среде и используют двустворчатых моллюсков, ракообразных или рыб. Далеко не для всех организмов известны геномные последовательности и это является препятствием для идентификации новых белков-биомаркеров загрязнения водной среды и установления молекулярных механизмов токсического действия. Обнаруженные до сих пор в протеомных исследованиях белки относятся к полифункциональным и широко распространенным. Дальнейшие исследования должны быть направлены в сторону идентификации малочисленных белков, а также в сторону функциональной протеомики-, например, исследования влияния токсикантов на изменение состава изоформ фермента глутатион-S-трансферазы, участвующей в детоксикации ксенобиотиков.

Список литературы

- Еропкин М.Ю., Кулева Н.В. Биохимические методы в токсикологии и экотоксикологии. 2008. СПб: Изд. С.Петербург. ун-та, 104с.
- McDonagh B., Sheehan D. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: Carbonylation is not a prerequisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. *Aquatic Toxicology*. 2006. vol. 79, p. 325-333.
- Monsinjon T., Knigge P. Proteomics applications in ecotoxicology. *Proteomics*. 2007. vol. 7, p. 2997-3009.
- Rodriguez-Ortega M., Grosvik B.E., Rodriguez-Aziza A et al. Changes of protein expression profiles in bivalve mollusks (*Chamaelea gallina*) exposed to fore model environmental pollutants. *Proteomics*. 2003. vol. 3. p. 1535-1543.
- Vikhoreva N., Vikhorev P., Fedorova M., Hoffmann R., Mansson A., Kuleva N.V. The in vitro motility assay parameters of actin filaments from *Mytilus edulis* exposed in vitro to copper ions. *Archiv. Biochem. Biophys.* 2009. vol. 491, p. 32-38.

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ ЭСТЕРАЗ У КАРПОВЫХ РЫБ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ПЕСТИЦИДАМИ РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ

И.Л. Левина, Е.А. Федорова, Л.Я. Кузнецова, О.А. Зинчук

Азовский НИИ Рыбного Хозяйства (ФГУП «АзНИИРХ»),
344002, Ростов-на-Дону, ул. Береговая, 21/в, Россия, ir_lev@rambler.ru

При оценке состояния ихтиофауны в ответ на пестицидное воздействие, являющееся одним из существенных химических факторов загрязнения водной среды, важным является исследование метаболических механизмов, обезвреживающих пестициды. Особый интерес вызывает изучение системы первой фазы детоксикации у рыб.

Как известно, в первой фазе детоксикация пестицидов происходит через реакции окисления, восстановления, гидролиза, отщепления от их молекул различных химических групп. Этот процесс осуществляется в первую очередь с участием ферментов эндоплазматического ретикулума - семейства цитохромов Р-450. Важное значение в процессах биотрансформации пестицидов играют эстеразы. Их низкая специфичность обеспечивает гидролиз эфиров различного строения, а сам процесс гидролиза при действии ферментов обычно рассматривают как средство, продуцирующее более полярные продукты со значительно меньшим токсическим потенциалом (Куценко, 2004). У животных эстеразы широко распространены в различных тканях, локализуются в микросомах и цитозоле.

Ацетилэстераза (КФ 3.1.1.6) гидролизует ацетильные сложноэфирные связи (ацетиловый эфир + H_2O = спирт + ацетат). Тривиальное название – ацетилэстераза, систематическое название - ацетил-эфир ацетилгидролаза. Другие названия: С-эстераза (в животных тканях), гидролаза ацетильных эфиров, п-нитрофенилацетат эстераза.

При действии пестицидов наиболее изучена карбоксилэстераза (КФ 3.1.1.1). Она обладает низкой субстратной специфичностью и осуществляет реакцию гидролиза карбоксильных сложноэфирных связей (карбоксильный эфир + H_2O = спирт + карбоксильный анион). Тривиальное название – карбоксилэстераза, систематическое название - гидролаза карбоксильных эфиров. Другие названия: али-эстераза, В-эстераза, бутирилэстераза, неспецифическая карбоксилэстераза и др. Карбоксилэстераза микросом также катализирует реакции ферментов КФ 3.1.1.2 (арилэстераза), КФ 3.1.1.6 (ацетилэстераза) и ряда других энзимов этой группы. Наибольшая активность фермента зафиксирована в печени животных.

Результатом работы эстераз является изменение токсичности ксенобиотиков, т.к. гидролиз эфиров изменяет биологическую активность веществ. Так, крысы имеют более высокий эндогенный уровень карбоксилэстеразы, чем приматы и это различие связывают с меньшей чувствительностью крыс к действию ксенобиотиков (Chambers et. al., 1991). Доказано участие эстераз в резистентности ко многим фосфорорганическим и пиретроидным инсектицидам насекомых, у которых образуются мутантные ферменты, имеющие высокое сродство к конкретному пестициду (Рославцева, 1997). Установлено, что у млекопитающих карбоксилэстераза участвует в метаболизме карбаматов (Forkert et. al., 2001), детоксицирует пиретроиды (Лавина 1999). В исследованиях *in vitro* установлено ингибирование активности карбоксилэстеразы и ацетилэстеразы в жабрах, мускулах и гепатопанкрексе мидий при действии карбаматов и фосфорорганических пестицидов (Ozretic, Krajnovic-Ozretic, 1992).

Целью работы стало изучение динамики активности ферментов карбоксилэстеразы (КарбЭ) и ацетилэстеразы (АцЭ) у рыб при воздействии пестицидов, относящихся к различным химическим классам - неоникотиноидов (тиазолы), триазолов и стробилуринов.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio*). В опыты брали 10-15 животных на каждый вариант постановки, в контроль 25-30 экземпляров.

Токсическими агентами выступали гетероциклические пестициды класса неоникотиноидов (тиазолы): инсектициды Тиаметоксам и Тиаклоприд; класса триазолов: фунгициды Ципроконазол и Флутриафол; класса стробилуринов: фунгициды Пиракlostробин и Трифлуксистробин. Пестициды вносили в 50-л аквариумы с рыбами в концентрациях, соответствующих минимальным летальным ($ЛК_{16}^{4 сут.}$), значения которых были рассчитаны на основе выживаемости карпа в острых предварительных опытах и составили следующие величины (мг/л): Тиаметоксам – 52.5; Тиаклоприд – 93.9; Ципроконазол – 18.83; Флутриафол – 59.65; Пиракlostробин – 0.67; Трифлуксистробин – 0.84.

Пробы отбирали на 1-е, 2-е и 4-е сутки воздействия пестицидов. В гомогенатах печени и жабр рыб определяли активность КарбЭ (Временные методические указания ..., 1987) и АцЭ методом Покровского в собственной модификации (Покровский, Арчаков, 1968). Полученные результаты подвергали статистической обработке, используя t-критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение. Динамика активности эстераз в печени и жабрах сеголетков карпа при воздействии пестицидов 3-х химических классов представлена в табл. 1, 2.

Неоникотиноиды (тиазолы) оказывали ингибирующее действие на активность эстераз. Значительное ингибирование активности АцЭ при действии инсектицидов отмечали в печени рыб.

Таблица 1. Динамика активности ацетилэстеразы в тканях карпа при действии пестицидов различных химических классов, нмоль/ мг белка/мин

Ткань карпа	Контроль	Пестицид	Длительность экспозиции, сутки		
			1	2	4
Неоникотиноиды					
печень	90.41±7.43	Тиаметоксам	49.61±4.57 [#]	36.59±3.41 [#]	32.23±2.79 [#]
	112.53±4.44	Тиаклоприд	44.46±3.25 [#]	73.47±11.02 [#]	41.55±5.57 [#]
жабры	9.35±0.42	Тиаметоксам	7.38±0.21 [#]	6.97±0.59 [#]	4.53±0.55 [#]
	9.87±0.33	Тиаклоприд	9.15±0.56	7.96±0.69 [#]	7.96±0.72 [#]
Триазолы					
печень	120.06±8.94	Ципроконазол	122.51±7.19	130.02±11.61	159.41±5.81*
		Флутриафол	111.41±8.65	117.69±10.06	151.69±3.12*
жабры	11.80±0.38	Ципроконазол	11.75±0.33	13.48±0.62*	10.64±0.73
		Флутриафол	11.48±0.38	14.01±0.83*	10.79±0.67
Стробилурины					
печень	51.88±3.57	Пиракlostробин	54.86±4.33	54.84±7.47	69.21±11.03*
		Трифлуксистробин	71.74±7.38*	98.96±9.83*	130.48±9.55*
жабры	8.21±0.33	Пиракlostробин	7.53±0.45	7.15±0.43	11.03±0.93*
		Трифлуксистробин	9.57±0.35*	11.66±0.92*	11.19±0.67*

Примечание. Здесь и в табл. 2 [#] - достоверное снижение значений относительно контроля (p<0.05); * - достоверное увеличение значений относительно контроля (p<0.05)

При действии Тиаметоксама активность фермента постепенно снижалась на 45-64% по мере протекания эксперимента, воздействие Тиаклоприда приводило к ингибированию активности АцЭ в 1.5-2.7 раза относительно контроля в течение 4-х суток. В жабрах рыб активность АцЭ также была ниже контрольных значений при действии Тиаметоксама на 21-45%, при действии Тиаклоприда на 19% на 2-е и 4-е сутки экспозиции. Изменения активности КарбЭ были более выражены в печени рыб. При воздействии Тиаметоксама активность фермента снижалась в 2-5 раз, при действии Тиаклоприда в 2-2.4 раза в течение эксперимента. В жабрах рыб КарбЭ ингибировалась во все сутки воздействия воздействия Тиаметоксама и на 2-е сутки под влиянием Тиаклоприда.

Воздействие триазолов на рыб сопровождалось увеличением активности эстераз. В печени рыб активность АцЭ возрастала под влиянием фунгицидов к концу экспозиции на 24-33 %. В жаберной ткани активность фермента увеличилась на 2-е сутки воздействия Ципроконазола и Флутриафола. В печени рыб на 4-е сутки экспозиции Ципроконазол и Флутриафол вызывали увеличение активности КарбЭ в 2 раза. В жабрах рыб динамика изменения активности КарбЭ под влиянием триазолов была аналогична – максимальные изменения отмечались на 4-е сутки опыта (25-40 %).

Действие стробилуриновых фунгицидов вызывало возрастание активности эстераз с увеличением сроков экспозиции. Под влиянием Пираклостробина на рыб активность АцЭ в тканях была выше контрольных значений только на 4-е сутки (33-34%). При действии Трифлуксисробина активность фермента возрастала в течение 4-х суток от 38 до 152% в печени и от 17 до 42 % в жабрах. Активность КарбЭ в печени и жабрах карпа при действии Пираклостробина возрастала через 48 и 96 часов. Более интенсивно увеличивалась активность КарбЭ у рыб под влиянием Трифлуксисробина. В печени опытных рыб изменения составляли от 60 до 67%, в жабрах максимальные изменения отмечали к концу опыта (52 %).

Для объяснения полученных результатов обратимся к механизму действия КарбЭ, который исследован для ряда пестицидов. Как известно, основной функцией эстераз является гидролиз эфиров, тиоэфиров, иногда амидных связей. При этом пестицид связывается с эстеразным участком молекулы КарбЭ, его эфирная группа расщепляется с образованием кислот или спиртов, обладающих меньшей токсичностью. Установлено, что гидролитическое расщепление характерно для пестицидов из группы амидов (пропанид), эфиров различных кислот (эфиры 2,4-Д).

Однако, существует второй защитный механизм действия, известный для КарбЭ, когда она обезвреживает потенциальные антихолинэстеразные агенты. Он заключается не в гидролизе эфирных связей, а в так называемой, стехиометрической секвестрации, т.е. в связывании самого антихолинэстеразного соединения (Cashman et. al.. 1996). Вещества такого типа подвергаются

метаболической активации, могут превращаться в соответствующие оксоны, которые необратимо присоединяются к ферменту и ингибируют его активность, гидролиза не происходит. В таком случае КарбЭ выступает в роли связывающего белка, что приводит к снижению количества вещества антихолинэстеразного действия, которое непосредственно достигает свою мишень – ацетилхолинэстеразу мозга. Подобный механизм действия КарбЭ млекопитающих изучен для фосфорорганических пестицидов, известен для пиретроидов и тиокарбаматов (Gupta, Kadel, 1989; Cantalamessa, 1993; Cashman et. al., 1996).

Таблица 2. Динамика активности карбоксилэстеразы в тканях карпа при действии пестицидов различных химических классов, нмоль/ мг белка/мин

Ткань карпа	Контроль	Пестицид	Длительность экспозиции, сутки		
			1	2	4
Неоникотиноиды					
печень	616.73±50.35	Тиаметоксам	306.69±61.88 [#]	132.33±13.69 [#]	190.27±32.46 [#]
	529.73±27.59	Тиаклоприд	219.75±42.14 [#]	267.35±31.94 [#]	232.14±62.41 [#]
жабры	63.57±3.36	Тиаметоксам	44.14±3.43 [#]	47.14±3.39 [#]	34.82±4.23 [#]
	72.82±2.69	Тиаклоприд	72.44±6.63	55.95±3.72 [#]	72.58±4.79
Триазолы					
печень	439.23±35.34	Ципроконазол	505.19±50.65	625.84±81.19*	834.75±76.52*
		Флутриафол	433.37±63.67	570.75±85.75	922.43±74.46*
жабры	90.37±4.28	Ципроконазол	100.92±4.77	104.26±3.17	126.08±9.23*
		Флутриафол	91.98±4.65	113.90±7.24*	123.70±7.83*
Стробилурины					
печень	421.56±25.68	Пиракlostробин	404.48±18.46	531.07±44.82*	609.23±61.85*
		Трифлостистробин	688.68±50.87*	704.00±43.62*	674.26±65.28*
жабры	92.97±3.29	Пиракlostробин	97.48±6.74	116.16±9.76*	112.18±8.86*
		Трифлостистробин	117.93±5.98*	112.30±7.92*	140.44±5.07*

Очевидно, что в случае инсектицидов класса неоникотиноидов, которые являются аналогами нейромедиатора ацетилхолина, взаимодействуют с его никотиновыми рецепторами и медленно или вообще не расщепляются ацетилхолинэстеразой (Tomizawa, Casida, 2003), механизм действия обеих эстераз у рыб был аналогичным вышеизложенному – происходила необратимая изоляция молекул неоникотиноидов за счет их присоединения к ферментам и ингибирования активности.

Фунгициды, относящиеся к классам триазолов и стробилуринов, не содержат эфирных связей и не являются антихолинэстеразными агентами. Увеличение активности эстераз при их действии может быть связано с процессами детоксикации по механизму гидролиза эфирных связей их промежуточных метаболитов либо являться защитной приспособительной реакцией организма рыб на пестицидную интоксикацию.

Выводы. Изменение активности эстераз у рыб зависело от химической структуры изученных классов пестицидов и было связано с разными механизмами их действия в процессах I фазы детоксикации. Показатели активности АцЭ и КарбЭ можно рекомендовать в качестве информативных биохимических маркеров пестицидной интоксикации гидробионтов, позволяющих дифференцировать природу химического загрязнения водоемов.

Список литературы

- Временные методические указания по методу биоиндикации поверхностных вод на основе анализа биоритмов ферментативной активности моллюсков. Серия 1. Л.: Гидрометеиздат, 1987. С. 44-62.
- Куценко С. А. Основы токсикологии. СПб: Фолиант, 2004. 720 с.
- Лавина С.А. Сравнительный анализ влияния перметрина на ферменты в условиях экспериментов *in vivo* // Актуальные проблемы ветеринарной науки: Тез. докл. / Моск. Гос. акад. Ветеринарной медицины и биотехнологии. М., 1999. С. 66-67.
- Покровский А.А., Арчаков А.И. Определение активности ацетилэстеразы по А.А. Покровскому, А.И. Арчакову // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 50-51.
- Рославцева С.А. Проблема резистентности членистоногих к инсектоакарицидам (по материалам восьмого Международного конгресса по химии пестицидов // Агрохимия. 1997. № 3. С. 89-92.

- Cantalamesa F. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin in neonatal and adult rats // Arch. Toxicology. 1993. № 67. P. 510-513.
- Cashman John R., Perotti Beatrice Y.T., Berkman Clifford E., Jing Lin Environmental Health Issues Carboxylesterases and Detoxication of Chemicals // Environmental Health Perspectives Supplements Volume 104, Number S1, March 1996. Pharmacokinetics and Molecular Detoxication.htm
- Chambers JP, Hartgraves SL, Murphy MR, Wayner MJ, Kuman N, Valdes JJ. Effects of three reputed carboxylesterase inhibitors upon rat serum esterase activity // Neurosci Biobehav Review. 1991. № 15. P. 85-88.
- Forkert Poh-Gek, Lee Raymond P., Reid Ken Involvement of CYP2E1 and carboxylesterase enzymes in vinyl carbamate metabolism in human lung microsomes // Drug Metab. And Disposit. 2001. 29. № 3. P. 258-263.
- Gupta RC, Kadel WL. Concerted role of carboxylesterase in the potentiation of carbofuran toxicity by iso-OMPA pretreatment // J. Toxicol. Environ. Health. 1989. № 26. P. 447-457.
- Ozretic B., Krajnovic-Ozretic M. Esterase heterogeneity in mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects of organophosphate and carbamate pesticides in vitro // Comp. Biochem. Physiol. 1992. V. 103C. № 1. P. 221-225.
- Tomizawa Motohiro, Casida John E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors // Annual Review of Entomology. 2003. V. 48. P. 339-364.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ОРГАНИЗМ ОКУНЯ ПРИ ПОРОГОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ КАТИОНОВ В ПРЕСНОЙ ВОДЕ

В.И. Мартемьянов, А.С. Маврин

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

Обмен многих веществ между организмом водных животных и средой осуществляется через жабры. Они имеют обширную поверхность, позволяя растворенному в воде кислороду легко проникать в кровь. Однако такая структура жабр имеет негативные последствия для водно-солевого обмена. Содержание ионов во внутренней среде пресноводных гидробионтов существенно выше, чем в пресной воде (табл. 1). В силу этого обстоятельства между организмом и внешней средой создаются ионные градиенты, обуславливающие с определенной скоростью диффузию электролитов из внутренней среды через поверхность жабр в пресную воду. Часть ионов теряется из организма с мочой. Этим негативным процессам противостоят структуры (ионные насосы), расположенные главным образом в жабрах, которые осуществляют активный транспорт ионов из внешней среды в организм и выводят продукты жизнедеятельности, поддерживая осмотический, ионный и кислотно-щелочной баланс организма.

Таблица 1. Содержание катионов в плазме крови окуня и речной воде (р. Ильдь).

Показатель	Плазма, ммоль/л	Содержание катионов в речной воде, ммоль/л	Градиент плазма/среда
Натрий	150.8±0.8	0.30	503
Калий	4.5±0.5	0.05	90
Кальций	3.5±0.09	1.20	3
Магний	0.47±0.08	0.48	1

Полагают (Pagenkopf, 1983), что ионы меди негативно влияют на жаберный эпителий, повреждая ионную регуляцию между организмом рыб и средой. Однако механизм действия ионов меди на ионный обмен между организмом рыб и внешней средой до сих пор не выяснен.

Нами апробирован простой способ по выявлению предельно низких концентраций натрия, калия, кальция, магния во внешней среде необходимых для поддержания жизнедеятельности различных видов гидробионтов (Мартемьянов, 2008; Мартемьянов, Маврин, 2010а,б,в). При пороговых концентрациях механизмы поддержания ионного баланса между организмом гидробионтов и средой функционируют в предельном режиме. На этом фоне действие неблагоприятных факторов должно проявляться наиболее четко.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ионов меди на организм окуня, содержащегося при пороговых значениях концентрации ионов натрия, калия, кальция, магния в пресной воде.

Работа выполнена на окуне *Perca fluviatilis* L. массой 5-7 г, отловленного в р. Ильдь. Пробы крови на анализ брали сразу после поимки, когда исследуемые показатели еще не успевают существенно измениться из-за стресса, вызванного отловом.

Другая часть улова доставлялась в лабораторию. Рыбы помещались в аквариумы и в течение 10 сут акклиматизировались к лабораторным условиям. После акклиматизации рыб отлавливали, промывали в дистиллированной воде и помещали по 1 особи в отдельные аквариумы, в количестве 10 штук, наполненные по 10 л дистиллированной воды. Свежая дистиллированная вода имела кислую реакцию. Снятие кислотности осуществляли за счет пропускания через воду воздуха в течение 2-3 суток до посадки рыб. Подачу воздуха продолжали в ходе всего эксперимента. Сразу после помещения рыб в индивидуальные емкости из них с определенными интервалами времени отбирали пробы воды для анализа в ней содержания натрия, калия, кальция, магния методом пламенной спектрофотометрии.

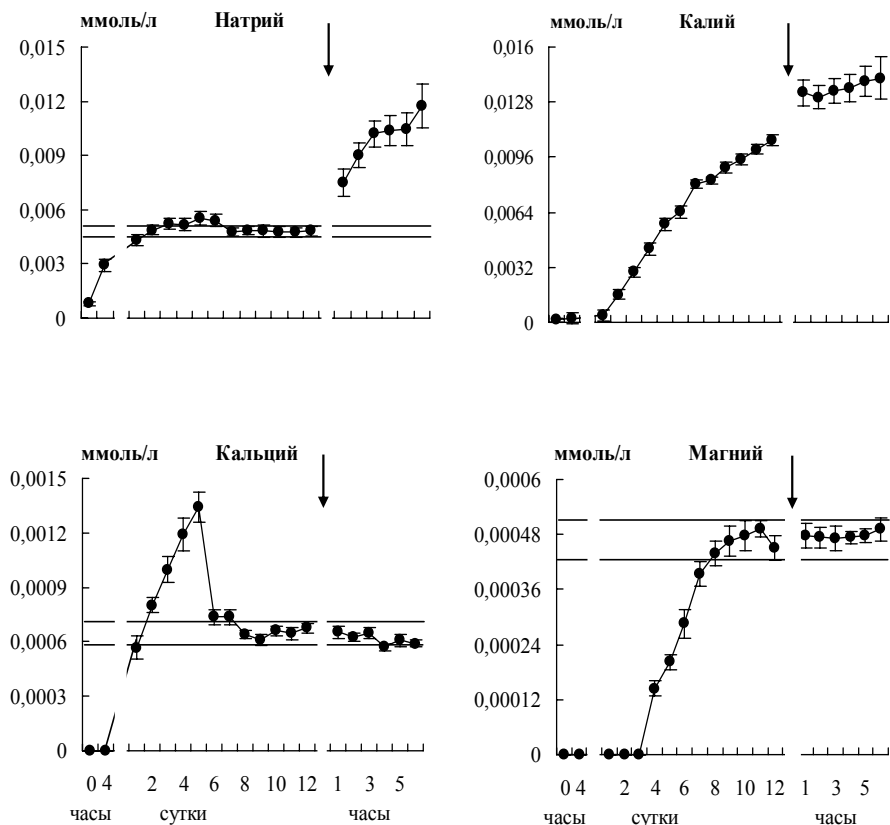


Рис. Динамика содержания катионов в среде после посадки рыб в дистиллированную воду.

По оси ординат: содержание ионов в воде; по оси абсцисс: время. Пороговые концентрации электролитов в воде, при которых достигается ионный баланс между организмом окуня и средой, отмечены горизонтальными линиями относительно оси абсцисс.

После помещения рыб в дистиллированную воду, в течение первых 5-8 суток наблюдалось постепенное повышение с определенными скоростями концентрации различных ионов в воде (рис.), свидетельствуя об их утечке из организма. В дальнейшем, содержание катионов в воде стабилизировалось на определенных уровнях. То есть, скорости потерь ионов из организма и их обратный транспорт были уравновешены между собой, в результате чего содержание электролитов в воде имело стабильные значения. Эти минимальные концентрации катионов в воде, при которых достигается ионный баланс между организмом и средой, являются пороговыми (предельными) для выживания окуня. При содержании электролитов в воде ниже пороговых, рыбы погибают вследствие обессоливания организма.

При пороговых концентрациях ионов в воде и чрезмерно высоких градиентов между организмом и средой системы ионной регуляции функционируют в предельном режиме. При таких условиях на 13 сутки эксперимента в каждый аквариум добавили раствор хлористой меди до конечной концентрации ионов меди в воде 0.16 мг/л (рис. отмечено стрелкой).

Медь оказала угнетающее действие на регуляцию между организмом и средой одновалентных ионов (рис.). В результате этого пороговая концентрация увеличилась для натрия и калия, соответственно, в 2.3 и 1.3 раза. Ионы меди не влияли на обмен двухвалентных катионов.

Таблица 2. Градиенты между организмом окуня и экспериментальной средой при пороговых концентрациях катионов в воде.

Показатель	Пороговые концентрации ионов в экспериментальной воде, ммоль/л	Градиент плазма/среда
Натрий	0.0045-0.0051	33083
Калий	0.0099-0.0112	450
Кальций	0.0005-0.0007	5833
Магний	0.0004-0.0005	1044

Через 5-6 часов после добавки меди в экспериментальную среду, все окуни погибли. Гибель рыб не может быть связана с влиянием меди на обмен ионов натрия и калия между организмом и средой. Пороговые концентрации для этих ионов, хотя и увеличились при действии меди на определенную величину, однако оставались стабильными на новых уровнях вплоть до гибели рыб.

Показано (Perschbacher, Wurts, 1999), что токсический эффект меди увеличивается при снижении концентрации ионов кальция в воде. На основе этих и наших данных можно составить следующие представления о токсическом влиянии ионов меди на организм пресноводных животных.

Транспорт ионов кальция из внешней среды в организм рыб осуществляется кальциевым насосом (Са-АТФ-азой), расположенным на клеточных мембранах жаберного эпителия. Для осуществления транспорта необходим контакт ионов кальция с насосами. При уменьшении концентрации кальция в воде вероятность соприкосновения ионов с насосами снижается. На этом фоне, чтобы сохранить требуемое количество транспортируемого кальция, необходимо включать имеющиеся в резерве насосы. Количество молекул Са-АТФ-азы в жаберном эпителии имеет конечную величину. Поэтому понижение концентрации кальция в воде допустимо до тех предельных значений, при которых достигается функционирование всех имеющихся в распоряжении Са-насосов. При таких условиях, имеющих в воде ионов кальция, является предельным для обеспечения необходимого количества контактов с Са-насосами.

При наличии ионов меди в воде, они также как и ионы кальция, сталкиваются с Са-насосами. В результате таких контактов ионы меди активно транспортируются в организм, оказывая токсическое влияние изнутри. Увеличение токсичности меди при снижении уровня кальция в воде связано с тем, что при таких условиях происходит уменьшение контактов ионов кальция с Са-насосами и, наоборот, увеличивается число соприкосновений с ионами меди. Это приводит к усилению накопления ионов меди в организме.

Повышение концентрации ионов меди в воде также ведет к увеличению числа столкновений с Са-насосами и, как следствие, усилению ее транспорта в организм. Именно это обстоятельство в большой степени определяет зависимость токсичности меди от ее концентрации в воде.

Транспорт ионов магния из воды осуществляется Mg-АТФ-азой, расположенной на клеточных мембранах жаберного эпителия пресноводных гидробионтов. Установлено (Perschbacher, Wurts, 1999), что токсический эффект меди на организм рыб не зависит от содержания магния в воде. Это указывает на то, что Mg-АТФ-аза не принимает участие в транспорте ионов меди из воды в организм.

Выводы. Окунь обладает структурами и системами, которые осуществляют эффективный транспорт различных, необходимых для жизнедеятельности, ионов из внешней среды против концентрационных градиентов между организмом и средой. Минимальные концентрации катионов во внешней среде, при которых транспортные системы окуня способны поддерживать ионный баланс между организмом и средой, составляют 0.0045-0.0051, 0.0099-0.0112, 0.0005-0.0007, 0.0004-0.0005 ммоль/л, соответственно, для натрия, калия, кальция, магния. Уменьшение минерализации воды сопровождается существенным увеличением градиентов концентрации катионов между организмом рыб и внешней средой, усиливая нагрузку на системы поддержания водно-солевого обмена.

Ионы меди из наружной среды активно транспортируются в организм Са-насосами жаберного эпителия. При понижении содержания кальция в воде происходит увеличение транспорта ионов меди в организм, усиливая тем самым ее токсичность для рыб. Наиболее

высокий транспорт ионов меди из воды в организм пресноводных животных, осуществляемый С-насосами, происходит при пороговых концентрациях кальция в среде, обеспечивая тем самым максимальную токсичность. При составлении ПДК для токсических соединений необходимо ориентироваться на данные, полученные по токсичности при пороговых концентрациях кальция во внешней среде. Различия литературных данных по токсичности того или иного токсиканта в большой степени могут быть связаны с проведением экспериментов с разными концентрациями кальция в воде.

Список литературы:

- Мартемьянов В.И. Роль систем ионного транспорта в распространении дрейссены // Дрейссениды: эволюция, систематика, экология. Лекции и материалы докладов I-ой Международной школы-конференции. Борок, 2008. С. 93-97.
- Мартемьянов В.И., Маврин А.С. Пороговые концентрации катионов во внешней среде определяющие границы ареала речного рака в пресных водоемах // Экология водных беспозвоночных. Сборник материалов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ф.Д. Мордухай-Болтовского. Ярославль: Принтхаус, 2010а. С. 195-198.
- Мартемьянов В.И., Маврин А.С. Пороговые концентрации катионов в пресной воде необходимые для поддержания ионного баланса между организмом гидробионтов и внешней средой // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Петрозаводск, 2010б. Т. 1. С. 146-150.
- Мартемьянов В.И., Маврин А.С. 2010в. Пороговые концентрации катионов во внешней среде определяющие границы ареала *Spirogyra* в пресноводных водоемах // Материалы I (VII) Международной конференции по водным макрофитам «Гидробиотика 2010». Ярославль: Принтхаус. С. 212–214.
- Pagenkopf G.K. Gill surface interaction model for trace metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness // Environ. Sci. Technol. 1983. V. 17. P. 342-347.
- Perschbacher P.W., Wurts W.A. Effects of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus* // Aquaculture. 1999. V. 172. P. 275-280.

ВОЗМОЖНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ МУТАГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

А.А. Мехтиев, Г.М. Палатников, С.К. Мовсум-заде.

Институт физиологии им. А.И.Караева НАН,
ул. Шариф-заде, 2, Баку AZ1100, Азербайджан, arifmekht@yahoo.com

Большинство неблагоприятных факторов окружающей среды способно индуцировать мутагенные изменения в клетках живых организмов, приводя к значительным поломкам генетического аппарата (Бикхем и др., 2000). Вместе с тем неблагоприятные факторы различной природы вызывают значительное изменение активности серотонинергической системы в тканях животных. В частности, хроническая экспозиция рыб в воде, содержащей примеси меди (Ханди, 2003) и ртути (Тсай и др., 1995), приводит к значительному снижению уровня серотонина в тканях животных. В исследованиях, проведенных на ракообразных, было показано, что длительная экспозиция животных в воде, содержащей примеси тяжёлых металлов и органических соединений, оказывает негативное воздействие на обмен серотонина, приводя к снижению его уровня (Фингерман и др., 1998). В этой связи представляет интерес изучение роли серотонинергической системы как возможного молекулярного механизма, лежащего в основе развития мутагенных изменений.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на годовалой молоди осетров (*Acipenser gueldenstaedti persicus*). Животных разбили на 3 группы: 1) группа интактных животных (n=7); 2) группа животных, находившихся в течение 5 сут в пресной воде, содержавшей нефть из месторождения «Нефтяные камни» в концентрации 100 мг/л (n=7); 3) группа животных, находившихся в течение 15 сут в пресной воде, содержавшей нефть в той же концентрации (n=7). По завершении экспериментов у осетров брали пробы крови из хвостовой вены для проведения микроядерного теста, а также пробы печени для определения уровня СМАБ методом иммуноферментного анализа. Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t-критерию Стьюдента.

Во второй серии исследования также осуществляли на молоди осетров весом 10-15 г и были использованы 3 группы животных: 1) группа интактных животных ($n=11$); 2) группа животных ($n=10$), которым внутримышечно вводили кроличьи неиммунные γ -глобулины в концентрации 1.5 мг/мл и объёме 0.7 мл (в целях контроля неспецифических эффектов гетерологических антител); 3) группа животных ($n=9$), которым вводили кроличьи поликлональные антитела к белку СМАБ в таком же количестве. Антитела к СМАБ очищали из раствора иммуноглобулинов, полученных в результате 5-6-месячной иммунизации кроликов этим белком, методом аффинной хроматографии на колонке CNBr-сефарозы с предварительно иммобилизованным СМАБ. После нанесения на аффинную колонку иммуноглобулинов к СМАБ, её тщательно отмывали 20-кратным объёмом 0.01 М раствором фосфатного буфера и под контролем спектрофотометра осуществляли элюцию специфически связавшихся антител хаотропным соединением – 3 М раствором роданистого калия. Элюированные антитела диализовали на холоде против 0.15 М хлористого натрия, забуференного до значения pH 7.2 с помощью двузамещённого фосфата натрия, и замораживали. За один цикл с аффинной колонки элюировали до 6 мг антител (концентрацию определяли по методу Бредфорд). СМАБ выделяли в препаративных количествах из головного мозга быка описанным ранее способом (Мехтиев, 2000); гомогенность выделенного белка оценивали методом электрофореза. Инъекции неиммунных γ -глобулинов и антител молоди осетров осуществляли дважды: в 1-ый день и через 24 ч. На 3-ьи сут после первой инъекции у животных из хвостовой вены забирали пробы крови для проведения микроядерного теста. Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Ранее выполненные биохимическими исследованиями на коре головного мозга наркотизированных крыс (Мехтиев, 2000), и электрофизиологические исследования, связанные с регистрацией нейрональной активности на идентифицированных командных нейронах моллюсков (Мехтиев и др., 2003), продемонстрировали, что содержание СМАБ в нервных клетках животных находится в прямой зависимости от уровня серотонина. Указанный факт позволяет оценивать внутриклеточную активность серотонинергической системы по уровню СМАБ в исследуемых тканях, а также целенаправленно воздействовать на активность этой системы путём изменения уровня СМАБ.

При экспозиции молоди осетров в загрязнённой нефтью воде в течение 5 сут не отмечалось увеличения уровня микроядер в эритроцитах (Рис.1А). При этом уровень СМАБ в печени подопытных животных не отличался от контрольного (Рис. 1Б). В то же время в группе животных, содержащихся в загрязнённой нефтью воде на протяжении 15 сут, наблюдалось резкое увеличение количества микроядер в эритроцитах ($p<0.01$; Рис. 1А), сопровождавшееся заметным снижением уровня СМАБ в печени ($p<0.01$; Рис. 1Б).

Результаты проведенных исследований позволили прийти к заключению о том, что при воздействии на организм неблагоприятных факторов снижение активности серотонинергической системы в тканях организма сопутствует возрастанию уровня мутагенных изменений. Для выявления роли активности серотонинергической системы в формировании мутагенных изменений в тканях были проведены эксперименты, в которых осуществляли избирательную блокаду активности СМАБ с помощью поликлональных антител.

В этих экспериментах двукратное внутримышечное введение антител к СМАБ приводило к значительному увеличению (на 56%) количества микроядер в эритроцитах молоди осетров по сравнению с животными, которым в таком же количестве вводили неиммунные γ -глобулины ($p<0.01$; Рис. 2). При этом, введение неиммунных γ -глобулинов вызывало увеличение уровня микроядер в эритроцитах относительно этого показателя интактных животных ($p<0.05$; Рис. 2), свидетельствующее о наличии токсических эффектов у использованных гетерологических неиммунных γ -глобулинов и антител. Полученные результаты продемонстрировали, что ингибирование активности серотонинергической системы индуцирует возникновение мутагенных изменений в тканях и что снижение активности этой системы может лежать в основе механизма формирования мутаций в клетках различных тканей при воздействии на организм неблагоприятных факторов окружающей среды.

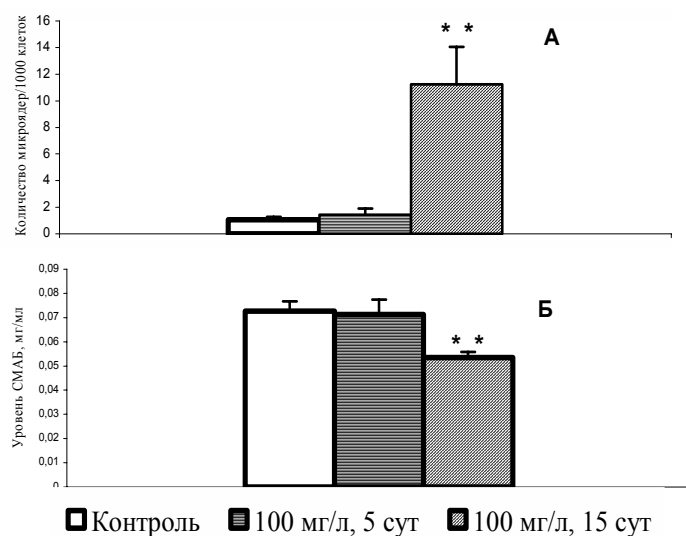


Рис. 1. Влияние нефти на уровень микроядер в эритроцитах (А) и уровень СМАБ в печени (Б) у молоди осетров. ** - $p < 0.01$.

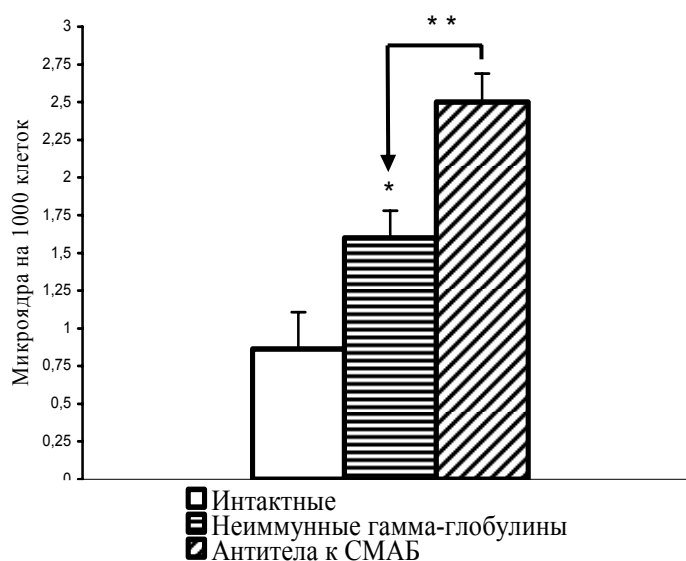


Рис. 2. Изменение уровня микроядер в эритроцитах молоди осетров под влиянием антител к СМАБ. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$.

Из литературы известно, что формирование микроядер в результате воздействия на организм животных неблагоприятных факторов происходит в период клеточного деления (Касуба и Разгай, 2002; Банасик и др, 2005). Возможно, это обусловлено большей уязвимостью хроматина в связи с конформационными перестройками, которые он претерпевает в этот период клеточного цикла. В тканях зрелого организма пролиферативная активность клеток, как известно, снижена. Таким образом, возникновение микроядер в условиях воздействия на организм неблагоприятных факторов может быть обусловлено вызванное сниженным уровнем активности серотонинергической системы переключением работы зрелых клеток на режим высокой митотической активности, способствующей возникновению мутагенных повреждений генетического аппарата.

Подтверждением правомочности предложенного механизма возникновения мутагенных изменений под влиянием неблагоприятных факторов являются результаты воздействия антител к СМАБ на уровень микроядер у молоди осетров. Целью данной серии исследований являлось моделирование влияния неблагоприятных факторов на уровень микроядер путём искусственного снижения активности серотонинергической системы. Значительное увеличение уровня микроядер в эритроцитах в условиях блокады СМАБ антителами относительно группы животных, которым вводили кроличьи неиммунные γ -глобулины (что, таким образом, исключает неспецифический характер эффектов гетерологичных антител), свидетельствует о том, что снижение уровня СМАБ в печени осетров, подвергнутых длительному воздействию нефтяного загрязнения, носит не сопутствующий характер, а, вероятно, является механизмом, запускаемым неблагоприятными факторами и реализующим мутагенные поломки в модифицированном генетическом аппарате.

Список литературы

- Мехтиев А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами // Бюллетень экспер. биол. мед. 2000. Т. 129, № 8, С. 147-150.
- Мехтиев А.А., Козырев С.А., Никитин В.П., Шерстнёв В.В. Избирательное влияние антител к белку SMP-69 на активность командных нейронов оборонительного поведения виноградных улиток // Российский физиол. журнал им. И.М.Сеченова, 2003, Т. 89, № 4, С. 389-396.
- Banasik A., Lankoff A., Piskulak A., Adamowska K., Lisowska H., Wojcik A. Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle // Environ. Toxicol. 2005. V. 20, № 4, P. 402-406.
- Bickham J.W., Sandhu S., Herbert P.D.N., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implication for biomonitoring and ecotoxicology.// Mutation Res., 2000. V. 463, p. 33-51.
- Fingerman M., Jackson N. C. and Nagabhushanam R. Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution.// Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1998, V. 120, № 3, pp. 343-350.
- Handy R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?// Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrated Physiology, 2003, V. 135, № 1, pp. 25-38.
- Kasuba V., Rozgaj R.. Micronucleus distribution in human peripheral blood lymphocytes treated in vitro with cadmium chloride in G0 and S phase of the cell cycle // Chemosphere. 2002. V. 49, № 1, P. 91-95.
- Tsai C.L., Jang T.H., Wang L.H. Effects of mercury on serotonin concentration in the brain of tilapia, *Oreochromis mossambicus*.// Neurosci Lett., 1995, V. 194, № 3, pp.208-211.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ СЕМЕЙСТВА UNIONIDAE

В.В. Минакова¹, Г.Н. Соловых², И.В. Карнаухова¹

¹*Оренбургский государственный педагогический университет, г. Оренбург, ул. Советская, 19*

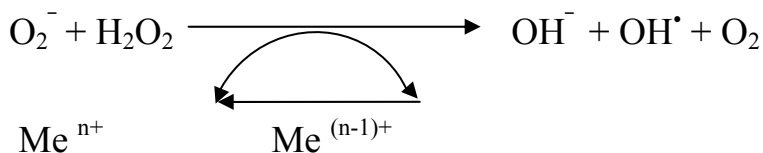
²*Оренбургская государственная медицинская академия,
г. Оренбург ул. Советская, 6, Россия, minakova@mail.ru*

Техногенная революция, произошедшая за последние десятилетия, привела к появлению и возрастанию частоты различных «болезней цивилизации» (Давыдов, 2002). Неблагоприятная экологическая обстановка наряду с возрастающим потреблением различных ксенобиотиков нарушает слаженную систему детоксикации организма, одним из побочных действий которых является нарушение баланса между прооксидантами и антиоксидантами с развитием окислительного стресса.

Известно, что свободные радикалы в физиологических условиях выполняют важную регуляторную роль в окислительном превращении эндогенных субстратов (например биосинтез стероидных гормонов, холестерина, жирных кислот), в окислительном разрушении ксенобиотиков, в защитной функции от микробов, в деструкции собственных поврежденных или ставшими аномальными клеток, а также в биохимических реакциях, регулирующих клеточный рост, пролиферацию, дифференцировку, ангиогенез, эмбриогенез (Владимиров, 1998; Зенков, 2004).

Однако исследования последних лет показали, что свободные радикалы, к которым относятся активные формы кислорода, при избыточном образовании могут играть важную роль в возникновении различных патологических состояний. Среди причин, способных приводить к активации свободнорадикальных механизмов можно выделить присутствующие в окружающей среде различные вещества, обладающие прооксидативным действием, из которых основная доля приходится на тяжелые металлы (ТМ) (Кирчук, 2006; Клишко, 2007).

Генерация активных форм кислорода происходит при взаимодействии ТМ с пероксидом водорода по реакции Хабера- Вейса и Фентона:



Следовательно, с одной стороны, прооксидантное действие ТМ будет реализоваться посредством продукции гидроксильного радикала (Руднева, 2008). С другой стороны, все ТМ объединяет избирательная способность вступать в химическое взаимодействие с сульфгидрильными группами различных макромолекул организма, в первую очередь - ферментных и других белковых структур, а также некоторых аминокислот. К числу ферментов, содержащих сульфгидрильные группы, относятся гидролазы, оксидоредуктазы, фосфатазы и ферменты антирадикальной защиты клетки – супероксиддисмутаза (SOD) и каталаза (CAT). Образование комплекса металла с SH-группами биомолекул сопровождается их повреждением, нарушением функции, что и инициирует развитие токсического процесса (Меньщикова, 2006).

Качество воды в р. Урал на территории области соответствует 3 классу качества и оценивается индексом загрязненности (ИЗВ) в районе г. Оренбурга в 1,92, в то время как фоновый створ для области в районе п. Березовский имеет ИЗВ равный 1,42. По данным лабораторных исследований за 2007 год, водные объекты в районе города Оренбурга не отвечали гигиеническим нормативам по химическим показателям в 40,4% проб воды, по Оренбургской области соответственно в 16,0% проб. Следовательно, городской показатель качества воды р. Урал превысил областной в 1,97 раза, что свидетельствует о неблагоприятной экологической обстановке в районе города Оренбурга (Быстрых, 2007).

Проблема загрязнения водной среды реки Урал в районе города Оренбурга ионами ТМ в значительной мере связана с биологической активностью многих из них. Поглощение и, следовательно, токсическое воздействие ионов тяжелых металлов на водные организмы зависят от факторов среды: повышение температуры увеличивает их поглощение и токсичность, а увеличение солености воды снижает; ввиду этого пресноводные гидробионты подвергаются воздействию ТМ при более низких концентрациях, чем морские организмы.

Важнейшим признаком стресс-реакции, а, следовательно, и стресса у водных животных при интоксикации на биохимическом уровне является колебательная динамика активности ферментов, достоверно превышающая по амплитуде естественную, наблюдаемую в контроле. Эта динамика универсальна в отношении воздействия разных токсических веществ и стереотипна для множества ферментных систем (Маляревская, 1985).

Поэтому было интересно в модельном эксперименте исследовать динамику активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы в ответ на возрастающую токсическую нагрузку ионами свинца и ртути.

Для проведения экспериментов использовали моллюсков вида *U. pictorum* примерно одинакового возраста, собранных в среднем течении реки Урал в районе г. Оренбурга. Возраст моллюсков определяли по количеству «годовых» колец на раковине и продольному размеру раковины, измеренному штангельциркулем.

Токсикологическому исследованию во всех случаях предшествовал этап предадаптации в течение трех суток. Особей выдерживали в аквариумах с водопроводной водой в течение 12 дней. Опытных животных разделили на три группы по 5 особей в каждой. Первая группа животных служила контролем и содержалась в аквариуме с водопроводной водой, вторая группа – была помещена в аквариум, содержащий ионы ртути, третья группа – ионы свинца. Все группы содержались при одинаковых условиях освещения, температуры и аэрации, без кормления.

Для экспериментов брались концентрации токсикантов соответствующие значениям ПДК, 20 ПДК, 100 ПДК, 1000 ПДК соответственно для вод открытых водоемов. ПДК для ртути составляло 0,0005 мг/л, для свинца- 0,1 мг/л Соли тяжелых металлов использовались в виде

растворимых солей (нитраты). Ввиду малых величин токсикантов готовили их матричные растворы, разбавлением которых получали необходимые для опыта концентрации растворенного в воде токсического вещества. Серию разбавлений готовили на дистиллированной воде.

Экспозицию опытных животных проводили в течение 12 суток. Через определенные промежутки времени (на 3-и, 6-ые, 9-ые, 12-ые сутки) из каждого аквариума отбирали животных для определения уровня активности супероксиддисмутазы и каталазы жаберной ткани, затем увеличивали нагрузку тяжелыми металлами.

Активность SOD определяли в надосадочной жидкости по реакции торможения аутоокисления адреналина в адренохром в щелочной среде (pH=10,5). За единицу активности принимали торможение аутоокисления в опыте по сравнению с контролем на 50%. Во всех пробах определяли содержание белка спектрофотометрически и рассчитывали удельную активность фермента на мг белка в пробе.

Активность CAT определяли спектрофотометрически. Метод основан на определении скорости утилизации пероксида водорода в реакционной смеси, в которую вносится биологический материал содержащий фермент. Об интенсивности утилизации судили по скорости снижения экстинкции при длине волны 260 нм, при которой пероксид водорода имеет максимум поглощения.

В контроле активность исследуемых ферментов значительно не изменялась и составляла для каталазы $0,76 \pm 0,2$ ед.а., для СОД $1,62 \pm 0,5$ ед.а.

В эксперименте прослеживалась выраженная динамика активности, связанная с возрастающей токсической нагрузкой. Так, активность SOD сходным образом изменялась как при воздействии солей ртути, так и свинца. Была зафиксирована максимальная активность SOD на 3 сутки экспозиции, что соответствовало нагрузке в ПДК. При дальнейшей экспозиции в условиях возрастания концентрации токсикантов, наблюдалось уменьшение активности с минимумом на 9 сутки при концентрации токсикантов на уровне 100 ПДК. Увеличение концентрации тяжелых металлов до 1000 ПДК приводило к возрастанию активности на 12 сутки эксперимента, что особенно ярко проявлялось под действием ионов ртути (рис. 1).

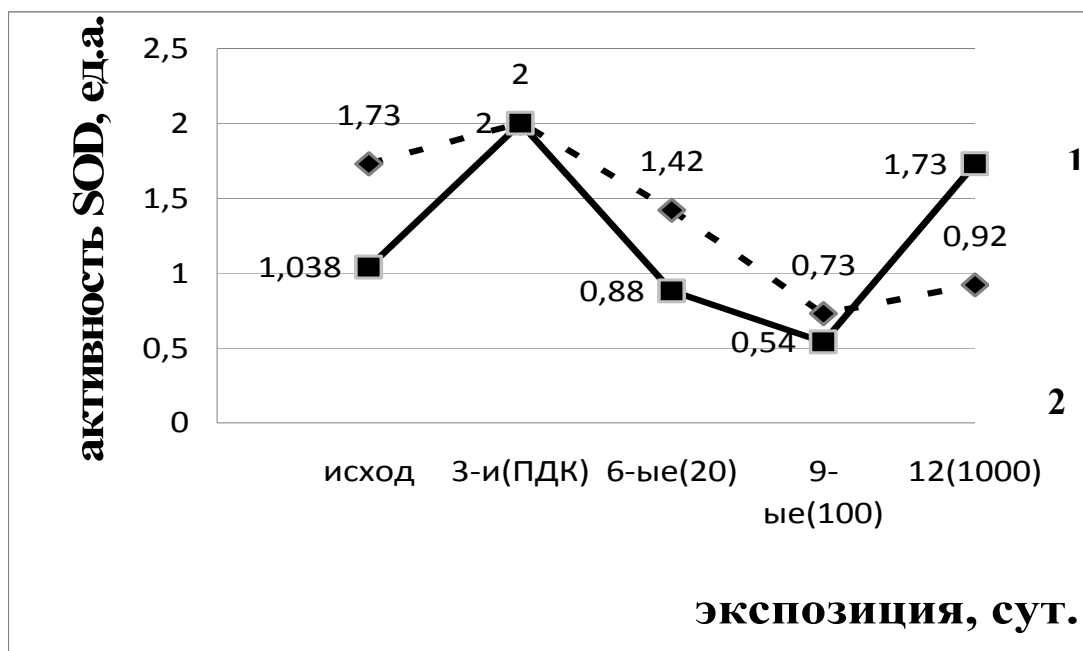


Рис. 1. Изменение активности SOD. 1-активность SOD в присутствии ионов ртути

2-активность SOD в присутствии ионов свинца

Изменение активности CAT в данных условиях эксперимента носило несколько иной характер и различалась в зависимости от природы токсиканта (рис.2).

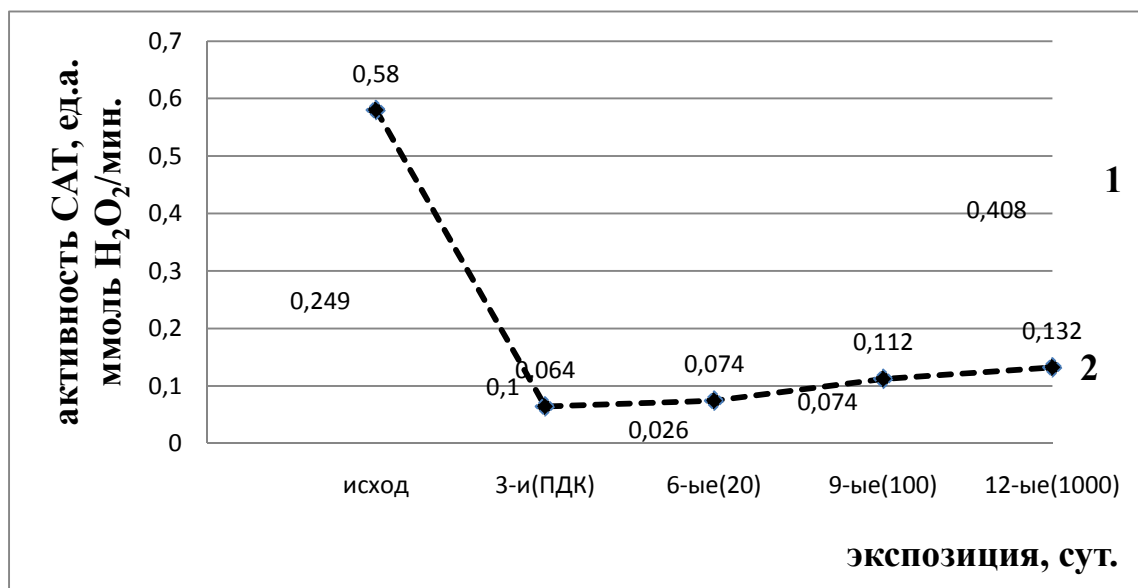


Рис. 2. Изменение активности САТ. 1-активность САТ в присутствии ионов ртути. 2-активность САТ в присутствии ионов свинца

Экспозиция моллюсков в присутствии ионов свинца разных концентраций не вызывало резких изменений активности фермента. Отмечено, постепенное уменьшение активности каталазы в 2 раза.

В то же время, нагрузка солями ионов ртути приводила к значительному снижению активности фермента на 6 сутки, это соответствовало 20 ПДК с последующим резким увеличением активности на 12 сутки эксперимента, что составляло 1000 ПДК.

Проведенные исследования показали, что на максимальную концентрацию ионов ртути организмы моллюсков реагируют сильнейшим всплеском активности обоих антиоксидантных ферментов. Такая гиперреакция характерна для истощающей фазы адаптации организмов к токсическому воздействию - фазы истощения, после которой наступает гибель организмов.

Поэтому такой ответ организма двустворчатых моллюсков на возрастающую концентрацию ионов ртути, объясняется более сильным токсическим воздействием, и свидетельствует о невозможности длительного переживания моллюсками загрязнения ртути в пределах 1000 ПДК и выше. В то же время моллюски способны переживать стрессовое воздействие вызванное присутствием ионов свинца в таких же концентрациях.

Список литературы:

- Быстрых В.В. Комплексная гигиеническая оценка факторов риска отдаленных последствий антропогенного воздействия: Автореф. дисс... д-ра мед. наук /В.В. Быстрых. – Оренбург, 2007. – 42 с.
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимирова // Вестник РАМН, 1998. - №8. – С. 43-51.
- Давыдов С.Л., Тарасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века /С.Л. Давыдов, В.И. Тарасов – М.: Издательство РУДН, 2002. –140 с.
- Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Успехи современной биологии, 2004. – Т.113. - №1. –С. 286 - 296.
- Кирчук Г.Е. Особенности накопления ионов тяжелых металлов в организме пресноводных моллюсков /Г.Е. Кирчук // Водная токсикология, 2006. – №7. – С. 99 – 110.
- Клишко О.К., Авдеев Д.В., Голубева Е.М. Особенности биоаккумуляции тяжелых металлов у моллюсков в аспекте оценки состояния окружающей среды /О.К. Клишко, Д.В. Авдеев, Е.М. Голубева // Доклады Академии наук. - Москва. 2007. - С.132-134.
- Маляревская А.Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам /А.Я. Маляревская //Гидробиол. журн. – 1985. – Т. 21, № 3. – С. 70 – 82.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков – М: Слово, 2006. - 135 с.
- Руднева И.И., Скуратовская Е.Н., Омельченко С.О., Залевская И.М. Ртуть в двустворчатых моллюсках /И.И. Руднева, Е.Н. Скуратовская, С.О. Омельченко, И.М. Залевская // Экологическая химия. - 2008. - №6. – С.77-82.

РЕАКЦИЯ ПИЯВКИ МЕДИЦИНСКОЙ *HIRUDOMEDICINALIS* НА ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ НЕФТИ (ВРФН) И ИНГИБИТОРА КОРРОЗИИ ИКБ-6-2 РАЗДЕЛЬНО И СОВМЕСТНО

Л.В. Михайлова, Л.Л. Косухина

ФГУП «Госрыбцентр», г. Тюмень, ул. Одесская, 33, Россия, g-r-c@mail.ru

При достаточно обширной литературе по влиянию нефти на пресноводные гидробионты, едва ли наберется десяток работ по влиянию на них ингибиторов коррозии, а информация об их совместном действии отсутствует. Вместе с тем нефтяная промышленность является одной из наиболее металлоемких, а коррозионное разрушение нефтепроводов и другого нефтепромыслового оборудования является основной причиной аварийного попадания в водоем нефти, а заодно и ингибиторов. В среднем на 1 т добытой нефти расходуется 0.01-0.1 % ингибиторов. В настоящее время только в Ханты-Мансийском автономном округе Тюменской области добывается нефти около 300 млн т/год (Шпильман, 2009) и регистрируется 4.0-5.5 тыс/год аварийных разливов нефти на площадь водосбора и непосредственно в водоемы (Соромотин, 2010).

Цель данной работы оценить токсичность тюменской нефти Холмогорского месторождения и ингибитора коррозии ИКБ-6-2 раздельно и совместно на представителя пресноводной фауны – пиявку медицинскую *Hirudomedicinalis*.

Материал и методика. Холмогорская нефть (плотность 0,779 г/см³) содержит 40.54 % метановых, 25.20 % - нафтенных, 16.04 % ароматических углеводородов (УВ), остальное – смолисто-асфальтеновые компоненты, низкомолекулярные кислоты и фенолы, сернистые и азотистые соединения, микроэлементы.

ИКБ-6-2 (ингибитор коррозии Башкирский) – продукт конденсации жирных кислот таллового масла и полиэтиленполиамида, разбавленный этанолом 1:1. Плотность - 0.9 г/см³, растворяется в воде и нефтепродуктах. Образует на поверхности металла защитную пленку. Растворы ВРФН (100.0; 75.0; 50.0; 25.0; 12.5; 6.25; 3.125 и 1.56 мг/л), ИКБ-6-2 (100.0; 50.0; 25.0; 12.5; 6.25; 3.12 мг/л) и их смеси (к пробам ВРФН прибавляли 1:1 ИКБ-6-2 в пороговой концентрации – 10 мг/л) готовили на отстоянной, аэрированной водопроводной воде, которая использовалась в качестве контроля (К). Выполняли экспресс-биотестирование (15 мин), острые (96 ч) и подострые (240 ч) опыты, а также исследовали эффект последствия (в чистой воде в течение 180 сут). Регистрировали: выживаемость, статичность состояния, повышенную двигательную активность, реакцию избегания, принятие аномальных поз и их разнообразие, выделение слизи и слюны, отрывание крови.

За 1 час до экспресс-биотестирования пиявок рассаживали по одной в чашки Петри, наполненные отстоянной водопроводной водой, до принятия ими состояния покоя, затем воду из чашек сливали и вновь заливали водой (К) и растворами (опыт) по 30 мл в каждую чашку. Регистрировали переход из статического состояния в активное: перемену поз или движение, избегание растворов. Регистрация состояния повторялась в течение 15 минут через каждые 3 мин в трех сериях опытов.

Результаты исследований. ИКБ-6-2. Границей острого летального действия ИКБ-6-2 по отношению к *H. medicinalis* явилась величина 25 мг/л. Временной диапазон летальности (от 50 до 100 % гибели) очень узок: в концентрации 100 мг/л 50 % пиявок погибло к 3 ч, 100 % - к 5 ч; в концентрации 50 мг/л соответственно к 8 и 24 ч; в концентрации 25 мг/л – к 48 и 72 ч. Следовательно, диапазон выживаемости тест-объектов сужался от 24 до 3 ч по мере увеличения концентрации от 25 до 100 мг/л.

В концентрации 20 мг/л и ниже гибели пиявок в остром опыте (96 ч) не отмечалось, но наблюдалось изменение поведения и нарушение состояния животных (табл. 1).

В подостром опыте (10 сут) в растворе ИКБ-6-2 с концентрацией 12.5 мг/л погибло 33 % пиявок, следовательно, пороговая концентрация летальности снизилась до этого уровня.

ВРФН. В остром и подостром опытах с ВРФН (от 1.56 до 100 мг/л) гибели пиявок не отмечалось. Вместе с тем в максимальных концентрациях - 50-100 мг/л наблюдалось стремительное плавание пиявок в 1 сут, которое сменилось полной потерей двигательной активности, судорожное сокращение мускулатуры в ответ на механическое раздражение в течение 4-5 дней сменилось глубоким параличом.

Таблица 1. Поведение и состояние пиявок при 96 ч экспозиции в растворах ИКБ-6-2

Время, час	Концентрация, мг/л				
	5.0-6.25	10.0-20.0	25.0	50.0	100.0
1-3	Повышенная двигательная активность (плавание)	Повышенная двигательная активность (плавание)	Стремительное плавание	Стремительное плавание	Стремительное плавание. Подгибание задних сегментов
4-12	Состояние покоя	Прикрепляются к стенкам и дну. Изредка меняют позы	Подгибание задних сегментов	Принятие аномальных поз, подгибание задних сегментов, скручивание в виде петель. К концу 12 ч – обильноеотрыгивание крови. Окутанные слизью особи опускаются на дно, раствор мутнеет и окрашивается в багровый цвет. Гибель 40%.	Принятие аномальных поз, подгибание задних сегментов, скручивание в виде петель. При этом обильное выделение крови, слизи; помутнение среды и окрашивание ее в багровый цвет. К 5 ч –гибель 100 % особей.
24-36	Состояние покоя	Состояние покоя. Изредка меняются позы	Плавание прекращается, смена поз.	Выделение слизи. Гибель 100 % особей	
48-60	Состояние покоя	Состояние покоя. У отдельных особей подгибание задних сегментов	Выделение слизи, изменение поз. Гибель 70 % особей.		
72-96	Состояние покоя.	Состояние покоя. У отдельных особей подгибание задних сегментов	Резкое снижение активности. Выделение слизи. Гибель остальных особей		
Примечание: в К в течение первых 3 ч – активное плавание пиявок, затем прикрепление к стенкам или ко дну сосуда и принятие ими позы покоя.					

ВРФН + ИКБ-6-2. При совместном действии ВРФН и ИКБ-6-2 гибели пиявок не отмечалось как в остром, так и подостром опытах, включая концентрацию 12.5 мг/л, где отдельно в ИКБ-6-2 погибло 33 % особей (рис. 1). В смеси в 1 сут наблюдалось стремительное плавание пиявок, сменившееся ко 2 сут состоянием анестезии, в которой они находились до конца опыта (10 сут).

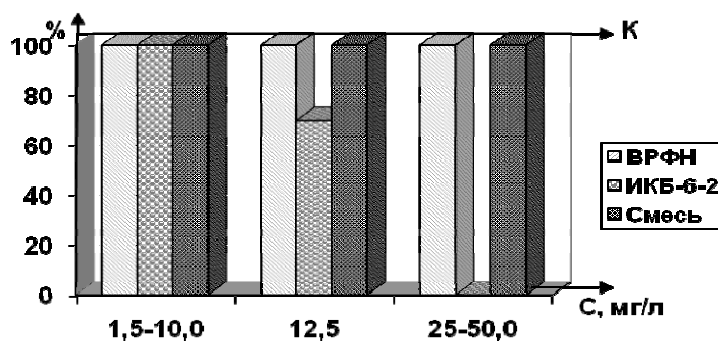


Рисунок 1. Выживаемость пиявок в ВРФН, ИКБ-6-2 и их смеси к 10 сут.

Таким образом, сравнение результатов опытов показало, что гибель пиявок наблюдалась лишь в растворах ИКБ-6-2 (до 12.5 мг/л). В растворах ВРФН и смеси с ИКБ-6-2 все животные в течение 10 сут были живы, то есть наблюдалась высокая резистентность пиявок к ВРФН при

кратковременном воздействии и ее защитный эффект при совместном с ИКБ-6-2 действии. Отмечалась разница в выраженности симптомов отравления. При наличии общих признаков отравления имели место и специфические признаки.

Таблица 2. Количество (%) пиявок в состоянии покоя в растворах ВРФН (3 серии)

Т, мин	Концентрации, мг/л							
	100.0	50.0	25.0	12.5	6.25	3.125	1.56	К
3	16 ^x ±0.15	16 ^x ±0.15	50 ^x ±0.20	50 ^x ±0.20	66±0.19	66±0.19	66±0.19	100±0.0
6	избег. ^x	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	50 ^x ±0.20	50 ^x ±0.20	66±0.19	100±0.0
9	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	66±0.19	66±0.19	83±0.15	100±0.0
12	избег. ^x	16 ^x ±0.15	16 ^x ±0.15	50 ^x ±0.20	66±0.19	50 ^x ±0.20	66±0.19	100±0.0
15	избег. ^x	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	66 ^x ±0.19	83±0.15	66±0.19	83±0.15	100±0.0
3	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	66±0.19	83±0.15	83±0.15
6	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	50 ^x ±0.20	50 ^x ±0.20	83±0.15	100±0.0
9	избег. ^x	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	66±0.19	66±0.19	66±0.19	100±0.0
12	16 ^x ±0.15	16 ^x ±0.15	50 ^x ±0.20	33 ^x ±0.19	66±0.19	83±0.15	83±0.15	100±0.0
15	избег. ^x	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	66±0.19	66±0.19	83±0.15	100±0.0
3	16 ^x ±0.15	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	66±0.19	66±0.19	100±0.0
6	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	66±0.19	83±0.15	83±0.15	100±0.0
9	16 ^x ±0.15	16 ^x ±0.15	50 ^x ±0.20	33 ^x ±0.19	50 ^x ±0.20	66±0.19	83±0.15	100±0.0
12	избег. ^x	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	66±0.19	50 ^x ±0.20	83±0.15	83±0.15
15	избег. ^x	16 ^x ±0.15	33 ^x ±0.19	33 ^x ±0.19	66±0.19	66±0.19	83±0.15	100±0.0

Примечание: x – достоверное отклонение от К

При остром отравлении нефтью регистрируется смена поз, подворачивание задних сегментов, перекручивание тел, быстрая потеря двигательной активности, как при фенольной интоксикации (Алексеев, Успенская, 1974; Флеров, Лапкина, 1979), судорожное сокращение мускулатуры как при отравлении полихлорпином (Флеров, 1973).

При действии ИКБ-6-2 - быстрое скручивание задних сегментов как при действии токсикантов с антихолинэстеразными свойствами (Лапкина, Чуйко, 2007). Избегание растворов ВРФН и ИКБ-6-2 в концентрации 50-100 мг/л – общий признак для большинства токсических веществ (Флеров, 1979).

В процессе экспресс-биотестирования выявилась высокая чувствительность пиявок именно к нефтяному загрязнению (табл. 2).

Таблица 3. Количество (%) пиявок в состоянии покоя в растворах ИКБ-6-2 (3 серии)

Время, мин	Концентрации, мг/л						
	100.0	50.0	25.0	12.5	6.25	3.0	К
3	16±0.15x	16±0.15x	66±0.19	66±0.19	83±0.15	83±0.15	83±0.15
6	33±0.19x	33±0.19x	50±0.20x	50±0.20x	83±0.15	83±0.15	83±0.15
9	33±0.19x	50±0.20x	50±0.20x	66±0.19	66±0.19	83±0.15	100±0.0
12	16±0.15x	50±0.20x	33±0.19x	66±0.19	83±0.15	66±0.19	100±0.0
15	16±0.15x	66±0.19	33±0.19x	50±0.20x	83±0.15	83±0.15	100±0.0
3	16±0.15x	16±0.15x	66±0.19	66±0.19	83±0.15	83±0.15	100±0.0
6	33±0.19x	16±0.15x	50±0.20x	66±0.19	66±0.19	100±0.0	100±0.0
9	33±0.19x	33±0.19x	50±0.20x	50±0.20x	83±0.15	83±0.15	100±0.0
12	16±0.15x	16±0.15x	33±0.19x	66±0.19	83±0.15	83±0.15	100±0.0
15	16±0.15x	33±0.19x	16±0.15x	50±0.20x	83±0.15	83±0.15	100±0.0
3	33±0.19x	16±0.15x	66±0.19	66±0.19	66±0.19	83±0.15	83±0.15
6	33±0.19x	33±0.19x	50±0.20x	66±0.19	83±0.15	83±0.15	100±0.0
9	16±0.15x	33±0.19x	33±0.19x	50±0.20x	66±0.19	100±0.0	100±0.0
12	16±0.15x	16±0.15x	50±0.20x	50±0.20x	66±0.19	83±0.15	100±0.0
15	16±0.15x	16±0.15x	33±0.19x	33±0.19x	66±0.19	83±0.15	100±0.0

Примечание: x – достоверное отклонение. Между сериями перерыв 15 мин.

Так, пороговой концентрацией ВРФН явилась величина 3,125 мг/л, где 50% особей переходило из статичного в динамичное состояние на 6 и 12 мин. Начиная с 12,5 мг/л до 50,0 мг/л 50-84% животных активно перемещались, в то время, как в К, пиявки находились в состоянии покоя. В концентрации 100,0 мг/л наблюдалось избегание пиявками раствора.

Достоверные отклонения поведения от нормы в растворах ИКБ-6-2 регистрировались с 3-9 до 15 мин. в зависимости от концентрации (табл. 3).

Пороговой концентрацией ИКБ-6-2 по результатам 3 серий экспресс-биотестирования оказалась величина 12.5 мг/л, которая определена и как порог летальности к 10 сут в подостром опыте.

Таким образом, по отношению к ВРФН пиявки проявили высокую чувствительность и высокую устойчивость, а к ИКБ-6-2 – низкую чувствительность и низкую устойчивость. Вероятно, эти токсиканты действуют в противоположном направлении и вследствие этого биологическая активность их смеси меньше наиболее активного ее компонента (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительная токсичность ВРФН, ИКБ-6-2 и их смеси по ответным реакциям пиявок с использованием критерия λ^2

Растворы	Концентрации, мг/л					
	1.5-3.125	6-10.0	12.5	25.0	50.0	100.0
ВРФН	0-1.78 ^x	0.06-2.28 ^x	1.78-2.28 ^x	1.78-2.28 ^x	1.78-3.5 ^x	3.5 -8.3 ^x
ИКБ-6-2	0-0.06	0-0.06	0.06-2.28 ^x	0.06-3.5 ^x	0.06-3.5 ^x	2.28-3.5 ^x
Смесь	0-0.06	0-0.06	0.6-1.78 ^x	0.6-1.78 ^x	1.78-2.28 ^x	3.5-3.7 ^x
Примечание: значения λ^2 : $\lambda^2 \leq 0.45$ – раствор не токсичен; $\lambda^2 \leq 2.5$ – раствор слабо токсичен; $\lambda^2 \leq 3.5$ – раствор токсичен; $\lambda^2 > 3.5$ – раствор гипертоксичен.						

Данные таблицы свидетельствуют о том, что поведенческие реакции и состояние пиявок менялись, начиная с 3.12 мг/л при действии ВРФН и с 12.5 мг/л в растворах ИКБ-6-2 смеси. В соответствии с критерием λ^2 величины этих отклонений характеризуют растворы как слабо токсичные. С увеличением концентрации токсичность растворов возрастает: ИКБ-6-2 – с 25 мг/л, ВРФН – с 50 мг/л, смеси – со 100 мг/л. В максимальной концентрации все растворы характеризуются как гипертоксичные, хотя в ВРФН и смеси гибели пиявок не отмечалось до 10 сут в подостром опыте.

Эффект последействия ИКБ-6-2 наблюдали у пиявок, отсаженных после опытов в чистую воду, в течение 180 сут. Установлено, что даже кратковременное воздействие ингибитора, начиная с концентрации 3 мг/л, приводит к последующей гибели червей к 100-180 сут. Так, 100 % пиявок из концентрации 3.0 мг/л погибли к 180 сут, из 5-6.25 мг/л – к 90 сут, из 10-12.5 мг/л – к 56 сут, из 15 мг/л – к 14 сут, из 20 мг/л – к 10 сут. В более высоких концентрациях животные погибли до окончания опыта. Таким образом, выявилась обратная зависимость между временем последействия (выживание) и концентрацией раствора, в которой находились животные в опытах.

Выводы

1. ВРФН, ИКБ-6-2 и их смесь оказывают токсическое действие на пиявку медицинскую. Действие этих токсикантов отличается по силе и выраженности.
2. Совместное влияние ИКБ-6-2 и ВРФН характеризуется антагонистическим действием токсикантов.
3. Даже кратковременное действие малых концентраций ИКБ-6-2 приводит к полной гибели пиявок в чистой воде в течение 100-180 сут.
4. Экспресс-биотестирование с помощью пиявок может служить эффективным методом оценки токсичности разных сред.

Список литературы

Алексеев В.А., Успенская Н.Е. Токсикологическая характеристика и симптомокомплекс острых фенольных отравлений у некоторых пресноводных червей. // Гидробиологический журнал. – 1974. – Т.10. - № 4. – 15 с.
Лапкина Л.Н., Флеров Б.А. Исследование острого отравления пиявок некоторыми токсическими веществами // В кн.: Физиология и паразитология водных животных. – Тр. ИБВВ АН СССР.- Л.: Наука, 1979. – С. 81-87.

Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М. Физиолого-биохимические реакции пиявок на действие фосфоорганических пестицидов // В кн.: Физиология и токсикология пресноводных животных. – Рыбинск: ОАО «Рыбинский дом печати», 2007. – С. 140-177.

Соромотин А.В. Воздействие добычи нефти на таежные экосистемы Западной Сибири. – Тюмень: ТГУ, 2010. – С. 210-320.

Флеров Б.А. Полихлорпинен и его влияние на водные организмы (литературный обзор) // В кн.: Экспериментальная водная токсикология. – Рига: Зинатне, 1973. – № 4. – С. 104-111.

Флеров Б.А. Сравнительное изучение реакций избегания токсических веществ у некоторых водных животных // Тр. ИБВВ АН СССР. – Л.: Наука, 1979. – С. 81-87.

Шпильман А.В. Стратегия развития минерально-сырьевого комплекса Ханты-Мансийского округа – Югры в 2009-2030 гг // Материалы междунар. академической конфер.: «Состояние, тенденции и проблемы развития нефтегазового комплекса Западной Сибири». – Тюмень. – 2009. – С. 4-10.

ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КАРПА В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ ГЕРБИЦИДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОЁМОВ

Т.В. Мищенко, А.А. Жиденко, А.В. Заворотинский

*Черниговский национальный педагогический университет им. Т.Г. Шевченко,
г. Чернигов, ул. Гетмана Полуботка, 53, Украина, taimi@inbox.ru*

Методы биоиндикации и биотестирования становятся всё более популярными, поскольку существующие методы анализа содержания токсикантов в воде, результаты использования которых, как правило, сравнивают с предельно допустимыми концентрациями, не отражают реальную опасность среды для живых организмов (Руднева И.И., 2005). Биоиндикация позволяет оценить экологическое состояние среды по реакциям гидробионтов на всех уровнях их биологической организации. Как виды-индикаторы часто используют моллюсков, микро- и макроводоросли, особенное значение имеет использование рыб, поскольку они относятся к позвоночным животным и являются завершающим звеном трофических цепей в гидросфере (Руднева И.И., 2005). У рыб биомаркерами могут быть морфо-физиологические параметры, состояние репродуктивной системы, генетические и биохимические характеристики, особенно показатели молекулярных защитных систем, такие как ферменты антиоксидантной защиты, параметры перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Известно, что нецелесообразное использование пестицидов может привести к существенной трансформации экосистем (Брокт Т., 2000). В небольших количествах они угнетают иммунную систему организма, в более высоких – проявляют мутагенный и канцерогенный эффекты (Заверуха Н.М., 2006). Процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы являются информативными показателями оценки влияния токсикантов на организм и могут быть использованы в разработке программ биомониторинга. Целью наших исследований являлось установление параметров ПОЛ в разных тканях сеголеток карпов под влиянием гербицида раундапа и выявление среди них наиболее показательных индикаторов загрязнения водоёмов гербицидами с помощью статистических расчётов.

Исследования проводились на сеголетках карпов (*Cyprinus carpio*), выращенных ОАО «Черниговрыбхоз». Рыба находилась в 200 дм³ аквариумах с отстоянной водопроводной водой, которую постоянно аэрировали и меняли каждые трое суток. Величина pH составляла 7.50±0.25, содержание кислорода – 5.6±0.4 мг/дм³, температура соответствовала природной (6.5-9 °С). Карпов размещали из расчёта 20 дм³ воды на одну особь в трёх вариантах: 1) контроль (без внесения раундапа), 2) действие 1 ПДК раундапа (предельно допустимая концентрация, 0.02 мг/дм³), 3) действие 2 ПДК раундапа. Действующее вещество раундапа – изопропиламинная соль глифосата, 480 г/дм³, N-(фосфонометил)-глицин. Необходимую концентрацию гербицида создавали путём внесения рассчитанного количества 36% раствора раундапа и поддерживали 14 суток. Продукты ПОЛ и активность каталазы определяли в гомогенатах пяти тканей: мышц, печени, мозга, жабр, почек.

Определение активности каталазы проводилось путём добавления к исследуемой пробе раствора пероксида водорода, реакцию останавливали ровно через 10 минут внесением раствора молибдата аммония. Через 5 минут добавляли раствор трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 минут, после чего измеряли оптическую плотность опытных и контрольной проб относительно соответствующих нулевых проб при 410

нм. Активность каталазы рассчитывали по полученным значениям оптической плотности (Агеев В.А., 2008). Содержание гидроперекисей липидов определяли добавлением к опытной пробе раствора трихлоруксусной кислоты, после чего осадок центрифугировали 10 минут при 4000 об./мин. Далее к супернатанту добавляли этанол, концентрированную соляную кислоту и 5% раствор $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, встряхивали 30 с, после чего вносили раствор NH_4SCN . Измеряли оптическую плотность против контроля при 480 нм. Относительное содержание гидроперекисей липидов устанавливали по величине оптической плотности (Агеев В.А., 2008). Содержание малонового диальдегида (МДА) устанавливали внесением раствора трихлоруксусной кислоты, после чего центрифугировали 10 минут при 6000 об./мин. К супернатанту добавляли раствор тиобарбитуровой кислоты, закрывали пробирки пробками и выдерживали на кипящей водяной бане 10 минут, затем охлаждали до комнатной температуры. Измеряли оптическую плотность против контроля при 532 нм. Содержание МДА рассчитывали по значению оптической плотности (Агеев В.А., 2008).

Статистическую обработку результатов проводили методами статистического анализа данных с помощью компьютерной программы Microsoft Excel (результаты считали достоверными и статистически значимыми при $p \leq 0.05$): достоверное различие между средними арифметическими величинами показателей экспериментальных и контрольных групп карпов определяли с помощью t-критерия Стьюдента; связь между показателями метаболизма карпов и концентрацией гербицидов определяли с помощью корреляционного анализа данных; влияние концентрации гербицидов на показатели карпов проверяли однофакторным дисперсионным анализом; прогнозирование зависимости между величинами показателей карпов и концентрацией гербицидов осуществляли с помощью линейного регрессионного анализа.

Полученные результаты по определению величин показателей перекисного окисления липидов и активности каталазы при действии 2 ПДК раундапа показали следующее. Активность каталазы достоверно снижается в жабрах в 1.5 и почках – в 2.3 раза относительно контроля, в других исследуемых тканях достоверные изменения не происходят. При этом концентрация продуктов ПОЛ в тканях меняется по-разному. Так, происходит накопление гидроперекисей липидов – увеличение в мозге в 1.9 раза, в жабрах – в 1.6 и почках – в 1.6 раза относительно контроля, а в мышцах и печени, наоборот, наблюдается снижение величины показателя соответственно в 2.3 и 2.0 раза.

Следовательно, для первых трёх тканей характерно развитие ПОЛ на стадии образования гидроперекисей липидов, что может быть связано со снижением активности каталазы в жабрах и почках. Известно, что у животных увеличение уровня полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) коррелирует с усилением процессов ПОЛ. Рыбы являются восприимчивыми к ПОЛ и более зависимыми от антиоксидантного статуса организма, поскольку в составе липидов рыб содержание ПНЖК выше, чем у млекопитающих (Алешин С.А., 1987). Противоположные изменения в мышцах и печени, возможно, происходят за счет активизации других ферментных систем антиоксидантной защиты, тогда как каталаза в этих тканях свою активность не меняет. Известно, что перекись водорода разлагается также глутатионпероксидазой и другими пероксидазами. Реакция восстановления перекисей жирных кислот глутатионом также катализируется глутатионпероксидазой (Гонский А.И., 1999). Кроме того, по полученным результатам видно, что содержание конечного продукта ПОЛ (малонового диальдегида) также снижается во всех исследуемых тканях, кроме жабр: в мышцах – в 1.6 раза, в печени – в 1.2, в мозге – в 1.5 и в почках – в 3.4 раза по сравнению с контролем. Такая тенденция изменений означает, что за 14 суток под влиянием раундапа не происходит развитие ПОЛ с накоплением конечного продукта.

Для установления взаимосвязи между исследуемыми показателями ПОЛ сеголеток карпов и концентрацией гербицидов (0 ПДК, 1 ПДК, 2 ПДК), прогнозирования дальнейших взаимосвязанных изменений этих величин нами были проведены корреляционный, дисперсионный и регрессионный анализы ($p < 0.05$).

Корреляционный анализ активности каталазы в тканях карпов и концентрации раундапа показал, что наибольшая связь между этими величинами характерна для почек ($r = -0.972$, сильная отрицательная связь) (табл. 1).

Исходя из этого, были проведены дисперсионный и регрессионный анализы для данного показателя. Дисперсионный анализ показал, что действительно средние значения активности каталазы в почках зависят от концентрации раундапа ($p < 0.05$). Регрессионный анализ позволяет

спрогнозировать концентрацию раундапа в воде в зависимости от изменения активности каталазы в почках (рис. 1). Уравнение регрессионной зависимости имеет вид:

$$K_p = 0.07 - 0.23 \cdot T_n,$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм³) в водной среде; T_n – активность каталазы в почках карпов (ммоль H₂O₂/см³*с).

Таблица 1. Корреляционная матрица зависимости между концентрацией раундапа (мг/дм³) и активностью каталазы в тканях карпов (ммоль H₂O₂/см³*с)

	Раундап	Мышцы	Печень	Мозг	Жабры	Почки
Раундап	1					
Мышцы	0.463	1				
Печень	-0.768	-0.483	1			
Мозг	-0.783	-0.289	0.562	1		
Жабры	-0.870	-0.314	0.756	0.703	1	
Почки	-0.972	-0.358	0.748	0.762	0.860	1

Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.94$, что свидетельствует о высокой аппроксимации.

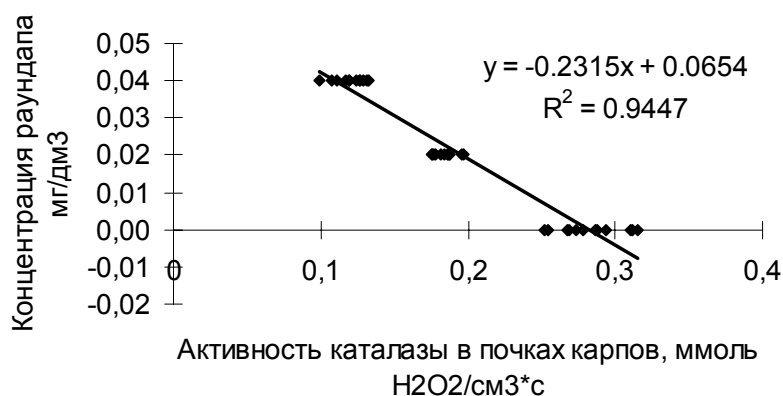


Рис. 1. Зависимость активности каталазы в почках карпов от концентрации раундапа.

Таким образом, из всех исследуемых тканей для мониторинга загрязнения водоёмов гербицидом раундап наиболее целесообразно использовать показатель активности каталазы в почках сеголеток карпов. Уравнение регрессионной зависимости позволяет рассчитать содержание раундапа в воде по экспериментально установленным показателям активности каталазы в почках карпов.

Аналогично был проведен корреляционный анализ для других параметров перекисного окисления липидов. Показатели содержания гидроперекисей липидов во всех исследуемых тканях значительно коррелируют с концентрацией раундапа в воде (табл. 2).

Таблица 2 .Корреляционная матрица зависимости между концентрацией раундапа (мг/дм³) и содержанием гидроперекисей липидов в тканях карпов (y.e./см³)

	Раундап	Мышцы	Печень	Мозг	Жабры	Почки
Раундап	1					
Мышцы	-0.960	1				
Печень	-0.948	0.934	1			
Мозг	0.935	-0.896	-0.903	1		
Жабры	0.959	-0.916	-0.886	0.905	1	
Почки	0.969	-0.942	-0.939	0.958	0.937	1

Наибольшая связь характерна для показателей трех тканей: мышц, жабр и почек (табл. 2), которые и были отобраны как возможные биоиндикаторы гербицидного загрязнения водоемов, что подтверждается дисперсионным и регрессионным анализами.

Дисперсионный анализ показал, что средние значения содержания гидроперекисей липидов в мышцах, жабрах и почках зависят от концентрации раундапа ($p < 0.05$). Коэффициент корреляции для мышц свидетельствует о сильной отрицательной связи ($r = -0.960$) (табл. 2). Уравнение регрессионной зависимости:

$$K_p = 0.06 - 0.01 \cdot T_m,$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм^3) в водной среде; T_m – содержание гидроперекисей липидов в мышцах карпов (у.е./см^3). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.92$, что свидетельствует о значительной аппроксимации.

Для жабр коэффициент корреляции указывает на сильную положительную связь ($r = 0.959$) (табл. 2). Прогнозирование концентрации гербицида в воде в зависимости от содержания гидроперекисей в жабрах карпов представлено уравнением регрессионной зависимости:

$$K_p = -0.04 + 0.01 \cdot T_{\text{ж}},$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм^3) в водной среде; $T_{\text{ж}}$ – содержание гидроперекисей липидов в жабрах карпов (у.е./см^3). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.92$, что свидетельствует о значительной аппроксимации.

Для почек коэффициент корреляции ($r = 0.969$) (табл. 2) указывает на сильную положительную связь. Уравнение регрессионной зависимости имеет вид:

$$K_p = -0.04 + 0.01 \cdot T_{\text{п}},$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм^3) в водной среде; $T_{\text{п}}$ – содержание гидроперекисей липидов в почках карпов (у.е./см^3). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.94$, что свидетельствует о высокой аппроксимации.

Показатели содержания малонового диальдегида во всех исследуемых тканях также были проверены на наличие корреляционной зависимости от концентрации раундапа в воде. Для мониторинга отобраны ткани, которым соответствуют наибольшие коэффициенты корреляции: мышцы, мозг, почки (табл. 3). Дисперсионный анализ показал, что средние значения содержания малонового диальдегида в мышцах, мозге и почках действительно зависят от концентрации раундапа ($p < 0.05$). Коэффициент корреляции для мышц свидетельствует о сильной отрицательной связи ($r = -0.971$) (табл. 3). Взаимосвязанные изменения показателей концентрации гербицида и содержания малонового диальдегида в мышцах представлены уравнением регрессионной зависимости:

$$K_p = 0.08 - 0.02 \cdot T_m,$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм^3) в водной среде; T_m – содержание малонового диальдегида в мышцах карпов (мкмоль/дм^3). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.94$, что свидетельствует о высокой аппроксимации.

Для мозга коэффициент корреляции свидетельствует о сильной отрицательной связи ($r = -0.991$) (табл. 3). Прогнозирование концентрации гербицида в воде в зависимости от содержания малонового диальдегида в мозге карпов представлены уравнением регрессионной зависимости:

$$K_p = 0.11 - 0.01 \cdot T_{\text{мг}},$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм^3) в водной среде; $T_{\text{мг}}$ – содержание малонового диальдегида в мозге карпов (мкмоль/дм^3). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.98$, что свидетельствует о высокой аппроксимации.

Таблица 3. Корреляционная матрица зависимости между концентрацией раундапа (мг/дм^3) и содержанием малонового диальдегида в тканях карпов (мкмоль/дм^3)

	Раундап	Мышцы	Печень	Мозг	Жабры	Почки
Раундап	1					
Мышцы	-0.971	1				
Печень	-0.962	0.950	1			
Мозг	-0.991	0.973	0.951	1		
Жабры	-0.747	0.752	0.721	0.753	1	
Почки	-0.997	0.970	0.957	0.991	0.745	1

Для почек характерна сильная отрицательная связь с концентрацией раундапа, на что указывает коэффициент корреляции ($r = -0.997$) (табл. 3). Уравнение регрессионной зависимости имеет вид:

$$K_p = 0.06 - 0.01 \cdot T_n,$$

де K_p – концентрация раундапа (мг/дм³) в водной среде; T_n – содержание малонового диальдегида в почках карпов (мкмоль/дм³). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.99$, что свидетельствует о высокой аппроксимации.

Таким образом, для мониторинга водоёмов на наличие в них раундапа наиболее эффективными биоиндикативными показателями среди параметров ПОЛ являются: активность каталазы в почках, содержание гидроперекисей липидов в мышцах, жабрах и почках, содержание малонового диальдегида в мышцах, мозге и почках, что подтверждается соответствующим статистическим анализом.

Список литературы.

- Агесв В. О., Дерев'янюк С. В., Дяченко Г. М. Антиоксидантний та імунний статус молодняку ВРХ за дії пробіотичних препаратів БПС-44 та БПС-Л // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту ветеринар. медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, № 3. – Ч. 1. – С. 10 – 17.
- Алешин С.А. О возможности использования альфа-токоферола и аскорбиновой кислоты как потенциальных средств защиты воспроизводительной системы радужной форели от токсического действия перекисных соединений корма // Вестн. Ленинград. ун-та. – 1987. – № 2. – С. 3 – 8.
- Гонський Я. І., Максимчук Т.П. Біохімія людини. – Тернопіль: Укр. акад. книжка, 1999. – 750 с
- Заверуха Н.М., Серебряков В.В., Скиба Ю.А. Основы екології. – Київ, 2006. – 134 с.
- Руднева И.И. Ответные реакции рыб на загрязнение морских акваторий // Биоразнообразие и роль животных в экосистемах: материал III Междунар. науч. конф., Днепропетровск, 4-6 октября 2005 г. – Днепропетровск: Изд-во ДНУ, 2005. – С. 88-89.
- Broct T.C.M., Lahr J, Van den Brink. P. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides. – The Netherlands. Alterra-Report 088, Wageningen, 2000. – 237 p.

ДЕЙСТВИЕ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ НА БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ *PLANORBIS CORNEUS* В ХРОНИЧЕСКОМ ОПЫТЕ

Е.В. Оганесова, О.Ф. Филенко

МГУ им М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, , Россия, toxic_fish@mail.ru

Введение. Моллюски, как неотъемлемая часть водного сообщества, в полной мере соответствуют всем требованиям и используются в качестве тест-объекта для определения токсичности различных соединений (Котова Л.И., Рыжков Л.П., Полина, 1989). Брюхоногие моллюски играют важную роль в круговороте органического вещества в водных системах и являются важным звеном при исследованиях по разработке ПДК как представители зообентоса (Методические указания, 1989). Для целей биотестирования используются такие виды брюхоногих моллюсков как: *Limnea stagnalis*, *Pomacea bridgesii*, *Marisa cornuarietis*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Physa acuta* и некоторые другие (Методы биотестирования, 1989). Из всего ряда моллюсков для экспериментальной практики предпочтительными являются виды, пригодные для лабораторного культивирования, имеющие короткий жизненный цикл, одинаково активных на протяжении года, обладающие достаточной чувствительностью к действию химических веществ различной химической природы, симптоматика изменения состояния которых наглядна и воспроизводима (Филенко О.Ф., Михеева, 2007., Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф., 1981, Полонский, 1991). Очевидно, наиболее перспективным может быть поиск таких тест – объектов среди видов, давно используемых в качестве обитателей аквариумов. Обычно аквариумные популяции моллюсков представляют собой линии вида, долго культивируемых в стабильных условиях с известной историей и режимом жизни без вмешательства посторонних факторов, способных вызвать реакцию стресса у животных. Из таких популяций может быть легко получена выборка особей для ведения контролируемых культур и получения экспериментального материала в любой сезон. В связи с этим целью нашего исследования была оценка практичности использования роговой катушки *Planorbis corneus*, в качестве тест-объекта в токсикометрии, а также выявление наиболее

интегральных показателей токсического эффекта, важных для определения возможной судьбы как особей (выживаемость, рост, развитие), так и популяции в целом (плодовитость, выживаемость молоди), важных для оценки токсичности в условиях длительного воздействия нелетальных концентраций. Оценить плодовитость гидробионтов в естественных условиях трудно, но это возможно в опытах на синхронизированной тест-культуре животных с коротким жизненным циклом (Строганов, 1971; Бадтиев, Кулемин, 2001).

Материалы и методы. Молодые половозрелые особи моллюсков *Planorbis corneus* были отобраны из популяции лабораторного аквариума, заселенного водной растительностью и рыбами. Культура моллюсков содержалась в стеклянном аквариуме с отстоянной водопроводной водой при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ и плотностью расселения 200 мл воды/особь. Подмену 1/3 части воды в аквариуме проводили 1 раз в неделю. Кормили моллюсков сухим кормом «Тетра» через день. Для освещения были использованы лампы «Power-glo» с УФ спектром излучения, период освещенности составлял 10 часов в сутки.

Для проведения испытаний моллюски по 5 особей были помещены в стеклянные емкости объемом 1 литр в трехкратной повторности для каждой концентрации исследуемых веществ. Смену растворов в экспериментальных емкостях производили 1 раз в 5 дней, использовали отстоянную водопроводную воду.

В процессе работы были проведены хронические опыты со следующими веществами: бихроматом калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, как стандартным токсикантом сравнения, метиленовым синим и профлавином (красителями и дезинфектантами для фотодинамического обеззараживания воды) и триметилоловохлоридом (ТМОХ), который, как и другие оловоорганические соединения, широко используется в промышленности и сельском хозяйстве в качестве биоцида и антиобрастателя. Для оценки хронической токсичности веществ были выбраны концентрации в диапазоне от 0.001 до 1.0 мг/л. Продолжительность опытов составляла 30 суток для каждого вещества. В ходе исследования учитывали выживаемость особей, прирост длины, ширины и высоты раковины, массу моллюсков, количество кладок, общий выход молоди и наличие яиц с нарушениями развития. Наличие кладок и погибших особей контролировали ежедневно. В кладках просчитывали количество яиц, фиксировали сроки созревания, и количество выклюнувшейся молоди, оценивали выживаемость за первые 10 суток жизни. Замеры линейных размеров раковины и массы моллюсков проводили еженедельно. Перед взвешиванием лишнюю влагу с раковин удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Достоверность отличия результатов, получаемых в токсичной среде от контрольных, оценивали традиционными методами вариационной статистики.

Результаты. Влияние на показатели роста и массы тела моллюсков. Бихромат калия обладал летальным действием при концентрациях, превышающих 0.1 мг Cr/л. Достоверно значимого влияния хрома в составе бихромата калия на показатели роста и массы тела *P. corneus* при этой концентрации не было отмечено (табл.1).

Профлавин оказывал летальное действие в концентрациях, превышающих 1.0 мг/л. В концентрации 0.1 мг/л уже на 10 сутки проявлялись отличия от контроля по высоте раковины и массе. В концентрациях 0.01 мг/л достоверны отличия по длине раковины на 10-е сутки опыта. В концентрации 1.0 мг/л прирост массы тела на 10-е и 20-е сутки был достоверно ниже, чем в контроле (табл.1).

Метиленовый синий оказывал летальный эффект в концентрациях 1.0 мг/л и более. В концентрации 1.0 мг/л отличие по всем измеренным линейным параметрам и массе было достоверно отлично от контрольных в сроки на 10 и 20 сутки. В концентрации 0.1 мг/л величины длины и ширины раковины достоверно отличались от контрольных, тогда как в концентрации 0.01 мг/л метиленового синего достоверных отличий не обнаружено. Достоверные отличия были обнаружены в концентрациях 1.0 мг/л метиленового синего по высоте и массе тела на 10-е сутки и по длине, высоте и массе тела на 20-е сутки. В концентрации 0.01 мг/л токсиканта на 30-е сутки показатели прироста массы тела, также были достоверно отличны от контрольных (табл.1).

Влияние ТМОХ на показатели роста раковины проявляется при обоих исследуемых концентрациях (табл.1). Замедление роста длины раковины в концентрации 0.01 мг/л отмечено на 4-е и 30-е сутки и ширины – на 15-30 сутки опыта. В концентрации 0.1 мг/л токсиканта на 15-е сутки показатели ширины раковины, также были достоверно отличны от контрольных. Концентрация 0.001 мг/л не оказывала достоверного влияния на массу тела моллюсков, но приводила к отставанию по длине (15-30 сутки) и ширине (4-е сутки) раковины. Достоверное

отставание в массе тела в концентрациях 0.1 мг/л отмечено на 4-е сутки и с 4-х по 30-е сутки в концентрации 0.01 мг/л (табл.1).

Таблица 1. Воздействие токсикантов на показатели роста моллюсков *P. corneus* (в %% по отношению к контролю).

Вещества	Контролируемые параметры	Конц., мг/л	Срок в сутках					
			0	4	7-10	14-15	20-21	30
Бихромат калия	Длина раковины	0.1 мгСг/л	98.7	-	99.6	99.7	96.7	97.0
	Ширина раковины		103.4	-	104.3	104.7	105.0	96.9
Метиленовый синий	Длина раковины	0.1	90.2	-	90.9*	-	94.7	97.8
		1.0	94.1	-	82.9*	-	72.0*	-
	Ширина раковины	0.1	93.0	-	93.8	-	101.9	98.3
		1.0	92.4	-	87.5*	-	82.7*	-
	Высота раковины	0.1	90.7	-	89.1*	-	95.2	96.1
		1.0	97.7	-	77.1*	-	68.3*	-
	Масса тела	0.1	75.6	-	84.7	-	87.0	81.3
		1.0	89.9	-	58.0*	-	34.0*	-
Профлавин	Длина раковины	0.01	91.1	-	93.9*	-	88.9	87.2
		0.1	109.7	-	99.8	-	93.8	89.4
		1.0	101.4	-	101.4	-	100.0	93.6
	Ширина раковины	0.01	117.8	-	97.8	-	91.2	84.0
		0.1	102.7	-	102.2	-	91.2	96.6
		1.0	102.7	-	102.2	-	96.5	93.2
	Высота раковины	0.01	90.0	-	84.7*	-	88.4	83.6
		0.1	105	-	89.8*	-	91.3	90.7
		1.0	105.0	-	91.5*	-	101.4	96.0
	Масса тела	0.01	82.9	-	67.2	-	81.5	88.4
		0.1	120.8	-	70.1*	-	85.6	106.1
		1.0	118.3	-	71.9*	-	98.6	93.6
ТМОХ	Длина раковины	0,001	96.3	97.4	-	94.2*	95.3*	90.8*
		0.01	95.5	96.6*	-	96.7	96.7	91.8*
		0.1	94.4	97.7	-	95.7	95.7	100
	Ширина раковины	0,001	96.8	91.1*	-	96.5	94.3	92.6
		0.01	100	96.4	-	93.0	96.4	89.1
		0.1	98.1	96.4	-	94.7	108.9	96.3
	Масса тела	0.01	85.0	89.8*	-	88.1*	81.5*	78.3*
		0.1	84.6	87.6*	-	92.2	89.2	91.1

* - отличие достоверно

Влияние на показатели плодовитости. Воздействие бихромата калия в концентрации 0.1 мг/л вызывало увеличение количества яиц и кладок по сравнению с контролем, при этом общий выклев молоди на 19.4 % отставал от показателя в контроле, а наиболее чувствительными моллюски были в период между 13-18 сутками опыта, когда различие в количестве отложенных яиц было достоверным. Воздействие бихромата калия увеличивает вариабельность продолжительности срока инкубации, и период развития составлял от 10 до 16 дней в растворе, при 12-13 днях в контроле. При этом в кладках, находящихся в растворе 0.1 мг Сг/л, было отмечено развитие отдельных яиц в сроки от 2-х до 11 суток. В контроле подобных нарушений онтогенеза не было зафиксировано на протяжении всего периода наблюдений. Процент вылупившихся яиц в контроле составлял 70-100%, тогда как под действием токсиканта этот показатель составлял от 40 до 75% за период наблюдений. Выживаемость молоди при воздействии бихромата калия была достоверно ниже, чем в контроле, до 10 дневного возраста не дожили 21.6 % от общего количества вылупившихся моллюсков при смертности менее одного процента в контроле (табл.2).

Появление кладок катушек под воздействием профлавина было отмечено на 5-е сутки в концентрации 0.01 мг/л, тогда как в контроле появление первой кладки было отмечено на 8-е сутки (как и для метиленового синего).

Таблица 2. Воздействие токсикантов на показатели продуктивности моллюсков *P. corneus*

Вещество	Концентрации, мг/л	Анализируемые параметры			
		Яйца с нарушением развития, от общего кол-ва, %	Средний инкуб. период, сутки	Смертность яиц, от общего кол-ва, %	Выживаемость молоди (первые 10 суток жизни), %
K ₂ Cr ₂ O ₇ , мгСг/л	контроль	не отмечено	12-13	52,6	99
	0.1	25,7	10-16	72,0	78.4
Метиленовый синий	контроль	не отмечено	12-13	26,3	99
	0.01	7.7	11-14	24,0	85.7
	0.1	1.9	11-17	19,2	50
Профлавин	контроль	не отмечено	12-13	58,8	98
	0.01	0.5	12-14	47,8	81
	0.1	11.7	10-15	64,2	70
	1.0	18.3	10-16	40,7	50
ТМОХ	контроль	не отмечено	12-13	38.7	100
	0.001	0.3	12-14	15.5	96
	0.01	2.8	10-14	77.2	82
	0.1	9.5	10-15	60.2	70

Среднее количество яиц на кладку с увеличением времени опыта возрастало в контроле и во всех концентрациях, кроме 0.01 мг/л, где максимум этого показателя пришелся на период 8-15 суток. В концентрации 0.01 мг/л и контроле параметры плодовитости достоверно не отличались. Количество яиц на особь и яиц на кладку достоверно отличалось от контрольных в концентрации 0.1 мг/л в период с 4-х по 7-е сутки. Отличие по этим показателям на период с 16-30-е сутки было достоверно при воздействии профлавина в концентрации 1.0 мг/л. Таким образом, профлавин оказывал угнетающее влияние на показатели плодовитости моллюсков в концентрации 1.0 мг/л и стимулирующее в концентрации 0.1 мг/л.

Метиленовый синий в испытанных концентрациях снижал общую плодовитость моллюсков, что отразилось на общем количестве яиц и кладок. Сравнение средних количеств кладок на одну особь показало, что в присутствии метиленового синего их количество сходно (в концентрации 0.01 мг/л) и меньше (в 0.1 мг/л), чем в контроле. В итоге, общий выход молоди при этой концентрации составил менее 40% по сравнению с контрольной величиной. Нарушения развития яиц в кладках отмечены в обеих концентрациях метиленового синего, максимальное их количество приходится на 8-е сутки индивидуального развития. Эти данные позволяют предполагать, что токсическое действие метиленового синего вызывает нарушения развития на последней стадии, что приводило к гибели сформированных эмбрионов.

Влияния ТМОХ на показатели плодовитости в концентрации 0.001 мг/л не наблюдали, тогда как общее количество отложенных яиц было достоверно ниже в концентрациях 0.01 и 0.1 мг/л. При этом количество кладок в наибольшей концентрации остается высоким, но яиц в них мало. Выживаемость яиц в концентрации 0.001 мг/л выше, чем в контроле, что свидетельствует о некотором стимулировании жизненных процессов и защитных функций организма под воздействием ТМОХ. Нарушения развития яиц в кладках отмечены для всех исследуемых концентраций. Массовый выход молоди пришелся на следующие 10 суток после окончания основного эксперимента. Выживаемость молоди уменьшалась с возрастанием концентрации ТМОХ (табл. 2).

Заключение. В процессе работы было установлено воздействие хрома в концентрации 0.1 мг Сг/л, метиленового синего в концентрациях 0.1 и 0.01 мг/л, профлавина в концентрациях 0.01, 0.1, 1.0 мг/л и ТМОХ в концентрациях 0.001, 0.01, 0.1 мг/л не вызывало гибели половозрелых особей *Planorbis corneus*, однако воздействие всех исследуемых веществ на развитие яиц было очевидным. Было отмечено, что длительность инкубационного периода увеличивается под действием токсикантов, что свидетельствует о влиянии веществ на процесс репродуктивного развития зародыша, а смертность только что вылупившихся моллюсков - о необратимых

нарушениях в программе развития. Высокое, по сравнению с контролем, количество кладок и яиц в отдельных концентрациях свидетельствует о некоторой стимуляции размножения. Отмечено, что смертность яиц в контроле была обусловлена лишь поеданием кладок родительскими особями, чего не наблюдалось в растворах веществ, где кладки гибли по другим причинам.

Для каждого токсиканта при воздействии на моллюсков характерны свои особенности проявления токсичности. Так воздействие красителей приводило к нарушениям эмбриогенеза моллюсков на разных стадиях - метиленовый синий вызывал нарушения развития на последних стадиях, тогда как профлавин влиял на первые этапы развития яиц. Влияние всех исследуемых токсикантов на показатели роста раковины моллюсков было незначительным, но статистически достоверным в более высоких концентрациях. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что размножение и рост оказываются, по крайней мере, на порядок более чувствительными показателями токсичности, чем выживаемость. Проведенные исследования позволяют нам рекомендовать аквариумный моллюск *Planorbis corneus* с коротким циклом жизни как удобный тест-объект для токсикологических исследований.

Список литературы

- Бадтиев Ю.С., Кулемин А.А. Биоиндикация окружающей природной среды.// Экологический вестник России. – 2001. - № 5. – с. 36-38.
- Котова Л.И., Рыжков Л.П., Полина А.В. Биологический контроль качества вод. М.: Наука. – 1989. – 144 стр.
- Методы биотестирования качества водной среды. Методические указания./ Под. ред. О.Ф.Филенко.- М.:МГУ. – 1989. – 124 стр.
- Методические указания по установлению эколого – рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение / Под ред. О.Ф. Филенко, С.А. Соколовой.- М.: Изд-во ВНИРО, 1998.- 145 стр.
- Полонский А.С. Содержание и разведение аквариумных рыб.– М.: Агропромиздат. 1991.– 383стр.
- Строганов Н.С. Методика определения токсичности водной среды.// Методика биологических исследований по водной токсикологии.- М.: Наука. – 1971. – с.14-16.
- Филенко О.Ф., Михеева И.Н. Основы Водной токсикологии. - М.: Колос, 2007.- 144 стр.
- Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф. Предсказание токсического эффекта загрязняющих веществ на гидробионтов в отдаленный период на основе данных острых опытов//В сб.: Теоретические вопросы водной токсикологии. Л.:Наука.-1981.- с. 121 – 137.

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ОТРАБОТАННЫХ АВТОПОКРЫШЕК НА МОЛОДЬ ЮЖНО-КАСПИЙСКОГО ОСЕТРА (*ACIPENCER GÜLDENSTÄDTI PERSICUS NATION KURENSIS*)

Г.М. Палатников, Г.Р. Вагабова, Р.Ю. Абдурахманова

*Институт физиологии НАН Азербайджана, лаборатория экологической физиологии и токсикологии,
г. Баку, Азербайджан, gmpal@mail.ru*

В мире каждый год появляется один миллиард изношенных шин, каждая из которых содержит 100 г. опасных веществ (Таб.1). Однако до сих пор не создана экономичная технология их переработка и сотни миллионов покрышек накапливаются на свалках.

Изношенные шины являются отходами, которые занимают много физического пространства, с трудом поддаются уплотнению, сбору и ликвидации. Они не поддаются биологическому разложению, поскольку срок их разложения не поддается определению. В их состав входят опасные компоненты, такие как свинец, хром, кадмий и другие тяжелые металлы. В отсутствие надлежащего удаления и регулирования шины представляют собой угрозу для здоровья и окружающей среды.

Считается, что отходы, указанные в приложении I к Базельской конвенции, обладают одним или более опасными свойствами, указанными в приложении III, которые могут включать "Токсичные вещества (вызывающие затяжные или хронические заболевания)", "Экотоксичные вещества" и "Токсичные (ядовитые) вещества".

Однако, до сих пор не создана экономичная технология их переработка и сотни миллионов покрышек накапливаются на свалках. В связи с этим, родилась идея заливать их цементом, для

утяжеления, и сбрасывать в моря и океаны, создавая, таким образом, искусственные атоллы. По мнению авторов этой идеи, такие искусственные образования будут привлекать гидробионтов, и служить местом нереста для рыб. И в 70-80-х годах минувшего столетия такие искусственные рифы начали создаваться у берегов Австралии, Флориды, Новой Зеландии, Ямайки, Греции, Японии и Германии. Были предприняты попытки создать подобные сооружения и у восточного побережья Каспия.

За несколько десятилетий было утоплено больше 2 миллионов покрышек. Однако, как показали подводные съемки, «Рифы» остаются безжизненными. Так называемый Риф Осборна, занимающий площадь порядка 150 тысяч квадратных метров (!) не только не стал приютом для рыб, ракообразных и прочих, но и начал разрушать естественную экосистему.

Таблица 1. Опасные вещества, содержащиеся в шинах. (Приложение 1 к Базельской конвенции)

Обозн. по Базельской конвенции	Химическое наименование	Примечания	Содержание (% веса)	Содержание * (кг)
Y22	Соединения Меди	Легирующий компонент металлического армирующего материала (стального корда)	Прибл. 0.02%	Прибл. 1.4 г
Y23	Соединения Цинка	Оксид цинка, сохраняющаяся в составе резины	Прибл. 1%	Прибл. 70 г
Y26	Кадмий	Следовые количества, т.к. соединения кадмия являются сопутствующими веществами окиси цинка	Макс. 0.001%	Макс. 0.07 г
Y3 1	Свинец соединения свинца	Следовые количества, т.к. являются сопутствующими веществами окиси цинка	Макс. 0.005%	Макс. 0.35 г
Y34	Кислотные растворы или кислоты в твердом виде	Стеариновая кислота, в твердом виде	Прибл. 0.3 %	Прибл. 21 г
Y45	Органогалогенные соединения	Галогенный бутылкаучук	Содержание галогенов Макс. 0.10 %	Содержание галогенов Макс. 7 г

* В расчете на шину для легкового автомобиля весом 7 кг.

Исследования по диффузии вредных органических веществ из автопокрышек, были проведены в США только в 1995 г и показали, что в кислой среде (почва, вода) из шин вымываются тяжелые металлы (Cu, Zn, Cd, Pb), а в щелочных средах увеличивается диффузия полициклических ароматических углеводородов (ПАУ, ПХД) (Демина. <http://courier.com.ru/>).

В 2003 году тесты, проведенные Биркхольцем в Калифорнии (Birkholz 2003), с использованием каучуковой крошки, взятой с места, где ранее хранились шины, показали наличие токсичности для бактерий, беспозвоночных, рыб и зеленых водорослей.

Свои исследования влияния таких искусственных нерестилищ на оплодотворяемость икры, на развитие уже оплодотворенной икры, а так же поведенческие реакция молоди осетровых рыб на присутствие в воде автопокрышек, мы начали еще в 80-х годах прошлого века, но по некоторым, не зависящим от нас причинам, получили возможность опубликовать эти данные только в последние годы (Палатников, Касимов 2010).

Материал и методика. В настоящей работе, используя микроядерный тест, мы изучали генотоксическое воздействие присутствия в водной среде отработанных автопокрышек на молодь южно-каспийского осетра (*Acipenser güldenstädti persicus nation kurensis*).

Эксперименты проводились на заводской молоди осетра, 10 месячного возраста. Рыбы были размещены в 2 ваннах объемом 30 л (по 6 рыб в каждой ванне) с пресной аэрируемой водой. В одну из ванн поместили фрагмент отработанной авто шины весом 1 кг. Вторая ванна была оставлена с чистой водой в качестве контроля. Рыбы выдерживались в этих условиях в течение 5 суток, а затем у всех рыб была взята кровь из хвостовой вены и приготовлены мазки крови на

предметном стекле для проведения теста на наличие микроядер (м/я) и других патологий ядра (п/я) у эритроцитов.

Микроскопирование проводилось на световом микроскопе BIOLAR при увеличении 12х100 с иммерсией, фотографирование – на цифровом микроскопе MOTIC (10х100).

Подсчитывалось количество м/я и других патологий в двух тысячах эритроцитов и выводилось среднее.

Результаты и обсуждение. Просмотр полученных мазков крови выявил кроме микроядер (рис.1А,а), разнообразные патологии в эритроцитах. В основном наблюдались гипохромасия, отражающая процессы гемоглобинообразования (рис.1А,б), и полный распад ядра на фрагменты (рис.1.Б.).

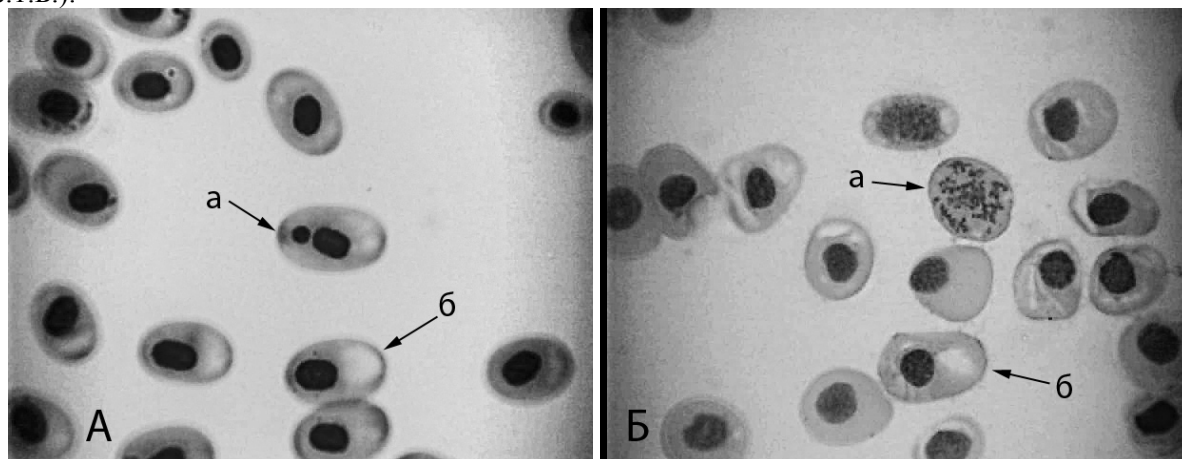


Рис. 1. Микрофотографии мазков крови. На фото А показан эритроцит с микроядром –а, и гипохромасия – б; На фото Б. Распад ядра – а, вакуолизация – б.

При подсчете микроядер (м/я) и патологических ядер (п/я) в эритроцитах, были получены следующие данные:

На 1000 клеток	Контроль	5 суток
Количество м/я	1.06 ± 0.22	13.22 ± 2.81
Количество п/я	1.49 ± 0.35	23.53 ± 5.81
Общее число патологий.	2.88 ± 0,60	36.8 ± 7.35

Таким образом, исходя из результатов наших экспериментов, можно с уверенностью сказать, что отработанные автопокрышки обладают повышенной экотоксичностью и оказывают сильнейшее негативное воздействие на ихтиофауну.

Создавая искусственные рифы, авторы проекта исходили из идеи, что такие искусственные рифы обеспечат быстрое развитие морских растений, увеличат первичную продуктивность водоемов и за короткое время привлекут очень большое количество морских животных, обеспечивая им хорошие условия питания, размножения и развития. Наблюдая за искусственными рифами, созданными в Черном и Азовском морях, некоторые исследователи (Э. Г. Яновский и др.,1987; Чекотун А. А., Цыкало А. Л., 2004) отмечали, что установленный риф обеспечил быстрое появление и развитие “первоначальной” морской растительности, а вскоре - привлек представителей многих видов черноморской флоры и фауны (бычки - кругляк, травяник, кнут, подкаменщик, мидии, морские желуди-балянусы и др.); в дальнейшем наблюдалось появление икры бычков. Однако в их работах не изучались отсроченные последствия обитания этих организмов на таком субстрате.

В ранее проведенных исследованиях, по изучению влияния отработанных автопокрышек на оподотворяемость и развитие оплодотворенной икры русского осетра (Палатников Г.М., Касимов Р.Ю. 2010), нами было показано резко отрицательное влияние присутствия в окружающей среде автопокрышек на эти показатели (оплодотворяемость икры в присутствии автопокрышки составила меньше 0,8 %, а из заранее оплодотворенной икры, помещенной для инкубации в среду с отработанными покрышками, не вышло ни одной жизнеспособной личинки).

На это же указывают и исследования, проведенные шведскими учеными, результаты которых показали, что даже за 1 день содержания радужной форели в присутствии образцов автопокрышек, в печени этих рыб происходят серьезные биохимические изменения, а при увеличении сроков содержания в такой среде, в желчи у этих рыб выявлено присутствие гидроксилированных метаболитов полициклических ароматических углеводородов (Stephensen E., Adolfsson-Erici M., et al, 2003). В то же время известно, что именно ПАУ являются сильнейшими мутагенами.

Токсическое действие автопокрышек было показано и на рачках (*Daphnia magna*) (Wik A., Dave G., 2005).

Т.о., присутствие в водной среде отработанных автопокрышек оказывает сильнейшее генотоксическое влияние на гидобионтов, разрушает генетический аппарат делая их не жизнеспособными. Создание так называемых «искусственных рифов» на основе отработанных автопокрышек наносит катастрофический удар по экосистемам водоёмов.

Список литературы.

- Материалы Конференции Сторон Базельской Конвенции о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением. // Девятое совещание Бали, 23-27 июня 2008 года. С.58.
- Палатников Г.М., Касимов Р.Ю. Влияние отработанных автопокрышек на поведение, оплодотворяемость и развитие оплодотворенной икры русского осетра.// Труды Азербайджанского Национального Комитета «Человек и Биосфера» (MaB ЮНЕСКО). Экологическая цивилизация, Устойчивое развитие, Окружающая среда. 2010, т.6, с. 205-210.
- Чекотун А. А., Цыкало А. Л. Создание искусственного рифа и наблюдения за ним в 2002 - 2003 гг. биолого-экологический и технико-экономический анализ различных конструкций искусственных рифов. //Источник: Ecologylife.ru
- Яновский Э. Г., и др. Использование искусственных рифов для повышения рыбопродуктивности Азовского моря.//Искусственные рифы для рыбного хозяйства. Сборник научных трудов ВНИРО.- М., 1987, с. 90-92.
- Birkholz D.A., Belton K.L., Guidotti T.L. Toxicological Evaluation for the Hazard Assessment of Tire Crumb for Use in Public Playgrounds // J. Air & Waste Manage. Assoc. 2003. v. 53, p.903–907
- Stephensen E, M Adolfsson-Erici, M Celander, Mats Hulander, J Parkkonen, T Hegelund, J Sturve, L Hasselberg, M Bengtsson, and L Forlin. Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber.// Environ Tox & Chem 2003. № 22, v.12, p. 2926-2931.
- Wik A., Dave G. Environmental labeling of car tires-toxicity to *Daphnia magna* can be used as a screening method. // Chemosphere. 2005. Feb; 58 (5) p.645-651

ХРОНИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНСЕКТИЦИДА ТАНРЕК НА *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (CLADOCERA)

Г.А. Папченкова

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

В настоящее время появилось масса новых инсектицидов нового поколения, которые характеризуются высокой эффективностью и быстрым действием. Современные препараты обладают чрезвычайно высокой активностью и применяются в очень низких дозах. Например, для приготовления 10 л рабочего раствора из “Кинмикс” (действующее вещество бетациперметрин) для опрыскивания против целого комплекса вредителей требуется всего 2,5 мл препарата, из “Танрек” (действующее вещество имидаклоприд) всего 1 мл. Как правило, в инструкциях по применению написано, что “рекомендован к применению в коллективных и личных подсобных хозяйствах, благодаря низким нормам расхода не наносит вреда окружающей среде”. При опрыскивании садов, полей и огородов, возможно попадание препарата в водоемы. Целью данной работы было проверить, какое влияние оказывает последний из вышеназванных инсектицидов на гидобионты на примере *Daphnia magna* Straus.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнялся на культуре *D. magna*, размножающейся в лабораторных условиях партеногенезом. Культура непрерывно поддерживалась в аквариумах с дехлорированной водопроводной водой при температуре 22–25°C.

Для приготовления растворов токсиканта использовали инсектицид Танрек – системный инсектицид из класса неоникотиноидов (действующее вещество имидаклоприд) – рекомендован

для применения в сельском хозяйстве для защиты от колорадского жука, от комплекса сосущих вредителей, а также уничтожения саранчовых. Обладает острым контактно-кишечным действием, воздействует на нервную систему вредителей. Выпускается в виде водорастворимого концентрата фирмой “Август”.

Хроническое действие Танрека определяли в длительном эксперименте (21 сутки – новорожденная молодь и 33 суток – половозрелые особи). Воздействие токсикантом проводилось параллельно в двух линиях: на молодь, возраст которой не превышал 24 часа на начало эксперимента (далее молодь, или 1 линия) и на половозрелых рачков в возрасте 11 суток, после появления 1–3 выводков (далее половозрелые, или 2 линия). В обоих случаях генетически однородных рачков, возраст которых был менее 24 часов, рассаживали в стаканы объемом 250 мл с 175 мл среды по 5 штук в каждый в 3 повторностях для контроля и для каждой концентрации токсиканта в диапазоне 1×10^{-3} – 1×10^{-23} М инсектицида в расчете на действующее вещество. Для эксперимента был выбран вышеуказанный диапазон, исходя из следующего: раствор концентрацией 1×10^{-3} М, в котором имидаклоприда на 4 порядка больше, чем ПДК на него в нормативах по содержанию имидаклоприда в воде водоемов (ГН 1.2.1323-03 ..., 2003), концентрация 1×10^{-23} М соответствует пределу Авогадро. Таким образом, для исследования охватывался очень широкий диапазон концентраций токсиканта.

Рабочие растворы получали методом последовательного десятикратного разбавления. Концентрация каждого последующего раствора была на порядок меньше предыдущего. Биотестирование проводили с учетом рекомендаций методики Государственного комитета РФ по охране окружающей среды (Токсикологические ..., 1999). В контроле использовали отстоянную водопроводную воду, насыщенную кислородом. На этой же воде готовили растворы токсиканта (в пересчете на действующее вещество). Рачков ежедневно кормили суспензией клеток водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer., культура которой поддерживается в лаборатории. Один раз в сутки в одно и то же время контролировали выживших особей, подсчитывали народившуюся молодь, периодически выборочно измеряли длину экспонируемых в токсиканте особей. Измерения проводили под бинокулярным микроскопом при увеличении $\times 8$. Длина тела измерялась от вершины головы до основания хвостовой иглы. Для получения цифровых фотографий использовали микроскоп Olympus CX31 при увеличении (4 \times 10) и видеокамеру JVC TK-C1481BEG.

Результаты и обсуждение. Эффект от влияния инсектицида ощущался уже после 1-х суток экспозиции особей 1-ой линии в инсектициде. В токсиканте самой большой концентрации 1×10^{-3} М все особи погибли, в концентрации 10^{-4} М погибло 30% особей, в 10^{-5} М – порядка 20%, большая часть живых опустилась на дно, признаки жизни у них обнаруживались по присутствию сердцебиения и подрагивания тела, но это уже были не жизнеспособные особи. В концентрациях до 10^{-11} М визуально стало заметно, что по сравнению с контролем изменился характер движения, цвет особей стал бледнее, изменилась форма тела – задняя его часть была как бы подогнута под брюхо. Все вышеперечисленные признаки становились все более выраженными с ростом концентрации. После 2-х суток экспозиции погибло 100% рачков в токсиканте с концентрацией 10^{-4} М, а при 10^{-5} М – 40% особей. Визуальные признаки влияния токсиканта усилились и проявились в разной степени во всех вариантах опыта. В последующие 3–4 сутки гибель рачков в высоких концентрациях продолжилась – в концентрации 10^{-5} М не осталось живых особей, в низких же концентрациях гибли единичные особи, но по-прежнему наблюдалась визуальная разница между особями из контроля и экспонируемыми в токсиканте.

Эффект от воздействия токсиканта проявляется и во 2-ой линии эксперимента, но носит частично иной характер. После 1-ых суток экспозиции, как и в случае с молодью, половозрелые особи в токсиканте концентрацией 10^{-3} М погибли все. Особи из 10^{-4} М полностью погибли после 3-х дней экспозиции, а из 10^{-5} М – после 8 дней. Гибель единичных рачков в токсиканте меньших концентраций наблюдался и у половозрелых. Визуальные признаки влияния токсиканта по сравнению с контролем выражены тоже несколько слабее. То есть в целом половозрелые особи более устойчивы к инсектициду.

На рис. 1 представлена суммарная плодовитость на 1 особь за 21 сутки 1-ой линии эксперимента, по оси абсцисс время эксперимента (сутки), по оси ординат количество особей (штуки). Кривая **a** представляет собой среднюю суммарную плодовитость особей контроля. Пучок кривых **b** отображает средние суммарные плодовитости особей, экспонируемых в инсектициде концентрацией 1×10^{-6} – 1×10^{-23} М.

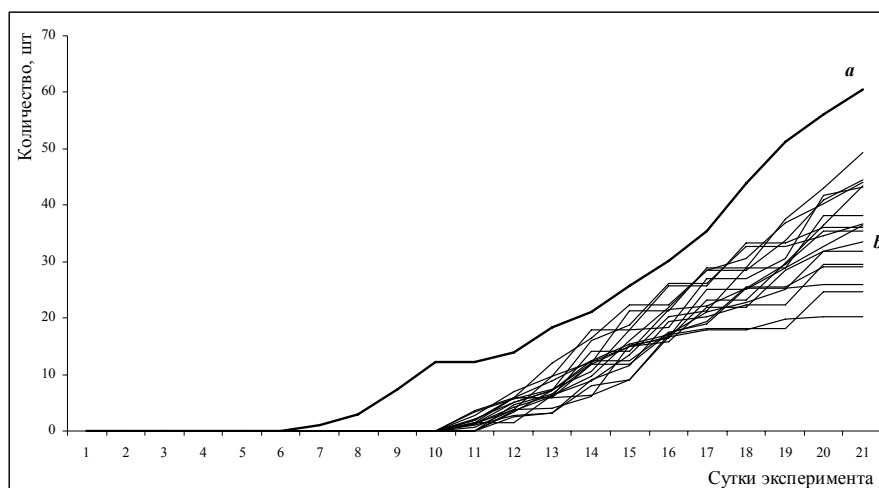


Рис. 1. Суммарная плодовитость на 1 особь за 21 сутки 1-ой линии эксперимента (новорожденная молодь), *a* контроль, *b* – растворы токсиканта концентрацией 1×10^{-6} - 1×10^{-23} М.

Как видим из графика, первый вымет особей из контроля наступает на 7-ой день эксперимента, а особей экспонируемых в токсиканте – на 11–12 день. Кроме того, видно, что контрольные особи значительно выигрывают по величине суммарной плодовитости в расчете на одну особь. Что касается задержки первого вымета, то мы уже сообщали (Папченкова, 2011), что раствор свежеприготовленного Танрека блокирует развитие первичных половых клеток и соответственно задерживает первый вымет.

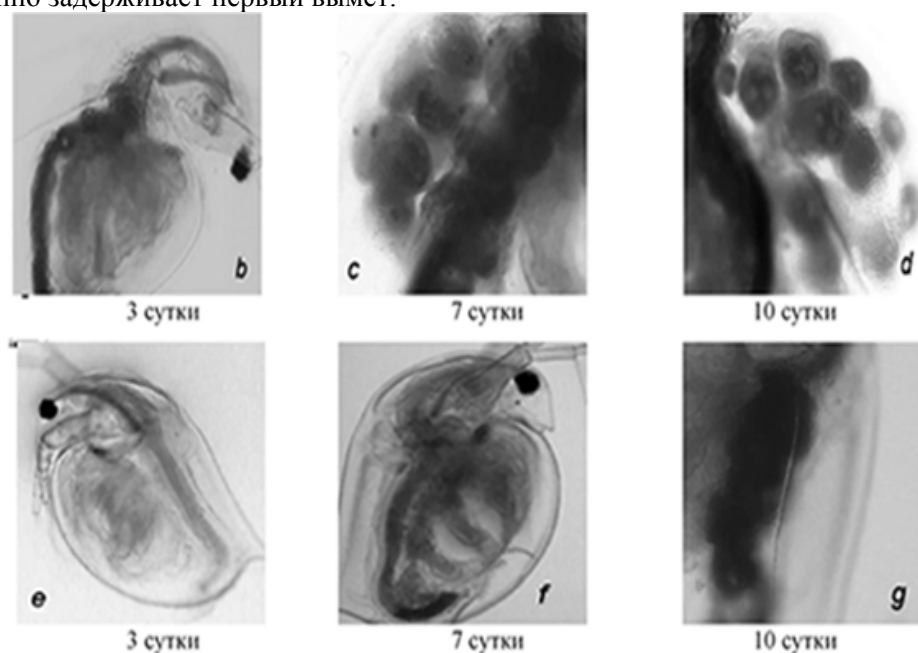


Рис. 2. Степень развития яичников *Daphnia magna*: *b, c, d* - экспозиция в чистой воде (контроль); *e, f, g* – в растворе инсектицида Танрек при концентрации 10^{-7} М.

В данном случае воздействие токсиканта оценивалось по степени развития яичников, которые у *D. magna* в виде парных трубок тянутся по сторонам кишечника, открываясь короткими яйцеводами в выводковую камеру (Peters, 1987). Развитие рачков, экспонируемых в токсиканте, значительно отличалось от контрольных рачков, экспонируемых в воде. Влияние инсектицида на репродукцию дафний отмечалась уже на стадии оогенеза. Так, на третий день эксперимента у контрольных рачков (рис. 2b) в яичнике явственно просматривалась цепочка созревающих ооцитов в отличие от экспонируемых в токсиканте особей (рис. 2e), у которых ооциты в яичниках не созревали и не запаслись желтком. На 7-ой день эксперимента у контрольных особей яйца переместились в выводковую камеру (рис. 2c), развились до подвижных эмбрионов, готовых

покинуть камеру, а в яичнике началась вторая волна созревания ооцитов. У особей, экспонируемых в токсиканте (рис. 2f), в яичнике по-прежнему отсутствовали развивающиеся ооциты. Лишь к десятому дню экспозиции в них стал наблюдаться рост и вителлогенез ооцитов (рис. 2g). В это время у контрольных особей в яичниках созревала уже третья генерация ооцитов (рис. 2d). Таким образом, Танрек снижает плодовитость рачков.

В хроническом эксперименте с половозрелыми рачками (2-я линия эксперимента) картина суммарной плодовитости в расчете на 1 самку выглядит несколько иначе (рис. 3). Все особи этой линии 10 дней экспонировались в чистой воде, первый вымет появился на 7–9 день, на 11 день особи были рассажены в токсикант концентрацией $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-23}$ М. В трех самых высоких концентрациях $10^{-3} - 10^{-5}$ дафнии тоже погибли, соответственно, в течение 1, 2, 4 суток. Суммарная плодовитость остальных рачков за 33 суток эксперимента представлена на рис. 3: кривая *a* – контроль, *b* – пучок кривых суммарной плодовитости особей из растворов инсектицида. Видим, что после воздействия токсикантом на 11 сутки эксперимента происходит резкий всплеск отраждения молоди, но надо отметить, что среди качественной молоди в этот период много особей мертвых, неполноценных, с незаконченным развитием, которые, очевидно, появились под воздействием токсиканта. Суммарная плодовитость контрольных особей в этот период заметно меньше экспонируемых в токсиканте. С 18–19 дня эксперимента суммарная плодовитость контрольных особей начинает опережать опытных. То есть сначала токсикант вызывает активизацию активного вымета молоди, развивавшейся в чистой воде, развитие же следующей порции ооцитов при воздействии токсиканта происходит значительно медленнее.

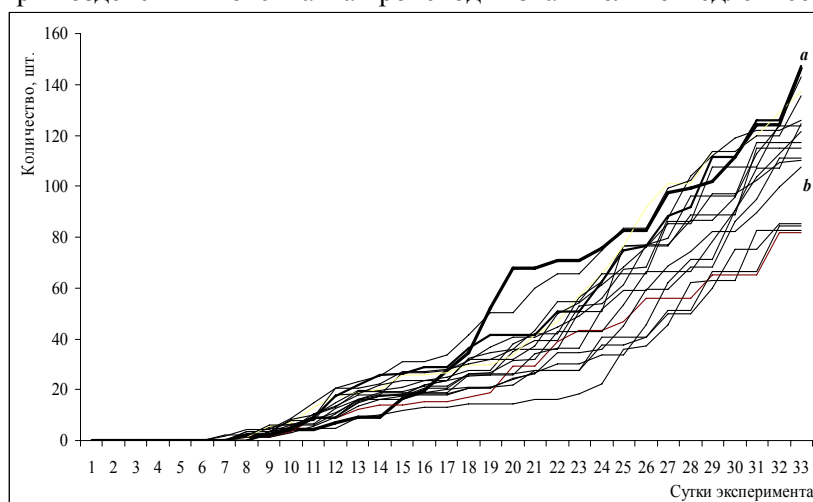


Рис. 3. Суммарная плодовитость на 1 особь за 33 суток 2-ой линии эксперимента (половозрелые особи), *a* – контроль, *b* – растворы токсиканта концентрацией $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-23}$ М.

Состояние яичников половозрелых особей после воздействия инсектицидом приведено на рис. 4. В контроле (*a*) наблюдается как заполненная эмбрионами выводковая сумка, так и следующая генерация развивающихся ооцитов в яичниках.

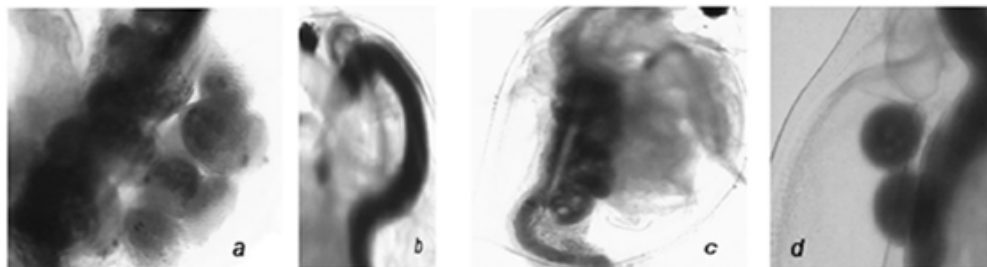


Рис. 4. Степень развития яичников половозрелых *Daphnia magna*: *a* – экспозиция в чистой воде (контроль); *b, c, d* – после воздействия инсектицидом Танрек

В особях, экспонируемых в токсиканте через 5–6 дней после воздействия, наблюдаются разные отдельные стадии развития: *b* – яичники не заполнены ооцитами, *c* – в яичниках начали развиваться ооциты, *d* – в выводковой сумке появились единичные яйца. И в случае с половозрелыми дафниями тоже наблюдается явно выраженный эффект блокировки развития ооцитов под воздействием Танрека, хотя и в меньшей степени, чем с новорожденной молодью.

Выводы. Выявлено острое токсическое действие в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ М и угнетающее в диапазоне $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-23}$ М инсектицида Танрек на новорожденную молодь и половозрелых особей *Daphnia magna*. Обнаружен повреждающий эффект действия инсектицида Танрек, выраженный в блокировке развития ооцитов.

Список литературы.

ГН 1.2.1323-03. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень). Минздрав РФ. Москва. 2003. 61 с.

Папченкова Г.А. Влияние инсектицида танрек на плодовитость *Daphnia magna* Straus (Cladocera) // Тезисы докладов научно-практической конференции Биологически активные вещества: Фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый Свет, Крым, Украина 23–28 мая 2011. С. 391–392.

Токсикологические методы контроля // Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. Государственный комитет РФ по охране окружающей среды. М., 1999. 35 с.

Peters R.H., De Bernardi R. *Daphnia*. Memorie Dell'istituto Italiano Di Idrobiologia. 1987. Vol. 45. 502 pp.

АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ В КИШЕЧНИКЕ ОКУНЯ ИЗ АЦИДНЫХ ОЗЕР С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ РТУТИ

Г.А. Пенькова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 п. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия, penkovds44@gmail.com*

В результате усилившихся техногенных нагрузок на атмосферу и гидросферу тяжелые металлы из естественного компонента природной среды, участвующего во всех круговоротах, превратилась в весьма опасный компонент для здоровья человека и живой природы. Ртуть рассматривается как один из самых опасных элементов, оказывающих токсическое действие на гидробионтов. Во всех странах мира она включена в списки загрязняющих веществ 1-го класса опасности. Весьма существенно то, что ртуть входит в группу элементов, которые, с одной стороны, являются сильно токсичными, а с другой, достаточно широко распространенными. Мигрируя на большие расстояния и попадая в водоемы, ртуть может представлять угрозу экосистемам и здоровью населения.

Высокие концентрации ртути (1–3 мг/кг) неоднократно регистрировались в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России. Доминирующим фактором в повышении биодоступности ртути при низком ее содержании в абиотических компонентах системы является закисление воды. Соли двухвалентной ртути, особенно органические, легко поглощаются водными организмами: водные беспозвоночные накапливают ее в высоких концентрациях, рыбы также поглощают этот металл и удерживают его в тканях главным образом в виде метилртути. При ацидификации водоемов уровень аккумуляции ртути в тканях рыб существенно возрастает, а её содержание в кишечнике приближается к максимальному, отмеченному для мышечной ткани (Комов, 1999).

Ртуть принадлежит к числу тиоловых ядов, оказывает мутагенные и тератогенные эффекты (Samson, Shenker, 2000), вызывает значительные изменения белкового, липидного и углеводного обменов (Немова, 2005). Вследствие этого снижается темп роста рыб, нарушаются процессы созревания гонад, воспроизводства. В организм рыб она поступает преимущественно с пищей (Hall et al., 1997), однако действие этого металла на пищеварительные ферменты рыб из природных популяций изучено недостаточно. Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, для оценки физиолого-биохимического состояния особую актуальность представляет изучение влияния накопленной в организме ртути на гидролиз углеводных компонентов корма.

В связи с этим цель работы состояла в изучении накопления и хронического действия ртути на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике окуня *Perca fluviatilis* L. из ряда водоемов Новгородской области с кислым значением pH воды.

Рыбы отловлены в летне-осенний период 2005–2007 г. из кислотных озер Рдейского заповедника Новгородской области: оз. Роговское, Чудское и Малое Горьковское. Площадь озер

составляет 91578, 1619559 и 563605 м² соответственно. Масса окуней составляла 30 ± 2.8 г, длина тела – 12.8 ± 0.4 см. Всего исследовано 40 экз. окуня.

Для определения ферментативной активности использовали гомогенаты слизистой оболочки медиальной части кишечника, приготовленные на растворе Рингера для холоднокровных животных (110 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 13 mM CaCl₂, pH 7,4). Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20), и активность сахаразы КФ 3.2.1.48 определяли модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969) при температуре 20°C, pH 7.4. Кинетические характеристики гидролиза крахмала и сахарозы – значения кажущейся константы Михаэлиса (Km) и максимальной скорости реакции (Vmax) определяли графическим методом Лайнуивера-Берка.

Результаты обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003 и представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при $p = 0.05$.

Окунь исследованных озер различался по содержанию ртути в мышцах (табл.). Минимальный уровень (0.18 м/кг сырой массы ткани) отмечен у окуня из оз. Роговское, максимальный уровень (0.49 м/кг) у рыб из оз. М. Горецкое. Линейно-массовые характеристики рыб из исследованных озер достоверно не отличались. В то же время у окуня из оз. М. Горецкое с наибольшим содержанием ртути в мышечной ткани значения коэффициента упитанности достоверно выше по сравнению с рыбами двух других озер. Ранее, в хронических экспериментах на молоди рыб, получавших корм с повышенной концентрацией ртути, были установлены разнонаправленные эффекты накопления этого металла в организме на линейно-массовые характеристики рыб. В частности, повышение содержание ртути в мышцах привело к замедлению роста молоди плотвы и повышению роста молоди окуня (Комов и др., 2004). Выявленные различия, по всей вероятности, могут быть связаны как с видовыми особенностями реакции рыб на присутствие токсиканта, так и с различным уровнем его накопления в мышечной ткани.

Содержание ртути в кишечнике рыб из озер М. Горецкое, Чудское и Роговское составило 0.02 ± 0.01 , 0.05 ± 0.004 и 0.09 ± 0.001 мг/кг, соответственно, и положительно коррелировало с содержанием ртути в мышечной ткани рыб. При этом содержание ртути в кишечнике рыб не превышало 20% от ее содержания в мышцах. С ростом содержания ртути амилолитическая активность слизистой оболочки кишечника снижались в 1.4 раза, активность сахаразы – в 1.6 раза.

Таким образом, при увеличении накопления ртути в кишечнике окуня из кислых озер отмечено последовательное снижение уровня активности ферментов, гидролизующих ди- и полисахариды.

Таблица. Активность гликозидаз в слизистой оболочке кишечника окуня с различным накоплением ртути в организме.

Показатель	Озеро		
	Роговское	Чудское	М. Горецкое
Содержание Hg мг/кг сырой массы мышц	0.18 ± 0.02^a	0.36 ± 0.04^b	0.49 ± 0.02^b
Содержание Hg мг/кг сырой массы кишечника	0.02 ± 0.001	0.05 ± 0.004^b	0.09 ± 0.001^b
Амилолитическая активность, мкмоль/(г·мин)	2.17 ± 0.08^a	2.03 ± 0.05^a	1.52 ± 0.01^b
Активность сахаразы, мкмоль/(г·мин)	0.46 ± 0.01^a	0.36 ± 0.01^b	0.28 ± 0.01^b
Km гидролиза крахмала, г/л	2.52 ± 0.15^a	3.33 ± 0.15^b	4.46 ± 0.07^b
Vmax гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин	2.94 ± 0.11^a	2.82 ± 0.06^a	2.36 ± 0.07^b
Km гидролиза сахарозы, ммоль	3.41 ± 0.26^a	2.50 ± 0.20^b	5.98 ± 0.38^b
Vmax гидролиза сахарозы, мкмоль/г·мин	0.48 ± 0.01^a	0.38 ± 0.01^b	0.30 ± 0.01^b
Количество исследованных рыб	9	20	11

Примечание. Разные надстрочные индексы указывают на статистически достоверные различия между показателями в строке (ANOVA, LSD-тест), $p < 0.05$.

Озера Новгородской области, как и другие водоемы Северо-Запада России, испытывают значительные антропогенные нагрузки. Ртуть, являющаяся наиболее опасной в экотоксикологическом отношении, имеет значительный коэффициент накопления и способна аккумулироваться по звеньям трофической цепи (Комов, 1999). Попадая с атмосферными осадками в водоемы, где низкие значения pH создают благоприятные условия для интенсивного протекания процессов метилирования, и, пройдя по трофической цепи, ртуть аккумулируется в мышцах рыб в концентрациях, часто превышающих ПДК (Комов, 1999; Немова, 2005).

Согласно современным представлениям основной физиологический эффект низких pH воды состоит в нарушении кислотно-щелочного баланса и ионной регуляции. Влияние закисления воды на пищеварительную функцию рыб систематически не исследовалось. Вместе с тем известно, что снижение pH инкубационной среды до 5.0 в опытах *in vitro* приводит к почти двукратному снижению активности кишечных карбогидраз у видов, входящих в состав ихтиофауны северо-западных районов России (Голованова, 2008). Близкие результаты получены и при исследовании других пищеварительных гидролаз у многих видов рыб, значительно различающихся по таксономии и экологии. В условиях *in vitro* уровень ферментативной активности снижается в результате денатурирующего действия кислоты на пищеварительные гидролазы. Однако в условиях *in vivo* помимо попадания закисленной воды в пищеварительный тракт может наблюдаться каскад реакций организма (кислотно-щелочной дисбаланс → закисление крови → нарушение дыхания различных тканей → снижение интенсивности синтеза ферментов), в результате чего могут подавляться начальные этапы ассимиляции пищи.

Ранее на примере окуня из водоемов Вологодской области было показано, что накопление ртути в кишечнике составляло лишь 25% от его уровня в мышцах рыб из озера с нейтральным pH воды и достигало 80% у рыб из кислотных озер (Голованова, Комов, 2005). При этом отмечена положительная корреляция содержания ртути в кишечнике и мышечной ткани окуня из исследованных озер. Полученные в нашей работе данные хорошо согласуются с результатами более ранних работ по влиянию накопления ртути на активность пищеварительных карбогидраз окуня из кислотных озер (Голованова, Комов, 2005). Уровень амилалитической активности и активности сахаразы в слизистой оболочке кишечника рыб из оз. Роговское, Чудское и М. Горькое (pH 4.5) близок таковому у окуня из кислотных озер Дубровское и Мотыкино (pH 4.5) Дарвиновского заповедника Вологодской области. Как в том, так и другом случае активность карбогидраз достоверно снижалась по мере увеличения накопления ртути в организме. Изучение кинетических характеристик гидролиза крахмала и сахаразы также позволило выявить прямую корреляцию между величиной кажущейся K_m и уровнем накопления ртути. Повышение содержания ртути сопровождалось увеличением значений K_m в 1.3–1.8 раза, что свидетельствует о снижении фермент-субстратного сродства и отсутствии адаптивных изменений этого показателя. Ранее аналогичная закономерность была отмечена при исследовании кинетических характеристик гидролиза крахмала и сахаразы у окуня из озер с нейтральным значением pH воды, относительное содержание ртути в кишечнике которых не превышало 25% (Голованова, Комов, 2005). В то же время у окуня из кислотных озер Дарвиновского заповедника (Вологодская обл.), относительное содержание ртути в кишечнике которых было значительно больше, отмечено увеличение сродства ферментов к субстрату, имеющее адаптивный характер (Голованова, Комов, 2005). Максимальная скорость реакции гидролиза углеводов в кишечнике окуня также несколько снижалась с увеличением содержания ртути в 1.2–1.6 раза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что направленность изменений характеристик пищеварительных карбогидраз зависит в большей мере от концентрации ртути в кишечнике, чем в мышечной ткани. Снижение амилалитической активности и активности сахаразы, V_{max} и сродства ферментов к субстрату у окуней с большим накоплением ртути свидетельствует об ухудшении эффективности начальных этапов ассимиляции углеводов в кишечнике рыб.

Список литературы.

- Голованова И.Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб: ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН. 2006. 43 с.
- Голованова И.Л., Комов В.Т. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // Вопр. ихтиологии. 2005. Т. 45. № 5. С. 695–701.
- Комов В.Т. Природное и антропогенное закисление малых озер северо-запада России: причины, последствия, прогноз: Дисс. ...док. биол. наук. С-Пб.: Институт озераведения РАН. 1999. 45 с.

Комов В. Т., Степанова И. К., Гремячих В. А. Содержание ртути в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России: причины интенсивного накопления и оценка негативного эффекта на состояние здоровья людей // Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: Рыбинский Дом печати. 2004. С. 99–123.

Немова Н.Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.

Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С. 192–196.

Hall B.D., Bolaly R.A., Furge R.J.P. et al. 1997. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish // Water, Air and Soil. Pollut. V. 100. № 1–2. P. 13–24.

Samson J.C, Shenker J. 2000. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio* // Aquat. Toxicol. V.4. № 2–3. P. 343–354.

БИОХИМИЧЕСКИЙ ОТВЕТ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ХРОНИЧЕСКОЕ НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ СРЕДЫ

Г.А. Петухова

*Тюменский государственный университет,
625003, г. Тюмень, ул. Семакова, 10, Россия, gpetuhova1@mail.ru*

Активная добыча, транспортировка и переработка нефти ведет к частичной потери нефтепродуктов. Поступая в окружающую среду углеводороды нефти оказывают негативное влияние на процессы жизнедеятельности организмов, в том числе на работу биохимических систем, отражающих как степень повреждения клеток, так и уровень биохимической защиты от действия повреждающего фактора.

Исследования проводили на моллюсках *Planorbium rugiruga*. Пятнадцатидневное содержание в воде с загрязненным нефтью грунтом (1%), сопровождалось увеличением активности супероксиддисмутазы (на 130% по отношению к контролю) и каталазы (на 110%). Возрастание биохимической активности ряда ферментов свидетельствует о серьезных изменениях метаболизма животных в условиях нефтяного загрязнения.

В другом эксперименте использовали нефть с разных месторождений, а так же такие растворимые компоненты нефти как ВРФН и этилбензол.

Удельная концентрация каротиноидов в мягком теле моллюсков при хроническом действии нефти и ее компонентов, внесенных в грунт (рис.1), увеличилась во всех опытных вариантах, при этом в опытах с самотлорской нефтью концентрация каротиноидов была выше, чем в других опытных вариантах. Таким образом, хроническое действие нефти увеличивает содержание каротиноидов в мягких тканях моллюсков, что свидетельствует о включении защитных биохимических систем при действии нефтяного загрязнения на организмы.

При определении процентного содержания соединений кремния в раковинах моллюсков при хроническом действии нефти и ее компонентов, внесенных в грунт, было показано (рис. 1) увеличение содержания соединений кремния в раковинах моллюсков. При этом в наибольшей степени на этот показатель влияет северо-вынгаяхинская нефть, а шаимская – в наименьшей степени. Таким образом, хроническое действие нефти и отдельных ее компонентов изменяет процентное содержание соединений кремния, играющего в организме протекторную роль.

Уровень повреждения клеток при действии нефтяного загрязнения среды оценивали по концентрации шиффовых оснований как одного из продуктов перекисного окисления липидов. Анализ концентрации шиффовых оснований в мягком теле моллюсков показал (рис.1), что этилбензол/, входящий в состав нефти, увеличивает этот показатель по сравнению с контролем почти в два раза, тогда как самотлорская нефть и ее водорастворимая фракция снижают концентрацию шиффовых оснований, причем цельная нефть в большей степени.

Наряду с моллюсками, исследование биохимических механизмов защиты клеток проводили на мухах дрозофилах. Мухи были отселектированы по признаку нефтеустойчивости. В течение 70 поколений мух содержали на среде, содержащей полулетальную концентрацию нефти – 5%. В таких экстремальных условиях шел отбор устойчивых генотипов и настройка биохимических механизмов у мух, выживших в условиях нефтезагрязнения. В ходе селекции мух на нефтеустойчивость регистрировали изменение ряда биохимических характеристик. В ходе эксперимента анализировали активность каталазы и супероксиддисмутазы у мух.

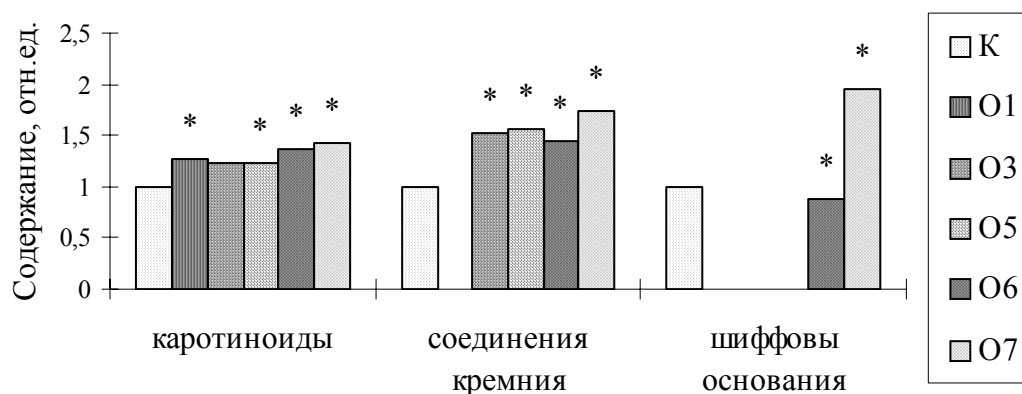


Рис. 1. Содержание некоторых веществ в мягком теле и раковинах *Planorbarium purpurea* при хроническом действии нефти и ее компонентов, внесенных в грунт (К – чистый грунт; O1 – шаимская нефть, 2,5 %; O2 – шаимская нефть 5,0 %; O3 – шаимская нефть 3 %; O4 – самотлорская нефть, 2,5 %; O5 – северо-вынгайхинская нефть 2,5 %; O6 – ВРФН самотлорской нефти, 0,9 %; O7 – этилбензол 0,002 %.)

Было показано, что в ходе адаптации мух к концентрации нефти в среде 2,5 % идет возрастание активности ферментов (табл. 1), участвующих как в перекисном окислении, так и в антиоксидантной защите в клетке. В первом поколении мух, содержащихся в условиях нефтяного загрязнения питательной среды, активность СОД резко снижается, а каталазы – возрастает. В 70-м поколении мух выявлено увеличение активности СОД: при действии концентрации нефти 2,5% – в 1,5 раза, а при действии концентрации 5,2% – почти в 2 раза по сравнению с контрольным уровнем. Активность каталазы возросла еще больше – в концентрации 2,5% нефти – в 1,6 раза, а в 5,2% – в 2,1 раза.

Полученные данные свидетельствуют об активации защитных биохимических механизмов мух

Таблица 1. Изменение активности СОД и каталазы у мух при хроническом действии нефтяного загрязнения среды

Варианты эксперимента	Поклоения	Активность СОД (% ± m)	Активность каталазы (мк моль/100 г)
Контроль		11,6 ± 0,56	51,6 ± 1,71
Опыт 1 (2,5%)	F 1	7,9 ± 0,62*	78,6 ± 1,90 *
	F 70	17,0 ± 0,54*	84,7 ± 1,18*
Опыт 2 (5%)	F 1	5,3 ± 0,41*	89,4 ± 1,06*
	F 70	22,8 ± 0,38*	109,9 ± 1,40*

Для оценки эффективности работы систем защиты у мух нефтеустойчивых линий был проведен анализ концентрации каротиноидов у линий мух *Drosophila melanogaster* таких как контрольные мухи, мухи нефтеустойчивые к 2,5% и 5% нефти в среде. В наших исследованиях показано, что у мух содержащихся на среде с добавлением нефти 2,5% и 5% концентрация каротиноидов больше, чем у контрольных мух содержащихся на чистой среде. Это свидетельствует о том, что на биохимическом уровне для ликвидации последствий действия нефтяных углеводородов на организм идет активация (практически в 2 раза) системы каротиноидной защиты в клетке, позволяющей нейтрализовать последствия нефтяного воздействия на клетку и организм в целом. Следует отметить, что такая система либо возникает в ходе адаптации мух самостоятельно, либо является одним из побочных эффектов действия генов нефтеустойчивости, сформировавшихся в ходе отбора устойчивых генотипов.

Еще одним показателем, по которому проводили анализ влияния нефтяной среды на мух, было содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов у *Drosophila melanogaster*. У мух нефтеустойчивых линий провели анализ содержания диеновых конъюгатов в теле мух. Результаты проведенного исследования показали (рис.2), что доля содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) у мух содержащихся на нефтяной среде с концентрацией 2,5% одинакова с мухами контрольной линии.

У мух, адаптированных к жизни в среде с концентрацией нефти 5% содержание диеновых конъюгатов в 3,48 раза выше, чем у контрольных мух.

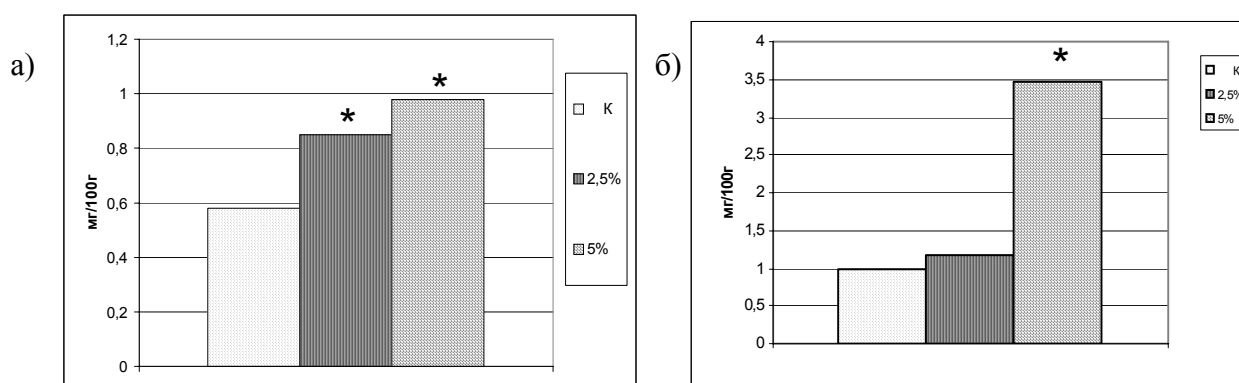


Рис.2. Содержание каротиноидов (а) и диеновых конъюгатов (б) в теле мух при хроническом действии нефтяного загрязнения среды

Таким образом, высокое содержание диеновых конъюгатов у мух содержащихся на нефтяной среде с концентрацией 5% свидетельствует о повышенным образованием свободных радикалов и активацией перекисного окисления липидов.

В следующей серии экспериментов изучали состояние монооксигенозной системы у мух нефтеустойчивой линии - содержание цитохромов b5, P-450, его инактивированной формы P-420 и суммарного количества P-450+P-420, поскольку эта система является одной из универсальных систем организма, отвечающих за его гомеостаз и его взаимодействие с факторами окружающей среды

Проведенное исследование показывает (рис.3а, б), что содержание цитохрома b5 у мух нефтеустойчивой линии, в течение всего срока эксперимента содержащихся на среде с нефтью (O1)- не отличается от содержания цитохрома b5 в контроле. Мухи дикого типа впервые столкнувшиеся с нефтью (O2) имеют пониженное содержание b5 по сравнению с K и O1(нефтеустойчивые мухи) на 10 день, а на 20 день в 2 раза содержание b5 в O2 превышает содержание цитохрома в K и у мух нефтеустойчивой линии из O1 (рис.3а).

Также нами проводилось исследование динамики содержания основного каталитического звена монооксигеназной системы - цитохрома P-450 во всех вышеперечисленных вариантах опыта. В O1, где мухи нефтеустойчивой линии все 20 дней эксперимента содержались на среде с нефтью, содержание P- 450 превышает контрольное значение. Уровень цитохрома P-450 у мух дикого типа, впервые попавших на нефтяную среду на 20 дней (O2), повышен по сравнению с контролем на 20 день(F0 и F1). По сравнению с нефтеустойчивыми мухами из O1 содержание P-450 в O2 почти в 4 раза меньше на 10 день, на 20й - достигает уровня нефтеустойчивых мух из O1. Действие нефти на мух дикого типа выражается в пониженном содержании P-450 в начале и повышении к концу эксперимента.

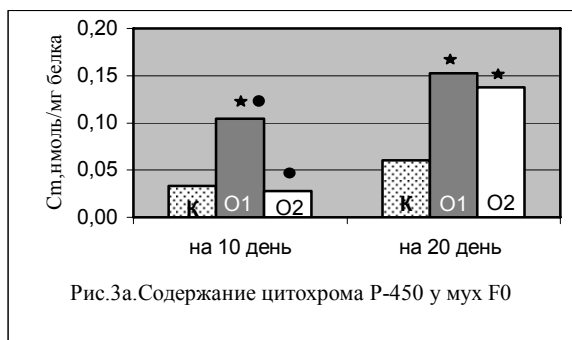


Рис.3а.Содержание цитохрома P-450 у мух F0

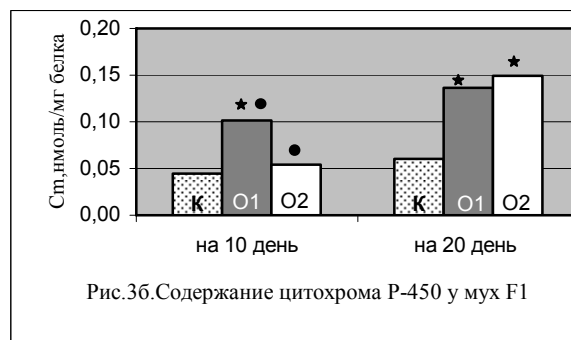


Рис.3б.Содержание цитохрома P-450 у мух F1

Самым большим содержанием цитохрома P-450 характеризуются мухи нефтеустойчивой линии (F0), все 20 дней эксперимента содержащиеся на среде с нефтью.

Под влиянием самых различных факторов цитохром Р-450 может переходить в свою неактивную форму – цитохром Р-420. Поэтому в нашей работе мы исследовали изменение и этого показателя в тех же вариантах опыта. Содержание Р-420 у нефтеустойчивых мух F0 из О1 находится на уровне контроля, на 20 день отмечено повышение содержания Р-420 у нефтеустойчивых мух. Неблагоприятное действие нефти на мух дикого типа проявляется в том, что мухи дикого типа 20 дней содержавшиеся на нефтяной среде (О2), обладают повышенным содержанием Р-420 по сравнению с К на 10 день – почти в 6 раз, на 20й- 20ти кратное увеличение. Такое же значительное увеличение содержания Р-420 в О2 наблюдается по сравнению с О1 (нефтеустойчивая линия) во все сроки наблюдения.

Суммарное содержание Р-450 + Р-420 достоверно выше, чем в контроле, у нефтеустойчивых мух О1 и у мух дикого типа, впервые столкнувшихся с нефтью (О2), во все сроки наблюдения. При сравнении нефтеустойчивых мух из О1 и мух дикого типа из О2 показано, что у мух дикого типа исходного и первого поколения содержание Р-450+Р-420 достоверно больше только на 20 день. Наибольшим суммарным содержанием Р-450+ Р-420 характеризуется О2 на 20й день, где мухи дикого типа F0 впервые попали на нефтяную среду и содержались там 20 дней, причем наибольший вклад в формирование показателя вносит неактивная форма цитохрома Р-420. У мух нефтеустойчивой линии в процессе адаптации к нефти наблюдается увеличение содержания Р-450+ Р-420 по сравнению с К за счет увеличения активной формы цитохромов Р-450.

Таким образом, проведенные исследования на моллюсках и дрозофилах показали вклад ферментативных систем в работу биохимических систем защиты клеток при нефтяном загрязнении среды. Нейтрализация продуктов перекисного окисления и активизация защитных систем позволяет организмам выживать в экстремальных условиях.

АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ И ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

Е.С. Петухова¹, Г.А. Петухова¹, А.Г. Перекупка²

¹Тюменский государственный университет, 625043, г. Тюмень, ул. Пирогова, 3,

²ОАО «Гипротюменнефтегаз», 625000,
г. Тюмень, ул. Республики, 62, Россия, es_petukhova@mail.ru

Нефтегазодобывающая промышленность является ведущей отраслью Тюменской области и оказывает самое непосредственное влияние на экологическое состояние региона (Московченко, 1998). Она приводит к нарушению практически всех природных компонентов: недр и атмосферы, рельефа и почв, поверхностных и грунтовых вод, флоры и фауны (Чижов, 1988).

Особое опасение в настоящее время вызывает все возрастающее загрязнение водоемов, морей и океанов, почв и воздуха, в первую очередь, нефтью и нефтепродуктами (Михайлова, 1976). В воду переходят в основном легкие фракции или окисленные продукты (Нестеров, 1984). Присутствие загрязняющих веществ часто вызывает серьезные последствия благодаря тому, что эти вещества не свойственны данной среде, и живые организмы не обладают против них защитными свойствами. Сырая нефть является продуктом естественного происхождения, но, тем не менее, она действует как настоящий загрязнитель (Нельсон-Смит, 1977). Действие нефти на живые организмы проявляется на организменном, популяционном и биоценоотическом уровнях. Влияние нефти выражается, в частности, в остром и хроническом отравлении организма (Добринский, 1997). Не все организмы оказываются приспособленными к присутствию нефти, могут адаптироваться в измененных условиях, для многих нефть представляет угрозу для жизни, вызывает широкий спектр нарушений.

Изучением токсического, мутагенного, канцерогенного влияния нефти на различные живые системы занималось много исследователей (Петухова, 2007). Интерес представляет применение биологически активных веществ, проявляющих антимутагенное действие, обеспечивающих жизнеспособность и генетическую стабильность живых организмов. Парааминобензойная кислота (ПАБК) – один из таких репарагенов (Кудрявцева, 1984). В литературе недостаточно изучены механизмы защиты растений от нефтяного загрязнения. Представляло интерес изучить влияние ПАБК на биохимические системы внутриклеточной защиты. В связи с этим целью работы был

анализ активации биохимических механизмов защиты растений и изменений морфофизиологических показателей при действии воды, загрязненной нефтью.

Нами были поставлены и решены следующие задачи:

1. Изучить содержание хлорофиллов А и В в элодее канадской, ряске малой, овсе посевном, костреце безостом, овсянице луговой и пшенице мягкой
2. Исследовать содержание каротиноидов в изучаемых объектах
3. Проанализировать содержание флавоноидов в элодее канадской, ряске малой, овсе посевном, костреце безостом, овсянице луговой и пшенице мягкой
4. Исследовать всхожесть овса посевного, костреца безостого, овсяницы луговой, пшеницы мягкой
5. Изучить морфометрические показатели тестируемых проростков

Эксперимент проводился в 2 этапа:

На первом этапе работы было проведено изучение влияния водной вытяжки из почвы, загрязненной нефтью Шаимского месторождения (5%), анализ модифицирующего действия парааминобензойной кислоты при нефтяном загрязнении на ряску малую (*Lemna minor* L.) и элодею канадскую (*Eloдея canadensis* Michx).

Растения помещались в емкости по 200 мл, на дне которых находилось по 50 г почвы, остальной объем заполнялся водой. Было поставлено несколько вариантов: контроль (чистая почва и отстоянная водопроводная вода), опыт 1 (чистая почва, залитая раствором ПАБК в концентрации 0.001% на 1 л воды), опыт 2 (почва с 5% содержанием нефти с Шаимского месторождения, залитая отстоянной водопроводной водой) и опыт 3 (вариант с комбинированным действием нефти и 0.001% раствора ПАБК). В течение 14 дней выращивали элодею, ряску выращивали 7 дней, затем регистрировали физиологические показатели (содержание пигментов фотосинтеза и флавоноидов).

Таблица 1. Содержание пигментов фотосинтеза в элодее канадской при действии нефти и ПАБК

Вариант опыта	Хлорофилл А	Хлорофилл В	Каротиноиды
Контроль	15.71±0.31	9.40±0.19	17.10±0.36
Опыт 1 (ПАБК)	12.33±0.30***	6.99±0.26***	13.22±0.34***
Опыт 2 (нефть)	12.88±0.26***	7.03±0.16***	13.49±0.09***
Опыт 3 (нефть +ПАБК)	40.52±0.13***	10.87±0.23***	23.85±0.31***

Примечание: * - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,05$), ** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,01$), *** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,001$)

При действии ПАБК было показано снижение эффективности работы системы пигментов фотосинтеза и стабилизация работы системы флавоноидной защиты у элодеи канадской; у ряски малой стимуляция работы системы пигментов фотосинтеза и угнетение системы флавоноидной защиты. При действии нефтяного загрязнения у элодеи и ряски отмечено снижение содержания пигментов фотосинтеза и флавоноидов, что свидетельствует об угнетающем действии нефти на защитные системы растений. При комбинированном действии нефтяного загрязнения и ПАБК у элодеи и ряски выявлено увеличение эффективности работы системы пигментов фотосинтеза.

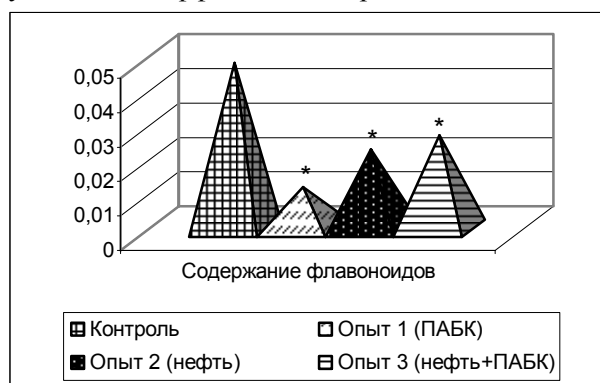


Рис. 1. Содержание флавоноидов в ряске малой при действии нефти и ПАБК

Система флавоноидной защиты при комбинированном действии нефти и ПАБК была высоко эффективной у элодеи и ряски (концентрация флавоноидов увеличивается). Система флавоноидной защиты растений оказалась более чувствительной к действию нефтяного загрязнения и модифицирующему действию ПАБК на фоне нефтяного загрязнения по сравнению с каротиноидной системой защиты и системой хлорофиллов. Ряска малая по ряду биохимических показателей оказалась более чувствительным тест-объектом по сравнению с элодеей. Способность ПАБК стимулировать работу протекторных систем растений позволяет использовать этот репаратив для защиты растений в условиях нефтяного загрязнения.

Второй этап нашей работы был посвящен оценке степени нефтяного загрязнения территории Кальчинского месторождения. Для достижения поставленной цели на территории месторождения были взяты пробы воды. Отбор проб производился в месте разлива нефти (О1), в 20 м от места разлива (О2) и в 35 м от места разлива (О3), в качестве контроля использовали пробы с фоновой территории. Пробы воды были взяты из водосборной канавы, проложенной вдоль трубопровода, по 1.5 литра с глубины 20 см. На исследуемых образцах воды проращивали семена овса посевного (*Avena sativa* L.), костреца безостого (*Bromopsis inermis* Fourr), овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Hudson) и пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.).

Проведенный химический анализ проб воды с Кальчинского нефтяного месторождения выявил превышение предельно допустимой концентрации (ПДК) по нефтепродуктам, железу, цинку и меди.

Таблица 2. Химический анализ проб воды с территории Кальчинского месторождения

Вариант опыта	Нефтепродукты, мг/дм ³	Железо, мг/дм ³	Кадмий, мг/дм ³	Свинец, мг/дм ³	Цинк, мг/дм ³	Медь, мг/дм ³
О1	10.28±2.57	7.32±0.73	<0.0002	0.0025±0.0008	0.030±0.007	0.014±0.003
О2	0.144±0.046	5.56±0.56	0.00025±0.00007	0.0024±0.0008	0.056±0.014	0.018±0.004
О3	0.137±0.055	4.49±0.67	<0.0002	0.0022±0.0007	0.020±0.005	0.018±0.005
ПДК рыбохоз.	0.05	0.1	0.005	0.006	0.01	0.001

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, превышающие ПДК.

Фитотоксичность воды с Кальчинского месторождения оценивали при помощи проростков овса посевного. Также представляло интерес изучить защитное влияние парааминобензойной кислоты (ПАБК) при действии нефтяного загрязнения. ПАБК регулирует активность ферментов и, таким образом, повышает адаптивность организма в неблагоприятных условиях среды (Строева, 2000). В данном эксперименте использовали 5 опытных вариантов в трех повторностях:

- контроль – вода с Кальчинского месторождения с фоновой территории,
- опыт 1 – вода с места разлива нефти,
- опыт 2 – вода из района в 20 м от места разлива,
- опыт 3 – вода, взятая в 35 м от места разлива,
- опыт 4 – 0.001% раствор ПАБК,
- опыт 5 – комбинированное действие нефтяного загрязнения и ПАБК: вода с места разлива нефти + 0.001% раствор ПАБК.

Семена овса помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу и заливали на 0.5 см слоем исследуемой воды. В каждом опытном варианте было использовано по 100 семян, эксперимент длился в течение 14 дней.

На 3, 10 и 14 день фиксировали всхожесть семян овса посевного. По истечении срока проводили анализ содержания пигментов фотосинтеза и флавоноидов в проростках. Всхожесть семян овса посевного в разные сроки эксперимента повышалась ($P < 0.05$) при действии нефтяного загрязнения и в варианте с ПАБК. При комбинированном действии нефти и ПАБК показатели всхожести выходили на контрольный уровень, что говорит о защитном действии ПАБК, обеспечивающей адаптацию растений.

При анализе содержания пигментов фотосинтеза в растениях овса посевного при обработке водой с Кальчинского месторождения было выявлено снижение ($P < 0.05$) концентрации

хлорофилла А и каротиноидов в вариантах с водой взятой в 35 м от места разлива и при комбинированном действии нефти и ПАБК. Концентрация хлорофилла В снижалась ($P<0.05$) во всех опытных вариантах.

Содержание флавоноидов в овсе посевном при обработке водой с Кальчинского месторождения повышалось в вариантах с водой, загрязненной нефтью ($P<0.01$), что говорит об активации ферментной защиты растения. Также стимулирующий эффект был отмечен в варианте с использованием ПАБК ($P<0.05$). При комбинированном действии нефти и парааминобензойной кислоты содержание флавоноидов в проростках овса посевного становится примерно равным контрольному уровню. Это подтверждает гипотезу об адаптивном действии ПАБК.

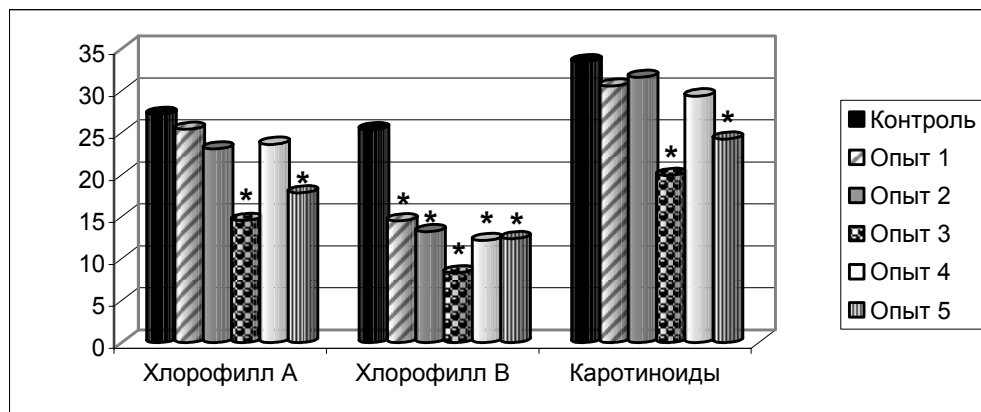


Рис. 2. Содержание пигментов фотосинтеза у овса посевного при обработке водой с Кальчинского месторождения нефти.

В эксперименте с проростками костреца безостого, овсяницы луговой и пшеницы мягкой использовали 3 опытных варианта в трех повторностях:

- контроль – вода с Кальчинского месторождения с фоновой территории,
- опыт 1 – вода с места разлива нефти,
- опыт 2 – вода из района в 20 м от места разлива,
- опыт 3 – вода, взятая в 35 м от места разлива.

Семена помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу и заливали на 0.5 см слоем исследуемой воды. В каждом опытном варианте было использовано по 100 семян, эксперимент длился в течение 8 дней.

На 3, 5 и 8 день фиксировали всхожесть семян овса. По истечении срока проводили анализ содержания пигментов фотосинтеза и флавоноидов в проростках.

При выращивании костреца безостого на воде с Кальчинского нефтяного месторождения увеличивалась длина зелёной части, количество корней и максимальная длина корня ($P<0.01$), повышалось содержание пигментов фотосинтеза и концентрация флавоноидов ($P<0.01$). Это говорит о том, что растения приспосабливались к действию нефтяного загрязнения, включались дополнительные резервы и защитные системы.

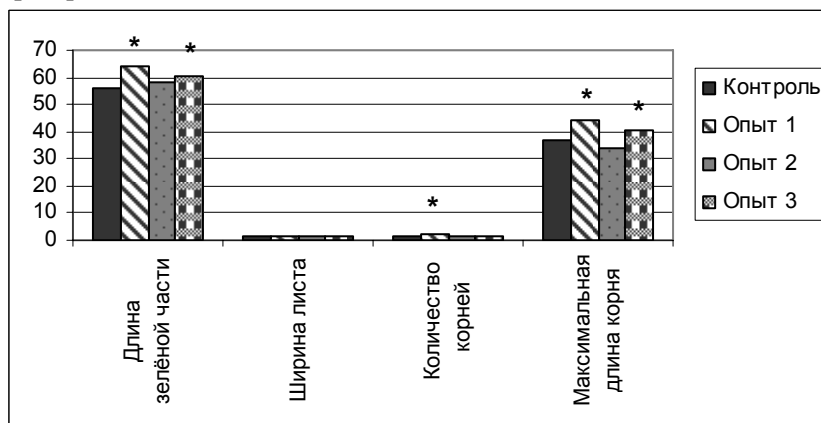


Рис. 3. Морфометрические показатели костреца безостого при обработке водой с Кальчинского месторождения

У овсяницы луговой при выращивании на воде, загрязненной нефтью, всхожесть семян снижалась ($P<0.05$), уменьшалась длина зелёной части ($P<0.01$), количество корней ($P<0.05$) и максимальная длина корня ($P<0.01$), повышалось содержание пигментов фотосинтеза ($P<0.001$), содержание флавоноидов вблизи разлива нефти снижалось ($P<0.01$), однако резко увеличивалось в 35 м от места разлива ($P<0.001$).

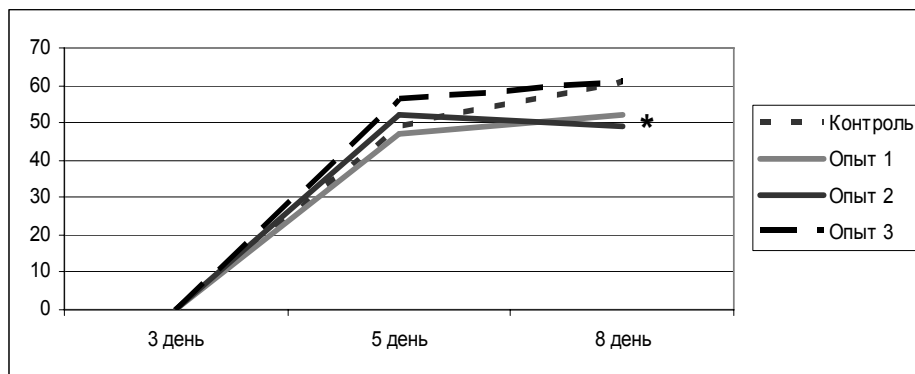


Рис. 4. Всхожесть проростков овсяницы луговой (%) при обработке водой с Кальчинского месторождения

Растения овсяницы оказались более чувствительны к нефтяному загрязнению, однако защитные биохимические системы включались в работу, соответственно шла адаптация к стрессу. У пшеницы мягкой при выращивании на воде с Кальчинского нефтяного месторождения снижались анализируемые показатели ($P<0.01$). Данный вид растения также оказался не приспособлен к нефтяному стрессу.

Полученные результаты можно объяснить тем, что кострец и овсяница являются растениями, используемыми в рекультивационных смесях, поэтому они оказались более устойчивы к действию нефтяного загрязнения, чем пшеница, являющаяся сельскохозяйственным растением.

Выявлено защитное действие парааминобензойной кислоты на фоне нефтяного загрязнения, проявляющееся в нормализации содержания пигментов фотосинтеза и флавоноидов у ряски малой и элодеи канадской, показателей всхожести и содержания флавоноидов в овсе посевном. Среди растений, выращенных на воде, загрязненной нефтью, самой чувствительной оказалась пшеница мягкая, менее чувствительной – овсяница луговая и наиболее устойчивым оказался кострец безостый, который может быть рекомендован к применению при проведении биологической рекультивации. Необходимо дальнейшее изучение защитных механизмов растений и применение веществ, способствующих активации протекторных систем организма.

Список литературы

- Добринский, Л.Н. Экология Ханты-мансийского Автономного округа / Л.Н. Добринский, В.В. Плотников. – Тюмень: Софт Дизайн, 1997. – 220 с.
- Кудрявцева, В.М. Размножение луковичных многолетников в опытах на ПАБК / В.М. Кудрявцева // Химические мутации в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений. – М.: Наука, 1984. – С. 194-197.
- Михайлова, Л.В. Динамика ВРФН в воде, её проникновение в организм гидробионтов и влияние на обменные процессы / Л.В. Михайлова, А.Ш. Бышевский // Эколого-физиологические исследования в природе и эксперименте. – Фрунзе, 1978. – С. 281.
- Московченко, Д.В. Нефтегазодобыча и окружающая среда: эколого-географический анализ Тюменской области: монография / Д.В.Московченко. – Новосибирск: Наука, Сиб. Предприятие РАИ, 1998. – 112 с.
- Нельсон-Смит, А. Нефть и экология моря: монография / А. Нельсон-Смит. – М.: Прогресс, 1977. – 301 с.
- Петухова, Г.А. Эколого-генетические последствия воздействия нефтяного загрязнения на организмы / Г.А. Петухова // Дис. ...доктора биол. наук – Тюмень, 2007. – 526 с.
- Нестеров, И. И. Тайны нефтяной колыбели / И.И. Нестеров, А.С. Рябухин. - Свердловск, 1984. – 156 с.
- Строева, О.Г. Биологические свойства парааминобензойной кислоты / О.Г. Строева // Онтогенез. – 2000. – Т. 31, № 4. – С. 259-283.
- Чижов, Б.Е. Лес и нефть Ханты-мансийского автономного округа / Б.Е. Чижов. – Тюмень, 1988. – 141 с.

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

Ю.А. Подунай, И.Н.Залевская

Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского,
АР Крым, г. Симферополь, пр-кт Академика Вернадского, 4, 95007, Украина, grab-ua@yandex.ru

Чёрное и Азовское моря находятся в зоне интенсивной хозяйственной деятельности человека, в связи с чем испытывают колоссальную антропогенную нагрузку. Бытовые, промышленные и сельскохозяйственные стоки, попадая в морские акватории, вызывают негативные последствия для экосистемы и, прежде всего, для биоты (Жерко и др., 2001; Себах, 1995; Rudneva, 2001). У побережья Украины в море сбрасывается ежегодно 11,4 млн. т неочищенных, 89 млн. т частично очищенных и 190,6 млн. т нормативно очищенных сточных вод. Различные токсиканты и патогенные микроорганизмы, попадающие в воду и в грунты, представляют реальную опасность для биоты, губительно влияют на выживание, рост, репродукцию и здоровье гидробионтов (Руднева и др., 2005, Моисеенко, 2005).

Наиболее часто в диагностических целях в тканях гидробионтов анализируют содержание различных загрязнителей, которые могут вызывать существенные нарушения обмена веществ и повреждение важнейших биомолекул. В этом случае по характерным биохимическим параметрам (биомаркерам) можно оценить степень этих нарушений, адаптивный или токсический ответ организма на качество среды обитания.

В последнее время для оценки повреждающего действия ксенобиотиков используются биомаркеры “присутствия”, отклики которых свидетельствуют о наличии в воде токсикантов и характеризуют неблагоприятное действие последних на организм (Немова и др., 2004). Протеиназы действуют на первом, ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки, поэтому велика их роль в механизмах биохимических адаптаций (Немова, 1991). Считается, что основным токсическим субстратом, ответственным за возникновение стадии аутоагрессии эндотоксикоза, могут стать продукты клеточной дезорганизации, неполного распада и неферментного превращения белков крови и тканей. Среднемолекулярные олигопептиды, являясь продуктами распада белков, действуют как вторичные эндотоксины, вызывая расстройство различных физиологических процессов. Повышение уровня среднемолекулярных олигопептидов в тканях может быть обусловлено как возникновением окислительного стресса, так и действием внутриклеточных протеиназ.

Морские организмы очень чувствительны к изменяющимся факторам среды, в том числе к антропогенному загрязнению различными химическими элементами, включая металлы. Чем выше загрязнение среды ксенобиотиками, тем в большей степени они накапливаются в тканях рыб, нарушая нормальную жизнедеятельность. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи между уровнем загрязнения морской среды, активностью катепсина Д и содержанием молекул средней массы.

Материалы и методы. Материалом исследования служила мышечная ткань черноморских рыб (Морской ерш *Scorpaena porcus* (L.), Морской налим *Gaidropsarus mediterraneus* (L.), Султанка *Mullus barbatus ponticus* (Essipov), Мерланг *Merlangus merlangus euxinus* (Nordmann), Ставрида средиземноморская *Trachurus mediterraneus* (Staidachner)), обитающих в акваториях г. Севастополя (бухты Мартынова и Карантинная). Готовили 30 % гомогенат мышц в дистиллированной воде и физиологическом растворе.

Определяли содержание среднемолекулярных олигопептидов в тканях. Степень фрагментации окисленных белков гомогената мышечной ткани определяли в надосадочной жидкости, полученной путем осаждения белков 10 % раствором трихлоруксусной кислоты. Определение СМП массой 500-5000 дальтон основано на детекции гомогената ткани, освобожденной от грубодисперсных белков при помощи 10% раствора трихлоруксусной кислоты и разведения дистиллированной водой, путем измерения оптической плотности плазмы в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм (Габриэлян и др., 1984).

Общий индекс эндогенной интоксикации рассчитывался по методу Малаховой М.Я. и Оболенского С.В. (1995) как число молекул средней молекулярной массы, поскольку именно средние молекулы являются критерием эндотоксикоза (те же авторы): ОИИ плазмы=МСММ

плазмы, где МСММ – молекулы средней молекулярной массы в плазме крови. Количество МСММ определялось скрининг-методом Н.И. Габриэлян: спектрофотометром «СФ – 46» (производство «ЛоМо», Россия) в конкурентной зоне ультрафиолетового излучения (длина волны 254 нм), и измерялось в единицах оптической плотности (ЕОП).

Определяли активность катепсина Д в мышечной ткани. Метод определения активности катепсина Д основан на способности этого фермента гидролизовать гемоглобин с образованием пептидов, растворимых в присутствии ТХУ. По количеству образовавшихся пептидов судят об активности катепсина Д (Дингл, 1980).

Статистические расчеты выполняли в среде электронных таблиц Excel 2003 для Microsoft Office и программы STATISTICA v.6.0.. Все измерения и исследования осуществляли на оборудовании, прошедшем метрологическую поверку и экспертизу.

Результаты и обсуждение. Известно, что практически все метаболические реакции катализируются ферментами, поэтому регуляция метаболизма сводится к регуляции типа и интенсивности ферментативных функций. Протеиназы действуют на первом, ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки, поэтому велика их роль в механизмах биохимических адаптаций (Немова 1991). Реактивность системы внутриклеточного протеолиза в условиях поступления ксенобиотиков имеет выраженные межвидовые различия, зависящие от степени аккумуляции загрязнителя, интенсивности детоксикационных процессов, степени изменения свойств макромолекул генетического аппарата и ферментных систем клетки.

Литературные данные свидетельствуют о том, что активность ферментов рыб может зависеть от времени года. Такая изменчивость обмена связана как с существованием годовых физиологических ритмов, которые могут быть обусловлены сезонными колебаниями температурного и водно-солевого режима водоемов, обеспеченности пищей, потреблением кислорода, так и с различной степенью загрязнения водоемов на протяжении года (Руднева, 2003). На основании вышеизложенного представляло интерес исследовать активность катепсина Д одновозрастных рыб в разные сезоны года.

Одним из факторов, который влияет на параметры белковой системы в разные периоды года, может быть температура воды. При анализе сезонных изменений учитывали среднюю температуру сезона исследуемого периода времени, данные о которой были предоставлены Севастопольским отделением Государственной инспекции по охране Черного моря (зима +7,8, весна +12,2, лето +23,1 и осень +18,4).

В таблице 1 представлена активность катепсина Д в мышечной ткани черноморских рыб в разные сезоны года.

Таблица 1. Активность катепсина Д в мышцах черноморских рыб (Е 270/ г ткани/ч) по сезонам

№	Объект исследования	зима	весна	лето	осень
1	Морской ерш	0,089±0,004	0,192±0,003*	0,285±0,004**	0,108±0,006
2	Налим	0,097±0,003	0,221±0,014*	0,339±0,006*	0,224±0,004
3	Мерланг	0,036±0,003	0,162±0,007***	0,088±0,001	0,065±0,001
4	Султанка	0,157±0,007	0,201±0,031	0,154±0,004**	0,084±0,002
5	Ставрида	0,113±0,005	0,258±0,003***	0,138±0,014	0,104±0,005

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с показателями зимнего периода, ** – осеннего (p < 0,05)

Показано, что для у рыб, ведущих донный и придонно-пелагический образ жизни (морской налим, морской ерш, мерланг), наименьшая активность фермента отмечена в зимний период, наивысшая – в летний. У султанки и ставриды наименьшая активность катепсина Д показана в осенний период, наивысшая – в весенний.

Изменение активности ферментов в течение года может быть связано как с существованием сезонных физиологических ритмов, так и с различным уровнем антропогенной нагрузки в каждый период года. При этом обе группы факторов тесно взаимосвязаны между собой. С одной стороны, с повышением температуры наблюдается интенсификация обменных процессов в организме рыб, подготовка к нересту и нерест. Преднерестовый и нерестовый периоды характеризуются высоким уровнем метаболизма у исследуемых видов. С другой стороны, в связи с повышением температуры наблюдается рост рекреационной нагрузки на прибрежные акватории, что способствует попаданию в организм высоких концентраций ксенобиотиков. Зимой в связи с

падением температуры воды уровень метаболизма у рыб снижен, потребление кислорода и тканевое дыхание гораздо меньше, чем в остальные периоды. Двигательная активность в значительной степени сокращена. Снижается и рекреационная нагрузка на места обитания рыб. В связи с этим активность ферментов в мышечной ткани в данный период года падает.

В связи с вышеизложенным, представляло интерес изучить влияние антропогенной нагрузки на протеолитическую систему рыб и уровень содержания МСММ. Исследования проводили в тканях рыб, выловленных в двух севастопольских бухтах –Мартыновой и Карантинной, подвергающихся разной антропогенной нагрузке: по данным Государственной инспекции по охране Черного моря известно, что бухта Карантинная испытывает больший антропогенный прессинг по сравнению с бухтой Мартыновой. В Карантинной бухте отмечено большее содержание нефтепродуктов, СПАВ, некоторых тяжелых металлов и других загрязняющих веществ.

Показаны изменения в протеолитической активности лизосом рыб, отражающие степень загрязнения акваторий моря. Отмечено, что активация катепсина Д происходит в мышцах морского ерша, налима и смарида, обитающих в Карантинной бухте (Табл.2). Для ставриды показана противоположная тенденция. В случае повышения активности фермента в мышцах рыб, обитающих в Карантинной бухте лизосомальный аппарат клетки, по-видимому, участвует не только в процессах биотрансформации ксенобиотиков, но и в адаптивной перестройке белкового обмена клетки в акваториях с большим уровнем токсических элементов в воде. У ставриды, ведущей активный образ жизни, эти различия выражены в меньшей степени. Если рассмотреть изменение активности фермента в ряду от донных, придонных, придонно-пелагических к пелагическим рыбам, можно видеть, что идет повышение активности фермента у рыб, ведущих активный образ жизни. Также высокий уровень активности катепсина отмечен у морского ерша, который является биомонитором, и отвечает на загрязнение акватории.

Таблица 2. Активность катепсина Д в мышцах черноморских рыб (Е 270 / г ткани/ч)

Объект исследования	Место сбора	
	Бухта Мартынова	Бухта Карантинная
Морской ерш	0,068±0,001*	0,178±0,041
Мерланг	0,059±0,005*	0,121±0,015
Налим	0,084±0,002*	0,105±0,012
Султанка	0,155±0,007	0,128±0,005
Ставрида	0,164±0,011	0,125±0,007

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с показателями зимнего периода, ** – осеннего (p < 0,05)

Активность лизосомальных ферментов может приводить к утилизации белков, поврежденных действием ксенобиотиков. Протеолитический распад таких белков, а также окислительная модификация некоторых белков может сопровождаться образованием в мышцах среднемолекулярных олигопептидов (Табл.3.).

В последние годы исследованию синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ) отводится важная роль. Показано, что эндотоксемия развивается при всех патологических состояниях, связанных с повышенным катаболизмом или блокадой детоксикационных систем организма. В современной отечественной литературе класс среднемолекулярных продуктов протеолиза именуют как молекулы средней массы (МСМ). Химический состав МСМ весьма неоднороден и объединяет гетерогенную группу веществ. Он включает пептиды, гликопептиды, нуклеопептиды, эндорфины, аминоксахара, полиамины, многоатомные спирты, некоторые гуморальные регуляторы – инсулин, глюкагон, некоторые витамины, нуклеотиды, олигосахариды, производные глюкуроновых кислот и другие .

В мышцах рыб из Карантинной бухты показано увеличение уровня среднемолекулярных олигопептидов при всех длинах волн (а также индекса эндогенной интоксикации при длине волны 254 нм), что коррелирует с увеличением активности катепсина Д в данной акватории у морского ерша, налима и смарида. У ставриды при длине волны 254нм отмечается противоположная тенденция. Обнаружено также увеличение уровня среднемолекулярных олигопептидов в ряду от донных к пелагическим видам рыб при длинах волн 272 и 280 нм, тогда как при длине волны 280 нм тенденция обратная. По-видимому, это связано с образованием различных типов молекул средней массы у рыб, принадлежащих к разным экологическим группам.

Таблица 3. Содержание среднемолекулярных олигопептидов в мышечной ткани исследуемых видов рыб (услов. ед., $M \pm m$)

№ (по убыв. ед.; М = 10)					
№	Объект исследования	Длина волны, нм			Σ содержания СМО
		254	272	280	
Бухта Мартынова					
1	Морской ерш	1,027±0,010	0,285±0.006*	0,145±0,004*	1,457
2	Мерланг	1,957±0,008*	0,213±0,006*	0,147±0,005	2,317
3	Налим	0,989±0,010	0,247±0,007*	0,151±0,006	1,387
4	Султанка	0,820±0,013	0,340±0,009	0,201±0,003	1,361
5	Ставрида	0,952±0,024	0,523±0,016*	0,344±0,013	1,819
Бухта Карантинная					
1	Морской ерш	1,500±0,021	0,575±0,009	0,440±0.008	2,465
2	Мерланг	1,113±0.011	0,325±0,008	0,158±0,007	1,596
3	Налим	0,985±0,019	0,352±0,012	0,220±0,012	1,530
4	Султанка	0,846±0,017	0,365±0,009	0,236±0,006	1,447
5	Ставрида	0,853±0,013	0,610±0,009	0,363±0,024	1,826

Примечание: * - достоверность различий содержания СМО в мышцах рыб из Мартыновой бухты по сравнению с Карантинной при $p \leq 0,01$

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, подтверждают участие ферментов лизосом в развитии ответной реакции организма на действие ксенобиотиков различного происхождения, так как известно, что степень воздействия на организм токсикантов зависит от эффективности защитных и восстановительных клеточных механизмов, к которым можно отнести систему внутриклеточного протеолиза. Можно предположить участие катепсина Д и системы образования окисленных форм белков в таких процессах, как адаптация на уровне внутриклеточного метаболизма, обеспечивающих устойчивость организма к изменяющимся факторам внешней среды. Также проведенные исследования подтверждают развитие синдрома эндогенной интоксикации как ответной реакции на воздействие неблагоприятных условий среды.

Выводы

1. Установлены видовые особенности и сезонные вариации активности протеолитического фермента катепсина Д мышечной ткани.
2. Загрязнение морской среды приводит к повышению активности внутриклеточных протеолитических ферментов.
3. Синдром эндогенной интоксикации, выражающийся в повышении уровня молекул средней молекулярной массы, может развиваться как ответ на действие ксенобиотиков морской среды на организм гидробионтов.
4. Изученные параметры можно рекомендовать в качестве биомаркеров для оценки состояния рыб и среды их обитания.

Список литературы

- Жерко Н.В., Егоров В.Н., Гулин С.Б., Малахова Л.В. Полихлорбифенилы в компонентах экосистемы Севастопольской бухты // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зоны и комплексное использование ресурсов шельфа. - Севастополь: ЭКОСИ Гидрофизика, 2001. - С. 28-35.
- Себах Л.К., Панкратова Т.М. Оценка загрязненности Черного и Азовского морей в современных антропогенных условиях // Труды ЮгНИРО. - 1995. - Т. 41. - С. 91-93.
- Руднева И. И., Шевченко Н. Ф., Залевская И. Н., Жерко Н. В. Биомониторинг прибрежных вод Черного моря // Водные ресурсы. – 2005. – Т. 32. - № 2. – С. 238 – 246.
- Моисеенко Т. И. Экоотоксикологический подход к оценке качества вод // Водные ресурсы. – 2005. – Т. 32. - №.2 – С. 184-195.

Немова Н. Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н.Н. Немова, Р.И. Высоцкая. - М.: Наука, 2004. – 215 с.
Немова Н.Н. Свойства и физиологическая роль внутриклеточных протеиназ в тканях рыб / Н.Н. Немова // Усп. совр. биол. - 1991. - Т. III, № 6. - С. 948-954.
Габриэлян Н.И., В. И. Липатова Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лаб. дело. – 1984. – № 3. – С. 138-140.
Дингл Дж. Методы исследования / Дж. Дингл. - М.: Мир, 1980. - 344 с.
Руднева И. И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы у рыб и процессов перекисного окисления липидов / И. И. Руднева // Успехи совр. биологии. – 2003. – Т. 123, № 4. – С. 392-340.
Rudneva I.I. & Petzold-Bradley E. Environmental and security challenges in the Black Sea region // In Environmental conflicts: Implications for Theory and Practice (Petzold-Bradley E., Carius, A., Vince, A., ed). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. - 2001. - P. 189- 02.

КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА–МЕНТЕН КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ, КАК КРИТЕРИЙ АНТРОПОГЕННОГО ВЛИЯНИЯ НА ВНУТРИВИДОВУЮ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЮ ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA*) В РЫБИНСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ

Л.В. Поликарпова, И.Л. Цветков, А.С. Коничев

*Московский государственный областной университет
105005 Москва, ул. Радио, 10а, Россия, ecolab@mgou.ru*

Для анализа состояния водных экосистем в условиях интенсивного антропогенного воздействия важно знать о реагировании гидробионтов на загрязнение среды обитания. Анализ изменений в метаболических процессах и генетическом аппарате в клетках способствует выявлению действия повреждающих факторов среды на организм, углублению представлений о процессах адаптации организмов на молекулярном уровне.

Актуальной задачей современной экологической биохимии гидробионтов является анализ биохимических процессов, обеспечивающих нормальное существование и адаптационные возможности различных организмов в изменяющихся условиях среды [10]. Одновременно, такие исследования существенны для создания комплексной системы мониторинга пригодности различных сред обитания, включая водные экосистемы. Отсюда, в частности, возникает необходимость оценки состояния популяций рыб и особенно их хозяйственно-ценных видов, что обуславливает поиск биохимических показателей, служащих индикаторами физиологического состояния при изменяющихся условиях обитания [11,12]. В связи с этим несомненный интерес представляет исследование константы Михаэлиса кислой фосфатазы, как возможного критерия антропогенного влияния на внутривидовую дифференциацию лещей обитающих в Рыбинском водохранилище.

Константа Михаэлиса (K_m) – один из основных параметров кинетики ферментативных реакций, введенный Л. Михаэлисом (L. Michaelis) и М. Ментен (M. Menten) в 1913 году, характеризует зависимость скорости ферментативного процесса от концентрации субстрата. Согласно теории Михаэлиса–Ментен, первым этапом любого ферментативного процесса является обратимая реакция между ферментом (E) и субстратом (S), приводящая к образованию промежуточного фермент-субстратного комплекса (ES), который затем подвергается практически необратимому расщеплению на продукт реакции (P) и исходный фермент. Скорость ферментативной реакции, т.е. количество субстрата, превращаемое в единицу времени (как правило, в микромолях субстрата, превращенного за 1 мин), зависит как от концентраций фермента (E) и субстрата (S) или продукта (P), так и от сродства фермента к субстрату, а также от максимальной скорости реакции (V_{max}). K_m – так называемая константа Михаэлиса численно равна той концентрации субстрата, при которой активность фермента составляет половину максимальной ($V_{max}/2$). Максимальная скорость реакции достигается при избытке субстрата, т.е. тогда, когда фермент насыщен субстратом.

Для большинства ферментов характерна гиперболическая кривая насыщения субстратом. Скорость реакции зависит только от концентраций субстрата и продукта и гиперболически возрастает с повышением концентрации субстрата, т.е. удовлетворяет условиям соотношения Михаэлиса–Ментен.

Понятно, что при высокой концентрации субстрата взаимодействие его с ферментом более вероятно и потому скорость ферментативной реакции в целом выше, чем при более низкой концентрации. Насколько чувствительно реагирует фермент на изменение концентрации

субстрата, указывает крутизна кривой его насыщения субстратом. Чем круче кривая, тем больше меняется скорость реакции при незначительном сдвиге концентрации субстрата. Из этих рассуждений ясно, что скорость оборота веществ в клетке зависит от их концентрации. Как правило, субстраты ферментов (метаболиты) содержатся в клетке в концентрациях ниже K_m .

В результате наших исследований выявлены отличия, обусловленные молекулярным полиморфизмом кислой фосфатазы (КФ), возникшие вследствие длительной изоляции популяций леща и возникновении внутривидовой дифференциации. Лещи ведут преимущественно оседлый образ жизни и не совершают значительных миграций, что позволило исследовать данный биологический материал с привязкой к конкретным местам обитания, которые отличаются по степени влияния на популяции антропогенных факторов. Внутрипопуляционные адаптации генетически закреплялись в течение смены нескольких поколений. Нами была рассмотрена корреляция этих изменений на практике. Объектом для исследования служили лещи, выловленные траловым методом на 4 станциях Рыбинского водохранилища: Мшичино, Первомайка, Городок, Любец, по 16–21 особи леща на каждой. Для анализа использовали экстракты водорастворимых белков из печени, изъятый из индивидуальных особей. Белки их ткани экстрагировали с пятикратным объемом 0,15M NaCl при 0–2°C. Центрифугировали 30 мин при 6000g и 4°C, супернатант использовали для биохимического анализа.

Активность КФ определяли спектрофотометрически по скорости гидролиза модельного субстрата – p-нитрофенилфосфата в 0,05 M ацетатном буфере с pH 4,0 (оптимальный для КФ печени леща). За единицу активности (Е) принимали количество фермента, дающего прирост содержания продукта ферментативной реакции на 1 мкмоль за 1 мин. K_m определяли по активности КФ с серией концентраций субстрата состоящей из растворов от 0,01 mM до 2 mM. Расчет K_m производили с помощью специально созданного алгоритма в программе MS Excel и выражали в моль/л. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента.

Форма графиков зависимости активности КФ печени леща от концентрации субстрата оказалась весьма близка к классической (рис. 1).

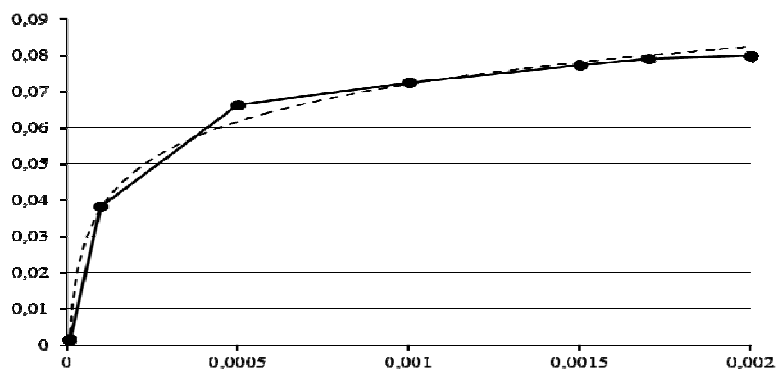


Рис. 1. Зависимость активности КФ печени леща, выловленного на станции Любец Рыбинского водохранилища, от концентрации субстрата (пунктиром показана линия тренда).

С концентрацией субстрата выше 2 mM (не показано) мы выявили некоторую полиномиальную зависимость (не показана), по которой невозможно установить максимальную скорость реакции. По нашему мнению причиной тому является молекулярная гетерогенность КФ из печени леща и наложение на график нескольких кинетических кривых, характерных для разных множественных форм КФ. Дальнейший электрофоретический анализ активности КФ (7,8% полиакриламидный гель, в качестве субстрата использовали α -нафтилфосфат, зоны ферментативной активности окрашивали прочным синим Б) подтвердил наше предположение (рис. 2). КФ печени леща действительно представлена комплексом из 4 множественных форм с разной, но вполне сопоставимой активностью, поэтому в дальнейших экспериментах максимальную скорость реакции мы определяли только для диапазона концентраций от 0,01 до 2 mM.

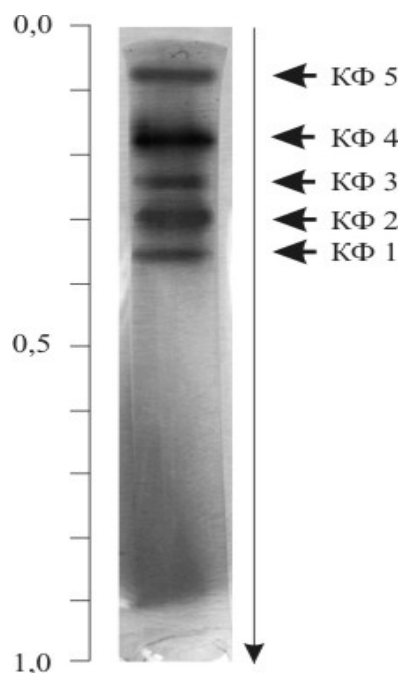


Рис. 2. Электрофореграмма активности комплекса кислых фосфатаз (цифры – относительная электрофоретическая подвижность, стрелка – направление электрофореза от катода к аноду, КФ1–КФ5 – зоны локализации активности кислых фосфатаз).

На разных акваториях Рыбинского водохранилища величины K_m у КФ леща оказались различными (таблица).

Таблица. Величины Константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции, определенные для КФ печени леща из разных акваторий Рыбинского водохранилища

Станции	$K_m \times 10^{-3}$	V_{max} , Е (сред.)	Достоверность отличий			
			Мшичино	Первомайка	Городок	Любец
Мшичино	$0,181 \pm 0,005$	0,091	–	–	+	+
Первомайка	$0,185 \pm 0,013$	0,072	–	–	–	+
Городок	$0,186 \pm 0,005$	0,094	+	–	–	+
Любец	$0,161 \pm 0,003$	0,089	+	+	+	–

Примечание: плюс – различия между значениями K_m для КФ леща, выловленного на соответствующих станциях, достоверны с вероятностью 0,95; минус – различия не достоверны

Для характеристики группового сходства и различий по величине K_m для КФ из печени леща мы провели кластерный анализ по всем индивидуальным значениям K_m , полученным в эксперименте, расчет производили с помощью программы Statistica. Для сравнения аналогичный анализ провели по величинам активности КФ (рассчитана по максимальной скорости гидролиза субстрата концентрацией в диапазоне от 0,01 до 2 мМ), полученные дендрограммы представлены на рисунке 3.

Исходя из величин K_m станции Мшичино и Первомайка отличаются наибольшим сходством. Следующей группой выступает станция Городок, и наиболее сильно отличается станция Любец. Эта кластеризация полностью соответствует ожидаемой, поскольку станция Любец расположена в наиболее загрязненной акватории, и популяции леща, обитающие там, испытывают наибольшее техногенное воздействие. Как следствие – наименьшее из всех выявленных значение K_m , которое свидетельствует о наибольшем сродстве к субстрату, сформировавшемся в результате адаптации к обитанию в условиях токсического загрязнения.

В тоже время кластеризация групп особей леща по величине активности КФ привела к иным результатам, интерпретировать которые не представляется возможным, поскольку никакой явной связи с условиями обитания леща и территориальной удаленностью станций его вылова не обнаруживается. Скорее всего, данный признак не может служить диагностическим для хронической интоксикации и соответственно, показателем для выявления длительного, многолетнего загрязнения акватории.

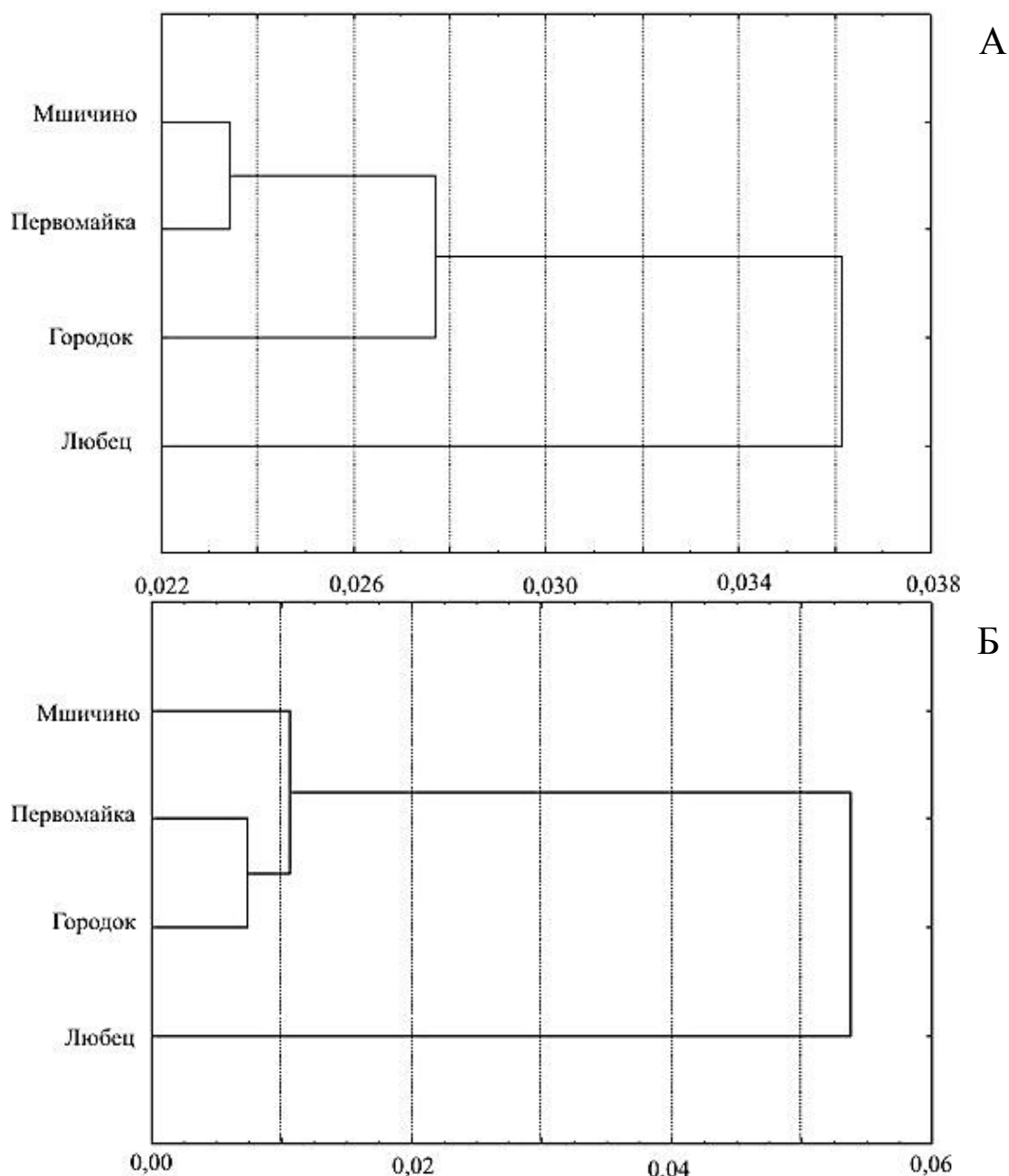


Рис. 3. Дендрограммы групп особей леща из разных акваторий Рыбинского водохранилища, построенные по величинам Km (А) и активности КФ

Согласно многолетним данным ряда авторов, по степени антропогенного загрязнения из исследуемых станций самой неблагоприятной является Любец, а самой чистой Мшичино. В рыбинском водохранилище выделяют четыре основных района(плёса): Волжский, Моложский, Шекснинский и Главный, первые три из которых располагаются по долинам соответствующих рек. Установлено, что воды основных питающих водохранилище рек (Волги, Мологи и Шексны), поступая в водоем замедленного водообмена, продолжительное время сохраняют свои свойства, и лишь в центральной части водохранилища в результате трансформации речных вод формируется новая водная масса, отличная по характеристикам от всех исходных. В результате водные массы различного происхождения отчетливо прослеживаются в водохранилище в течение всего года и занимают в годовом цикле (с некоторыми колебаниями по сезонам) определенные его участки, что обуславливает существенные гидрохимические различия между районами водоема. Многочисленные исследования показали пространственную неравномерность загрязнения Рыбинского водохранилища такими токсикантами, как тяжелые металлы, полиароматические углеводороды, полихлорированные бифенилы, хлорорганические пестициды и др. Установлено, что основным локальным источником химического загрязнения водоема является Череповецкий

индустриальный комплекс, наиболее загрязненным районом – Шекснинский плес, а наиболее чистым – Моложский плес[3]. Таким образом, величина К_т действительно может свидетельствовать о внутривидовом полиморфизме леща в Рыбинском водохранилище. В местах, где К_т у КФ леща имеет наименьшее значение, следует ожидать повышенного загрязнения, причем остающегося таковым на протяжении ряда поколений леща.

Работа выполнена на средства гранта МД1168.2011.4 Президента Российской Федерации для молодых ученых.

Список литературы

- Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. – М.: Наука, 2008. – 284 с.
- Зиньковский О.Г., Потрохов А.С., Евтушенко Н.Ю. Влияние меди и марганца на нуклеазную активность органов и тканей производителей карпа в репродуктивный период // Гидробиол. журн. – 1995. – 31, № 4. – С. 76–82.
- Siddall et al., 1994; Козловская, Герман, 1997; Флеров и др., 2000; Чуйко и др., 2008.
- Морозов А.А., Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Функциональное состояние антиоксидантной системы печени леща (*Abramis brama* L.) из районов Рыбинского водохранилища с различной степенью антропогенной нагрузки // III Всерос. конф. по водной токсикологии, конф. по гидроэкологии и школа-семинар: Объединенные материалы, Борок, 11–16 ноября 2008 г. – Т. 2. – С. 101–105.
- Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. – М.: Наука, 2004. – 216 с.
- Попов А.П., Коничев А.С., Цветков И.Л. Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) // Прикл. биохимия и микробиол. – 2003. – 39, № 5. – С. 518–523.
- Попов А.П., Цветков И.Л., Коничев А.С. Разделение и характеристика дезоксирибонуклеаз гепатопанкреаса живородки речной в норме и при модельной интоксикации *in vivo* // Биохимия. – 2008. – 73, Вып. 8. – С. 1161–1167.
- Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.
- Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У. Активность лизосомальных ферментов в печени окуня из разных зон Онежского озера.// В кн.: Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Изд-во Карел. Науч. центра Ран, 1983. С. 85-95.
- Хочака П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М., 1980. 283 с.
- Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М., 1972. 367 с.

ВЛИЯНИЕ РЯДА ТОКСИКАНТОВ НА ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА КЛЕТОК ВОДОРОСЛЕЙ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ОСЛАБЛЕНИЯ ГУМАТАМИ

М. Н. Саксонов¹, А.Э. Балаян¹, Д.О. Таран¹, О.А. Бархатова²

¹НИИ биологии при ФГБОУ ВПО ИГУ

г. Иркутск, ул. Ленина 3, а/я 24, Россия, root@bio.isu.runnet.ru

²ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1

Гумусовые кислоты (ГК) обладают высоким сродством к полиароматическим углеводородам (ПАУ), что позволяет им контролировать концентрацию свободной формы ПАУ в воде и играть роль детоксикантов по отношению к этому классу соединений. Показано, что основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных комплексов ПАУ-ГК (Гречищева, 2000). Но, возможно, что в процесс детоксикации ПАУ вносит и повышение резистентности к ПАУ тест-объектов гуминовыми веществами. Для проверки такой возможности было выполнено данное исследование.

Микроводоросли являются главными продуцентами в водоемах и своеобразными экологическими мишенями для различных антропогенных загрязнений, часто поступающих в водные экосистемы. Водоросли рекомендованы как один из основных объектов биотестирования (Маторин и др., 1990).

Одним из определяющих критериев выбора методов является возможность их инструментализации. В этом плане особенно привлекательными представляются флуоресцентные методы, отличающиеся высокой чувствительностью, воспроизводимостью и экспрессностью.

Методика определения токсичности воды по изменению уровня флуоресценции хлорофилла клеток водорослей основана на регистрации снижения уровня флуоресценции хлорофилла и снижении численности клеток зеленых протоккоковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* под

воздействием токсических веществ по сравнению с контролем (дехлорированная водопроводная вода) (Методика..., 2007).

Уровень флуоресценции измеряли с помощью анализатора «Флюорат 02-3М».

Снижение уровня флуоресценции хлорофилла водорослей за 72 часа более чем на 20 % указывает на проявляющийся токсический эффект загрязняющих веществ, а критерием острой токсичности является гашение флуоресценции хлорофилла водорослей на 50 % и более, по сравнению с контролем.

Токсикологический эффект ПАУ оценивали как относительное уменьшение тест-отклика в присутствии ПАУ по сравнению с тест откликом в контрольном растворе:

$$T = \frac{I_k - I_o}{I_o} \cdot 100\%,$$

где I_k , I_o - интенсивность флуоресценции в условных единицах в контроле и опыте соответственно. Симуляцию (противоположная угнетению реакция тест-объектов на воздействие токсикантов) до уровня 30% по сравнению с контролем считают как нетоксичное действие испытуемых растворов на тест-объект.

Водные растворы ПАУ готовили из стандартных образцов антрацена, бенз(а)пирена и нафталина в ацетонитриле. Гумат *Powhumus* (Германия) в исследуемых концентрациях хорошо растворим в воде.

Было определено токсическое действие ПАУ на изменение уровня флуоресценции хлорофилла водорослей и найдены концентрации LC_{50} , вызывающие гашение флуоресценции хлорофилла в 2 раза по сравнению с контролем (таблица 1).

Таблица 1. Изменение уровня флуоресценции хлорофилла клеток водорослей при действии воды, содержащей ПАУ и нитробензол (процентное отклонение от контроля)

Токсикант	Концентрация токсиканта, мкг/дм ³				LC_{50} , мкг/дм ³
	5	10	20	40	
антрацен	39,8	53,2	62,0	-	8,9
3,4 бенз(а)пирен	44,3	73,3	96,5	-	5,8
нафталин	29,2	34,3	51,2	76,5	17,8

Определена токсичность смесей ПАУ в концентрациях, оказывающих острое токсическое действие на водоросли и гумата в концентрациях нетоксичных для тест-объекта. Показано значительное снижение токсического действия гуматом бенз(а)пирена, антрацена и нафталина для водорослей (таблица 2).

Таблица 2. Влияние полиароматических углеводов и нитробензола на уровень флуоресценции хлорофилла клеток водорослей в присутствии гумата (процентное отклонение от контроля)

Токсикант	Концентрация, мкг/дм ³	Вода	Гумат, мг/дм ³		
			5	10	50
без токсиканта	-	-	10,5	7,3	-5,6
антрацен	20	60,2	34,6	18,2	1,6
бенз(а)пирен	10	73,3	38,3	23,9	9,7
нафталин	20	51,2	30,7	12,7	-5,3

Для проверки гипотезы культуру водорослей инкубировали в течение 24 часов в растворе гумата, затем центрифугировали, отмывали питательной средой для культивирования водорослей и проводили биотестирование растворов ПАУ по изменению уровня флуоресценции хлорофилла клеток водорослей, предварительно обработанных раствором гумата (таблица 3)

Обнаружена достаточно высокая степень ослабления токсического действия на водоросли по гашению флуоресценции хлорофилла после предварительной обработки тест-объекта гуматом, т.е. в отсутствии прямого контакта ПАУ с гуматом. Следует отметить, что при предварительной обработке культуры водорослей в растворе гумата были использованы более высокие концентрации гумата, чем в смесях ПАУ и гумата.

Таблица 3. Влияние полиароматических углеводородов и нитробензола на уровень флуоресценции хлорофилла клеток водорослей, предварительно инкубированных в растворах гумата (процентное отклонение от контроля)

Токсикант	Концентрация, мкг/дм ³	Предварительная обработка гуматом, мг/дм ³		
		без обработки	50	100
без токсиканта	-	-	-10,1	-22,5
антрацен	20	60,2	23,2	9,8
бенз(а)пирен	10	73,3	26,2	10,3
нафталин	20	51,2	33,0	17,7

Можно сказать, что гуматы увеличивают устойчивость клеток водорослей к действию ПАУ, по крайней мере, по исследуемому параметру.

Список литературы

Гричищева Н.Ю. Взаимодействие гумусовых кислот с полиядерными ароматическими углеводородами: химические и токсикологические аспекты // Автореферат диссерт. на соискание учен. степени к.х.н. – М., 2000 – 21 с.
 Маторин Д.Н. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона / Д.Н. Маторин, П.С. Венедиктов // Итоги науки и техн. ВИНТИ. Сер. Биофизика, 1990. – Т.40. – С. 49-100.
 Методика определения токсичности воды, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей // ФР.1.39.2007.03223. М.: АКВАРОС, 2007. 48 с.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ДАФНИЯМИ КАК БИОМАРКЕР КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ

С.В.Сладкова, С.В. Холодкевич

*Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН,
 Санкт-Петербург, Корпусная, 18, Россия, sladkova_sv1@mail.ru*

Введение. Для оценки качества водной среды в настоящее время широко используются методы биоиндикации и биотестирования. Пристальное внимание уделяется разработке и развитию биологических экспресс-методов оценки химической опасности подвергающихся антропогенной нагрузке природных и биологически очищенных сточных вод. С этой точки зрения наиболее перспективным представляется биомаркерный подход, который применяется в экотоксикологии с начала 1990х годов. При этом под биомаркером подразумевается - «биологическая реакция на воздействие химических веществ». В настоящее время термин биомаркер определен и уточнен многими исследователями (Depledge et al, 1995), которые предлагают использовать в качестве биомаркеров ряд биохимических, клеточных, физиологических и поведенческих реакций. Использование физиологических и поведенческих биомаркеров при оценке качества воды, как показывает опыт, позволяет наиболее оперативно получать необходимую информацию о степени влияния на живой организм изменений качества среды их обитания. Как известно, любое химическое соединение, в том числе и вредное, первоначально вызывает в организме целый ряд реакций на молекулярном уровне, которые влекут за собой изменения структуры и функций клеточных органелл. Субклеточные и клеточные нарушения, в свою очередь, отражаются на физиологическом статусе организма. (Моисеенко, 2009). Уровень энергетического обмена интегрирует в себе скорость обменных процессов на молекулярном уровне и поэтому в наибольшей степени характеризует физиологическое (функциональное) состояние организма. Энергетический статус аэробных организмов можно косвенно оценивать по потреблению кислорода. Многие исследователи (Колупаев, 1992; Martins J.C. et al, 2007) рекомендуют основывать биоконтроль токсичности воды на изменении интенсивности дыхания гидробионтов, используемых в качестве тест-организмов. Однако имеется некоторая неоднозначность существующих литературных данных относительно направленности изменений аэробного энергообмена гидробионтов в токсических средах. Поэтому для использования этого показателя в качестве биомаркера необходимо определить оптимальные условия его применения.

В качестве тест-объекта, с точки зрения минимизации времени контроля, лучше выбирать гидробионтов с высокой степенью оксифильности, т.е. представителей зоопланктона или рыб. Традиционный тест-объект водной токсикологии *Daphnia magna* - наиболее часто используемый в

качестве стандартного биоиндикаторного организма вид как в эко-токсикологических, так и общебиологических исследованиях.

Целью работы являлось изучение динамики аэробного дыхания дафний в нормальной и токсической средах на основе измерения интенсивности их потребления кислорода. В задачи исследования входило также изучение особенностей использования этого биомаркера для оценки качества водной среды.

Материал и методы. Исследования проводились на лабораторной партеногенетической культуре *Daphnia magna* Strauss которая культивируется в лаборатории в контролируемых условиях. Непосредственно перед началом экспериментов осуществляли предварительный контрольный тест по определению чувствительности используемой культуры к референтному токсиканту, в качестве которого использовался бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$), для которого в интервале концентраций 0.6–2.1 мг/л проводили оценку острой токсичности в течение 24 часов. В экспериментах использовались 7-10 суточные дафнии.

В качестве модельных токсикантов были выбраны растворы сернокислых солей эссенциальных металлов меди ($CuSO_4$) и цинка ($ZnSO_4$) сублетальных и летальных концентраций (от 0.01 мг/л до 1 мг/л по ионам Cu^{2+} и Zn^{2+}). Исследовалась интенсивность потребления кислорода рачками в зависимости от концентрации ионов меди и времени воздействия (1ч, 3ч), а также выживаемость рачков в этих токсических растворах на протяжении 96 часов. В качестве контрольной воды использовали культивационную (аквариумную) воду. Исходная концентрация растворенного кислорода: более 8 мг/л, достигалась предварительной аэрацией воды с помощью микрокомпрессора. Эксперименты проводили при температуре 21°C и естественной освещенности в марте месяце.

Для измерения интенсивности потребления кислорода дафнии помещались в открытые сосуды с исследуемой средой емкостью 2,5 мл на 1 час, после чего туда помещался полярографический электрод Кларка кислородомера АЖА-101, сосуды герметично закрывали и в течение 15 минут ежеминутно проводили измерения концентрации растворенного кислорода. Мешалка в сосуды не помещалась, во избежание травмирования дафний, постоянное характерное движение которых обеспечивало достаточное перемешивание. Интенсивность потребления кислорода дафниями определяли на линейных участках кинетических кривых по формуле:

$$Q = \frac{(C_1 - C_2)V}{(t_1 - t_2)W}, \text{ где}$$

Q – скорость потребления кислорода (мгO₂/г·мин)

t – время (мин)

C – концентрация кислорода мг/л в среде в момент времени t

V – объем сосуда (л),

W – масса дафний (г).

Дафнии взвешивались на торсионных весах после проведения эксперимента. После каждого опыта оценивали потребление кислорода присутствующими в воде микроорганизмами по аналогичной процедуре. Измерения показали, что во всех случаях оно не превышало 3% потребления кислорода дафниями.

Результаты и обсуждение. На рисунке 1 показаны типичные кривые, получаемые в эксперименте, величина угла наклона которых характеризует скорость снижения концентрации кислорода в сосуде с дафниями в контрольной среде и в токсическом растворе 1 мг/л Cu^{2+} . Видно, что в течение 20-минутной записи угол наклона кривой в контрольной среде не изменяется и падение кислорода в среде, не превышает 15%, что свидетельствует в пользу того, что дафнии не испытывают гипоксии, поскольку не изменяют скорости потребления кислорода, изменение которой является одним из механизмов адаптации гидробионтов к гипоксическим условиям (Сладкова и др., 2006).

Получено, что скорость потребления кислорода дафниями в контроле составляет 0.93 ± 0.05 мгO₂/г·ч (n=50). В токсических растворах с концентрацией 0.01 мг/л не обнаружено достоверных изменений интенсивности потребления кислорода дафниями. При концентрации 0.1 мг/л ионов меди происходит снижение скорости потребления кислорода приблизительно на 30% после часового воздействия. Такая же концентрация ионов цинка приводит к снижению интенсивности дыхания только на 15%.



Рис.1. Скорость падения кислорода в сосуде с дафниями после часового воздействия (сплошная линия- контрольная среда, пунктир- токсический раствор меди в концентрации 1мг/л Cu^{2+} .)

Дальнейшее увеличение экспозиции в растворах указанной концентрации приводит к тому, что уровень потребления кислорода увеличивается, достигая контрольной величины, и даже несколько превосходит ее (см. табл.1). Увеличение концентрации ионов обоих металлов до 1мг/л вызывает снижение интенсивности аэробного дыхания в первый час воздействия примерно на 30%. При продолжении воздействия наблюдается его дальнейшее устойчивое снижение, что в конечном итоге приводит к гибели рачков. Причем токсическое воздействие такой высокой концентрации ионов металла, в особенности меди, проявляется также в отклонении получаемых кривых от линейной зависимости на протяжении 20 минут регистрации. (Коэффициент корреляции получаемых кривых равен в среднем 0,7, тогда как при других концентрациях и в контроле он лежит в диапазоне 0.91-0.99).

Таблица. Выживаемость и интенсивность потребления кислорода дафниями в растворах меди и цинка.

№	Токсические растворы мг/л	Выживаемость час	Интенсивность потребления кислорода, %	
			1 час	3 час
1	0.01 Cu^{2+}	Более 96	98	103
2	0.1 Cu^{2+}	24	70*	115*
3	1 Cu^{2+}	1.8±0.3	68*	50**
4	0.01 Zn^{2+}	Более 96	100	102
5	0.1 Zn^{2+}	48	85*	105
6	1 Zn^{2+}	10	70*	60
7	контроль	Более 96 часов	100	100

*- достоверные отличия от контроля. Достоверность различий между контролем и опытом определялась по критерию Стьюдента. **- измерение проводилось через 1.5 часа воздействия.

Классический эксперимент на острую токсичность по выживаемости дафний показал, что только растворы с концентрацией 0.01 мг/л по иону металла не оказывают острого токсического действия. Воздействие всех остальных изученных концентраций ионов металлов приводит к гибели рачков в течение 96 часов, однако стоит отметить, что время жизни рачков в различных растворах разное (см. табл.). Полученные результаты и их сопоставление позволяет сделать несколько предположений о токсическом действии изученных растворов металлов.

Токсический эффект таких тяжелых металлов, как медь и цинк проявляется в подавлении интенсивности потребления кислорода после первого часа воздействия, причем ионы меди оказывают более сильное токсическое действие, чем ионы цинка. Примечательно, что не получено простой пропорциональной зависимости уменьшения скорости аэробного дыхания от концентрации токсического агента. Получаемый токсический эффект при увеличении времени экспозиции зависит от концентрации токсиканта. Так, при предельно высоких концентрациях токсиканта, при которых летальный исход наблюдается уже через несколько часов после начала воздействия, интенсивность аэробного газообмена продолжает падать, а разброс значений от среднего возрастает, что свидетельствует как о нарушении регуляции дыхания, так и о глубоких

физиологических нарушениях. Уменьшение интенсивности дыхания в 2 раза по сравнению с контролем является индикацией наступления предела адаптивной энергии и заканчивается летальным исходом, что особенно четко прослеживается в растворах с медью. При меньших концентрациях тяжелых металлов в растворах наблюдаемое после одного часа воздействия снижение активности дыхания уже через 3 часа воздействия нивелируется и достигает уровня, достоверно превышающего потребление кислорода в контрольной среде. Известно, что способность повышать энергетический обмен в стрессовых условиях, каковым является и токсическое воздействие, выработана у животных в процессе эволюции и является важнейшей их преадаптацией к изменению условий среды (Бигон и др., 1989). Не останавливаясь подробно на механизмах прямого действия тяжелых металлов на организм, стоит отметить, что они нарушают адекватное снабжение кислородом его органов и тканей (Колупаев 1992; Spicer and Weber.1991), и эти нарушения отражаются в уменьшении интенсивности потребления кислорода. Дальнейшая экспозиция приводит к «включению» механизмов детоксикации, что сопряжено с повышением энергетических затрат и результатом этих механизмов компенсации в дальнейшем может быть либо адаптация, либо полное истощение и гибель. Последнее и наблюдается в экспериментах с концентрацией ионов металла 0.1 мг/л.

Из вышеизложенного следует, что при использовании скорости дыхания дафний в качестве биомаркера принципиальным моментом является выбор времени регистрации. Нам представляется оптимальным регистрация интенсивности потребления кислорода дафниями в районе часового диапазона, когда собственно токсический эффект уже присутствует, а механизмы компенсации еще недостаточно развились. Возможно, также будет информативна регистрация скорости дыхания в первые минуты действия токсиканта, на стадии сигнальной реакции на стрессорное воздействие.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что интенсивность потребления кислорода дафниями является полезным биомаркером и может быть использована в биологических системах раннего обнаружения опасных уровней загрязнения водной среды.

Список литературы

- Бигон М., Хартер Дж., Таунсенд Дж. Экология: Особи, популяции и сообщества. Москва, Мир, 1989. Т.1 667С. Т.2 447С.
- Колупаев, Б.И. Дыхание гидробионтов в токсичной среде. Казань: КГУ, 1992. 127С.
- Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология. Теоретические и прикладные аспекты. Москва, Наука, 2009. 400С.
- Сладкова С.В., Федотов В.П., Холодkevич С.В. Компенсаторные возможности сердечно-сосудистой системы раков в условиях прогрессирующей гипоксии. Ж.эвол.биохим. и физиол. 2006. Т. 42, №1. С.49-56.
- Depledge M.N., Aagard A., Gyorkosb P. Assesment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. Marin Pollution Bulletin, V 31, №1-3, 1995, P 19-27.
- Martin J.S., Saker M.L., Teles L.F., Vasconcelos V.M. Oxygen consumption by *Daphnia magna* Strauss as a marker of chemical stress in the aquatic environment. Environ.Toxicol.Chem.2007, V26, №9, P. 1987-1991.
- Spicer J.I., Weber R.E. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. Comp.Biochem.Physiol.C. 1991, V100, №3, P 339-342.

ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РЯСКУ МАЛУЮ ПРИ ИХ ИНФИЛЬТРАЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ

М.А. Субботин, Ю.С. Григорьев

Сибирский федеральный университет

г. Красноярск, пр. Свободный 79, 660041, Россия, submih@rambler.ru

При биотестировании токсичности вод часто используется представитель высшей водной растительности – ряска малая (*Lemna minor* L.) в виду своей неприхотливости в уходе и относительно высокой скорости вегетативного размножения. Ряска обладает быстрой изменчивостью морфологических признаков и позволяет на этой основе получать качественную оценку токсичности воды.

При работе с ряской используется также ряд экспрессных методов оценки негативного воздействия на растение. К ним относятся оценка ингибирующего воздействия на фототаксис хлоропластов, анализ количества живых и мертвых клеток методом витального окрашивания красителями, а также флуоресцентные методы.

Методологический подход с использованием флуоресцентных методов позволяет наблюдать за объектом *in vivo* и количественно оценить состояние растений (Гольд и др., 1984). Источником оперативной информации о характере функционирования фотосинтетического аппарата при токсическом воздействии является процесс замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла (Маторин и др., 1995, Григорьев, Власова, 2009).

Водные растения, обитающие на поверхности воды, имеют много воздухоносных полостей, обеспечивающих плавучесть организма. Эти полости могут затруднять передвижение веществ по апопласту от нижних клеток, соприкасающихся с водной средой, к паренхимным клеткам мезофилла. Можно предположить, что заполнение воздушных полостей водной средой позволит быстрее токсикантам достигать всех клеток растения, а апопластный транспорт будет создавать высокую концентрацию токсикантов во внутренних полостях. Поэтому целью данной работы было изучить действие ионов тяжелых металлов на ряску малую в условиях инфильтрации тест-объекта.

Культура ряски выращивалась на среде Штейнберга в климатостате В-2, в котором поддерживалась постоянная температура 21-22 °С и обеспечивалось круглосуточное освещение люминесцентными лампами интенсивностью 3500-4000 люкс. В маточной культуре, как и в токсикологическом эксперименте, стерильность не поддерживалась. В качестве модельных токсикантов выступали ионы меди, кадмия и цинка добавляемые в 2% питательную среду Штейнберга в виде сульфатов.

Для изучения влияния ионов тяжелых металлов на ЗФ в условиях заполнения межклетников средой использовали процедуру вакуум-инфильтрации растительного объекта, путем погружения растений в раствор и разряжения воздуха. Экспозиция растений с ионами металлов проводилась при температуре 27-28 °С в течение 24 часов после инфильтрации. Замедленную флуоресценцию ряски регистрировали на флуориметре Фотон 10, разработанном в СФУ.

Наиболее показательные результаты усиления токсического действия ионов тяжелых металлов после инфильтрации тест-объекта наблюдались при воздействии ионов меди (рис. 1.). Без инфильтрации растений ряски снижение замедленной флуоресценции (ЗФ), наблюдалось при концентрации ионов меди в среде от 0.032 мг/л и выше. При этом действие ионов меди на ЗФ возбуждаемой светом высокой интенсивности (ЗФв), выражено в большей степени, чем ЗФ возбуждаемой светом низкой интенсивности (ЗФн).

При инфильтрационном введении ионов меди в межклетники ряски отмечалось более сильное воздействие на фотосинтетический аппарат, что выражалось в подавлении интенсивности послесвечения даже в минимальной исследованной концентрации ионов металла (от 0,008 мг/л). Таким образом, инфильтрация тест-объекта средой с ионами меди способствовало большему проникновению металла внутрь растения.

Сравнение морфологических изменений в обоих опытах после 24-часовой экспозиции показало, что при инфильтрации объекта раствором данного тяжелого металла (ТМ) действие на розетки ряски отмечалось при более низкой концентрации (0.032 мг/л), чем при обычных условиях экспозиции тест-объекта (0.063-0.125 мг/л).

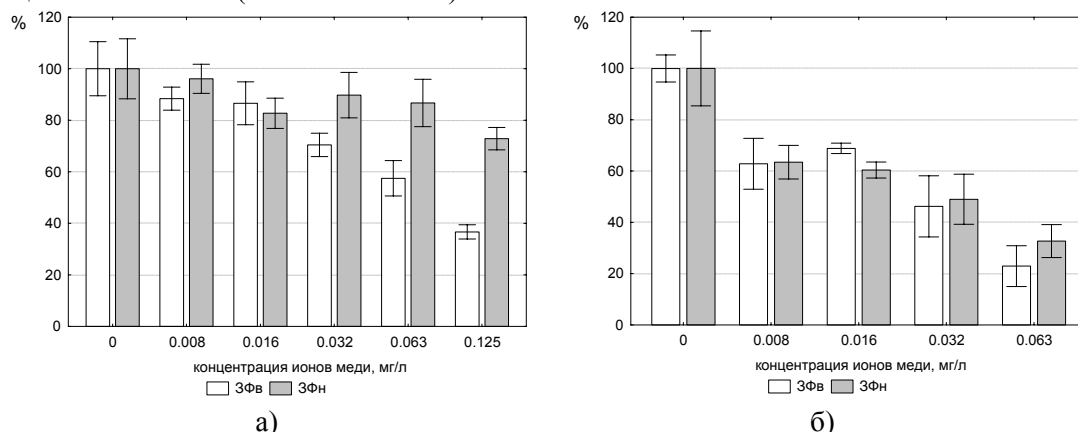


Рис. 1. Действие ионов меди на показатели замедленной флуоресценции ряски малой.
а) обычные условия экспозиции; б) при инфильтрации тест-объекта.

Таким образом, эти опыты показали, что в сравнении с морфологическими признаками проявления токсического воздействия ионов меди замедленная флуоресценция хлорофилла

является более чувствительным показателем. При этом после инфильтрационного введения ионов меди наблюдается более выраженный токсический эффект данного ТМ на показатели ЗФ ряски.

При изучении действия ионов кадмия при суточной экспозиции было отмечено, что их воздействию в большей степени проявляется в снижении ЗФв (рис. 2.). Интенсивность ЗФн в этих условиях была достоверно ниже контрольных значений, однако мало изменялась с увеличением концентрации металла. При инфильтрации тест-объекта средой с ионами кадмия наблюдалось более сильное подавление интенсивности ЗФ даже в минимальных исследованных концентрациях, по сравнению с опытами без инфильтрации. После инфильтрации ионы кадмия вызывали более равномерное снижение обоих показателей ЗФ.

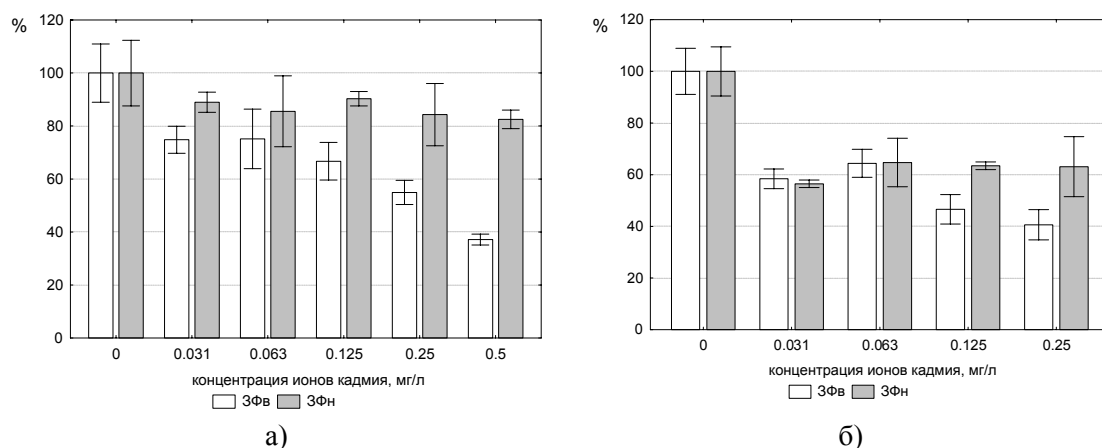


Рис. 2. Действие ионов кадмия на показатели замедленной флуоресценции ряски малой а) обычные условия экспозиции; б) при инфильтрации тест-объекта.

Сравнение морфологических изменений розеток после суточной экспозиции с ионами кадмия показало, что при инфильтрации наблюдалось разделение листочков уже при концентрации 0.031 мг/л, в то время как в обычных условиях этот эффект наблюдался только при содержании металла в среде свыше 0.125 мг/л.

Следовательно, при оценке токсического воздействия ионов кадмия на ряску среди двух использованных методов более чувствительным является ЗФ хлорофилла.

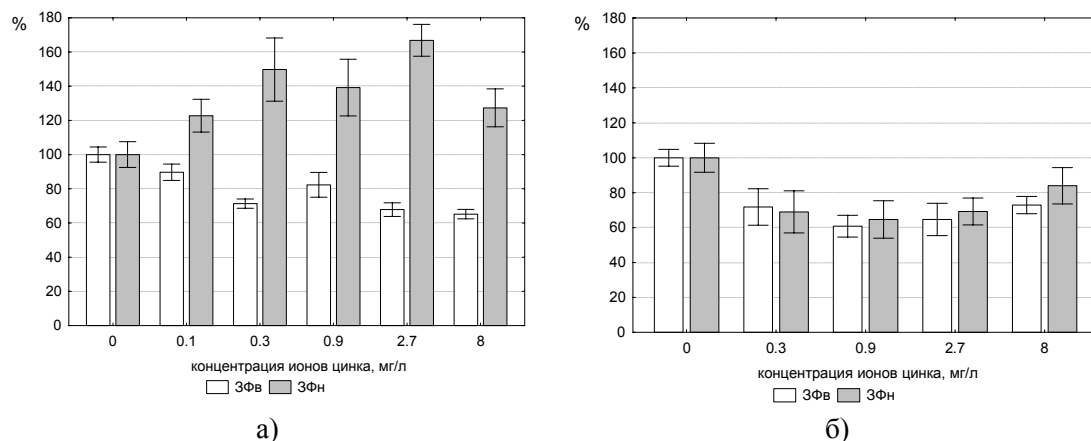


Рис. 3. Действие ионов цинка на показатели замедленной флуоресценции ряски малой. а) обычные условия экспозиции; б) при инфильтрации тест-объекта.

Действие ионов цинка на интенсивность ЗФ показано на рисунке 3. При обычных условиях экспонирования отмечались значительное снижение ЗФв при концентрациях от 0.3 мг/л и выше по сравнению с контролем. В этих условиях интенсивность ЗФн существенно увеличивалась при всех исследованных концентрациях металла. После инфильтрационного введения ионов цинка в межклетники ряски отмечалось сильное подавление как ЗФв, так и ЗФн во всех концентрациях ионов в среде.

Регистрация морфологических параметров розеток ряски после 24 часовой экспозиции с ионами цинка показали, что в обычных условиях эксперимента цинк не оказывал значительное

действие на ряску малую, в то время как при инфильтрационном введении металла отмечалось значительное влияние на целостность розеток при всех исследованных концентрациях.

Таким образом, инфильтрационное введение токсиканта в межклетники водного растения способствует проявлению их большей токсичности на ряску малую, возможно, за счет лучшего проникновения в растительные клетки. Токсическое действие малых концентраций ионов тяжелых металлов можно обнаружить с помощью регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла уже после суточной экспозиции с токсикантами.

Список литературы

- Гольд В.М. и др. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла. Учебное пособие. / В.М. Гольд, Н.А. Гаевский, Ю.С. Григорьев, А.В. Гехман. Красноярск: Изд-во КрасГУ, 1984. 84 с.
- Григорьев Ю.С., Власова Е.С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer), Москва, 2009, 43 с., ПНД Ф Т 14.1:2.4.16-09 16.1:2.3:3.14-09, ФР.1.31.2009.06642
- Маторин Д.Н. и др. Применение метода регистрации замедленной флуоресценции для биотестирования загрязненности природных вод гербицидами и фитотоксичными веществами // Д.Н. Маторин, П.С. Венедиктов, В.С. Маренков, И.В. Попов. Водные ресурсы, 1995. Т. 22. №2.

ВЛИЯНИЕ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ НА МИТОЗ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS*) И ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA*)

М.Г. Таликина, В.В. Крылов

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

Магнитные бури – один из древнейших экологических факторов на Земле. Их воздействие на живой организм привлекало и привлекает внимание исследователей, о чем свидетельствует обширнейшая библиография о их связи с различными физическими, биологическими и социальными явлениями (Хлыстов, 2004). Однако экспериментальное изучение влияния этого фактора на биологические системы на фоне синхронного контроля довольно сложная задача.

Как показали первые опыты на плотве, действие сигнала типичной естественной магнитной бури, воспроизведённой в направлении *H*-компоненты, в течение суток и более на начальные этапы эмбриогенеза приводило к очевидным биологическим эффектам, проявившимся в снижении размерно-массовых показателей сеголеток и изменении их позвоночного фенотипа (Крылов и др., 2010).

К числу наиболее важных аспектов в изучении любого экологического фактора, особенно в экстремальном его проявлении, следует отнести выяснение характера его влияния на наследственные структуры организма. Задача настоящей работы состояла в выяснении специфики действия типичной магнитной бури (МБ) на пролиферативный статус бластоцитов и определении уровня хромосомных aberrаций в процессе митотического деления у плотвы и леща.

Материал и методы исследования. Материалом служили две партии осемененной икры плотвы, каждая из которых была получена от двух пар разных производителей, и одной партии осемененной икры леща. Воспроизведение МБ проводилось в экспериментальной установке, состоящей из: трёхкомпонентного феррозондового магнитометра, регистрирующего локальное низкочастотное магнитное поле и его вариации; модуля генерации-компенсации трёх компонент магнитного поля; модулей цифро-аналогового и аналого-цифрового преобразования сигналов и компьютера со специальным программным обеспечением. Описание сигнала МБ, использованного в экспериментах, приведено в статье Крылова с соавт. (2010). Опыты проводили во время спокойной геомагнитной обстановки. Кристаллизаторы с развивающейся икрой экспонировали в МБ от оплодотворения икры до начала органогенеза, что составило 27- 29 ч. Контрольные образцы находились в условиях естественного магнитного поля.

По окончании экспозиции эмбрионы плотвы и леща фиксировали в смеси Серра. Цитогенетический анализ проводили на тотальных давленных препаратах, окрашенных ацетоорсеином (Методы биологии развития, 1974). Учитывали: общее число просматриваемых клеток, клетки с нормой развития и клетки с отклонениями по отдельным стадиям митоза - метафазы, анафазы и телофазы. Критериями нарушений были хромосомные и хроматидные мосты

и полумосты, отставание хромосом при расхождении к полюсам и наличие их фрагментов в цитоплазме (Алов, 1972). Для анализа использовали не менее 10 зародышей. Показателем активности размножения эмбриональных клеток служил митотический индекс (общее число делящихся клеток в ‰), в процентах от этого показателя выражали суммарную долю аберрантных анафаз и телофаз.

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные таблице, свидетельствуют, что при выбранном режиме МБ, происходит значительная стимуляция пролиферативной активности зародышевых клеток. Характерно, что у обоих видов возрастание митотического индекса, по сравнению с контролем, составляет примерно равные величины – у плотвы в 1.7, а у леща – в 1.8 раза. В отношении хромосомных аберраций достоверных изменений ни в одной из опытных групп не выявлено.

Таблица. Действие МБ на некоторые показатели митотического деления бластоцитов плотвы и леща

Показатели	Плотва				Лещ	
	Партия 1		Партия 2		Контроль	МБ
	Контроль	МБ	Контроль	МБ		
Все бластоциты	12 525	13 050	13 000	4 390	4 200	5 910
Все митозы	157	289	173	100	82	214
Митотический индекс (МИ), ‰	12.5±0.6	22.1±2.9*	13.3±1.1	22.8±1.9*	19.5±4.1	36.2±2.5*
Митозы, в % от МИ:						
нормальные	94.8±3.3	90.0±2.4	92.3±2.6	93.2±3.5	88.9±3.0	90.2±3.5
аберрантные	5.2±3.3	9.9±2.4	7.7±2.6	6.8±3.5	11.0±3.0	9.8_3.5

Примечание.*- различия статистически значимы.

Митоз – генетически детерминированный процесс, основная задача которого равное распределение наследственного материала и субклеточных структур в две образующиеся дочерние клетки, нарушение его чревато несбалансированными хромосомными наборами и онтогенетическими нарушениями на разных уровнях структурной организации организма (Ильинских, 1992).

Результаты выполненного нами цитогенетического анализа не выявили статистически значимых нарушений эмбриональных митозов при действии МБ, однако достоверный биологический отклик, проявившийся в значительном увеличении делящихся бластомеров, указывает на чувствительность к нему определенных клеточных структур.

Известно, что переход клетки к делению обеспечивается так называемым «фактором, стимулирующим митоз», который синтезируется в цитоплазме в течение интерфазы. Установлена биохимическая структура входящих в него компонентов, включающая циклин, зависимость от циклина неактивную протеинкиназу и активный фактор стимуляции митоза, инициирование каждой из этой триады сопряжено с той или иной фазой митоза (Ченцов, 2004).

Эти данные наводят на мысль, что тестируемый нами экологический фактор оказал, по всей видимости, потенцированное влияние на работу этой системы в целом (или на отдельные ее звенья), либо сыграл определенную триггерную роль через специфические рецепторы клеточной мембраны, обусловившую активизацию процесса пролиферации бластных клеток плотвы и леща. Механизм выявленного биологического эффекта МБ остается не вполне ясным и нуждается в дополнительном изучении с помощью методов молекулярной биологии.

Список литературы

- Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 263 с.
 Ильинских И.Н. 1992. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Наука, 272 с.
 Крылов В.В., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г. и др. 2010. Действие типичной магнитной бури на ранний онтогенез плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биология внутренних вод. № 4. С. 67-70.
 Методы биологии развития. 1974. М.: Наука, 619 с.
 Хлыстов А. Эхо магнитных бурь. 2004 // Техника молодежи. № 1. С. 56-59.

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА И АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ У ОЛИГОХЕТ *TUBIFEX TUBIFEX* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РТУТЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В КОРМЕ

Г.А..Урванцева, Е.Л. Грачева ,А.М. Гоголева ,И.А. Берко

ЯрГУ им. П.Г. Демидова 150057, Ярославль, проезд Матросова 9, Россия, 6652553@mail.ru

В настоящее время тяжелые металлы являются одним из наиболее распространенных компонентов воздействия на гидросферу. При попадании в природные среды в результате антропогенной деятельности, они начинают мигрировать и при определенных биогеохимических условиях и концентрациях начинают оказывать токсическое воздействие на живые организмы. По степени токсического воздействия на живой организм ртуть занимает ведущее место в ряду тяжелых металлов. Соединения ртути принадлежат к первому классу опасности. ПДК ртути в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового использования составляет 0.0005 мг/л (Лапердина, 2000г). Поступая в атмосферу в результате выбросов промышленных предприятий, деятельность которых направлена на хлорирование органических веществ, либо сжигание органического топлива соединения ртути мигрируют и трансформируются. По нашему мнению наибольший интерес в этом цикле представляет метилирование ртути, происходящее в водоемах при участии живых организмов. При этом образуются наиболее токсичные органические соединения ртути (метил-, этил-, фенилртуть), которые имеют высокое сродство к тканям организма и выраженный кумулятивный эффект, в том числе и по трофическим сетям. Работы, посвященные изучению токсичности ртутьорганических соединений, проводятся на млекопитающих, птицах(Лапердина,2000г) и рыбах(Немова, 2010г), с недавнего времени – на беспозвоночных(Медведев,2006г; Томилина 2010г; Урванцева 2004г). Учитывая, что в настоящее время биохимический аспект влияния токсикантов на водные организмы приобретает все больший интерес, возникает необходимость исследовать множественные реакции, протекающие на молекулярном и клеточно-тканевом уровнях(Мур, 1987г) в ответ на токсическое действие ртути. Материалом для проведения исследования служили олигохеты *Tubifex tubifex*, взятые из естественного водоема и содержащиеся в лабораторных условиях. В качестве корма использовали фарш из мышечной ткани рыб. Корм олигохетам давали раз в два дня. Культуре с высоким содержанием ртутьорганических соединений давали по 2 мг фарша, содержащего 0.452 мг ртути на 1 кг сырой массы, а с низким – 0.097 мг ртути на 1 кг сырой массы. В культуре была сформирована следующая трофическая цепь: мышечная ткань рыб → бактерии → олигохеты. Пробы для анализа отбирались перед первым кормлением (контрольная группа) и через 24, 48, 72, 120 часов после него. Экстракты из тел животных получали в процессе гомогенизации образцов и последующим их центрифугированием. Анализ ртути проводили методом атомной абсорбции холодного пара с использованием резонансной линии 237.7 нм на анализаторе ртути Юлия-5К (НПО “Метрология”, Казань). Изменения белкового состава у олигохет *T.tubifex* под влиянием ртутьорганических соединений отслеживали при помощи метода электрофореза в ПААГе. Суммарную активность кислой фосфатазы определяли с помощью спектрофотометра СФ-16. В контроле было обнаружено 6 белковых фракций. При кормлении исходной культуры(контроль), предварительно разделенной на две группы, рыбным фаршем с высоким и низким содержанием ртути наблюдалось постепенное изменение белкового спектра. В опытной группе №1 наблюдалось временное ослабление исходных фракций (Рис. 1, фракция № 3, 4, 6, 7, 9, 10). Однако для фракций № 3, 7 и 9, которые ослабевали и даже исчезали с электрофореграммы, к пятому дню эксперимента наблюдалось увеличение интенсивности. Фракция № 6 осталась неизменной. Также наблюдалась индукция новых высокомолекулярных фракций № 1 и 2 (первая впервые регистрировалась через 24 часа после начала эксперимента; далее обе регистрировались через 72 и 120 часов). Через 24 часа наблюдалась индукция фракции № 5, сохранившейся до конца эксперимента, через 48 часов – фракции № 8. Также наблюдались многочисленные низкомолекулярные фракции слабой интенсивности. Через 24 часа также отмечалась индукция фракций № 12 и 17, сохранившихся до конца эксперимента, и фракций № 13 и 16, регистрировавшихся на электрофореграмме также через 48 часов. Через 48 часов отмечена индукция фракций № 14 и 15 (сохранялась до 72 часов). Фракция № 12 к окончанию опыта приобрела среднюю интенсивность. Таким образом, через 120 часов после первого кормления белковый спектр группы олигохет, получавшей фарш с относительно низким содержанием

ртуторганических соединений, был представлен семью фракциями низкой интенсивности и двумя фракциями средней интенсивности. В опытной группе №2 наблюдалось ослабление интенсивности всех исходных фракций, в том числе до полного исчезновения на электрофореграмме (фракция № 4, 6, 7). Также наблюдалась временная индукция новых фракций низкой интенсивности, преимущественно низкомолекулярных. Высокомолекулярная фракция № 1 регистрировалась через 24, 48, 72 часа после первого кормления. Фракция № 5 – через 24 и 48 часов. Фракция № 8 – через 48 часов. Низкомолекулярные фракции № 11 – через 24, 48, 72 и 120 часа, фракции № 13 и 16 – через 24 часа, а фракции № 15 и 17 – через 48 часов. Через 120 часов после начала эксперимента в опытной группе №2 наблюдалось только 4 белковых фракции низкой интенсивности.

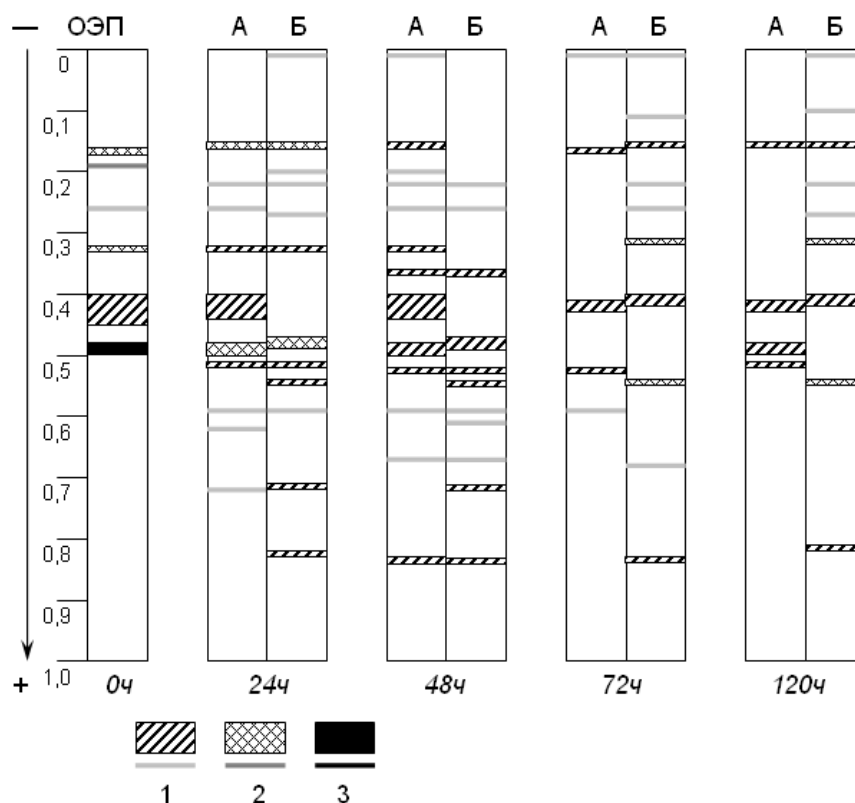


Рис. 1. Влияние ртуторганических соединений на белковые спектры олигохет *Tubifex tubifex*: 0ч – контроль; А – опытная 2; Б – опытная 1. Интенсивность белковых фракций: 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – высокая.

Мы можем констатировать, что различия в белковых спектрах изученных олигохет при кормлении кормом с высоким и низким уровнем ртуторганических соединений выражаются в следующем:

- 1) В группе животных, получавших корм с высоким содержанием ртуторганических соединений (опытная №2), происходит снижение интенсивности и исчезновение исходных белковых фракций, в то время как в опытной группе №1 вслед за этим наблюдается их частичное восстановление;
- 2) В группе, получавшей корм с более низкой концентрацией ртуторганических соединений, наблюдается индукция синтеза большего числа белковых фракций, преимущественно низкомолекулярных, многие из которых сохраняются до окончания эксперимента; вновь индуцированные низкомолекулярные фракции в опытной группе №1 имеют большую ширину полос и иногда более высокую интенсивность, чем в опытной группе №2.

Так как данные о токсичности конкретных уровней содержания ртути для олигохет отсутствуют, то неправомерно считать уровень ртути опытной группы №1 «безопасным». Из литературных данных известно, что тубифициды очень чувствительны к действию ртутного загрязнения (Безматерных, 2007г). Известно, что даже концентрации ртути в корме, не превышающие ПДК, производят токсическое действие на хирономид и цереодафний (Томилина, 2010г).

Снижение интенсивности исходных фракций в обеих группах, по-видимому, связано с подавлением синтеза определенных групп белков. В обоих случаях наблюдается изменение

обмена веществ, но у организмов опытной группы №1 уже к окончанию опыта происходит частичное восстановление исходного состояния белкового спектра. Как в опытной группе олигохет №2, так и в опытной группе №1 происходит индукция низкомолекулярных белков, которые могут являться металлотионеинами (Цветков,2009г), белками теплового шока и других семейств низкомолекулярных белков(Devlin,1998г),принимающих участие в борьбе с ртутным отравлением. Их более активный синтез в опытной группе №1, возможно, объясняется тем, что механизмы детоксикации более активны при воздействии небольших доз ртутиорганических соединений. Не следует также исключать и стимулирующее влияние ртутиорганических соединений на организм гидробионта(Devlin,1998г). С нашей точки зрения, поскольку в опытной группе №1 произошло частичное восстановление интенсивности исходных фракций, это свидетельствует о том, что *T. tubifex* способен быстро адаптироваться к данной концентрации ртутиорганических соединений в корме. В то же время исследование белкового спектра опытной группы №2 явно показывает, что животные находятся в угнетенном состоянии.

В исходной культуре червей (Рис. 2., Табл. 1, 0 ч (контроль)) была определена суммарная активность кислой фосфатазы (КФ). При кормлении исходной культуры, предварительно разделенной на две группы, рыбным фаршем с высоким и относительно низким содержанием ртути наблюдалось изменение активности фермента (Рис. 2, опытные группы №2 и №1 соответственно).

Таблица 1. Влияние ртутиорганических соединений на активность КФ *T. tubifex*, мкмоль/г*мин

Время от начала эксперимента, ч	Удельная активность кислой фосфатазы, мкмоль/г*мин			Наличие статистически достоверных различий в опытной и контрольной группе(p = 0,05)
	контроль	Опытная №1	Опытная №2	
0	0.07±0.012	-	-	-
24	-	0.04±0.008	0,05±0,005	-
48	-	0.09±0.006	0,12±0,006	+
72	-	0.09±0.006	0,11±0,009	+
120	-	0.1±0.014	0,09±0,008	-

В рамках опыта мы наблюдали волнообразное колебание активности кислой фосфатазы. Через 24 часа после первого кормления наблюдается статистически достоверное снижение активности фермента в обеих группах, однако, статистически достоверных различий между группами не установлено. Через 48 часов регистрируется резкий подъем активности кислой фосфатазы с ее последующим снижением к концу эксперимента, когда она, однако, не падает до исходного уровня. Статистически достоверные различия в группах регистрируются нами через 48 и 72 часа.

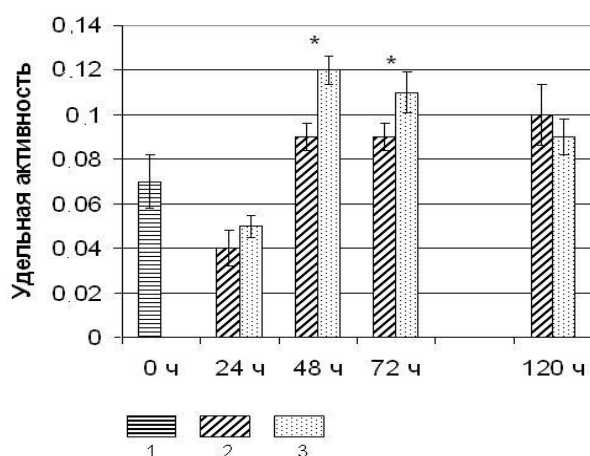


Рис. 2. Влияние ртутиорганических соединения на суммарную активность кислой фосфатазы олигохет *Tubifex tubifex*: 1 – контроль, 2 – опытная №1, 3 – опытная №2. *- статистически достоверные различия (p = 0.05).

Подобные колебания активности ряда ферментов (в том числе и кислой фосфатазы у *T. tubifex*) отмечены в работе И.Л. Цветкова (Цветков,2009г) при исследовании токсического

действия неорганических соединений меди, кадмия и цинка. Причем химическая природа вещества и его концентрация не отражается на форме зависимости активности фермента от продолжительности опыта. По-видимому, реакция кислой фосфатазы на токсическое воздействие ртутьорганических соединений аналогична ее реакции на неорганические соединения других тяжелых металлов (Цветков, 2009г). Концентрация органической ртути в корме не отражается на форме зависимости активности фермента от продолжительности опыта, а влияет только на величину изменения активности фермента.

Наши исследования показали, что воздействие ртутьсодержащих соединений вызывает у олигохет *T. tubifex* изменение белковых спектров, связанное как с ингибированием белкового синтеза, так и с индукцией синтеза защитных белков, так же отмечено волнообразное изменение активности кислой фосфатазы. Олигохеты *T. tubifex* способны быстро адаптироваться к относительно невысокой концентрации ртутьорганических соединений (0.097 мг/кг) в корме; однако при отравлении ртутьорганическими соединениями более высоких концентраций (0.452 мг/кг) прослеживаются признаки угнетения метаболизма.

Список литературы

- Безматерных, Д. М. Зообентос как индикатор экологического состояния водных экосистем Западной Сибири : анализ. обзор / Гос. публич. науч.-техн. б-ка Сиб. отд-ния Рос. акад. наук, Ин-т вод. и экол. проблем. – Новосибирск, 2007. – 87 с.
2. Лапердина Т.Г. Определение ртути в природных водах. Новосибирск, Наука, 2000г.-222с.
- Медведев И.В. Влияние ртутьорганических соединений природного происхождения на регенерацию, размножение и пищевое поведение свободноживущих червей (олигохет и планарий) Автореферат дисс. канд. биол. наук, Борок, 2006. -20с.
- Мур Дж. В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. М.: Мир. 1987.-286с.
- Немова Н.Н., Комов В.Т. Показатели биохимического метаболизма у пресноводных рыб с повышенным содержанием ртути. Ртуть в биосфере: эколого-геохимические аспекты. Материалы международного симпозиума (Москва 7-9 сентября 2010г.). – М.: ГЕО-ХИ РАН, 2010. – с. 297-300.
- Томилина И.И., Гремячих В.А. Закономерности накопления ртути пресноводными гидробионтами. Ртуть в биосфере: эколого-геохимические аспекты. Материалы международного симпозиума (Москва 7-9 сентября 2010г.). – М.: ГЕО-ХИ РАН, 2010. – с. 318-321.
- Урванцева Г.А., Аксенова И.А., Комов В.Т. Влияние ртутьорганических соединений природного происхождения, поступающих с кормом, на некоторые биохимические показатели энхитреид (*Enchytraeus albidus*) / Экологические проблемы уникальных природных ландшафтов. Материалы всероссийской научно-практической конференции (Ярославль, 16-17 декабря 2004г) – Ярославль, 2004.-с 255-257.
- Цветков И.Л. Биохимические параметры стресс-редуцирующей реакции гидробионтов при интоксикации: Автореф. дис. ...д-ра. биол. наук – М, 2009.-46с
- E. W. Devlin, B. Clary. In Vitro Toxicity of Methyl Mercury to Fathead Minnow Cells, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 1998, V. 61, pp. 527-533.

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ В КИШЕЧНИКЕ СЕГОЛЕТКОВ ПЛОТВЫ *Rutilus rutilus* (L.).

А.А. Филиппов

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

В условиях интенсивного антропогенного загрязнения многие водоемы и обитающие в них гидробионты подвержены действию различных веществ, как органической (хлорофос, MNNG), так и неорганической (тяжелые металлы) природы.

Хлорофос – фосфорорганический пестицид с нервнопаралитическим действием, ранее применявшийся для борьбы с эктопаразитами рыб, нарушает нормальную функцию различных органов и систем, изменяет поведение, темп роста и развития рыб (Глубоков, 1990; Таликина и др., 2003). N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) – генотоксикант с прямым влиянием на химическую структуру ДНК. Кратковременная экспозиция в растворах MNNG концентрацией 0.5-150 мг/л вызывает многочисленные новообразования в различных, в том числе и пищеварительных органах пресноводных и морских видов рыб (Amanuma et al., 2004). Наряду с органическими ксенобиотиками важнейшее место в загрязнении водных экосистем принадлежит тяжелым металлам, которые не подвергаются трансформации в организме гидробионтов, крайне

медленно покидая биологический цикл, в высоких концентрациях становятся токсичными (Алабастер, Ллойд, 1984). Попадая в организм с водой и/или пищей, они могут оказывать прямое и опосредованное влияние на морфофункциональные характеристики пищеварительного тракта рыб. Особый интерес представляют отдаленные последствия действия токсических агентов в зародышевый период, поскольку у большинства видов рыб все стадии эмбриогенеза протекают во внешней среде и прямое действие повреждающих факторов возможно уже на самых ранних этапах индивидуального развития.

В связи с этим цель данной работы состояла в изучении влияния органических токсикантов (хлорофос, MNNG) на активность гликозидаз, их чувствительность к действию ионов меди и цинка, и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.).

Для изучения отдаленных последствий кратковременного влияния органических ксенобиотиков осемененную икру плотвы инкубировали в кристаллизаторах с растворами хлорофоса концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-2}$ мг/л или MNNG – $3 \cdot 10^{-7}$ – $3 \cdot 10^{-1}$ мг/л, приготовленными на речной воде (рН 7.2–7.4). Инкубация продолжалась до стадии подвижного эмбриона, что при температуре 15–17°C составило 54 и 48 часов соответственно. Икра, инкубировавшаяся в кристаллизаторах с чистой речной водой, служила контролем. Приготовление растворов токсикантов и их смену, а также смену воды в контроле проводили дважды в сутки. Затем растворы были заменены речной водой. После утилизации желточного мешка и перехода на внешнее питание личинки развивались в однотипных выростных прудах с естественной кормовой базой. Выживаемость молоди в контроле и всех вариантах эмбриотоксического воздействия не превышала 77 % от общего числа посаженных личинок. Для анализа отбирали 4-х месячных сеголетков плотвы (по 20–22 экз. в каждой точке) и определяли у них длину и массу тела, а также абсолютную и относительную длину и массу кишечника. Опыты по влиянию меди и цинка *in vitro* на активность гликозидаз проведены на взрослых особях и сеголетках плотвы из естественных популяций, а также молоди всех экспериментальных групп. В качестве источника металлов использовали сернокислые соли меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Концентрации ионов меди и цинка, рассчитанные по общему содержанию металла в соли, составляли 0.1–25 мг/л, что соответствует содержанию этих металлов в естественной пище рыб.

Активность гликозидаз определяли в суммарных гомогенатах слизистой оболочки кишечника от 6–22 экз. рыб при температуре 20°C и рН 7.4 в пяти повторностях. Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20), а также активность сахаразы КФ 3.2.1.48 оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). Значения кажущейся константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V) определяли графическим способом Лайнуивера-Бэрк (Страйер, 1984). Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при $p = 0.05$.

Хлорофос в ряду испытанных концентраций вызывает достоверное снижение амилолитической активности в слизистой оболочке кишечника подопытных рыб по сравнению с контрольными особями (Табл. 1), причем максимальный эффект торможения (45–49% от контроля) отмечен в вариантах с содержанием $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ мг/л хлорофоса. Диаметральный эффект выявлен при анализе активности сахаразы, возросшей в 1.5–2 раза по сравнению с контролем, при этом наибольший стимулирующий эффект (90–103% от контроля) отмечен в крайних точках испытанного диапазона концентраций. Исследование кинетических характеристик гидролиза крахмала выявило статистически достоверное снижение значений K_m в 1.3–3.8 раза. При этом величина эффекта отрицательно коррелировала с дозой токсиканта. Значения K_m гидролиза сахарозы, напротив, достоверно возрастали в 2–4 раза обратно пропорционально концентрации хлорофоса. Значения V гидролиза полисахарида крахмала в большинстве случаев достоверно снижались в 1.7–3.3 раза, гидролиза дисахарида сахарозы – повышались в 1.5–2.5 раза во всем диапазоне испытанных концентраций хлорофоса.

В опыте с MNNG отмечено достоверное снижение уровня амилолитической активности и активности сахаразы в слизистой оболочке кишечника подопытных рыб, по сравнению с контрольными особями (Табл. 2). Крайние из испытанного диапазона концентраций MNNG ($3 \cdot 10^{-7}$, $3 \cdot 10^{-6}$ мг/л и $3 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-1}$ мг/л) вызывали сходные эффекты: амилолитическая активность снижалась на 30–41%, активность сахаразы – на 31–46% от контроля. Средние из испытанных концентраций MNNG, как правило, оказывали меньшие по величине тормозящие эффекты.

Сравнение кинетических характеристик гидролиза крахмала показало, что у подопытных сеголеток, по сравнению с контрольными, значения K_m снижаются в 1.6-2.5 раза, изменения же V менее значительны. Исключение составляет опытный вариант с концентрацией MNNG $3 \cdot 10^{-4}$ мг/л, в котором кинетические характеристики гидролиза крахмала достоверно не отличаются от аналогичных показателей у контрольных рыб. Максимальное снижение K_m гидролиза крахмала на 58-60% отмечено в крайних точках ($3 \cdot 10^{-7}$ и $3 \cdot 10^{-1}$ мг/л) тестируемого диапазона концентраций MNNG. Изменение K_m гидролиза сахарозы в зависимости от концентрации MNNG носит колебательный характер, при этом различные концентрации токсиканта оказывают как, так и стимулирующий эффект. Наибольшее снижение K_m гидролиза сахарозы отмечено при концентрации MNNG $3 \cdot 10^{-5}$ и $3 \cdot 10^{-1}$ мг/л. Значения V гидролиза сахарозы у подопытных рыб снижаются в 1.3-1.6 раза, в большей степени при двух самых низких и самой высокой из испытанных концентраций MNNG.

Таблица 1. Физиолого-биохимические показатели сеголетков плотвы контрольной и опытной (воздействие хлорофосом в период эмбриогенеза) групп.

Показатели	Концентрация хлорофоса, мг/л					
	0	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин	40.7±0.28 ^a	29.3±0.48 ^b	22.4±0.42 ^b	20.7±0.38 ^г	25.9±0.35 ^д	43.9±0.37 ^е
K_m гидролиза крахмала, г/л	3.79±0.11 ^a	1.00±0.14 ^д	1.01±0.07 ^д	2.04±0.11 ^г	2.40±0.19 ^б	2.96±0.07 ^б
V гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин	66.5±1.52 ^a	24.7±1.35 ^б	19.9±0.51 ^г	39.5±1.12 ^б	37.2±1.83 ^б	65.5±2.07 ^a
Активность сахаразы, мкмоль/г·мин	1.04±0.03 ^a	2.11±0.14 ^б	1.63±0.07 ^б	1.57±0.08 ^б	1.62±0.04 ^б	1.98±0.07 ^б
K_m гидролиза сахарозы, ммоль	3.66±0.29 ^a	15.08±0.98 ^б	8.30±0.69 ^б	7.86±0.36 ^б	3.64±0.27 ^a	7.68±0.56 ^б
V гидролиза сахарозы, мкмоль/г·мин	1.20±0.03 ^a	2.99±0.14 ^д	2.13±0.06 ^{б,г}	2.00±0.11 ^{б,б}	1.75±0.04 ^б	2.30±0.09 ^г

Примечание: Здесь и в табл.2. приведены средние значения показателей и их ошибки ($M \pm m$); надстрочные индексы указывают на статистически значимые отличия между показателями в строке, $p < 0.05$.

При изучении модифицирующего влияния органических токсикантов на чувствительность гликозидаз к действию ионов меди и цинка *in vitro* показано разнонаправленное действие хлорофоса в ряду испытанных концентраций. Амилолитическая активность в присутствии ионов меди в большинстве случаев снижается. При этом четкий концентрационно-зависимый эффект выявлен у рыб контрольной группы и в вариантах опыта с концентрацией хлорофоса $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ мг/л. В присутствии цинка активность гликозидаз у рыб контрольной группы снижается при всех концентрациях металла, в вариантах с концентрацией хлорофоса $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-2}$ мг/л – лишь при наиболее высоких концентрациях металла. У особей, подвергнутых действию низких доз хлорофоса ($1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ мг/л) в эмбриональный период, в ряде случаев отмечено увеличение ферментативной активности в присутствии низких концентраций ионов меди и цинка.

В эксперименте с MNNG сеголетков контрольной группы в присутствии ионов меди или цинка (1–25 мг/л) амилолитическая активность снижается на 10–69 %. При совместном действии металлов ингибирующий эффект усиливается и носит четко выраженный концентрационно-зависимый характер. Действие MNNG в период эмбриогенеза в большинстве случаев снижает чувствительность гликозидаз к действию металлов (степень торможения, как правило, снижается). Лишь в варианте опыта с концентрацией MNNG $3 \cdot 10^{-3}$ мг/л тормозящие эффекты меди и цинка усиливаются, особенно при их совместном действии.

Экспериментально показана высокая чувствительность пищеварительных гликозидаз плотвы к действию органических ксенобиотиков не только в низких, но и в сверхнизких концентрациях. Сверхнизкими концентрациями биологически активных веществ считают значения 10^{-12} – 10^{-15} моль, когда на 1 клетку приходится от 1 до 10 молекул вещества (Гуревич,

2001). Выделяют несколько особенностей их действия: неустойчивость величины и знака эффекта, совпадение эффектов сверхмалых доз препаратов и доз, превышающих их на несколько порядков, а также наличие «мёртвой зоны», в которой эффект отсутствует.

Таблица 2. Физиолого-биохимические показатели сеголетков плотвы контрольной и опытных (воздействие MNNG в период эмбриогенеза) групп.

Показатели	Концентрация MNNG, мг/л							
	0	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-1}$
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин	52.6±0.7 ^a	35.7±0.7 ^д	30.9±0.5 ^е	43.8±1.3 ^б	47.1±1.9 ^б	39.6±0.7 ^г	37.0±1.1 ^{г,д}	44.7±1.5 ^б
K _m гидролиза крахмала, г/л	4.9±0.1 ^a	2.1±0.1 ^г	2.5±0.1 ^б	3.2±0.2 ^б	4.5±0.0 ^a	2.3±0.1 ^{б,г}	3.0±0.1 ^б	2.0±0.1 ^г
V гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин	66.1±1.3 ^a	41.0±0.8 ^д	35.8±1.1 ^е	60.6±1.9 ^б	64.7±1.7 ^a	51.7±1.3 ^б	46.5±1.4 ^г	57.2±1.4 ^б
Активность сахаразы, мкмоль/г·мин	2.6±0.1 ^a	1.7±0.0 ^{г,д}	1.4±0.0 ^е	2.0±0.0 ^б	1.8±0.0 ^{б,г}	1.8±0.0 ^б	1.8±0.1 ^{б,г}	1.6±0.1 ^д
K _m гидролиза сахарозы, ммоль	4.5±0.2 ^a	3.4±0.3 ^б	7.2±0.1 ^г	3.5±0.3 ^{б,б}	6.5±0.5 ^г	4.2±0.2 ^{а,б}	9.1±0.1 ^д	4.5±0.5 ^a
V гидролиза сахарозы, мкмоль/г·мин	2.9±0.1 ^a	1.9±0.1 ^{г,д}	1.8±0.0 ^д	2.2±0.1 ^{б,б}	2.2±0.1 ^{б,б}	2.0±0.0 ^{б,г}	2.3±0.1 ^б	1.8±0.1 ^д

Анализ результатов эмбриотоксического действия малых и сверхмалых концентраций хлорофоса и MNNG на молодь плотвы выявил сходную парадоксальную закономерность. Показано, что пищеварительные гликозидазы развивающихся сеголетков проявляют высокую чувствительность к эмбриотоксическому действию не только низких, но и сверхнизких (порядка $2-4 \cdot 10^{-12}$ моль) концентраций органических токсикантов. При действии хлорофоса на осеменённую икру зависимость показателей активности пищеварительных гликозидаз от концентрации раствора была U-образной, указывая на стимулирующий эффект крайних доз токсиканта. Нелинейный характер дозовой зависимости проявился и при анализе эмбриотоксического действия MNNG на активность гликозидаз кишечника плотвы. Анализ K_m гидролиза сахарозы выявил не только нелинейный, но и нестабильный характер его значений в диапазоне испытанного концентрационного ряда MNNG, в котором повышение сродства ферментов к субстрату чередуется со снижением. При этом эффекты сверхмалых концентраций и концентраций, отличающихся на 5–6 порядков соизмеримы.

Таким образом, анализ отдаленных последствий кратковременного действия малых концентраций хлорофоса на ранних этапах эмбрионального развития выявил у развивающихся сеголетков плотвы неспецифические разнонаправленные изменения активности пищеварительных гликозидаз и кинетических характеристик гидролиза ди- и полисахаридов. При изучении отдаленных последствий кратковременного действия малых концентраций MNNG в период раннего эмбриогенеза выявлено неспецифическое снижение активности пищеварительных гликозидаз на фоне увеличения показателей линейно-массового роста 4-х месячной молоди плотвы. У рыб опытной группы выявлено адаптивное увеличение фермент-субстратного сродства в ответ на эмбриотоксическое действие MNNG. Токсические вещества органической природы не только изменяют активность пищеварительных гликозидаз, но и изменяют их чувствительность к действию биогенных металлов. Эмбриотоксическое действие хлорофоса в большинстве случаев усиливает тормозящий эффект меди и снижает таковой цинка. Действие MNNG в эмбриональный период, как правило, снижает чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка. Величина и направленность эффектов зависят от природы и концентрации токсических агентов.

Список литературы.

- Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1984. 344 с.
- Глубоков А.П. Рост трех видов рыб в ранние периоды онтогенеза в норме и в условиях токсического воздействия // Вопр. ихтиологии. 1990. Т. 39. № 1. С. 137–143.
- Гуревич К.Г. Закономерные и возможные механизмы действия сверхмалых доз биологически активных веществ // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. Т. 42. № 2. С. 131–134.
- Страйер Л. Биохимия. Пер. с англ. М.: Мир. 1984. Т. 1. С. 232.
- Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В. Отдаленные генотоксические ответы у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* после воздействий органических ядов на спермии родителей // Вопр. ихтиологии. 2003. Т. 43. № 3. С. 411–417.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука. 1969. С. 192–196.
- Amanuma K., Nakamura T., Aoki Y. MNNG-induced mutations in the adult gill and hepatopancreas and in embryos of rpsL transgenic zebrafish // Mutat. Res. 2004. V. 22. № 1–2. P. 151–161.

НОВЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ СОСТОЯНИЯ (ЗДОРОВЬЯ) ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ АДАПТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ С ПОМОЩЬЮ СТАНДАРТИЗОВАННЫХ ТЕСТ-ВОЗДЕЙСТВИЙ

С.В. Холодкевич, А.В. Иванов, В.В. Трусевич, Т.В. Кузнецова

Учреждение Российской Академии наук

*Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН
197110, г. С.-Петербург, ул. Корпусная, 18, Россия, kholodkevich@mail.ru*

В настоящее время значительное развитие получили методы биоиндикации качества поверхностных вод, как среды обитания, основанные на неинвазивной регистрации и анализе в реальном времени физиологических показателей, в частности, кардиоактивности и поведения бентосных беспозвоночных с экзоскелетом: раков, крабов, раковинных моллюсков. Измерительные системы, с помощью которых получают такие показатели, получили название биоэлектронных (Холодкевич, 2007), так как в них животные непосредственно включены в состав первичных преобразователей, являясь неотъемлемой частью электронной системы регистрации тех или иных физиологических или поведенческих биомаркеров. Существенным преимуществом биоиндикации качества воды такими инструментальными экофизиологическими методами является возможность интегральной оценки воздействия загрязняющих веществ на биоту и их экспрессность.

В наших недавних работах, направленных на поиск и разработку новых биомаркеров кардиоактивности и поведения бентосных беспозвоночных, которые могут использоваться в методах активной биоиндикации состояния (здоровья) водных экосистем, было обнаружено, что животные одного вида и возраста, но отобранные из различных акваторий, зачастую демонстрируют разное время восстановления паттернов кардиоактивности и поведения (движения створок) после стрессовых тест-воздействий (Kholodkevich et al., 2010; Холодкевич и др., 2011; Kholodkevich et al., 2011). В связи с этим целью настоящей работы являлось проведение цикла экспериментальных экотоксикологических исследований, направленных на обоснование того, что эти временные отличия можно использовать в качестве биомаркеров для оценок состояния экосистем.

Материалы и методы. Методологической основой данного исследования является оценка компенсаторных реакций тест-организмов на стандартизованные тест-воздействия (например, быстрое изменение в пределах толерантности вида солености воды), вызывающих осмотический стресс. Объектом исследования служили 2-3-хлетние черноморские мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. размером 55-60 мм, собранные в акватории Карадагского природного заповедника (Феодосия, Украина) – у Золотых ворот, с глубины 1.5 - 2-х м. Этих моллюсков часто используют в качестве биоиндикаторов экологического состояния акваторий южных морей и, в особенности, Черного моря (Трусевич и др., 2006). Опыты проводили в мае-июне 2010 года.

После акклимации 16-ти мидий к условиям аквариумного содержания с постоянным протоком свежей морской воды в течение 1 недели на их створки, в области расположения сердца, неинвазивно

приклеивали волоконно-оптические датчики измерения частоты сердечных сокращений (ЧСС), а также основанные на эффекте Холла датчики величины раскрытия створок (ВРС) и в течение 7 дней регистрировали фоновые показатели этих физиологических и поведенческих характеристик. Кардиоактивность измеряли методом, разработанным ранее (Холодкевич, 2007), а ВРС – путем использования системы, описанной в (Трусевич и др., 2006; 2008).

Предварительными исследованиями из 16 животных была отобрана референтная группа из 10 животных, которые, во-первых, демонстрировали устойчивый суточный ритм по этим двум показателям, что является достаточно убедительным свидетельством того, что животное находится в хорошем функциональном состоянии, а во-вторых, давали однотипную реакцию на предложенные нами ранее тест-воздействия (Холодкевич и др., 2010; Kholodkevich et al., 2010; 2011). В качестве такого теста применяли гипо- и/или гиперосмотическое воздействие с быстрым изменением солености воды на 50%. В соответствии с этой методикой тестирования в аквариум с животными добавляли необходимое количество либо дистиллированной воды (гипоосмотический тест), либо раствор морской соли Красного моря (гиперосмотический тест). Через 1 час после начала такого воздействия соленость возвращали к первоначальному значению. В компенсаторном ответе кардиосистемы и поведенческой реакции мидий на тест-воздействие (осмотический стресс) обращали внимание на временные характеристики развития реакции, а после снятия воздействия - на время возвращения ЧСС и характеристик движения створок мидий к первоначальному (до тестирования) паттерну, индивидуальному для особей.

С целью моделирования влияния искусственно вызванного ухудшения функционального состояния животных, отобранная по приведенной выше методике референтная группа мидий подвергалась воздействию ионов меди (медный купорос) в концентрации 100 ПДК (500 мкг/л) в течение суток. Затем мидий отмывали в протоке чистой морской воды, после чего с помощью осмотического теста анализировали развитие компенсаторных ответов организма мидий, отражающих адаптивные способности моллюсков, через 8 часов и через 24 часа отмывания.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования получены следующие данные по динамике изменения кардиоактивности и движения створок мидий. На рис. 1 и 2 представлены тренды усредненных по 10 мидиям ЧСС (рис. 1) и ВРС (рис. 2) референтной группы мидий в процессе гипоосмотического тестирования до (кривые 1 на рис. 1 и 2) и после суточного воздействия 100 ПДК (500 мкг/л) Cu^{2+} и последующего отмыва чистой морской водой в течение 8 часов (кривые 2 на рис. 1 и 2) и 24 часов (кривые 3 на рис. 1 и 2), соответственно. Из рисунков 1 и 2 (кривые 1) видно, что в чистой морской воде отобранные животные демонстрируют быстрое восстановление паттернов ЧСС и ВРС после восстановления первоначальной солености (за 30 и 20 мин, соответственно).

Реакция на загрязненность воды катионами меди проявилась у моллюсков с первых минут экспозиции. В частности, все животные продемонстрировали защитный рефлекс изоляции – створки всех мидий закрылись и оставались в таком состоянии практически все время экспозиции. В состоянии закрытых створок мидии обычно переходят на анаэробный обмен, и у них развивается гипоксия. Возможно, с этим связаны наблюдаемые нами время от времени, в течение суточной экспозиции в токсиканте, кратковременные «всхлопывания» (приоткрывания) створок, которые мы связываем с вентиляцией жабр и выбрасываниями продуктов метаболизма, аналогично указанному, например, в работе (Curtis et al., 2000).

Предполагалось, что воздействие меди в концентрации 500 мкг/л в течение суток достаточно для того, чтобы привести к ухудшению функционального состояния животных и к снижению их адаптивных возможностей реагировать на изменения характеристик среды их обитания. В этом случае можно было бы ожидать существенного увеличения времени восстановления паттернов ЧСС и ВРС животных сразу после токсического воздействия меди, а после отмыва животных – частичного или полного восстановления фоновых паттернов активности. Именно такие эффекты нам удалось наблюдать в наших экспериментах.

Функциональная активность моллюсков претерпевает значительные изменения при кратковременном воздействии на организм измененной солености. При кратковременном гипоосмотическом стрессе, который мы использовали в качестве функциональной нагрузки, наблюдается быстрое угнетение двигательной активности створок и уменьшение средней ЧСС. Опосредованно по этим показателям мы можем судить о снижении фильтрационной активности и уровня потребления кислорода моллюсками, поскольку, как известно, ЧСС является надежным показателем респираторной функции организма.

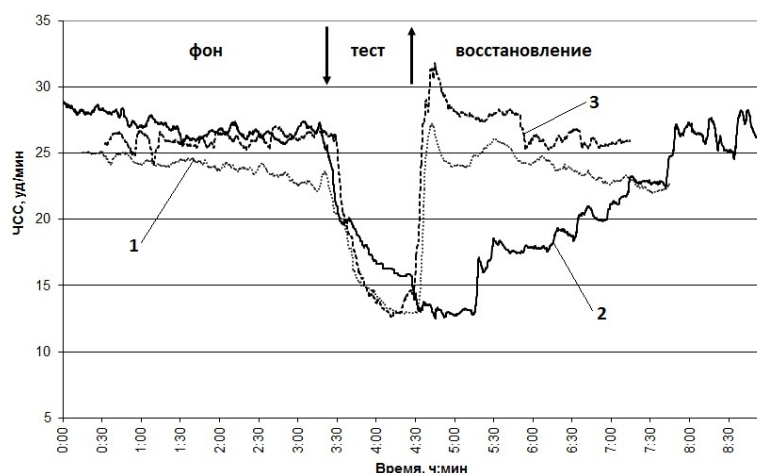


Рис. 1. Различия в скорости восстановления фоновых характеристик ЧСС. Гипоосмотическое тестирование. Кривая 1 - в норме. Кривые 2 и 3- отмывание в течение 8 и 24 час, соответственно, после суточного воздействия на моллюсков ионов меди (500 мкг/л). Усредненные значения по 10 мидиям референтной группы. Стрелками на рисунке указаны времена: начала снижения солёности с 19 до 10‰ и последующего восстановления солёности. По оси абсцисс – продолжительность проведения эксперимента.

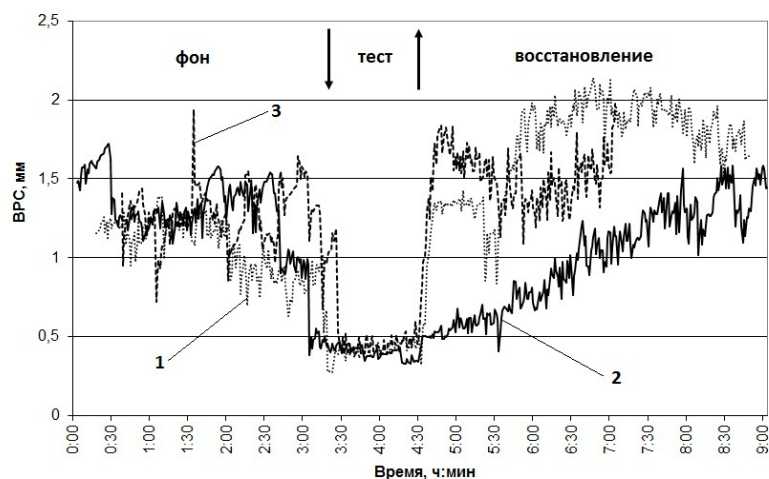


Рис. 2. Различия в скорости восстановления фоновых характеристик ВРС. Гипоосмотическое тестирование. Кривая 1 - в норме. Кривая 2 - после 8 часов и кривая 3 - 24 часов отмывания моллюсков, следующего за суточным воздействием на них ионов меди (500 мкг/л). Усредненные значения по 10 мидиям референтной группы. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Гипоосмотическое тестирование позволило установить, что в результате токсического воздействия меди значительно увеличивается время восстановления фоновых паттернов активности (кривые 2 на рис. 1 и 2), по сравнению с этими показателями до токсического воздействия (кривая 1). Длительность восстановительного периода увеличилась с 20-30 минут до 4-5 часов.

Отметим, что дальнейшее, более продолжительное пребывание животных в чистой морской воде приводит к практически полному восстановлению исходного, быстрого (около 0.5 часа) восстановления паттернов активности животных после гипоосмотического тест-воздействия (см. кривые 3 на рис. 1 и 2). Последующий мониторинг ЧСС и ВРС выявил наличие суточного ритма активности животных, нарушенного экспериментально вызванным загрязнением воды, что убедительно свидетельствует о восстановлении функционального состояния животных. Способность к восстановлению функционирования после кратковременного изменения качества среды обеспечивает моллюскам сохранение относительно стабильного уровня функциональной активности всего организма.

Выводы. Полученные в настоящей работе экспериментальные данные могут служить убедительным доказательством перспективности использования времени восстановления паттернов движения створок и показателей кардиоактивности беспозвоночных животных после

стандартизованных стрессовых тест-воздействий, как нового экотоксикологического биомаркера для оценки состояния (здоровья) водных экосистем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-92424-BONUS_a.

Список литературы

- Трусевич В.В., Столбов А.А., Мишуков В.Ж., Шеянов В.А. Двигательная активность створок моллюсков как инструмент биологического мониторинга водной среды // *Экология моря* 2006, вып. 71, С. 64-67.
- Трусевич В.В., Мишуков В.Ж., Кузьмин К.А. Современные биотехнологии в организации мониторинга водной среды // *Системы контроля окружающей среды. Средства, информационные технологии и мониторинг*/ Сборник научных трудов НАН Украины. МГИ: - Севастополь 2008. С. 395–399.
- Холодkevич С.В. Комплексное обеспечение химической безопасности водоснабжения населения городов для предотвращения и минимизации последствий чрезвычайных ситуаций (на примере Санкт-Петербурга) // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности: 05.26.02 – безопасность в чрезвычайных ситуациях (химическая технология). СПб, 2007. 39 с.
- Холодkevич С.В., Куракин А.С., Корниенко Е.Л., Лехтонен К. К, Штрэнд Я., Кузнецова Т.В., Камардин Н.Н., Любимцев В.А., Иванов А.В. Биоиндикация экологического состояния водных экосистем на основе биомаркеров кардиоактивности бентосных беспозвоночных // *Современные проблемы гидроэкологии. Тезисы докладов 4-й Международной научной конференции, посвященной памяти профессора Г.Г.Винберга (11-15 октября 2010 г., Санкт-Петербург, Россия)*. Санкт-Петербург. 2010. с. 198.
- Curtis T.M., Williamson R., Depledge M.H. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper // *Mar. Biol.* 2000. V. 136. P. 837-846.
- Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L., Lyubimtsev V.A., Ivanov A.V. Ecosystem state assessment of different sub-regions of the Baltic Sea based on cardiac activity biomarkers of bivalves // *Joint Baltic Sea Research Programme. BONUS Annual Conference. 19-21 January, 2010. Vilnius*. P. 74.
- S.V.Kholodkevich, A.V.Ivanov, V.V.Trusevich, T.V.Kuznetsova. New physiological biomarkers for express indication of aquatic ecosystems state on the base of adaptive capacities assessment of bivalves using standard test-stimuli // *SETAC Europe 21th Annual Meeting, Milan, 15-19 May, 2011, Abstract Book*. P. 168-169.

МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА МОЛЛЮСКОВ И ИХ УЧАСТИЕ В МЕЖПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В КОНТРАСТНЫХ УСЛОВИЯХ ОБИТАНИЯ

И.Л. Цветков, М.А. Цветкова, А.С. Коничев

*Московский государственный областной университет
105005 Москва, ул. Радио, 10а, Россия, ecolab@mgou.ru*

Начиная с 50-х годов стали накапливаться данные о существовании большого числа мобильных генетических элементов, присутствие которых в геноме не является обязательным, а их топография и количество могут варьировать в различных клетках, тканях и у разных индивидуумов [1, 2]. У прокариот такие элементы получили название транспозонов. Отличительной особенностью мобильных элементов является способность существовать как в интегрированном с хромосомой виде, так и в виде отдельных макромолекул - эписом, плазмид, вирусных частиц. Почти 50 различных семейств мобильных элементов описаны у дрозофилы. Вместе эти последовательности составляют около 12% гаплоидного набора [3]. В геноме млекопитающих содержится до 50 000 диспергированных копий ретропозона Line размером около 6500 п.н. Семейство Alu повторов, содержащее от 300 до 500 тысяч копий, также относится к числу мобильных элементов генома [4]. Явление лизогении, т. е. присутствие вирусных последовательностей в составе ДНК человека и наличие фрагментов генов человека в вирусных геномах, служит одним из примеров мобильности хозяйской ДНК и возможности передачи наследственно закрепленных признаков между видами.

Однако, по крайней мере для эукариот описано гораздо больше фактов встраивания транспозонов в некодирующие области ДНК, вследствие чего, с одной стороны, мобильные элементы сохраняются в этих областях значительно дольше, не будучи атакованными системой репарации ДНК. С другой стороны, их присутствие в геноме никак не сказывается на фенотипе и не может быть отсеяно естественным отбором. Геномная изменчивость такого рода постепенно накапливается и формирует своеобразный генетический штрих-код, характеризующий не только виды, но так же отдельные популяции и даже индивидуальные особи.

Этот штрих-код имеет большое значение, например, для идентификации личности, сортов культурных растений и пород домашних животных и решения других прикладных задач [5], однако играет весомую роль и в фундаментальных исследованиях. Исследование уникальных последовательностей, производимое методами кластерного анализа, позволяет охарактеризовать филогенетические отношения групп особей практически любого уровня, главное, чтобы эти группы имели какие-либо естественные границы своего распространения (непреодолимые препятствия или расстояния, различия в сроках или способах размножения и т.д.) [6].

Однако, возможна и другая трактовка результатов, которые получаются из анализа первичной структуры ядерной (а также и митохондриальной) ДНК. Заключается она в исследовании молекулярно-генетического полиморфизма, который является следствием обитания в различных экологических условиях. Мутационный процесс, в том числе обусловленный появлением инсерций и/или делеций мобильных генетических элементов, с одной стороны, и механизмы репарации ДНК с другой, происходят в любых условиях обитания, но их скорость и эффективность отличаются в зависимости от интенсивности неблагоприятного воздействия на организм, например, техногенной нагрузки. Причин тому может быть несколько, это непосредственное влияние некоторых токсикантов (мутагены) или физических факторов (например, ультрафиолетовое или радиационное излучение) на структуру ДНК, а также действие, оказываемое опосредованно через нарушение правильной репликации, своевременной репарации, и, наконец, направленные молекулярные процессы более высокого уровня, которые могут иметь адаптивное значение или быть следствием ослабления защитных свойств клетки [7, 8]. Так или иначе, можно ожидать, что в экстремальных условиях обитания техногенный мутационный процесс должен преобладать над естественным, а следовательно, индивидуальная изменчивость и молекулярно-генетический полиморфизм должны быть выше в тех популяциях, которые испытывают большую техногенную нагрузку, и меньше где условия существования близки к оптимальным.

На основании этого предположения, мы построили следующую схему исследования. Выбрали два водоема, близких по гидрологическим параметрам, но контрастных по степени загрязненности промышленными отходами. Сравнительно чистым водоемом служила р. Клязьма в границах Владимирской области выше г. Владимира, загрязненным водоемом – р. Которосль, точнее, её приустьевой участок в черте г. Ярославля. Чистоту Клязьмы подтверждали сообщения местных жителей и наши наблюдения, сделанные на основании видового состава водной и прибрежноводной растительности. Высокая загрязненность приустьевого участка Которосли была доказана нами рядом специальных гидробиологических и биохимических исследований [9].

В июле-августе 2009 г. на нескольких станциях в указанных водоемах собрали по 8-10 особей речной живородки (*Viviparus viviparus* L.: Viviparidae, Architaenioglossa, Gastropoda, Mollusca). Молекулярному анализу подвергали улиток строго индивидуально, используя одноразовые инструменты, посуду и другие приспособления. ДНК выделяли из мышц передней части ноги, которые измельчали с помощью микрогомогенизатора в микропробирках Эппендорф с четырьмя объемами лизирующего раствора на основе гуанидинтиоцианата (5,2М). Дальнейшая процедура выделения и очистки ДНК происходила в соответствии с инструкцией к использованному для этого набору реагентов «Ferrosil uni» (ООО «Компания «Биоком», Москва) для автоматического процессора магнитных частиц KingFisher ml (TermoFisher, Финляндия).

Сведений о мобильных элементах беспозвоночных в литературе пока чрезвычайно мало, хорошо изученными объектами на сегодняшний день можно считать только дрозофилу (*Drosophila melanogaster* Meigen) и нематоду *Caenorhabditis elegans* Maupas. Последний вид является наиболее близким родственником моллюсков, и потому сведения о нем были взяты нами за основу для эксперимента по изучению геномного разнообразия речной живородки с помощью маркеров мобильных элементов. Для этого мы использовали метод ПЦР с олигонуклеотидными праймерами, комплементарными инвертированным повторам мобильных Тс-элементов нематоды – Tc1, Tc3, Tc5 [10] (Таблица).

Реакцию проводили в термоциклере Терцик («ДНК-технология», Москва), реакционную смесь готовили из компонентов набора «ПЦР-ядро» (ООО «Компания «Биоком») и предварительно разбавленные праймеры (синтезированы ЗАО «Синтол», Москва), взятые в количестве 10 пмоль каждого на 1 реакцию, как по одному, так и в комбинации при совпадении температуры отжига.

Таблица. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, комплементарных инвертированным повторам мобильных Тс-элементов *Caenorhabditis elegans* [10]

Название	Последовательность 5'–3'	Температура отжига, °С
TC1R1S	GATCGACTCGATGCCACGTCGTTG	58
TC1R2	GATTTTGTGAACACTGTGGTGAAG	58
TC3.1	GGTCCTATAGAAGTTTCACACTGG	48
TC3.2	TTCGGAAGTTCCTCAAACCTTC	48
TC5.1	GCCAAACCTGCTCTGAAGCAG	48
TC5.4	GGATCATCTGTAACATCCTCTATCG	48

Продукты ПЦР детектировали с помощью электрофореза и характеризовали по молекулярной массе, определяемой с помощью ДНК-маркеров «Gene Ruler 100 bp DNA Ladder» (Promega Corp.). Одна из полученных электрофореграмм представлена на рис.1. При сопоставлении наборов ПЦР-продуктов, полученных с ДНК особей живородки из трех разных популяций, можно заключить, что искомый молекулярный полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами мобильных Тс-элементов у моллюсков, существует и даже позволяет дифференцировать отдельные популяции по степени сходства электрофореграмм этих фрагментов.

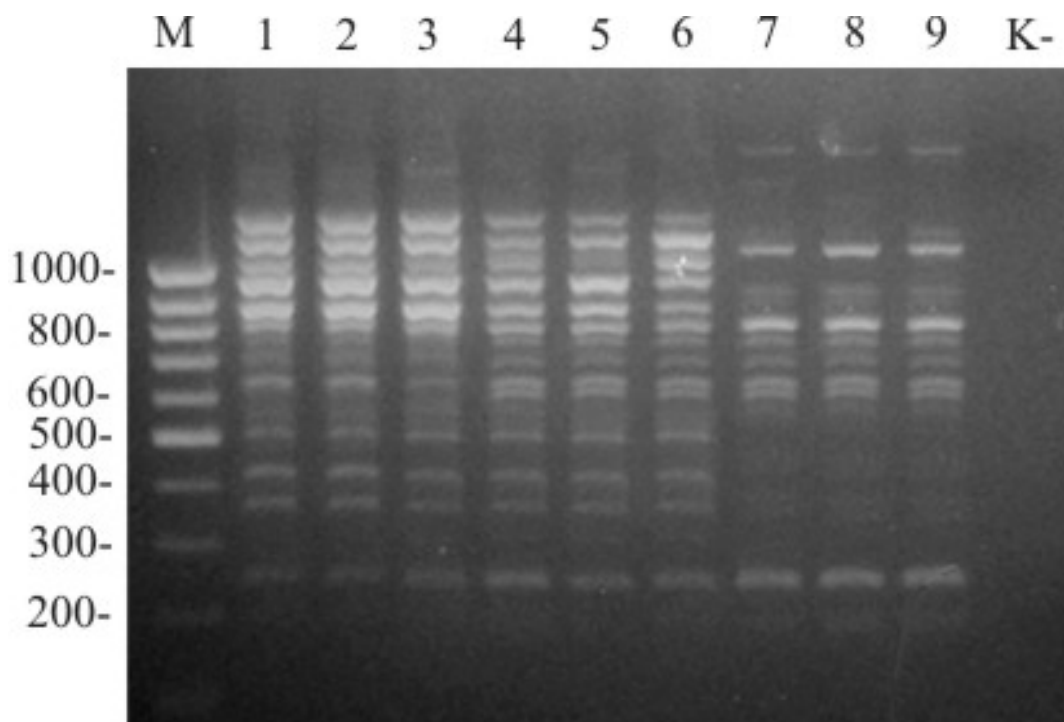


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с олигонуклеотидным праймером TC1R2 и ДНК живородки речной из трех популяций. М – маркер молекулярной массы (п.н.); 1-3 – особи, выловленные на станции 2 (р. Которосль, р-н ф-ки «Красный Перекоп»); 4-6 – на станции 3 (р. Которосль, приустьевой участок); 7-9 – на станции 5 (р. Клязьма, Владимирская обл.); К – отрицательный контроль.

Из набора амплифицированных фрагментов ДНК, выявленных у всех использованных для анализа особей улиток со всеми использованными праймерами и их комбинациями, мы исключили консервативные, не имеющие популяционной специфичности и встречающиеся повсеместно, остальные (общее число таких фрагментов – 84) свели в электронную таблицу и подвергли кластерному анализу с помощью программы Statistica 6.0. Полученная дендрограмма представлена на рис 2.

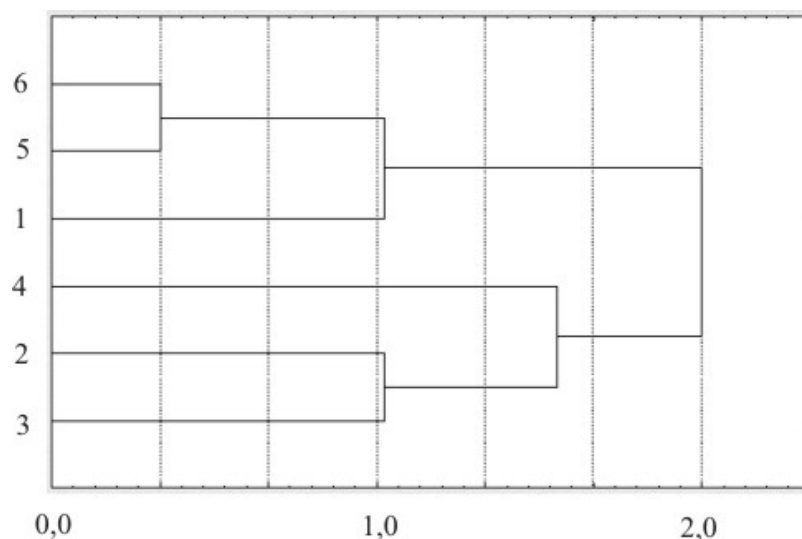


Рис. 2. Дендрограмма распределения особей речной живородки, построенная по составу амплифицированных межмикросателлитных последовательностей ДНК. По горизонтальной оси – эвклидово расстояние; 1–4 соответствуют номерам станций на р. Которосли (г. Ярославль), 5 и 6 – на р. Клязьме (Владимирская обл.)

В результате выяснилось, что наименьшими различиями в молекулярной структуре ДНК характеризовались популяции речной живородки, не всегда локализованные в непосредственной близости друг от друга, но всегда обитавшие в сходных условиях. Например, на станциях 1 в Которосли, 5 и 6 в Клязьме, где видимые следы техногенного воздействия отсутствуют, и на станциях 2–4 в Которосли, акваториях с выраженными показателями загрязненности промышленными и бытовыми отходами (приустьевой участок реки перед впадением в Волгу). Это свидетельствует о том, что межпопуляционный полиморфизм в загрязненном водоеме оказывается более выраженным и, следовательно, техногенная нагрузка на водоем действительно увеличивает активность мобильных элементов и способствует углублению внутривидовой дифференциации и увеличению темпов микроэволюции по сравнению с естественными, неизменными человеком условиями обитания. В дальнейшем мы планируем более тщательно исследовать выявленную закономерность и использовать для этого не только большее число станций сбора материала и большее видовое разнообразие, но и более тонкий анализ первичной структуры ДНК (методом секвенирования фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами).

Работа выполнена на средства гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых МД1168.2011.4

Список литературы

1. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // Science. 1984. Vol. 226. P. 792-801.
2. Berg D., Howe M.M. Mobile DNA. Washington: Amer. Soc. Microb., 1989. 247 p.
3. Golubovsky M. Mobile genetics and forms of heritable changes in eukaryotes. // Биополимеры и клетка. 1995. Т. 11, №2. С. 29-38.
4. Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. // Nature. 1994. Vol. 371. P. 215-220.
5. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия. // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70, №4. С. 296–315.
6. Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя. Обзор. // Биохимия. 2007. Т. 72, вып. 12. С. 1690–1699.
7. Инге-Вечтомов С.Г. Экологическая генетика и теория эволюции. // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13, №2. С. 362–371.
8. Чибисова Н.В., Долгань Е.К. Экологическая химия: Учебное пособие. / Калининград, 1998. 113 с.
9. Цветков И.Л., Цветкова М.А., Зарубин С.Л., Семерной В.П., Коничев А.С. Оценка качества сточных и природных вод с помощью биохимического показателя — активности кислой фосфатазы пресноводных моллюсков. // Водные ресурсы. 2006. Т. 33. №1. С. 62–70.
10. Martin E., Laloux H., Couette G., Alvarez T., Bessou C., Hauser O., Sookhareea S., Labouesse M., Ségalat L. Identification of 1088 new transposon insertions of *Caenorhabditis elegans*: a pilot study toward large-scale screens. // Genetics. 2002. Vol. 162. P. 521-524.

МЕТОДИКА ПОДСЧЁТА ПОЗВОНКОВ У ПЛОТВЫ
***RUTILUS RUTILUS* (CYPRINIDAE, CYPRINIFORMES)**
С АНОМАЛИЯМИ ПОЗВОНОЧНИКА, ПОЛУЧЕННЫМИ ПОСЛЕ ТОКСИЧЕСКОГО,
ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО И ТЕРМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭМБРИОНЫ

Ю.В. Чеботарева

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
п. Борок Некоузского р-на Ярославской обл., Россия, julia@ibiw.jaroslavl.ru*

Число позвонков у рыб является важным систематическим признаком. Оно достаточно стабильно для того, чтобы служить отличительной особенностью видов и внутривидовых групп (Павлов, 2007). Благодаря этому даже незначительные изменения в среднем количестве позвонков нередко оказываются значимыми и помогают выявить изменения в темпе развития рыб при различных воздействиях (Lindsey, 1988).

Позвоночник нормальной рыбы представляет собой ряд чётко отграниченных друг от друга элементов, отличающихся билатеральной симметрией и имеющих общий план строения в зависимости от того, в каком отделе (туловищном, хвостовом или переходном) находится позвонок. Подсчитать позвонки у нормальной рыбы достаточно просто. Однако среди экспериментального материала нередко встречаются рыбы с аномалиями позвонков. Эти аномалии заключаются в сращении обычно дискретных элементов позвоночника или, напротив, в разъединении структур, которые в нормальном состоянии составляют одно целое, в появлении дополнительных элементов, в отсутствии частей позвонков или деформации их.

Подобные нарушения в строении позвоночника отмечаются и у рыб из естественных популяций. В основном частота их встречаемости в природе незначительна, хотя в отдельных выборках некоторых видов аномалии позвоночника являются обычным явлением (Татарко, 1977). Рыбы с аномалиями отличаются пониженной жизнеспособностью, поэтому в природных условиях они имеют мало шансов на выживание. При экспериментальном выращивании рыб условия их обитания часто бывают близки к оптимальным (обилие пищи, отсутствие хищников), что повышает выживаемость рыб с различными нарушениями в строении и развитии.

На протяжении ряда лет мы совместно с Ю.Г.Изюмовым, В.В.Крыловым и М.Г.Таликиной проводили эксперименты по различным воздействиям (токсическим (Чеботарева, 2009; Чеботарева и др., 2009), электромагнитным и термическим) на ранний эмбриогенез плотвы. Все эксперименты проводились по одной схеме. От природных или прудовых производителей плотвы получали половые продукты. Проводили оплодотворение икры сухим способом. Эмбрионы развивались в кристаллизаторах с речной водой, которую меняли дважды в день. После заполнения плавательного пузыря воздухом личинок выпускали в пруды с естественной кормовой базой. Воздействие на эмбрионы проводили с момента оплодотворения и заканчивали в начале гастрюляции или в начале вылупления из оболочек. В возрасте около 4 месяцев сеголеток отлавливали и определяли у них ряд морфологических показателей, в том числе подсчитывали позвонки и аномалии позвоночника.

У сеголеток были отмечены следующие аномалии: сращение позвонков, деформация позвонков, незамкнутые невральные или гемальные дуги, сращение дуг разных позвонков, деформации дуг позвонков, отсутствие дуг позвонков, несращение дуги с телом позвонка, перемещение дуги на соседний позвонок, дополнительные дуги позвонков. В отдельных случаях доля рыб с аномалиями позвоночника в выборке может достигать до 90 %.

Исследования показали, что спектр нарушений не зависит от воздействующего на эмбрионы агента, может меняться лишь относительная частота тех или иных аномалий. Даже контроль «не застрахован» от появления нарушений в строении позвонков. В отдельные годы контрольная выборка по уровню аномалий позвоночника выглядела хуже, чем экспериментальные. По нашим наблюдениям, такое происходило в годы, когда начало развития эмбрионов приходилось на дни с повышенной или сильно колеблющейся температурой. Подсчёт позвонков в значительной степени затрудняется при исследовании рыб с дефектами позвонков. Наибольшие сложности вызывает точная оценка числа элементов позвоночника у рыб со сращениями позвонков. При сращении позвонков происходит слияние тел двух или нескольких позвонков в один блок, в котором отсутствует граница между отдельными позвонками. Однако тела позвонков в сращениях отчётливо различимы.

В большинстве случаев в сращении вместе с телом позвонка присутствуют в туловищном

отделе – невральные дуги и парапофизы, к которым прилегают рёбра, а в переходном и хвостовом отделах – невральные и гемальные дуги.

В различных выборках экспериментальной плотвы среднее число сращений позвоночника на одну рыбу может достигать до 2, а среднее число позвонков в сращениях – до 5. Максимальное число обнаруженных сращений у одной рыбы – 6, позвонков в составе сращений во всём позвоночнике – 17, в одном сращении – 8 (Чеботарева, 2009).

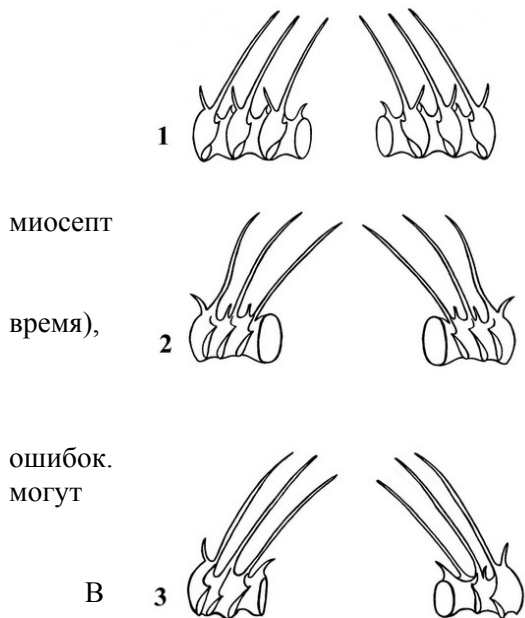


Рисунок. Нормальное строение туловищных позвонков (1) и их сращения: симметричное (2) и асимметричное (3).

Но эта

с нормальными. В то же время в контрольной выборке из этого же эксперимента число позвонков было больше у рыб без аномалий. Возможно, появление сращений позвонков и формирование их числа в пределах группы рыб, развивающихся в одних условиях, – это параллельно идущие процессы, вероятно, связанные с индивидуальными темпами развития организма.

В экспериментальных выборках плотвы иногда встречаются особи с необычными позвонковыми фенотипами. Например, нормальное число позвонков в туловищном отделе позвоночника у плотвы – от 15 до 17, в хвостовом отделе – от 14 до 16, в то же время у отдельных особей может быть в туловищном отделе 13-14 или 18-19 позвонков, а в хвостовом – 17 или 18. Как и у «стандартной» плотвы, у таких необычных рыб позвоночник может быть как со сращениями позвонков или другими аномалиями, так и без них.

Сращения позвонков бывают двух видов – симметричные и асимметричные. В симметричных сращениях и с левой, и с правой сторон число тел позвонков одинаково. В асимметричных сращениях с одной из сторон (левой или правой) различимо больше тел позвонков, чем с противоположной стороны. Соответственно, различается также число невральных и гемальных дуг позвонков. Асимметричные сращения позвонков у плотвы могут составлять большую часть от всех сращений позвонков. Например, в выборках сеголеток после воздействия малых доз хлорофоса (от 10^{-6} до 10^{-2} мг/л) доля асимметричных сращений была больше 60% (от 60,5 до 76,4% в разных выборках).

При наличии асимметричных сращений в позвоночнике необходимо учитывать, с какой стороны позвоночника находятся дополнительные полупозвонки. По нашим наблюдениям, дополнительные полупозвонки чаще располагаются с одной из сторон позвоночника – или все слева, или все справа. Таким образом, при подсчёте позвонков с левой и с правой стороны общее число позвонков будет различным. В отдельных случаях у плотвы разница между сторонами в числе позвонков достигает до 5-6.

В то же время встречаются рыбы, у которых дополнительные полупозвонки располагаются с обеих сторон позвоночника. Чаще всего такие разнонаправленные асимметричные сращения следуют одно за другим (например, слева можно различить два двойных сращения, а справа на

Окончательное число элементов осевого скелета определяется на ранних эмбриональных этапах развития рыбы, ещё до появления этих элементов (Lindsey, 1988; Павлов, 2007). Нарушения симметрии сегментации зародыша могут быть причиной нарушений в строении позвоночника, так как тела позвонков у плотвы формируются строго против (Ванюшина, 1990). Окостенение позвонков у плотвы проходит в течение 1-4 личиночных этапов, оно начинается из 4 центров (появляющиеся в разное от которых процесс окостенения идёт как в краниальном, так и в каудальном направлении (Ванюшина, 1990). Место встречи разных векторов окостенения может быть участком возможных. Кроме того, к нарушениям в строении позвонков приводит смещение и редукция зачатков отдельных позвонков, а также несогласованность в развитии соседних участков окостенения.

некоторых случаях наличие нарушений в строении позвоночника и общее число позвонков коррелируют. связь может быть с разным знаком. Например, после воздействия на эмбрионы малых доз хлорофоса было обнаружено повышенное число позвонков у сеголеток аномалиями позвоночника по сравнению с

том же месте тройное сращение и отдельный позвонок, на самом же деле это блок из неправильно заложившихся 4 позвонков, в котором нельзя выделять сращения 2-позвонковое и 3-позвонковое). Иногда между разнонаправленными сращениями находятся несколько позвонков. Чаще всего они деформированы. Мы считаем, что эти позвонки «гибридные», сложенные из частей разных последовательно стоящих позвонков. Их целостность обусловлена ошибкой окостенения позвоночника. Таким образом, при подсчёте позвонков два дополнительных полупозвонка, расположенные с разных сторон позвоночника, следует рассматривать как один позвонок, а все непарные дополнительные полупозвонки, расположенные с одной стороны позвоночника – как отдельные позвонки.

В связи со всем вышесказанным, мы можем предложить следующую методику подсчёта позвонков у рыб с аномалиями позвоночника. На отпрепарированном позвоночнике позвонки просматривают, начиная с головного конца позвоночника, как с левой, так и с правой стороны. Общее число позвонков подсчитывают с той стороны позвоночника, где их больше. Если в выборках рыб со значительной долей особей с аномалиями позвоночника подсчёт позвонков проводится только слева (как обычно принято), это необходимо указывать в методике. При таком подсчёте будет занижено число позвонков у особей с правосторонними дополнительными полупозвонками, что может отразиться на средневыворочном значении признака.

При наличии большого числа аномалий позвонков интересные данные можно получить при анализе локализации аномалий в позвоночнике, исследовании количества сращений позвонков, числа позвонков в составе сращений и соотношения видов сращений (симметричных и асимметричных; «односторонних» и «разнонаправленных»). Такие данные важны для оценки как экспериментальных выборок, так и для рыб при искусственном выращивании, среди которых также нередко встречаются особи с аномалиями развития.

Автор благодарит Ю.Г.Изюмова, В.В.Крылова и М.Г.Таликину за помощь на всех этапах работы.

Список литературы.

- Ванюшина О.Г. Развитие осевого скелета у леща (*Abramis brama* L.) и плотвы (*Rutilus rutilus* L.)// Труды ИБВВ. 1990. Вып.59 (62). С.4-9.
- Павлов Д.А. Морфологическая изменчивость в раннем онтогенезе костистых рыб. М.: ГЕОС. 2007. 264 с.
- Татарко К.И. Аномалии карпа и роль температурного фактора в их развитии// Биологический режим водоёмов-охладителей ТЭЦ и влияние температуры на гидробионтов. М.: Наука. 1977.С.157-196.
- Чеботарева Ю.В. Аномалии в строении позвоночника у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Cypriniformes) после воздействия токсикантов на ранние стадии развития//Вопр. ихтиологии. 2009. Т.49. №1.С.102-110.
- Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г. Некоторые морфологические особенности сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Cypriniformes)2009 после воздействия токсикантов на ранние стадии развития (позвонковые фенотипы, пластические признаки и флуктуирующая асимметрия)// Вопр. ихтиологии. 2009. Т.49. С.269-276.
- Lindsey C.C. Factors controlling meristic variation // Fish physiology. W.S. Haar, D.J. Randall (eds.). 1988. V. XI. Physiology of developing fish. Pt. B. Viviparity and posthatching juveniles. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Acad. Press. SNC. P. 197-274.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ ИЗБЕГАНИЯ ТОКСИКАНТОВ У РЫБ И РАКООБРАЗНЫХ

С.А. Черкашин

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4, Россия, cherkashin@tinro.ru

В токсикологических исследованиях большое внимание уделяется изучению влияния поллютантов на поведение животных, так как его нарушение – обычно наиболее явный показатель негативных последствий загрязнения. Однако даже малозаметные при визуальном наблюдении, но статистически достоверные изменения поведения предшествуют многим другим аномалиям и, возможно, становятся решающими для дальнейшего существования популяций гидробионтов. При этом изменение поведения происходит при существенно меньших концентрациях, чем проявление большинства других сублетальных эффектов. Поэтому регистрация нарушения

поведения служит оперативным чувствительным тестом для определения негативного воздействия (Cherry, Cairns, 1982; Черкашин, 1986; Лукьяненко, Черкашин, 1987; Флеров, 1989).

При оценке последствий загрязнения значительное внимание уделяется исследованию избегания или предпочтения гидробионтами различных поллютантов, т.к. они неоднозначно влияют на поведение животных. Для выявления минимальной токсичности растворов необходимо использовать чувствительные тест-объекты, реакции которых на многие вещества хорошо изучены. Практический интерес представляет изучение особенностей реакций избегания токсикантов у рыб и ракообразных, так как они наиболее чувствительны к большинству токсикантов. Реакция на поллютант, обычно возрастает с увеличением продолжительности его подачи, но при длительном проведении опыта или после предварительной экспозиции способна прекратиться (Черкашин, 1986, 2005; Лукьяненко, Черкашин, 1987; Флеров, 1989). Известно, что рыбы и ракообразные могут избегать одни концентрации загрязняющих веществ, но привлекаться другими, причем не обязательно сублетальными. Обнаружен бимодальный дозо-зависимый ответ озерного сига *Coregonus clupeaformis* на подачу кадмия (McNicol, Scherer, 1991). Достоверная реакция (у большей части рыб – избегание; у меньшей – предпочтение) проявлялась при концентрациях Cd 0.2-1 и 8-256 мкг/л. Иногда гидробионты привлекаются определенными концентрациями металлов, некоторыми нефтеуглеводородами (НУ), пестицидами, и животные, таким образом, становятся особенно уязвимыми для воздействия токсикантов (Флеров, 1989; Черкашин, 2005; Tierney et al., 2010).

Все же многочисленные факты свидетельствуют, что активно перемещающиеся гидробионты способны достаточно быстро уходить от токсичных концентраций металлов, детергентов, промышленных, городских, сельскохозяйственных сточных вод, хлорорганических и фосфорорганических соединений, фенолов, отдельных углеводородов и их смесей, нефти и нефтепродуктов, то есть поллютантов, которые влияют непосредственно на химические рецепторы или оказывают быстрое общее раздражающее воздействие. Отпугивает животных и затонувшая нефть; они перестают ощипывать донную растительность, так как меняется ее вкус. Лососевые и сиговые рыбы избегают даже малозагрязненных участков. Было высказано предположение, что лососевые изменяют миграционные пути при определенных концентрациях НУ. Молодь при этом, вероятно, вынуждена уходить в более открытые воды, где пищи меньше, а выедание ее хищниками больше. Некоторые ученые считают, что молодь лососевых способна избегать отдельные ароматические углеводороды в высоких концентрациях, однако вопрос, будет ли она избегать НУ в случае конкретных нефтяных разливов, остается открытым. Объяснить и предсказать поведение животных в естественных условиях могут экспериментальные работы, но их результаты весьма противоречивы.

Разложение сырых нефтей и нефтесодержащих осадков уменьшает избегание нефти и содержащую ее пищи морской амфиподой *Onisimus affinis* (Percy, Mullin, 1977). По-видимому, ракообразные реагируют на более летучие компоненты нефти, концентрация которых постепенно уменьшается. С увеличением содержания НУ в осадках реакция избегания становится менее выраженной, вероятно, из-за повреждения хеморецепции высокими концентрациями НУ. Голубой краб в 6-минутных экспериментах не избегал растворов с содержанием нафталина в воде менее 2 мг/л, несмотря на отсутствие нарушения хеморецепции (Pearson, Olla, 1980).

В установке с резкой границей между контрольным и тестируемым раствором в опытах с последовательно увеличивающимися концентрациями поллютантов самки эврибионтных мизид *Neomysis mirabilis*, избегали сублетальных концентраций дизельного топлива (Лукьяненко и др., 1987). Реакция на тестируемый раствор возрастала с увеличением продолжительности его подачи, но, как правило, стабилизировалась к завершению 10-минутного эксперимента. С повышением температуры избегание наступало при всё более низких концентрациях НУ и цинка. Избегаемая мизидами пороговая концентрация дизельного топлива при 4; 10 и 13 °C составляла соответственно 0.25; 0.10 мкг/л и 0.09 мг/л. При дальнейшем увеличении температуры (до 16 °C) эффективность избегания стабилизировалась и пороговой оставалась концентрация НУ 0.09 мг/л. Исследования Амурского залива (Японское море) показали, что мизиды отсутствовали на локальной акватории у Нефтебазы (в черте г. Владивостока) в августе 2004 г. (Черкашин, 2005). Здесь общая концентрация НУ в воде составляла 0.1-0.2 мг/л.

Молодь пиленгаса *Liza haematocheilus* Basilewsky, золотистого бычка *Acanthogobius flavimanus* Temminck et Schlegel и морской малоротой корюшки *Hypomesus japonicus* Brevoort в аналогичных опытах даже при достаточно высоких температурах не уходили от сублетальных концентраций дизельного топлива (0.005—0.5 мг/л), хотя поведение сеголетков видоспецифично

изменялось во всех тестируемых растворах (Лукьяненко и др., 1987). Однако на этих и других видах морских рыб показано усиление реакции избегания Zn, Cu и фенола с увеличением продолжительности подачи и концентрации токсикантов (Лукьяненко, Черкашин, 1987). Мальки опистоцентра глазчатого *Opisthocentrus ocellatus* Tilesius начинают уходить из растворов фенола при его концентрации 10 мг/л, а корюшки и мизид - при 1 мг/л. С повышением содержания фенола до 10 мг/л реакция избегания у мизид подавляется, вероятно, из-за нарушения хеморецепции. Десятиминутное пребывание рачков в растворе фенола 10 мг/л приводит к потере ими способности избегать другие токсиканты (50 мг/л цинка).

Значительное практическое и теоретическое значение представляет показанное нами становление реакции избегания в процессе онтогенеза гидробионтов. Зависимость реакции гидробионтов на токсиканты от возраста особенно наглядно выявлена в опытах с молодой креветкой *Pandalus kessleri* Ratbun. Двадцатидневная *P. kessleri*, выращенная в лабораторных условиях, не уходила от растворов фенола 0.1, 0.5, 1.0, 10, 20 и 50 мг/л при температуре 18.5°C (Лукьяненко, Черкашин, 1987). Вероятно, это объясняется тем, что хеморецепторы к концу личиночного развития еще не являются функционально зрелыми (Черкашин, Блинова, 2011). Сеголетки креветки длиной 30–32 мм при 19.3°C избегали фенол, начиная с концентрации 1 мг/л, однако уже 5 мг/л фенола подавляли эту реакцию. Более крупная молодь (38–41 мм) уходила из растворов фенола уже при концентрации 0.5 мг/л. Нарушение избегания происходило лишь при 10 мг/л токсиканта, как и в опытах с мизидами. Следовательно, поведение организмов при контакте с поллютантами определяется особенностями гидробионтов, используемых методов, физико-химическими свойствами, концентрациями и продолжительностью воздействия загрязняющих веществ. Выявлено значительное межвидовое варьирование пороговых избегаемых концентраций. Например, к Zn наименее чувствительными оказались трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus и корюшка, в то же время корюшка избегала более низкие концентрации фенола, чем опистоцентр глазчатый (Черкашин, 1986). В целом половозрелые особи рыб и ракообразных более эффективно реагируют как на органические, так и на неорганические токсиканты.

При сравнении чувствительности различных способов биотестирования качества вод и состояния биоты, определении токсичности отдельных загрязняющих веществ, для установления ПДК важно сопоставление пороговых избегаемых, минимальных эффективных и летальных концентраций. Поведенческие реакции более чувствительны, чем острые тесты на летальность, но пороговые избегаемые концентрации выше минимальных летальных в хронических экспериментах (Флеров, 1989; Черкашин, Блинова, 2011). Однако необходимо учитывать, что избегание или предпочтение проявляется у гидробионтов в течение первых минут контакта с тестируемыми растворами или донными отложениями, т.е. намного быстрее возможной гибели животных, особенно в хронических опытах.

Сопоставление медианных летальных и пороговых избегаемых концентраций (таблица) показало, что половозрелые мизиды длиной 11-19 мм и подросшая молодь креветки длиной 38–40 мм при достаточно высокой температуре растворов способны уходить от сублетальных концентраций ТМ и фенола. Полученные нами пороги избегания ТМ и НУ близки к концентрациям этих поллютантов, встречающимся при локальных или эпизодических загрязнениях морских акваторий. Поэтому оценка реакции избегания половозрелыми мизидами неблагоприятных факторов была рекомендована в качестве одного из элементов разработки ПДК потенциально вредных веществ для вод рыбохозяйственных водоемов и как экспресс-метод биотестирования природных и сточных вод (Черкашин, 1986). В различных системах биомониторинга качества вод в реальном времени, учитывая особенности реакций избегания токсикантов у рыб и ракообразных, необходимо использовать половозрелых представителей как той, так и другой групп водных организмов.

Подвижные животные, попавшие в замкнутое пространство, обычно пытаются покинуть его, и все регистрируемые в опытах ответы могут быть вызваны этой доминирующей мотивацией бегства. Поэтому непосредственное перенесение результатов лабораторных исследований в естественные условия неоправданно. Однако сопоставление экспериментальных данных с полевыми наблюдениями за распределением мизид во внутренних районах залива Петра Великого (Японское море) подтвердило влияние загрязнения на пространственную структуру популяций этих ракообразных и показало экологическую значимость реакции избегания.

Таблица. Сравнительная характеристика тест-реакций животных на воздействие поллютантов

Тест-объекты	Тест-реакции	Концентрации, вызывающие реакции, мг/л	Экспозиция
Cu			
<i>Neomysis mirabilis</i> , половозрелые, 11-19 мм	избегание, ЭК ₅₀	0.006	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	0.100	48 ч
Zn			
<i>Neomysis mirabilis</i> , молодь, 5-9 мм	избегание, ЭК ₅₀	2.790	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	0.082	48 ч
половозрелые, 11-19 мм	избегание, ЭК ₅₀	0.350	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	1.900	48 ч
<i>Pandalus kessleri</i> , молодь, 38-40 мм;	избегание, ЭК ₅₀	0.60	3-10 мин
30-32 мм	избегание, ЭК ₅₀	9.00	3-10 мин
18-21 мм	гибель, ЛК ₅₀	11.73	48 ч
10-12 мм	избегание, ЭК ₅₀	12.62	3-10 мин
<i>Hypomesus japonicus</i> , молодь, 220-280 мм	избегание, ЭК ₅₀	5.10	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	7.16	48 ч
<i>Opisthocentrus ocellatus</i> , молодь, 470-500 мм	избегание, ЭК ₅₀	0.41	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	1.90	48 ч
<i>Gasterosteus aculeatus</i> , молодь, 180-250 мм	избегание, ЭК ₅₀	7.44	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	14.0	48 ч
половозрелые, 450-500 мм	избегание, ЭК ₅₀	5.14	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	22.8	48 ч
фенол			
<i>Hypomesus japonicus</i> , молодь, 220-280 мм	избегание, ЭК ₅₀	2.66	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	2.18	24 ч
<i>Opisthocentrus ocellatus</i> , молодь, 470-500 мм	избегание, ЭК ₅₀	2.74	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	9.73	24 ч
<i>Neomysis mirabilis</i> , молодь, 7-8 мм	избегание, ЭК ₅₀	0.15	3-10 мин
	гибель, ЛК ₅₀	1.60	24 ч

Обобщая результаты исследований реакции избегания гидробионтами ЗВ, важно подчеркнуть, что она возникает:

- как оперативный отклик животных на неблагоприятные условия (уже в первые минуты тестирования);
- при существенно меньших концентрациях, чем большинство других сублетальных эффектов;
- как форма экологически значимых адаптивных реакций.

Именно поэтому, регистрация реакции избегания, получила широкое распространение в различных системах биотестирования и рекомендуется для оценки минимальных токсичных концентраций ЗВ в краткосрочных экспериментах и для биомониторинга качества вод в реальном времени. Для внедрения новых способов биотестирования качества вод и состояния биоты, определения токсичности потенциально опасных веществ, для установления ПДК необходимо использовать поведенческие реакции как рыб, так и ракообразных, поскольку они обладают существенными особенностями реагирования на присутствие поллютантов.

Список литературы

- Лукияненко В.И., Черкашин С.А. Экспериментальное обоснование возможности использования реакции избегания гидробионтами токсикантов для биотестирования качества водной среды // Физиология и биохимия гидробионтов. Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 1987. С. 48-57.
- Лукияненко В.И., Черкашин С.А., Кандинский П.А. Поведение молоди рыб и мизид в растворах токсикантов органического происхождения // Гидробиол. журн. 1987. Т. XXIII, №4. С. 64-69.

- Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989. 144 с.
- Черкашин С.А. Реакция избегания гидробионтами (молодь рыб и ракообразные) некоторых токсикантов: Автореф. канд. дис. Севастополь, 1986. 17 с.
- Черкашин С.А. Отдельные аспекты влияния углеводородов нефти на рыб и ракообразных // Вестник ДВО РАН. 2005. № 3. С. 83–91.
- Черкашин С.А., Блинова Н.К. Влияние тяжелых металлов на хеморецепцию и поведение ракообразных (обзор) // Гидробиол. журн. 2011. Т. 47, № 2. С. 89–101.
- Cherry D.S., Cairns J.Jr. Biological monitoring. Part V.: Preference and avoidance studies // Water Res. 1982. V. 16. № 3. P. 263–301.
- McNicol R.E., Scherer E. Behavioral Responses of Lake Whitefish (*Coregonus-Clupeaformis*) to Cadmium During Preference Avoidance Testing // Environ. Toxicol. and Chemistry. 1991. V. 10. № 2. P. 225–234.
- Pearson W.H., Olla B.L. Threshold for detection of naphthalene and other behavioural responses by Blue crab, *Callinectes sapidus* // Estuaries. 1980. V. 3, № 3. P. 224–229.
- Percy J.A., Mullin T.S. Effects of crude oils on the locomotory activity of Arctic marine invertebrates // Mar. Poll. Bull. 1977. V. 8, № 2. P. 35–39.
- Tierney K.B., Baldwin D.H., Hara T.J. et al. Olfactory toxicity in fishes // Aquatic Toxicol. 2010. V. 96, № 1. P. 2–26.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕСТИЦИДОВ ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ

Н.И. Щербакова, С.И. Катаскова, О.А. Зинчук

*ФГУП «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства»
г. Ростов-на-Дону, Россия, riasfp@aanet.ru*

В связи с ухудшением экологической обстановки, проблема предупреждения неблагоприятного воздействия химических веществ, и в частности пестицидов, на окружающую среду приобретает все большее экологическое и социальное значение. В связи с этим, особую роль в эколого-токсикологических исследованиях играют методы математического моделирования и прогнозирования токсичности веществ по их физико-химическим свойствам. Поиск закономерностей изменения биологической активности от строения и физико-химических свойств пестицидов открывает путь к прогнозированию опасности ксенобиотиков еще до начала их экспериментальной оценки, что дает возможность достоверно судить о сравнительной токсичности новых пестицидов, позволяет рационально планировать объем и направление токсикологических экспериментов.

Интенсивность токсического действия пестицидов определяется их химическим строением и физиологическими особенностями тест-объекта (Гусева С.С., Данильченко О.П., 1983; Корпакова И.Г., 1998; Зулькарнаев Т.Р. и др., 1999; Дрожжина Н.А., Гурова А.И., 1999.). Оценить связь токсического действия пестицидов с их химическим строением возможно при получении количественных соотношений между параметрами токсичности пестицидов и показателями, определяющимися химическим строением и выражающимися численно. В качестве таких параметров могут применяться различные физико-химические характеристики (Заугольников С.Д., 1978 и др.; Румянцев Г.И., Новиков С.М., 1979; Жолдакова З.И. и др., 2000; Смирнов В.Г. и др., 2002). Из многочисленных физико-химических характеристик действующих веществ пестицидов (молекулярная масса, температуры кипения и плавления, константа Генри и др.) нами был выбран коэффициент распределения октанол-вода (K_{ow}), не только обусловленный строением вещества, но и отражающий способность веществ проникать через биологические мембраны и накапливаться в гидрофобных участках биологических структур (Альберт Э.А., 1971; Ханч К., Лео А., 1979). В связи с тем, что биологическое действие пестицидов во многом определяется транспортно-распределительными процессами, коэффициент распределения октанол-вода является наиболее адекватным механизму токсического действия.

Целью работы являлось установление связей между коэффициентом распределения октанол-вода и токсикометрическими параметрами пестицидов различных химических классов для гидробионтов - осетровых рыб (*Acipenseridae*) на ранних стадиях онтогенеза и дафний (*Daphnia magna* Straus.). В соответствии с поставленной целью проведен анализ степени токсичности современных химических классов пестицидов, проходивших нормирование для воды рыбохозяйственных водоемов в отделе рыбохозяйственной токсикологии ФГУП АзНИИРХ с 1995 г., для эмбрионов, предличинок осетровых (осетр, севрюга, бестер) и дафний.

Таблица 1. Математические модели прогноза токсикометрических параметров пестицидов для эмбрионов, предличинок осетровых рыб и дафний

Тест-объект	Регрессионные уравнения	Статистические параметры	Модели прогноза
Действующие вещества пестицидов			
Эмбрионы	$\lg LK_{16} = 2.093 - 0.441 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.78, p < 0.00006$	$LK_{16} = 10^{(2.093 - 0.441 \times \lg Kow)}$
	$\lg LK_{50} = 2.223 - 0.358 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.75, p < 0.0004$	$LK_{50} = 10^{(2.223 - 0.358 \times \lg Kow)}$
	$\lg LK_{84} = 2.407 - 0.302 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.70, p < 0.002$	$LK_{84} = 10^{(2.407 - 0.302 \times \lg Kow)}$
Предличинки	$\lg LK_{16} = 2.456 - 0.637 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.92, p < 0.0000001$	$LK_{16} = 10^{(2.456 - 0.637 \times \lg Kow)}$
	$\lg LK_{50} = 2.988 - 0.717 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.89, p < 0.000002$	$LK_{50} = 10^{(2.988 - 0.717 \times \lg Kow)}$
	$\lg LK_{84} = 3.234 - 0.714 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.87, p < 0.000006$	$LK_{84} = 10^{(3.234 - 0.714 \times \lg Kow)}$
Дафнии	$\lg LK_{16} = 1.711 - 0.535 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.83, p < 0.0000001$	$LK_{16} = 10^{(1.711 - 0.535 \times \lg Kow)}$
	$\lg LK_{50} = 2.030 - 0.461 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.84, p < 0.0000001$	$LK_{50} = 10^{(2.030 - 0.461 \times \lg Kow)}$
	$\lg LK_{84} = 2.284 - 0.392 \times \lg K_{ow}$	$R = -0.86, p < 0.0000001$	$LK_{84} = 10^{(2.284 - 0.392 \times \lg Kow)}$

В ходе исследований проведена проверка соответствия величин токсикометрических параметров, рассчитанных на основании результатов эксперимента, их теоретическим уровням, рассчитанным по разработанным моделям прогноза. Расчеты показали, что более 80% значений токсикометрических параметров действующих веществ пестицидов, рассчитанных по прогностическим моделям, находились в пределах одного порядка с экспериментально-установленными (табл.2-4).

Таблица 2. Параметры токсичности действующих веществ пестицидов для эмбрионов осетровых рыб

№	Действующее вещество пестицида	$\lg K_{ow}$	Экспериментальные ЛК, мг/л			Прогнозируемые ЛК, мг/л		
			LK_{16}	LK_{50}	LK_{84}	LK_{16}	LK_{50}	LK_{84}
1	Феноксапроп-П-этил	4.58	9.00	21.6	36.9	1.18	3.83	10.56
2	Квизалофоп-П-тефурил	4.32	5.197	11.735	22.063	1.54	4.75	12.66
3	Феноксикарб	4.07	10.26	15.95	34.76	1.98	5.83	15.06
4	Фипронил	4.0	0.07	0.34	1.53	2.13	6.18	15.81
5	Толилфлуонид	3.95	0.76	4.32	24.20	2.36	6.71	16.95
6	Имазалил	3.82	1.55	3.28	6.93	2.56	7.17	17.92
7	Клодинафоп-пропаргил	3.8	0.65	1.91	5.62	2.61	7.29	18.17
8	Пенконазол	3.72	4.24	37.00	77.20	2.83	7.78	19.21
9	Тебуконазол	3.7	14.05	26.25	45.75	2.89	7.91	19.48
10	Триадимефон	3.11	19.50	20.60	23.70	2.27	12.87	29.36
11	Триадименол	3.08	8.06	21.55	57.65	5.42	13.19	29.98
12	Фуберидазол	2.67	0.678	1.82	4.88	8.23	18.50	39.87
13	Металаксил	1.71	5.68	28.90	90.10	20.95	39.49	75.60
14	Метамитрон	0.83	51.36	107.03	223.02	53.33	84.31	143.33
15	Иодосульфурон-метил натрия	0.7	1000.0	-	-	60.86	-	-
16	Имидаклоприд	0.57	33.63	70.71	148.67	69.44	104.46	171.74
17	Изоксафлютол		13.80	68.28	149.24	85.51	123.69	198.05
18	Глуфосинат аммония	0.1	247.00	356.30	491.10	111.92	153.89	238.12

Таблица 3. Параметры токсичности действующих веществ пестицидов для предличинки осетровых рыб

№	Действующее вещество пестицида	lgK _{ow}	Экспериментальные ЛК, мг/л			Прогнозируемые ЛК, мг/л		
			ЛК ₁₆	ЛК ₅₀	ЛК ₈₄	ЛК ₁₆	ЛК ₅₀	ЛК ₈₄
1	Феноксапроп-П-этил	4.58	0.27	0.44	0.64	0.35	0.51	0.92
2	Квизалофоп-П-тефурил	4.32	0.102	0.235	0.539	0.51	0.78	1.41
3	Феноксикарб	4.07	0.72	1.25	2.44	0.73	1.17	2.12
4	Фипронил	4.0	0.11	0.15	0.21	0.81	1.32	2.38
5	Толилфлуонид	3.95	0.127	0.153	0.185	0.94	1.55	2.81
6	Имазалил	3.82	3.39	7.93	18.55	1.05	1.77	3.20
7	Клодинафоп-пропаргил	3.8	0.51	1.25	3.06	1.08	1.83	3.31
8	Пенконазол	3.72	2.80	17.60	59.00	1.22	2.09	3.78
9	Тебуконазол	3.7	6.91	9.54	12.10	1.26	2.16	3.90
10	Триадимефон	3.11	16.50	20.60	23.70	2.98	5.73	10.29
11	Триадименол	3.08	13.38	23.64	41.77	3.11	6.02	10.81
12	Фуберидазол	2.67	2.71	5.61	11.63	5.69	11.85	21.21
13	Металаксил	1.71	21.60	65.50	133.00	21.94	54.11	96.27
14	Метамитрон	0.83	103.60	188.32	342.32	84.58	247.11	436.90
15	Иодосульфурон-метил натрия	0.7	>500.0	-	-	102.35	-	-
16	Имидаклоприд	0.57	116.11	123.18	130.68	123.85	379.59	669.92
17	Глуфосинат аммония	0.1	345.40	889.10	2289.1	246.77	824.71	1450.78
18	Хлорсульфурон	- 0.99	1000.0	-	-	1220.8	-	-
19	Метсульфурон-метил	- 1.74	>500.0	-	-	3667.6	-	-

Таблица 4. Параметры токсичности действующих веществ пестицидов для дафний

№	Действующее вещество	lgK _{ow}	Экспериментальные ЛК, мг/л			Прогнозируемые ЛК, мг/л		
			ЛК ₁₆	ЛК ₅₀	ЛК ₈₄	ЛК ₁₆	ЛК ₅₀	ЛК ₈₄
1	Лямбда-цигалотрин	7.0	0.00069	0.00712	0.073	0.0092	0.0634	0.350
2	Фамоксадон	4.65	0.136	0.436	0.805	0.167	0.770	2.91
3	Индоксикарб	4.6	0.287	1.217	4.603	0.177	0.812	3.04
4	Феноксапроп-П-этил	4.58	1.42	1.795	2.175	0.182	0.830	3.10
5	Флуазифоп-П-бутил	4.5	0.163	1.09	9.55	0.201	0.903	3.33
6	Квизалофоп-П	4.32	1.54	2.50	3.45	0.250	1.09	3.92
7	Диниконазол	4.3	0.073	0.64	4.25	0.257	1.12	3.99
8	Дифенокконазол	4.2	0.01	0.022	0.047	0.290	1.24	4.36
9	Феноксикарб	4.07	0.0235	0.568	4.56	0.341	1.43	4.97
10	Фипронил	4.0	0.0099	0.172	1.285	0.371	1.54	5.23
11	Толилфлуонид	3.95	3.325	6.75	10.15	0.395	1.62	5.47
12	Мефенпир-диэтил	3.83	9.85	20.5	30.95	0.458	1.84	6.09
13	Имазалил	3.82	0.298	2.20	6.95	0.464	1.86	6.15
14	Тебуконазол	3.7	2.25	7.0	18.4	0.538	2.11	6.85
16	Хлорпрофам	3.4	1.60	4.78	15.30	0.778	2.90	8.98
17	Десмедифам	3.39	0.044	0.34	0.94	0.788	2.93	9.06
18	Триадимефон	3.11	6.3	16.0	39.0	1.11	3.95	11.66
19	Триадименол	3.08	11.5	45.75	88.75	1.15	4.08	11.98
20	Спироксамин	2.79	2.6	4.0	5.8	1.65	5.54	15.56
21	Фуберидазол	2.67	0.424	3.76	11.2	1.91	6.30	17.33
22	Изоксафлютол	2.32	52.25	77.75	103.25	2.94	9.13	23.76
23	Флутриафол	2.3	1.72	7.21	37.0	3.02	9.33	24.20
24	Тралкоксидим	2.1	11.2	27.5	56.0	3.86	11.53	28.98
25	Метрибузин	1.58	20.359	40.972	82.5	7.33	20.03	46.31
26	Метамитрон	0.83	34.8	85.0	138.5	18.47	44.39	91.04
27	Оксадикил	0.73	55.5	173.5	285.0	23.06	53.73	107.08
28	Имидаклоприд	0.57	73.5	112.5	151.0	25.45	58.49	115.09
29	Хлоримурон-этил	0.36	115.0	252.0	552.0	44.86	95.30	174.23
30	Глуфосинат аммония	0.1	495.0	685.0	876.0	45.41	96.32	175.81
31	Просульфурон	- 0.21	10.572	21.390	43.710	66.54	133.84	232.50
32	Трибенурон-метил	- 0.44	31.6	62.8	125.2	88.35	170.84	286.06
33	Азисульфурон	- 1.37	452.5	800.0	1190.0	277.9	458.4	661.54
34	Римсульфурон	- 1.47	83.75	173.75	360.0	314.4	509.7	723.94
35	Метсульфурон-метил	- 1.74	510.0	695.0	877.5	438.5	678.8	923.44
36	Пропамокарб-гидрохлорид	- 2.6	212.0	323.0	433.0	1265.4	1691.0	2004.9

Для определения степени острой токсичности пестицидов для исследуемых гидробионтов были рассчитаны токсикометрические параметры на основе выживаемости дафний, эмбрионов и предличинок в токсических средах пестицидов. Корреляционно-регрессионный анализ, проведенный между $\lg K_{ow}$ и остро-летальными концентрациями - $\lg LK_{16}$, $\lg LK_{50}$ и $\lg LK_{84}$ для эмбрионов и предличинок осетровых рыб (*Acipenseridae*), выявил достоверную обратную линейную зависимость: с уменьшением $\lg K_{ow}$ наблюдалось увеличение логарифмических значений токсикометрических параметров, то есть уменьшение токсичности. Аналогичные результаты были получены при проведении корреляционно-регрессионного анализа между величинами $\lg K_{ow}$ и токсикометрическими параметрами для дафний.

Таким образом, на основании установленных достоверных корреляционно-регрессионных зависимостей были разработаны соответствующие математические модели прогноза, позволяющие расчетным путем до постановки эксперимента определить параметры острой токсичности пестицидов.

Список литературы.

- Альберт Э. Избирательная токсичность. - М.: Мир, 1971. - 431 с.
Гусева С.С., Данильченко О.П. Реагирование эмбрионов и личинок карпа на фосфорорганические соединения // Реакции гидробионтов на загрязнение. - М., 1983. - С.158-167
Дрожжина Н.А., Гурова А.И. Влияние радикалов молекул фосфорорганических соединений на их биологическую активность // Гигиена и санитария. - 1999, №3 - С.61-63
Жолдакова З.И., Харчевникова Н.В., Журков В.С., Синицына О.О. К обоснованию безвредных уровней для единого гигиенического нормирования веществ // Гигиена и санитария - 2000, №6. - С.51-54
Заугольников С.Д., Качанов М.М., Лойт О.О., Ставчанский И.И. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ. - Л: Медицина. - 1978. - 182 с.
Зулькарнаев Т.Р., Соломинова Т.С., Тюрина Л.А., Максимов Г.Г., Еникеев Д.А. Некоторые вопросы изучения связи между строением химических соединений и их действием на репродуктивную функцию и эмбриогенез // Токсикол. вестн. - 1999, № 2. - С. 17-21
Корпакова И.Г. Реакция гидробионтов на действие пестицидов разных классов // Сб. науч. трудов АзНИИРХ. - Ростов-на-Дону, 1998. - С.490-501
Румянцев Г.И., Новиков С.М. Ориентировочная оценка токсичности химических веществ. - М., 1979. - 52 с.
Смирнов В.Г., Маймулов В.Г., Нечипоренко С.П., Ллойт А.О., Лоянич А.А., Колбасов С.Е. Расчетные методы оценки опасности в гигиенического нормирования вредных веществ в разных средах. - С-Петербург, 2002. - 112 с.
Hansch C., Leo A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. - New York. - 1979.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТОКСИРЕЗОРУФИН-О-ДИЭТИЛАЗЫ В ПЕЧЕНИ И ПОЧКАХ ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA L.*) ИЗ РЫБИНСКОГО И ГОРЬКОВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩ

В.В. Юрченко¹, Г.М. Чуйко¹, Е.А. Флёрова²

¹ Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
Ярославская область, п. Борок, Россия,

² Ярославская государственная сельскохозяйственная академия
г. Ярославль, Россия, viksapiksa@gmail.com

Каталитическая активность этоксирезорурфин-О-диэтилазы (ЭРОД) гидробионтов интенсивно используется за рубежом в качестве биомаркера загрязнения водной среды органическими ксенобиотиками. Подавляющее большинство проектов по биомониторингу ориентировано на измерение величины данного показателя в печени, так как этот орган характеризуется максимальной активностью ЭРОД (Biomonitoring of environmental..., 2000; Hinch et al., 2004 и др.).

В целях расширения знания о биотрансформации чужеродных соединений необходимо получить информацию о степени выраженности индукции ЭРОД в естественной среде не только в печени, но и в почках – органе, также «ответственном» за трансформацию различных соединений.

Цель работы – определить каталитическую активность ЭРОД в печени и почках пресноводной костистой рыбы леща *Abramis brama L.* из Рыбинского и Горьковского водохранилищ.

Лещ (46 особей длиной 22–48 см и массой 250–2300 г) был отловлен в сентябре 2010 г. донным тралом в южной части Шекснинского, северной и южной частях Главного плёсов Рыбинского водохранилища и в 4 точках озерной части Горьковского водохранилища на участке между устьем р. Елнать и плотиной в г. Городец. Сразу после отлова рыб обездвигивали, регистрировали размерно-весовые характеристики, вычисляли индекс соотношения массы и длины тела по Кларк, вскрывали и извлекали печень и почки. От каждого органа отбирали навеску около 0.5 г, сразу же замораживали и хранили в жидком азоте до проведения биохимического анализа. Активность фермента определяли в постмитохондриальной и микросомальной фракциях. Для получения постмитохондриальной фракции навески печени и почек гомогенизировали в 1.5 мл буфера (1мМ ЭДТА 0.15 М KCl, pH 7.5), гомогенат центрифугировали при 10724 g (4°C, 40 мин). Для получения микросомальной фракции пробу гомогенизировали в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), центрифугировали при 10724 g (4°C, 25 мин), супернатант центрифугировали при 125423 g (4°C, 40 мин). Микросомальный осадок ресуспендировали в том же фосфатном буфере. Обе фракции хранили в жидком азоте до проведения аналитических процедур. Активность фермента определяли флюоресцентным методом (Franco et al., 2002; Hinck et al., 2004). Анализ проводили в 96-луночных планшетах на люминесцентном спектрофотометре LS 55 (PerkinElmer). Планшеты с реакционной смесью – фосфатный буфер, 7-этоксирезорифин, НАДФ·Н (MP Biomedicals) и анализируемая проба – инкубировали 40 минут при 27°C (постмитохондриальная фракция) и 10 минут при 25°C (микросомальная фракция). Каждую пробу анализировали в трёх повторностях. Флюоресценцию образовавшегося резорифина измеряли при длинах волн возбуждения и эмиссии 530 нм и 580 нм, соответственно. Для построения калибровочной кривой использовали стандарт резорифина (MP Biomedicals). Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Активность ЭРОД выражали в пмоль на мг белка в исследуемой фракции в минуту времени реакции (пмоль/мг/мин).

Статистический анализ проводился с использованием стандартного пакета программ STATGRAFICS Plus. Значения представляли в виде средних величин и их ошибок с крайними значениями в скобках. Достоверность различий оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и процедуры LSD-теста при уровне значимости $p < 0.05$.

Среднее значение активности ЭРОД в микросомальной фракции ($n = 20$) составило в печени -20.67 ± 5.42 (1.91–116.65), в почках -7.75 ± 1.97 (0–35.31) и в постмитохондриальной фракции ($n = 26$) в печени -0.391 ± 0.1 (0–2.55), в почках -0.024 ± 0.01 (0–0.23) пмоль/мг/мин. У двух особей ЭРОД-активность в микросомальной фракции почек была больше, чем в печени (в 1.36 и 1.65 раза), у одной рыбы в постмитохондриальной фракции почек была зафиксирована активность 0.046 пмоль/мг/мин при нулевой активности в печени. У 13 % от общей выборки ($n = 46$) активность фермента в почках была меньше, чем в печени только в 1,03–1,66 раза.

Проведение дисперсионного анализа позволило выявить среднюю корреляцию между активностью фермента и индексом соотношения массы и длины тела в постмитохондриальной фракции: $r = -0.53$ $p < 0.01$ (печень), $r = -0.57$ $p < 0.01$ (почки). В микросомальной фракции обратная зависимость ЭРОД-активности от индекса соотношения длины и массы леща зафиксирована в печени ($r = -0.5$ $p < 0.05$).

Полученные средние значения ЭРОД-активности в печени достоверно выше, чем в почках в обеих фракциях, что соответствует описанной для других видов модели. Диапазон значений признака позволяет сделать вывод, что в данной выборке представлена как базовая, так и индуцированная активность, которую можно отнести к умеренной и сильной (Whyte et al., 2000).

Печень характеризуется выраженным ответом на загрязнение окружающей среды, получает «основную» нагрузку в процессах биотрансформации ксенобиотиков. Но при определённых условиях вклад почек в метаболизм чужеродных соединений может быть весьма значительным. Ранее в экспериментах с радужной форелью (Pesonen et al., 1987; Huuskonen et al., 1996) был отмечен сходный ответ организма на действие сильных индукторов: бета-нафтофлавона, ПХБ 77, ПХБ 126. Возможными основаниями такого ответа были названы путь поступления ксенобиотиков, их перераспределение в организме, период полутрансформации соединений (Huuskonen et al., 1996).

Результаты дисперсионного анализа указывают на то, что уровень ЭРОД-активности в некоторой степени может зависеть от индекса соотношения длины и массы рыбы. Однако, для проверки этой гипотезы необходимо более детальное изучение локальных популяций с привлечением данных об уровнях биоаккумуляции в рыбе ксенобиотиков, способных индуцировать активность ЭРОД.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории экологии рыб ИБВВ РАН за помощь в проведении исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-01168-а.

Список литературы

- Biomonitoring of environmental status and trends (BEST) program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. Eds: Schmitt C.J., Dethloff G.M. U.S. Geological Survey: Information and technology report. 2000. 81 p.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Franco A., Malavasi S., Pranovi F., Nasci C., Torricelli P. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and fluctuating asymmetry (FA) in *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae) as indicators of environmental stress in the Venice lagoon // *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 2002. Vol. 9. P. 239–247.
- Hinck J.E., Bartish T.M., Blazer V.S., Denslow N.D., Gross T.S., Myers M.S., et al. Biomonitoring of environmental status and trends (BEST) program: environmental contaminants and their effects on fish in the Yukon River basin. U.S. Geological Survey: Information and technology report. 2004.
- Huuskonen S., Lindström-Seppä P., Koponen K., Roy S. Effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls (congeners 77 and 126) on cytochrome P4501A and conjugation activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1996. Vol. 113C, No. 2. P. 205–213.
- Pesonen M., Celander M., Forlin L., Andersson T. Comparison of xenobiotic biotransformation enzymes in kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1987. Vol. 91. No. 1. P. 75–84.
- Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J., Tillitt D.E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure // *Critical Reviews in Toxicology*. 2000. Vol. 30. Is. 4. P. 347–570.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
СУДЬБА, БИОДОСТУПНОСТЬ, БИОТРАНСФОРМАЦИЯ, БИОАККУМУЛЯЦИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ	
<i>Амирова А.Р., Гризориади А.С., Киреева Н.А., Онегова Т.С.</i> УСКОРЕНИЕ БИОДЕСТРУКЦИИ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ....	5
<i>Войкина А.В., Бугаев Л.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ В ПЕЧЕНИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ АЗОВСКОГО МОРЯ В 2009–2010 ГГ.....	7
<i>Давыдова Н.С., Зотина Т.А., Трофимова Е.А.</i> СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ВОДЕ И ВОДНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ Р. ЕНИСЕЙ НА РАЗНОМ УДАЛЕНИИ ОТ Г.КРАСНОЯРСКА.....	12
<i>Камшилова Т.Б., Комов В.Т., Гремячих В.А.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕМПА РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ РТУТИ В ОРГАНИЗМЕ ОКУНЯ <i>PERCA FLUVIATILIS</i> L. ИЗ ОЗЕР ДАРВИНСКОГО, РДЕЙСКОГО И ПОЛИСТОВСКОГО ЗАПОВЕДНИКОВ.....	15
<i>Комов В.Т., Тиллитт Д., Брумбо В., Эрденбат М., Жавзан Ч., Гремячих В.А.</i> СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В МЫШЦАХ РЫБ ИЗ РЕКИ ОРХОН И ЕЁ ПРИТОКОВ (МОНГОЛИЯ).....	19
<i>Кондратьева Л.М., Морозова О.Ю., Литвиненко З.Н.</i> РОЛЬ БИОПЛЕНОК В ТРАНСФОРМАЦИИ СТОЙКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ.....	22
<i>Крупина М.В.</i> ВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ.....	26
<i>Кудрявцева В.А., Новичкова А.А., Крупина М.В.</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАЗЛИЧНЫХ ГИДРОБИОНТАХ.....	28
<i>Лукьянова О.Н., Бродский Е.С., Чуйко Г.М.</i> СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ЭСТУАРНЫХ ЗОН ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ).....	32
<i>Небесихина Н.А., Павлов Д.Ф.</i> ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В МОЛЛЮСКАХ р. DREISSENA ИЗ ВОДОХРАНИЛИЩ МАНЫЧСКОГО КАСКАДА.....	35
<i>Резяпова К.И., Гурьева Л.В., Степанова Н.Ю., Фаттахов С.Г.</i> ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА МЕЛАФЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ И ТОКСИЧНОСТЬ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ.....	40
<i>Руднева И.И., Омельченко С.О., Рощина О.В.</i> БИОАККУМУЛЯЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ВИДАМИ-ИНДИКАТОРАМИ ПРИБРЕЖНЫХ ВОД СЕВАСТОПОЛЯ.....	42
<i>Рябухина Е.В.</i> ИЗМЕНЕНИЕ КАЧЕСТВА СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ САМООЧИЩЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ВОДОЕМОВ ОТ СИНТЕТИЧЕСКИХ МОЮЩИХ СРЕДСТВ.....	46
<i>Светашова Е.С.</i> О НАКОПЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РЫБАХ.....	50
<i>Сеник Ю.И., Бияк В.Я., Хоменчук В.А., Курант В.З.</i> ОСОБЕННОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ИОНОВ ЦИНКА И КАДМИЯ ЖАБРАМИ КАРПА.....	53
<i>Сливинский Г.Г.</i> УРОВЕНЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ БАССЕЙНА СРЕДНЕГО ТЕЧЕНИЯ РЕКИ ИЛИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ.....	57
<i>Сухоруков Б.Л., Новиков И.В.</i> ГОМЕОСТАЗ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ПО ДАННЫМ ДИСТАНЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ.....	59
<i>Трофимова Е.А., Зотина Т.А., Болсуновский А.Я.</i> ТЕХНОГЕННЫЕ РАДИОНУКЛИДЫ В КОМПОНЕНТАХ ВОДНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ СЕТЕЙ В РАЙОНЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ Р.ЕНИСЕЙ.....	64
<i>Цыганков В.Ю., Боярова М.Д., Лукашкина А.А., Лукьянова О.Н.</i> СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ В ОРГАНАХ СЕРОГО КИТА (<i>ESCHRICHTIUS ROBUSTUS</i>) ИЗ БЕРИНГОВА МОРЯ.....	66

БИОХИМИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ НА ДЕЙСТВИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

<i>Акатьева Т.Г.</i> РАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ СЛОЖНЫХ ТЕХНИЧЕСКИХ СМЕСЕЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ НЕФТЕДОБЫЧЕ, ДЛЯ РАКООБРАЗНЫХ.....	70
<i>Барбухо Е. В.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА <i>VACILLUS</i> ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА РЫБ.....	72
<i>Блинова Н.К., Черкашин С.А.</i> ОБОНЯНИЕ КАК СЕНСОРНАЯ ОСНОВА ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ РАКООБРАЗНЫХ НА ЗАГРЯЗНЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА....	74
<i>Гдовский П.А., Ружинская Н.Н.</i> ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ РЫБ.....	76
<i>Гершкович Д.М., Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф.</i> ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТОКСИКАНТЫ, КАК СРЕДСТВО СТИМУЛЯЦИИ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ.....	80
<i>Гинатуллина Е.Н., Камая М.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИЛЬТРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ <i>DAPHNIA MAGNA</i> ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ТЕСТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОБУС.....	83
<i>Гнатишина Л.Л., Фальфушинская Г.И., Бажура Я.В., Столяр О.Б.</i> РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТАЛЛ-ДЕПОНИРУЮЩЕЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ФУНКЦИЙ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ <i>ANODONTA CYGNEA</i> В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ.....	88
<i>Голованов В.К.</i> РЕАКЦИИ РЫБ НА ТОКСИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА В ЗОНЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР У ГРАНИЦ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ.....	92
<i>Голованова И.Л., Аминов А.И.</i> ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАП НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ РЫБ И ИХ КОРМОВЫХ ОБЪЕКТОВ.....	95
<i>Гудимов А.В.</i> ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ НА МОДЕЛЬНЫЕ ТОКСИКАНТЫ.....	100
<i>Денисова Т.П.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОБИОНТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ.....	102
<i>Дорохова И.И.</i> ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В ПЕЧЕНИ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ АКВАТОРИЙ.....	104
<i>Заботкина Е.А., Флерова Е.А.</i> ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАДМИЯ НА НЕКОТОРЫЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГОЛЫЦА УСАТОГО.....	108
<i>Зейферт Д.В., Габбасова Д.Т., Гареева Е.Ф., Цыбина Л.Г.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИТОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД.....	112
<i>Изюмов Ю.Г.</i> ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РЫБ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ХИМИЧЕСКИМИ И ФИЗИЧЕСКИМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ.....	116
<i>Ирейкина С.А., Лукьянова О.Н.</i> АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У РЫБ ИЗ ЭСТУАРНОЙ ЗОНЫ РЕКИ РАЗДОЛЬНАЯ (ПРИМОРСКИЙ КРАЙ).....	118
<i>Камардин Н.Н., Любимцев В.А., Корниенко Е.Л., Удалова Г.П.</i> ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЗАЩИТНЫЕ РЕФЛЕКСЫ У МОЛЛЮСКОВ (СРАВНИТЕЛЬНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ).....	121
<i>Капков В.И., Шошина Е.В.</i> РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ МОРСКИХ ВОД НЕФТЬЮ.....	126
<i>Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н.</i> БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ЭКСПРЕСС – МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ.....	129
<i>Крылова Е.Г.</i> ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП В РАСТВОРАХ СУЛЬФАТА МЕДИ.....	133
<i>Кузнецов В.В.</i> КАСПИЙСКИЙ ТЮЛЕНЬ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ....	145
<i>Кузнецова Т.В., Богданова Д.Л., Холодкевич С.В.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДЫ НА ОСНОВЕ БИОМАРКЕРОВ ПОВЕДЕНИЯ И КАРДИОАКТИВНОСТИ БРЮХОНОГОГО МОЛЛЮСКА <i>ROMA SEA SP</i>	138
<i>Кузьмина В.В., Комов В.Т., Гремячих В.А., Русанова П.В., Гладков А.В.</i> ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ РТУТИ В КОРМЕ РЫБ НА ПРОЦЕССЫ ЭКЗОТРОФИИ У КАРПА.....	146

Кузьминова Н.С. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЧЕРНОМОРСКОЙ СТАВРИДЫ <i>TRACHURUS MEDITERRANEUS</i> , ОТЛОВЛЕННОЙ В БУХТАХ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....	150
Кулева Н.В. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМИКИ В ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ.....	154
Левина И.Л., Федорова Е.А., Кузнецова Л.Я., Зинчук О.А. ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ ЭСТЕРАЗ У КАРПОВЫХ РЫБ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ПЕСТИЦИДАМИ РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ.....	155
Мартемьянов В.И., Маврин А.С. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ОРГАНИЗМ ОКУНЯ ПРИ ПОРОГОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ КАТИОНОВ В ПРЕСНОЙ ВОДЕ.....	159
Мехтиев А.А., Палатников Г.М., Мовсум-заде С.К. ВОЗМОЖНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ МУТАГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ.....	162
Минакова В.В., Соловых Г.Н., Карнаухова И.В. ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ СЕМЕЙСТВА UNIONIDAE.....	165
Михайлова Л.В., Косухина Л.Л. РЕАКЦИЯ ПИЯВКИ МЕДИЦИНСКОЙ <i>HIRUDO MEDICINALIS</i> НА ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ НЕФТИ (ВРФН) И ИНГИБИТОРА КОРРОЗИИ ИКБ-6-2 РАЗДЕЛЬНО И СОВМЕСТНО.....	169
Мищенко Т.В., Жиденко А.А., Заворотинский А.В. ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КАРПА В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ ГЕРБИЦИДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОЁМОВ.....	173
Оганесова Е.В., Филенко О.Ф. ДЕЙСТВИЕ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ НА БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ <i>Planorbis corneus</i> В ХРОНИЧЕСКОМ ОПЫТЕ	177
Палатников Г.М., Вагабова Г.Р., Абдурахманова Р.Ю. ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ОТРАБОТАННЫХ АВТОПОКРЫШЕК НА МОЛОДЬ ЮЖНО-КАСПИЙСКОГО ОСЕТРА (<i>ACIPENCER GÜLDENSTÄDTI PERSICUS NATION KURENSIS</i>).....	181
Папченкова Г.А. ХРОНИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНСЕКТИЦИДА ТАНРЕК НА <i>DAPHNIA MAGNA STRAUS</i> (CLADOCERA).....	184
Пенькова Г.А. АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ В КИШЕЧНИКЕ ОКУНЯ ИЗ АЦИДНЫХ ОЗЕР С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ РТУТИ.....	188
Петухова Г.А. БИОХИМИЧЕСКИЙ ОТВЕТ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ХРОНИЧЕСКОЕ НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ СРЕДЫ.....	191
Петухова Е.С., Петухова Г.А., Перекупка А.Г. АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ И ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ.....	194
Подунай Ю.А., Залевская И.Н. ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ.....	199
Поликарпова Л.В., Цветков И.Л., Коничев А.С. КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА–МЕНТЕН КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ, КАК КРИТЕРИЙ АНТРОПОГЕННОГО ВЛИЯНИЯ НА ВНУТРИВИДОВУЮ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЮ ЛЕЩА (<i>ABRAMIS BRAMA</i>) В РЫБИНСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ.....	203
Саксонов М. Н., Балаян А.Э., Таран Д.О., Бархатова О.А. ВЛИЯНИЕ РЯДА ТОКСИКАНТОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА КЛЕТОК ВОДОРΟΣЛЕЙ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ОСЛАБЛЕНИЯ ГУМАТАМИ.....	207
Сладкова С.В., Холодкевич С.В. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ДАФНИЯМИ КАК БИОМАРКЕР КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ.....	209
Субботин М.А., Григорьев Ю.С. ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РЯСКУ МАЛУЮ ПРИ ИХ ИНФИЛЬТРАЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ.....	212
Таликина М.Г., Крылов В.В. ВЛИЯНИЕ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ НА МИТОЗ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК ПЛОТВЫ (<i>RUTILUS RUTILUS</i>) И ЛЕЩА (<i>ABRAMIS BRAMA</i>)....	215
Урванцева Г.А., Грачева Е.Л., Гоголева А.М., Берко И.А. ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА И АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ У ОЛИГОХЕТ <i>TUBIFEX TUBIFEX</i> ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РТУТЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В КОРМЕ.....	217

Филиппов А.А. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ В КИШЕЧНИКЕ СЕГОЛЕТКОВ ПЛОТВЫ <i>RUTILUS RUTILUS</i> (L.).....	220
Холодкевич С.В., Иванов А.В., Трусевич В.В., Кузнецова Т.В. НОВЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ СОСТОЯНИЯ (ЗДОРОВЬЯ) ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ АДАПТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ С ПОМОЩЬЮ СТАНДАРТИЗОВАННЫХ ТЕСТ-ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	224
Цветков И.Л., Цветкова М.А., Коничев А.С. МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА МОЛЛЮСКОВ И ИХ УЧАСТИЕ В МЕЖПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В КОНТРАСТНЫХ УСЛОВИЯХ ОБИТАНИЯ.....	227
Чеботарева Ю.В. МЕТОДИКА ПОДСЧЁТА ПОЗВОНКОВ У ПЛОТВЫ <i>RUTILUS RUTILUS</i> (CYPRINIDAE, CYPRINIFORMES) С АНОМАЛИЯМИ ПОЗВОНОЧНИКА, ПОЛУЧЕННЫМИ ПОСЛЕ ТОКСИЧЕСКОГО, ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО И ТЕРМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭМБРИОНЫ.....	231
Черкашин С.А. ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ ИЗБЕГАНИЯ ТОКСИКАНТОВ У РЫБ И РАКООБРАЗНЫХ.....	233
Щербакова Н.И., Катаскова С.И., Зинчук О.А. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕСТИЦИДОВ ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ.....	237
Юрченко В.В., Чуйко Г.М., Флёрова Е.А КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТОКСИРЕЗОРУФИН-О-ДИЭТИЛАЗЫ В ПЕЧЕНИ И ПОЧКАХ ЛЕЩА (<i>ABRAMIS BRAMA</i> L.) ИЗ РЫБИНСКОГО И ГОРЬКОВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩ.....	240
СОДЕРЖАНИЕ	242

