

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 раундап 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 рН 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-(фосфометил)-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:

$$K_p = 0.07 - 0.23 * T_n,$$

где K_p – концентрация раундапа (мг/дм^3) в водной среде; T_n – активность каталазы в почках карпов (ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{см}^3 \cdot \text{с}$).

Таблица 1. Корреляционная матрица зависимости между концентрацией раундапа (мг/дм^3) и активностью каталазы в тканях карпов (ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{см}^3 \cdot \text{с}$)

	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.

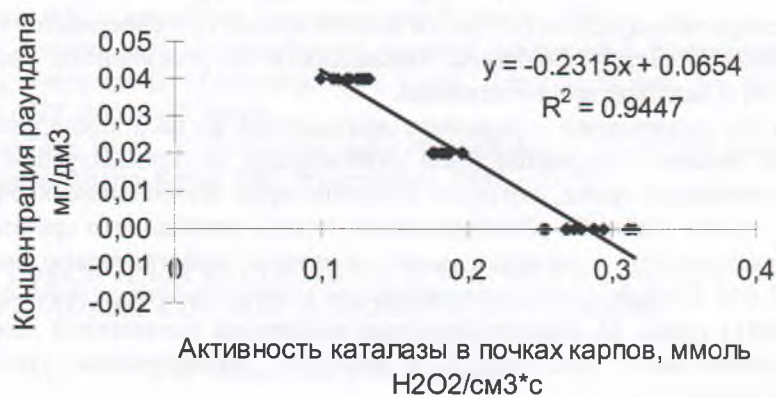


Рис. 1. Зависимость активности каталазы в почках карпов от концентрации раундапа.

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/дм^3) и содержанием гидроперекисей липидов в тканях карпов (y.e./см^3)

	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 водоёмов, 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:

$$K_p = 0.06 - 0.01 * T_m,$$

где K_p – концентрация раундапа ($\text{мг}/\text{дм}^3$) в водной среде; T_m – содержание гидроперекисей липидов в мышцах карпов ($\text{у.е.}/\text{см}^3$). 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:

$$K_p = -0.04 + 0.01 * T_{ж},$$

где K_p – концентрация раундапа ($\text{мг}/\text{дм}^3$) в водной среде; $T_{ж}$ – содержание гидроперекисей липидов в жабрах карпов ($\text{у.е.}/\text{см}^3$). 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:

$$K_p = -0.04 + 0.01 * T_n,$$

где K_p – концентрация раундапа ($\text{мг}/\text{дм}^3$) в водной среде; T_n – содержание гидроперекисей липидов в почках карпов ($\text{у.е.}/\text{см}^3$). 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:

$$K_p = 0.08 - 0.02 * T_m,$$

где K_p – концентрация раундапа ($\text{мг}/\text{дм}^3$) в водной среде; T_m – содержание малонового диальдегида в мышцах карпов ($\text{мкмоль}/\text{дм}^3$). 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:

$$K_p = 0.11 - 0.01 * T_{мг},$$

где K_p – концентрация раундапа ($\text{мг}/\text{дм}^3$) в водной среде; $T_{мг}$ – содержание малонового диальдегида в мозге карпов ($\text{мкмоль}/\text{дм}^3$). Величина адекватности регрессионного уравнения $R^2 = 0.98$, что свидетельствует о высокой аппроксимации.

Таблица 3. Корреляционная матрица зависимости между концентрацией раундапа ($\text{мг}/\text{дм}^3$) и содержанием малонового диальдегида в тканях карпов ($\text{мкмоль}/\text{дм}^3$)

	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/дм^3) в водной среде; T_n – содержание малонового диальдегида в почках карпов (мкмоль/дм^3). 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.

- Агеев В. О., Дерев'яноко С. В., Дяченко Г. М. Антиоксидантный 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.академкнига, 1999. – 750 с
- Заверуха Н.М., Серебряков В.В., Скиба Ю.А. Основы экології. – Київ, 2006. – 134 с.
- Руднева И.И. Ответные реакции рыб на загрязнение морских акваторий // Биоразнообразии 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*, *Potamea 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