

... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ... ZOOLOGY AND ECOLOGY ...

УДК: [579.64+574.64]+597.551.2:577.124

Использование пробиотика с целью компенсации негативного влияния гербицидной нагрузки на рыб **Е.В.Барбухо¹, Е.В.Бибчук¹, А.А.Жиденко¹, Л.В.Божок²**

¹Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко (Чернигов, Украина)

²Институт сельскохозяйственной микробиологии Национальной академии аграрных наук Украины
(Чернигов, Украина)
chgpu@chgpu.cn.ua; isgm@ukrpost.ua

Изучали влияние «Раундапа» (1, 2, 4 ПДК – предельно допустимые концентрации) на качественные и количественные характеристики роста колоний бактерий пробиотика БПС-44 и его воздействие на биохимические показатели углеводного обмена в органах сеголеток карпа в условиях гербицидной нагрузки. Биотический препарат БПС-44 оказывает положительное влияние на содержание глюкозы и активность α -амилазы [КФ 3.2.1.1] в крови, печени и белых мышцах сеголеток карпа при действии глифосата (2 ПДК).

Ключевые слова: пробиотики, гербициды, сеголетки карпа, печень, белые мышцы, кровь, глюкоза, гликоген, α -амилаза.

Використання пробіотику з метою компенсації негативного впливу гербицидного навантаження на риби **О.В.Барбухо, К.В.Бібчук, А.О.Жиденко, Л.В.Божок**

Вивчали вплив «Раундапу» (1, 2, 4 ГДК – гранично допустимі концентрації) на якісні і кількісні характеристики росту колоній бактерій пробіотику БПС-44 та його дію на біохімічні показники вуглеводного обміну в органах цьоголіток коропа в умовах гербицидного забруднення. Біотичний препарат БПС-44 справляє позитивну дію на вміст глюкози і активність α -амілази [КФ 3.2.1.1] в крові, печінці і білих м'язях цьоголіток коропа при дії гліфосату (2 ГДК).

Ключові слова: пробіотики, гербициди, цьоголітки коропа, печінка, білі м'язи, кров, глюкоза, глікоген, α -амілаза.

Use of the probiotic for the purpose of compensation of herbicides deleterious effect on fish **O.V.Barbuho, K.V.Bibchuk, A.O.Zhidenko, L.V.Bozhok**

The influence of Roundup (1, 2, 4 MAC – maximum allowed concentration) on qualitative and quantitative characteristics of growth of probiotic BPS-44 colonies and its effect on biochemical parameters of carbohydrates metabolism in underyearling carp organs under herbicides stress have been studied. Biotic preparation BPS-44 exerts positive effect on glucose content and α -amylase activity [EC 3.2.1.1] in blood, liver and white muscles of underyearling carps at glyphosate treatment (2 MAC).

Key words: probiotics, herbicides, underyearling carp, liver, white muscles, blood, glucose, glycogen, α -amylase.

Введение

Интенсификация сельского хозяйства приводит к постоянному расширению ассортимента гербицидов и росту их использования, что в свою очередь способствует загрязнению водной среды. Гербициды на основе изопропиловой соли глифосата применяют для уничтожения водной растительности оросительных каналов, водохранилищ и т.д., что может привести к ухудшению гидрохимического режима водоемов и негативно повлиять на рыб. *Cyprinus carpio* – это главный объект выращивания в прудовом рыбоводстве и ценный продукт питания. При исследовании влияния сублетальных концентраций некоторых распространенных загрязнителей естественных водоёмов (тяжёлых металлов, алюминия и аммиака) В.Ф.Коваленко установил, что карпы, по сравнению с белым амуром и гуппи, являются наименее чувствительными к действию токсикантов (Коваленко,

1993) и наиболее устойчивыми к действию фосфорорганических соединений, по сравнению с хищными рыбами (Флеров, 1977). В то же время, нами было установлено негативное влияние раундапа на морфологические, тканевые и биохимические изменения показателей двухлеток карпа. Оно выражалась в образовании на их внешних покровах, плавниках – язв, точечных кровоизлияний, отеков (Мусієнко та ін., 2005), а также в нарушениях структуры мышечных волокон и соотношения белковых фракций в белой мускулатуре и печени (Жиденко, 2008). В связи с этим, морфофункциональные изменения, полученные на этом объекте, являются наиболее ценными и носят обобщающий характер, так как карповые рыбы обладают высоким уровнем адаптационной пластичности, обусловленной как генетическими (полиплоидность), так и экологическими (широкий диапазон экологической толерантности) особенностями. Кроме того, известно (Лукьянова, 2007) применение пробиотических препаратов для повышения иммунофизиологического статуса объектов аквакультуры. Пробиотики угнетают рост патогенной микрофлоры, способствуют улучшению нормофлоры в кишечнике рыб, принимают активное участие в процессах пищеварения, повышают резистентность организма, их применение является эффективным методом компенсации неблагоприятных внешних воздействий на рыбу. Углеводный обмен в организме любого животного является наиболее чутким индикатором его физиологического состояния при действии любого стрессового фактора.

Цель работы: проверить чувствительность бактерий *Bacillus subtilis* 44-р к действию «Раундапа» и возможность использования пробиотического бацилярного препарата БПС-44 для компенсации негативного влияния на углеводный обмен *Cyprinus carpio* в условиях гербицидного загрязнения воды.

Материалы и методы исследования

Для проведения модельных исследований в качестве токсического фактора был выбран гербицид «Раундап» – изопропиламинная соль глифосата (480 г/л, что соответствует кислотному эквиваленту 360 г/л), фосулен (N-фосфонометилглицин) тов. «Монсанто» Украина. Чувствительность микроорганизмов к его действию определяли следующим образом: 1) методом диффузии в агаре с использованием бумажных дисков (Barry, Thornsberry, 1993; Методические указания ..., 1983). На поверхность приготовленного мясопептонного агара в чашки Петри наносили 0,1 мл суспензии бактерий *Bacillus subtilis* 44-р, компонент бацилярного препарата БПС-44 с титром жизнеспособных клеток $1,25 \times 10^8$ КОЕ/л, который был изготовлен в Институте сельскохозяйственной микробиологии НААНУ (ТУ У 24.4-00497360-691-2003). Затем накладывали диски, смоченные раствором «Раундапа» в концентрациях $0,02 \text{ мг/дм}^3$ (1 ПДК), $0,04 \text{ мг/дм}^3$ (2 ПДК), $0,08 \text{ мг/дм}^3$ (4 ПДК) (Перелік пестицидів ..., 2001); 2) после совместного культивирования в жидкой среде исследуемых микроорганизмов *Bacillus subtilis* 44-р (0,5 мл культуральной суспензии) и «Раундапа» в концентрациях 1 ПДК, 2 ПДК и 4 ПДК в течение 24 часов, при 37°C. Затем на поверхность агара в чашках Петри наносили по 0,1 мл суспензии бактерий. Количество жизнеспособных клеток штамма микроорганизмов *Bacillus subtilis* 44-р рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A \times P}{V}$$

где С – количество жизнеспособных клеток, КОЕ/л, А – среднее арифметическое числа колоний, выросших на чашках Петри с этим разведением, Р – величина, обратная разведению препарата, V – количество жидкости, взятой для посева на одну чашку, мл. За конечный результат принимали среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допустимое расхождение между которыми не должно превышать 30%. Для проведения модельного эксперимента использовали сеголеток карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.), выращенных ОАО «Черниговрыбхоз». Рыба была размещена в 200-литровых аквариумах (из расчета 1 экземпляр на 20 л воды) в трех вариантах: контроль, действие 2 ПДК гербицида и при совместном влиянии пробиотического препарата и гербицида (в воду, кроме указанного гербицида, за 2 суток до его внесения, добавляли суспензию препарата БПС-44). Во всех трех случаях контролировали гидрохимический режим на протяжении 14 суток эксперимента. Кровь у рыб брали путем пункции сердца с дальнейшим отстаиванием в холодильнике на протяжении 40 минут для получения сыворотки (Давыдов и др., 2006). Навески замороженных тканей печени и белых мышц измельчали с помощью гомогенизатора. В полученном гомогенате после центрифугирования (15 минут, 3000 об/мин) определяли глюкозу и гликоген глюкооксидазным методом согласно инструкции к лабораторному набору АО «Реагент» (Украина).

Для расщепления гликогена до глюкозы навеску ткани помещали на 15 минут в 30% раствор щелочи в соотношении 1:11, пробы инкубировали при 100°C на водяной бане 30 минут до полного их гидролиза. Определение активности α-амилазы [КФ.3.2.1.1] было осуществлено амилокластическим методом (Давыдов и др., 2006). Все результаты обработаны статистически с помощью стандартных компьютерных программ Microsoft Excel, достоверное расхождение между средними арифметическими величинами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Расхождение между сравниваемыми группами считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе эксперимента было установлено, что «Раундап» в концентрации 1 ПДК (0,02 мг/дм³) не только не угнетает жизнедеятельность культуры *Bacillus subtilis* 44-р, а наоборот, способствует росту бактерий (табл. 1). При использовании первого метода установили увеличение числа КОЕ и жизнеспособных клеток на 4%, по второму методу – на 5,4%. Морфология колонии *Bacillus subtilis* за 24 часа роста без добавления гербицида следующая: колонии округлой формы, средних размеров, выпуклые, с приподнятым центром, гладкие, слизистые, блестящие, цвет молочно-мутный, d=2–4 мм (рис. 1).

Таблица 1.

Количество жизнеспособных клеток штамма микроорганизмов *Bacillus subtilis* 44-р при действии «Раундапа» ($M \pm m, n=6$) 10^7

Показатели	Количество колоний, которые выросли на чашках Петри (1 метод)	Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) по 1 методу	Количество колоний, которые выросли на чашках Петри (2 метод)	Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) по 2 методу
Контроль <i>Bacillus subtilis</i> 44-р	178±5,29	$1,78 \cdot 10^7$	149±5,13	$1,49 \cdot 10^7$
1 ПДК (0,02 мг/дм ³)	184±8,19	$1,84 \cdot 10^7$	157±3,06	$1,57 \cdot 10^7$
2 ПДК (0,04 мг/дм ³)	159±8,29	$1,59 \cdot 10^7$	143±1,76	$1,43 \cdot 10^7$
4 ПДК (0,08 мг/дм ³)	147±6,81*	$1,47 \cdot 10^7$	125±2,52*	$1,25 \cdot 10^7$

* – достоверное отличие от показателей контроля ($p < 0,05 - 0,001$).

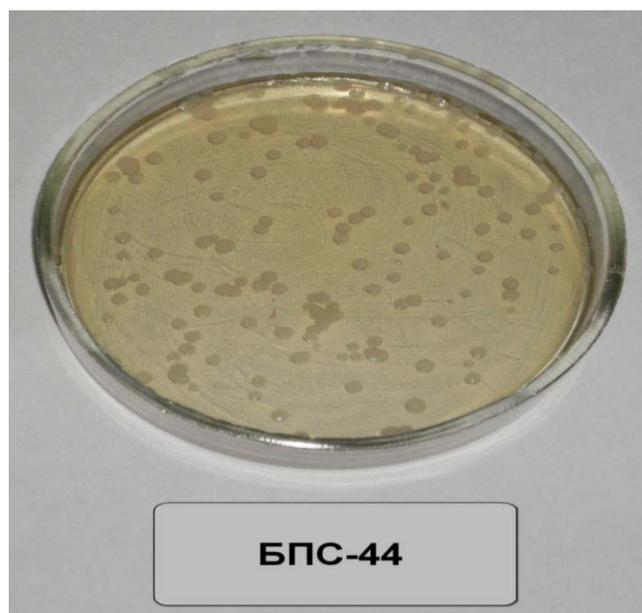


Рис. 1. Морфология колоний *Bacillus subtilis*

«Раундап» в концентрації 2 ПДК в експерименті приводить до зменшення кількості життєспособних кліток на 12% і на 4,2% (визначеному по двома методами), хоча якісних змін колоній не спостерігається (рис. 4–6). Концентрація 4 ПДК даного гербіцида (0,08 мг/дм³) оказує деяке інгібувальне дієвство на число колоній *Bacillus subtilis* 44-р: по першому методу зменшення числа колоній на 21%, по другому – на 19%, хоча знову ж таки якісних змін немає – колонії округлої форми, випуклі, гладкі, слизисті, блискучі, колір молочно-мутний. Поясненням даного факта може бути механізм дієвства глифосату, який інгібує фермент (5-енолпіруватшкімат-3-фосфат-синтетаза), що грає головну роль в біосинтезі ароматических амінокислот. Можливо, для *Bacillus subtilis* синтез цих амінокислот не є обов'язковим і їх надходження здійснюється з компонентами середовища, тому «Раундап» не оказує на ці бактерії такого токсического дієвства, як наприклад на рослини. Крім того, використовує нами чашечний метод має високий відсоток помилки (до 20%), тому кількесні зміни життєспособних кліток БПС-44 знаходяться в межах одного порядку.

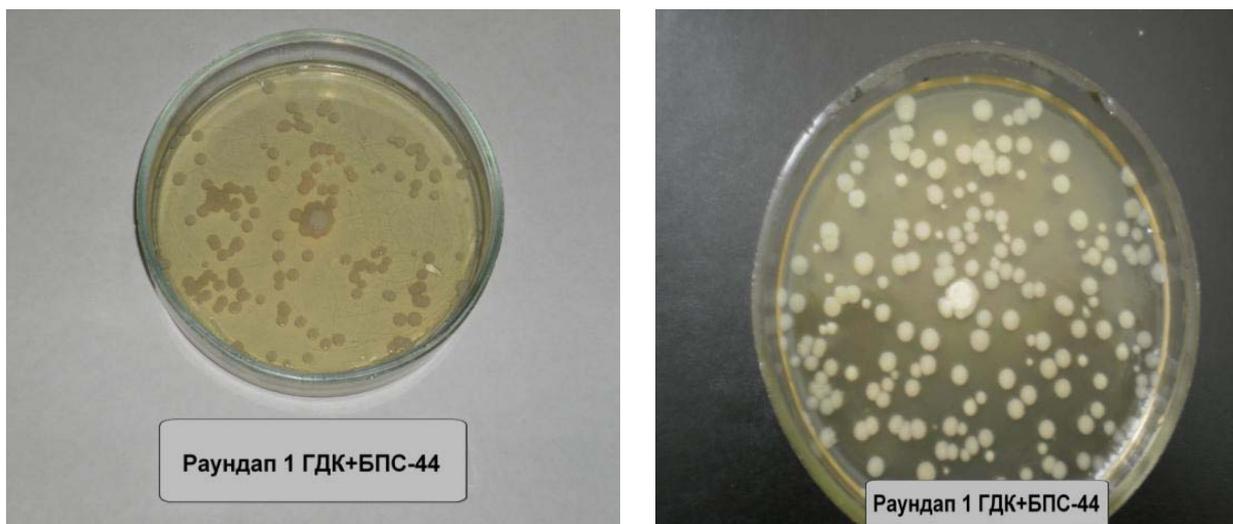


Рис. 2. Морфологія колоній *Bacillus subtilis* під впливом «Раундапа» (1 ПДК, перший метод)

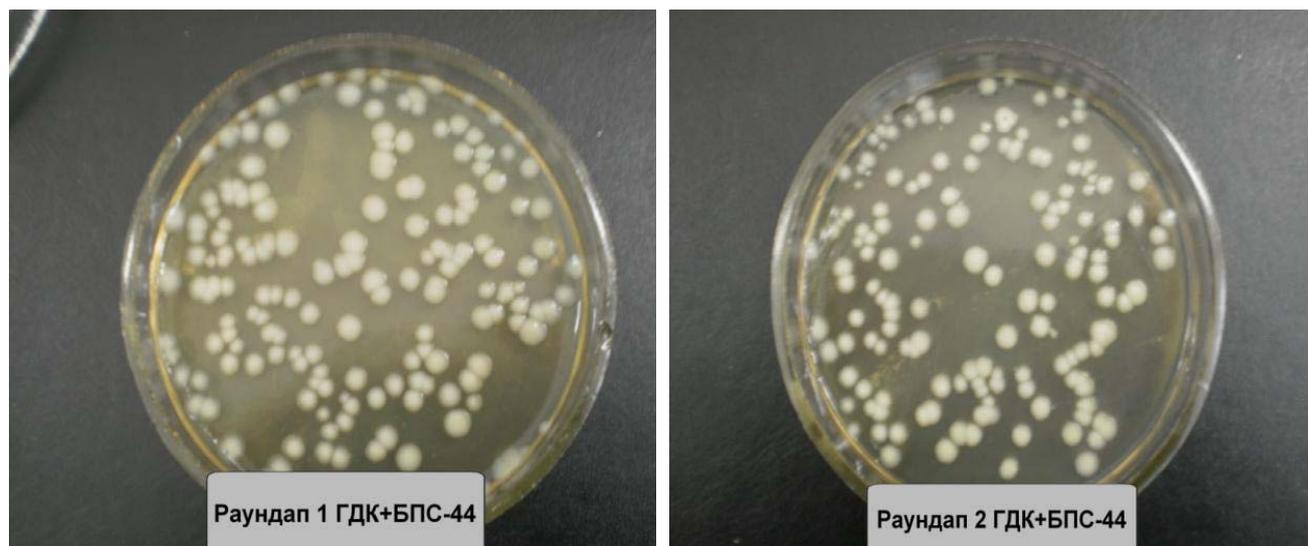


Рис. 3. Морфологія колоній *Bacillus subtilis* під впливом «Раундапа» (1 ПДК, 2 ПДК, другий метод)

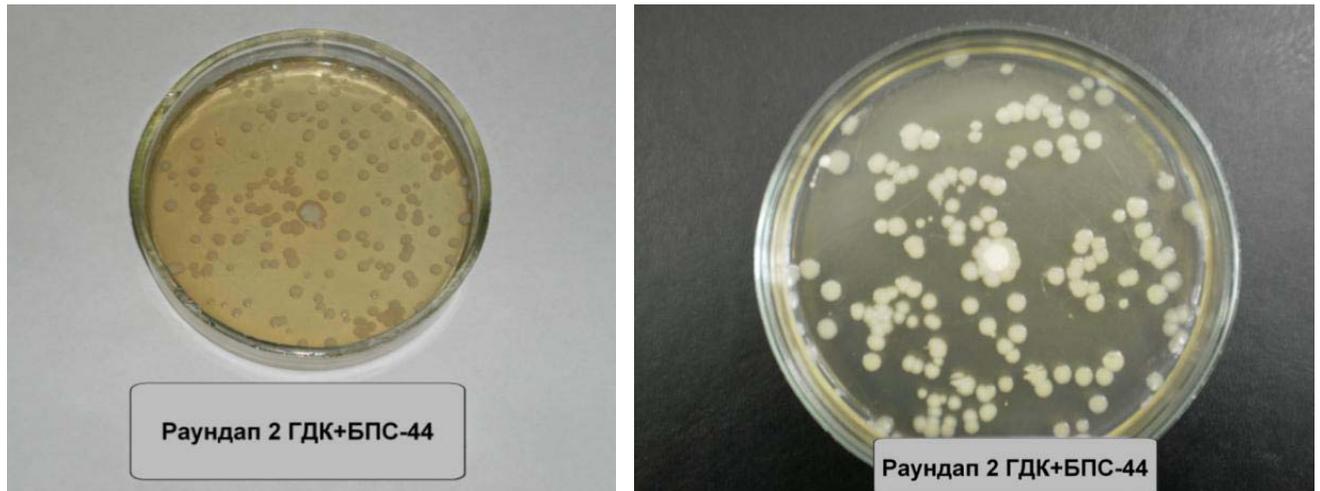


Рис. 4. Морфология колоний *Bacillus subtilis* под влиянием «Раундапа» (2 ПДК, первый метод)

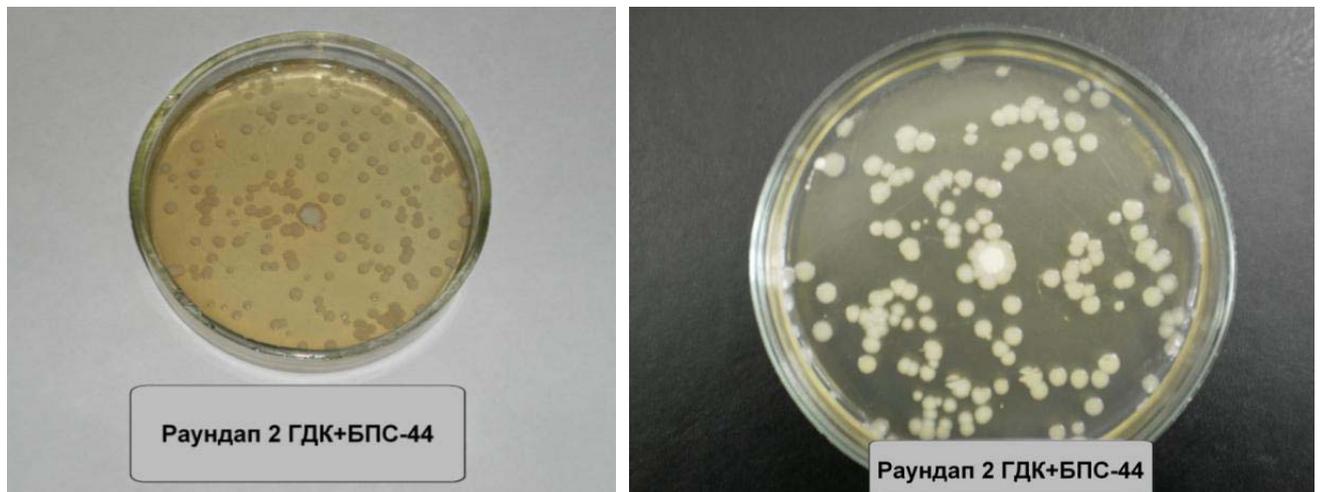


Рис. 5. Морфология колоний *Bacillus subtilis* под влиянием «Раундапа» (4 ПДК, первый метод)

Таким образом, доказав возможность применения пробиотиков, мы провели эксперимент на сеголетках карпа при совместном влиянии БПС-44 и гербицида (2 ПДК). В связи со значительными колебаниями у рыб индивидуальных показателей углеводного обмена, которые являются наиболее чувствительными к действию стрессовых факторов, полученные нами абсолютные данные мы представили как отклонения от контроля в процентах (рис. 6–8). При стресс-ответе организма происходит конкуренция двух противоборствующих систем: 1) системы, которая мобилизует энергетические ресурсы организма для спасения жизни, но во вред иммунной и другим физиологическим системам; 2) системы, которая ограничивает глубину действия стресс-фактора. (Иванов, 2003). Для индикации глубины стресса можно использовать концентрацию глюкозы в крови, которая у рыб является носителем энергии при срочной адаптации. Под влиянием «Раундапа» уровень глюкозы в сыворотке крови достоверно возрастает на 29,7%, в печени – на 32,3% и в белых мышцах – на 61,1% (рис. 6–8). Это происходит за счет увеличения активности амилазы в сыворотке крови, при снижении содержания гликогена в печени на 35,7%, которое в свою очередь приводит к торможению гликогенолиза и уменьшению активности амилазы на 16,9% в печени.

Как было сказано в разделе «Материалы и методы исследования», определение показателей углеводного обмена проводили на 14-е сутки эксперимента. За этот период происходит сдвиг метаболизма в сторону патологии или компенсации негативного влияния стрессового фактора.

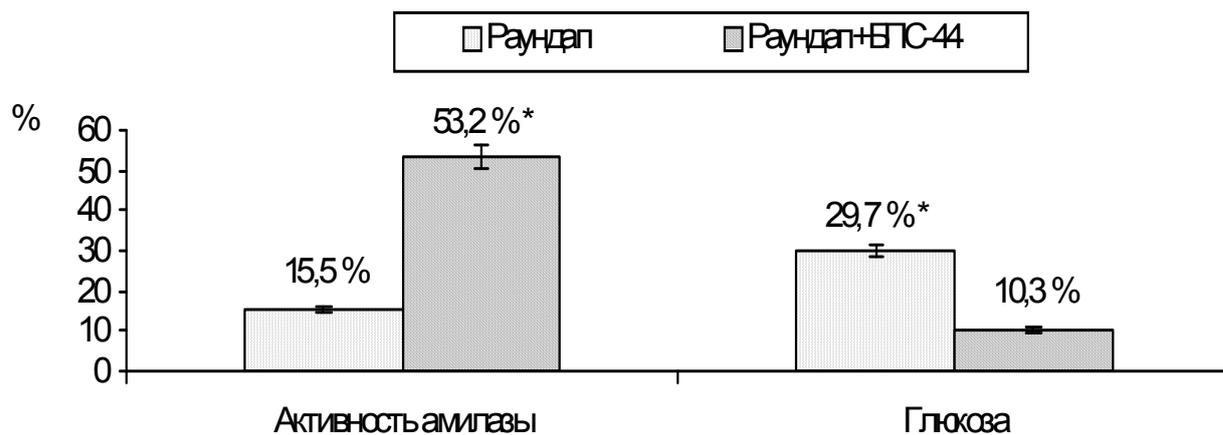


Рис. 6. Изменение активности амилазы и содержания глюкозы в сыворотке крови сеголеток карпа под влиянием «Раундапа» и БПС-44 (в % относительно контроля, n=6, * – p<0,05)

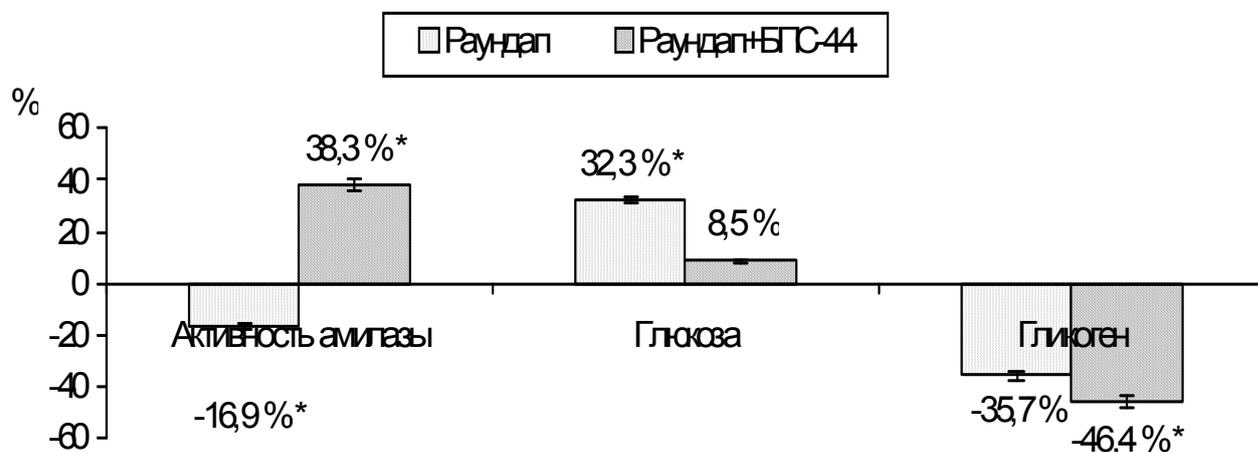


Рис. 7. Изменение показателей углеводного обмена в печени сеголеток карпа под влиянием «Раундапа» и БПС-44 (в % относительно контроля, n=6, * – p<0,05)

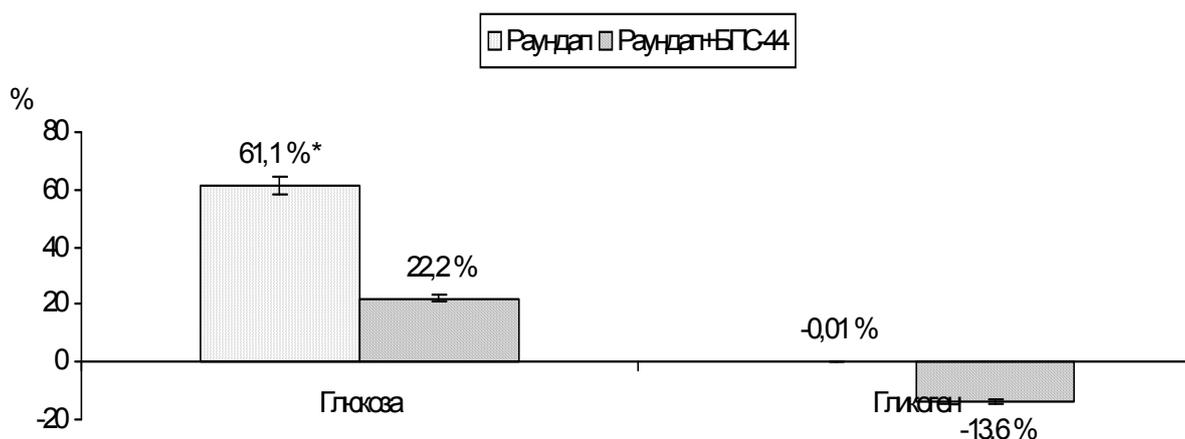


Рис. 8. Изменение количества глюкозы и гликогена в белых мышцах сеголеток карпа под влиянием «Раундапа» и БПС-44 (в % относительно контроля, n=6, * – p<0,05)

Препарат БПС-44 увеличивает активность амилазы и в крови – на 53,2 %, и в печени – на 38,3%. Одновременно происходит большее снижение гликогена и в печени, и в белых мышцах сеголеток карпа при совместном действии БПС-44 и «Раундапа», по сравнению с действием только гербицида. Предполагаемого роста уровня глюкозы в исследуемых органах не наблюдается, так как она расходуется на повышение основного обмена с целью увеличения резистентности сеголеток карпа к действию токсического вещества.

Таким образом, биотический препарат БПС-44 оказывает положительное влияние на отдельные показатели углеводного обмена в печени и белых мышцах сеголеток карпа в условиях действия глифосата (2 ПДК), нормализует содержание глюкозы во всех исследуемых тканях, приближая ее к контрольным величинам. Однако для рекомендации практического применения этого препарата при гербицидном загрязнении водохранилищ необходимо проведение дальнейших исследований.

Список литературы

- Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. Патология крови рыб. – К.: Фирма «ИНКОС», 2006. – 206с. /Davydov O.N., Temnikhanov Yu.D., Kurovskaya L.Ya. Patologiya krovi ryb. – K.: Firma «INKOS», 2006. – 206s./
- Жиденко А.А. Влияние гербицидов на структурный метаболизм карпа (*Cyprinus carpio* L.) разного возраста // Вісник Харківського національного ун-ту імені В.Н.Каразіна. Серія біологія. – 2008. – Вип.6, №788. – С. 86–92. /Zhidenko A.A. Vliyaniye gerbitsidov na strukturnyy metabolizm karpa (*Cyprinus carpio* L.) raznogo vozrasta // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo un-tu imeni V.N.Karazina. Seriya biologiya. – 2008. – Vyp.6, №788. – S. 86–92./
- Иванов А.А. Физиология рыб. – М.: Мир, 2003. – 284с. /Ivanov A.A. Fiziologiya ryb. – M.: Mir, 2003. – 284s./
- Коваленко В.Ф. Метаболические реакции у рыб при токсических воздействиях и их использование в биотестировании вод. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – К., 1993. – 17с. /Kovalenko V.F. Metabolicheskiye reaktsii u ryb pri toksicheskikh vozdeystviyakh i ikh ispol'zovaniye v biotestirovanii vod. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. – K., 1993. – 17s./
- Лукьянова Н.А. Пробиотические препараты и микроорганизмы, обладающие пробиотическими свойствами, применяемые в рыбоводстве // Тез. докл. Междунар. научно-практич. конф. «Рацион. использование преснов. экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК». – Москва: ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии, 2007. – С. 177–180. /Lukyanova N.A. Probioticheskiye preparaty i mikroorganizmy, obladayushchiye probioticheskimi svoystvami, primenyaemye v rybovodstve // Tez. dokl. Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Ratsion. ispol'zov. presnov. ekosistem – perspektivnoye napravleniye realizatsii natsional'nogo proekta «Razvitiye APK». – Moskva: GNU VNIIR Rossel'khozakademii, 2007. – S. 177–180/
- Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков. – М.: Б. изд., 1983. – 15с. /Metodicheskiye ukazaniya po opredeleniyu chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibiotikam metodom diffuzii v agar s ispol'zovaniyem diskov. – M.: B. izd., 1983. – 15s./
- Мусієнко Н.Г., Жиденко А.О., Мехед О.Б. та ін. Вплив пестицидів на морфологічні показники коропа // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка, Серія: Біологія. Спеціальний випуск «Гідроекологія». – 2005. – №3 (26). – С. 319–321. /Musiyenko N.G., Zhidenko A.O., Mehed O.B. ta in. Vplyv pestytsydiv na morfologichni pokaznyki koropa // Naukovi zapysky Ternopil'skogo natsional'nogo pedagogichnogo universytetu imeni Volodymyra Gnatyuka, Seriya: Biologiya. Spetsial'nyy vypusk «Gidroekologiya». – 2005. – №3 (26). – S. 319–321/
- Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. – Київ: Юні вест Маркетинг, 2001. – 274с. /Perelik pestytsydiv i agrohimiaktiv, dozvolenykh do vykorystannya v Ukraini. – Kyiv: Yuni vest Marketing, 2001. – 274s./
- Флеров Б.А. Физиологические механизмы действия токсических веществ и приспособления к ним водных животных // Гидробиол. журн. – 1977. – Т.13, №4. – С. 80–86. /Flerov B.A. Fiziologicheskiye mehanizmy deystviya toksicheskikh veshchestv i prispособleniya k nim vodnykh zhyvotnykh // Gidrobiol. zhurn. – 1977. – T.13, №4. – S. 80–86/
- Barry A.L., Thornsberry C. Susceptibility tests: diffusion test procedures // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol.14, №1. – P. 67–72.

Представлено: О.В.Надкерничною / Presented by: O.V.Nadkernychna

Рекомендовано до друку: В.В.Жмурком / Recommended for publishing by: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 05.03.2010.