

... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ...

УДК: 632.954+597.551.2:591.4

Влияние гербицидов на структурный метаболизм карпа (*Cyprinus carpio* L.) разного возраста А.А.Жиденко

Черниговский государственный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко (Чернигов, Украина)
chgrpu@chgrpu.cn.ua

Изучали влияние гербицидов, в количестве 2 ПДК (предельно допустимые концентрации), на изменения содержания веществ, связанных со структурным метаболизмом, в органах карпа разного возраста. Изменения содержания общего белка и его фракций в органах двухлетки карпа (биохимический уровень) соответствуют уровню поражения этого органа рыб, исходя из оценки гистологических препаратов. Поведенческие физиологические реакции соответствуют изменению содержания фосфора в сыворотке крови (активное плавание – увеличение энергозатрат – количественный рост неорганического фосфора в сыворотке крови), что и происходит под действием зенкора. Невозможность адаптации на одном уровне – органном (разрушение мышечных волокон под действием раундапа, гепатоцитов под действием раундапа и производных 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, клеток мозга – под действием 2,4-Д) приводит к формированию адаптации на другом – биохимическом (увеличение содержания водорастворимых белков – ферментов). Среди трёх изучаемых возрастных групп рыб наиболее чувствительными к действию гербицидов являются двухлетки карпа.

Ключевые слова: гербициды, мальки, сеголетки, двухлетки, карп, мышцы, печень, мозг, кровь, белок, азот, фосфор.

Введение

Разнообразные органические и неорганические вещества попадают в водоёмы с атмосферными осадками, вследствие смыва с водосборной площади, с бытовыми, промышленными сточными водами и приводят к загрязнению водных экосистем. Чужеродные низкомолекулярные соединения, к которым относятся и гербициды, проникают через покровы карпа, особенно эпителий жабр и ротовой полости, изменяя содержание метаболитов и пути их превращения в органах рыб.

Цель нашей работы: изучить влияние гербицидов на вещества, связанные со структурным метаболизмом органов карпа разного возраста.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования выбраны мальки, сеголетки и двухлетки карпа (*Cyprinus carpio* L.), выращенные ВАТ «Черниговрыбхоз». Опыты по изучению влияния гербицидов проводили в 200-литровых аквариумах, в которые рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 10 л, 20 л и 40 л воды. Длительность эксперимента продолжалась 7–14–21 сутки, замену воды проводили каждые два дня. Во всех случаях осуществляли контроль и поддерживали постоянный гидрохимический режим воды. Величина рН составила $7,90 \pm 0,29$; содержание кислорода – $5,8 \pm 0,5$ мг/л, температура воды отвечала естественной (+6 – +15°C). Масса рыб колебалась в границах 7–13 г, 40–105 г, 150–300 г. Концентрацию исследуемых гербицидов, которая отвечала 2 ПДК (предельно допустимые концентрации 0,2 мг/л, 0,008 мг/л, 0,04 мг/л), создавали путем внесения рассчитанных количеств 70%-ного порошка зенкора, производных дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 36%-ного водного раствора раундапа. Кровь у рыб брали путем пункции сердца (Давыдов и др., 2006). Получение сыворотки, определение белка по Лоури проводили согласно (Давыдов и др., 2006). Содержание общего белка и его фракций (водо-, соле- и нерастворимые белки) определяли методом Кьельдаля, (Филиппович и др., 1975), в нашей модификации (Явоненко и др., 1989). Определение остаточного азота крови после минерализации проводили прямой реакцией с реактивом Несслера (Ронин и др., 1977). Для определения неорганического фосфата использовали методику Лоури и Лопеса (Lowry, Lopez, 1946). Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Для проведения эксперимента были взяты 3 гербицида разной химической природы и с разными свойствами: зенкор – метрибузин (4-амино-6-*трет*бутил-3(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4H)-он), который используется как грунтовой гербицид; раундап – глифосат (N-фосфонометилглицин), широко применяемый для борьбы с сорняками на приусадебных участках, на землях несельскохозяйственного назначения, в лесном хозяйстве, и 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д), аминная соль (2,4-ДА), раствор 2,4-Д бутилового эфира. Последние активно применялись в 70–80-е годы, их запасы до сих пор хранятся в достаточных количествах и используются для уничтожения водной растительности. Изучением действия гербицидов, в частности, натриевой соли 2,4-Д занимался Л.П.Брагинский, но в его монографии «Пестициды и жизнь водоемов» показано влияние этих препаратов на массовые формы растительных и животных организмов пресных вод, на протекание важнейших биологических процессов в замкнутых водоемах и каналах (Брагинский, 1972). В книге К.К.Врочинського «Пестициди і охорона водних ресурсів» внимание сосредоточено главным образом на путях поступления пестицидов в водоёмы и методах их определения (Врочинський, 1987). Оценка токсичности гербицидов на основе глифосата с использованием в качестве биотеста ветвистоусых рачков была проведена группой авторов (Мельничук и др., 2007). Результаты нашего эксперимента должны показать ответную реакцию организма рыб на действие гербицидов на тканевом и биохимическом уровнях. Именно белковый обмен является основным процессом структурного метаболизма, физиологическая роль которого заключается в постоянном поддержании и обновлении структуры тела. В табл. 1 показаны изменения содержания белка в отдельных органах двухлетки карпа под действием гербицидов. Общий белок уменьшается как в крови, так и в других исследуемых органах. Гербициды, попадая в организм рыб в качестве поллютантов, должны подвергаться процессам детоксикации. Это всегда связано с дополнительными энергозатратами, для восстановления которых, кроме углеводов и липидов, необходимы определенные фракции белков. Химическая природа гербицидов различна: только глифосат хорошо растворим в воде, плохо в органических растворителях, поэтому и ответные реакции организма также отличаются. Так, под действием раундапа в большей степени, а под действием 2,4-Д в меньшей степени увеличивается фракция водорастворимых белков (на 25,4%, на 16,8% соответственно). Водорастворимые белки – это альбумины, физиологическая роль которых в качестве ферментов поддерживать на определённом уровне обмен веществ в органах, жизнедеятельность рыб. Их количественный рост обуславливает в данном случае формирование срочной адаптации (Физиология ..., 1986), когда деятельность организма протекает на пределе его физиологических возможностей – при почти полной мобилизации функционального резерва, на основе готовых, ранее сформировавшихся физиологических механизмов. На биохимическом уровне осуществляется первый тип адаптивного механизма – «количественный» (Хочачка, Сомеро, 1988), увеличивается концентрация уже имеющихся типов макромолекул, в нашем случае ферментов. Под действием зенкора количество водорастворимых белков практически не изменяется, но в 3,5 раза снижается количество солерастворимых белков. Последние являются основными компонентами сократительного актомиозинового комплекса, но визуально на гистопрепаратах их уменьшение не наблюдается (Жиденко, Коваленко, 2006), в отличие от гистопрепаратов мышечной ткани, испытывавшей действие раундапа (рис. 1, 2) и 2,4-Д (Коваленко, Жиденко, 2005). Эти изменения связаны с резким снижением концентрации нерастворимых белков почти в 11 раз (раундап), более чем в 2 раза (2,4-Д) и увеличением количества воды (на 7%, на 4,4 % соответственно). Нерастворимые белки входят в состав структурных компонентов клеток: рыхлой (эндомизий, перимизий), плотной (эпимизий, сухожилия) соединительной ткани, выполняющих в мышцах важную физиологическую роль. Ответную реакцию рыб на действие гербицидов можно сравнить с процессами голодания, когда наблюдается значительная дегградация мышечной ткани по закону «всё или ничего» в энергетических целях и увеличивается количество воды в тканях (Сидоров, 1985). Доказательством правильности полученных биохимических результатов является рис. 1Б, на котором можно наблюдать нарушение структуры мышечных волокон, неупорядоченное их расположение, а в некоторых участках – отсутствие поперечно-полосатой исчерченности, что и объясняет уменьшение нерастворимых белков мышц в условиях нагрузки раундапом.

Результаты, полученные при исследовании изменения содержания белков в печени, аналогичны таковым в мышцах: снижение общего белка под действием всех исследуемых гербицидов, практически одинаковое значение солерастворимых белков, увеличение водорастворимых белков под действием раундапа и достоверное уменьшение концентрации нерастворимых белков в печени рыб, находившихся в токсических условиях 2,4-Д и раундапа. Объяснением этих результатов служит рис. 2Б, где изображен гистологический препарат печени двухлетки карпа, испытывавшего пресс 2,4-Д. По сравнению с контролем в гистопрепарате печени

опытной рыбы наблюдается выраженная зернистая дистрофия гепатоцитов, участки с вакуольно-капельной дистрофией, некроз гепатоцитов (Коваленко, Жиденко, 2005).

Таблица 1.
Содержание белка в сыворотке крови и органах двухлеток карпа в условиях гербицидной (14 суток) нагрузки, $M \pm m$, $n=6$

Показатели	Контроль	Зенкор	2,4-Д	Раундап
Белки сыворотки крови, г%	5,6±0,48	3,1±0,55	4,16±0,34	2,45±0,14*
Водорастворимые белки мышц, г%	4,93±0,98	3,41±0,60	5,76±0,67	6,18±0,32
Солерастворимые белки мышц, г%	5,25±0,72	1,50±0,27*	4,56±0,74	5,23±0,55
Нерастворимые белки мышц, г%	9,23±1,35	8,19±1,53	4,18±0,82*	0,85±0,03*
Общий белок мышц, г%	19,41±2,33	13,09±1,71*	14,05±1,53*	12,26±2,61*
Содержание воды мышц, %	78,82±7,74	80,08±8,72	82,32±8,78	84,27±9,28*
Водорастворимые белки печени, г%	7,61±0,46	5,67±0,25	6,51±1,58	10,24±1,12*
Солерастворимые белки печени, г%	3,81±0,72	3,18±0,90	4,60±0,90	3,21±0,72
Нерастворимые белки печени, г%	5,58±0,98	5,81±0,67	2,53±0,34*	1,55±0,08*
Общий белок печени, г%	17,00±3,67	14,66±2,36*	13,64±2,58*	15,00±3,87*
Содержание воды печени, %	71,00±1,22	72,34±8,45	66,36±5,26*	75,00±2,98*
Водорастворимые белки мозга, г%	3,63±0,48	1,92±0,30*	3,24±0,44	4,51±0,54
Солерастворимые белки мозга, г%	3,35±0,50	2,74±0,48	3,81±0,65	3,42±0,31
Нерастворимые белки мозга, г%	5,22±1,08	4,26±0,78	1,05±0,04*	3,88±0,74
Общий белок мозга, г%	12,2±1,38	8,92±2,09	8,10±1,99	11,81±1,76
Содержание воды мозга, %	69,80±11,38	73,66±10,98	89,05±12,99*	74,27±18,76*

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

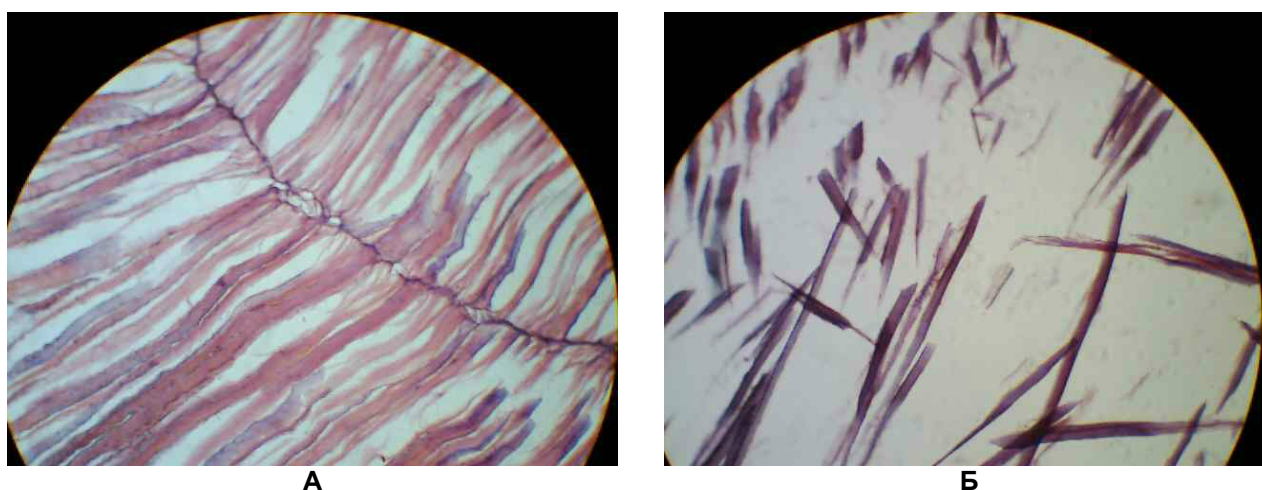


Рис. 1. Скелетные мышцы двухлетки карпа: А – контроль, Б – под действием раундапа на 14-е сутки эксперимента

Результаты, полученные при исследовании содержания белков мозга, немного отличаются, наибольшее уменьшение нерастворимых белков в 5 раз происходит под действием 2,4-Д, и опять же наиболее выраженные дистрофические изменения нейронов, некробиотические изменения нервной ткани, периваскулярные и перичелюлярные отёки, очаги инфильтрации можно видеть на рис. 3Б.

Данные рис. 4, 5 отражают возрастной аспект действия гербицидов на мышцы и печень мальков и сеголеток карпа. Содержание белка в этих органах контрольных и опытных рыб достоверных различий не имеет, но наблюдается тенденция снижения их уровня в исследуемых органах сеголеток, находившихся в токсических условиях. По данным О.Н.Давыдова с соавторами (Давыдов и др., 2006), при инвазии сеголеток карпа паразитами содержание белка в сыворотке крови колеблется, в печени однозначно увеличивается. При заражении двухлеток содержание белка в сыворотке крови достоверно уменьшается. Можно сделать предварительный вывод, что на

молекулярном (снижение содержания белков) и тканевом уровнях наименьшей лабильностью и возможностью к адаптации обладают двухлетки. Рис. 6 отображает изменения содержания азота в крови карпа разного возраста. Если у контрольных рыб возраст не играет существенной роли, то под действием раундапа в крови двухлеток количество азота уменьшилось в 35 раз, что свидетельствует об отрицательном азотистом балансе, экскреции азота из организма, неблагоприятном прогнозе для жизнедеятельности рыб.

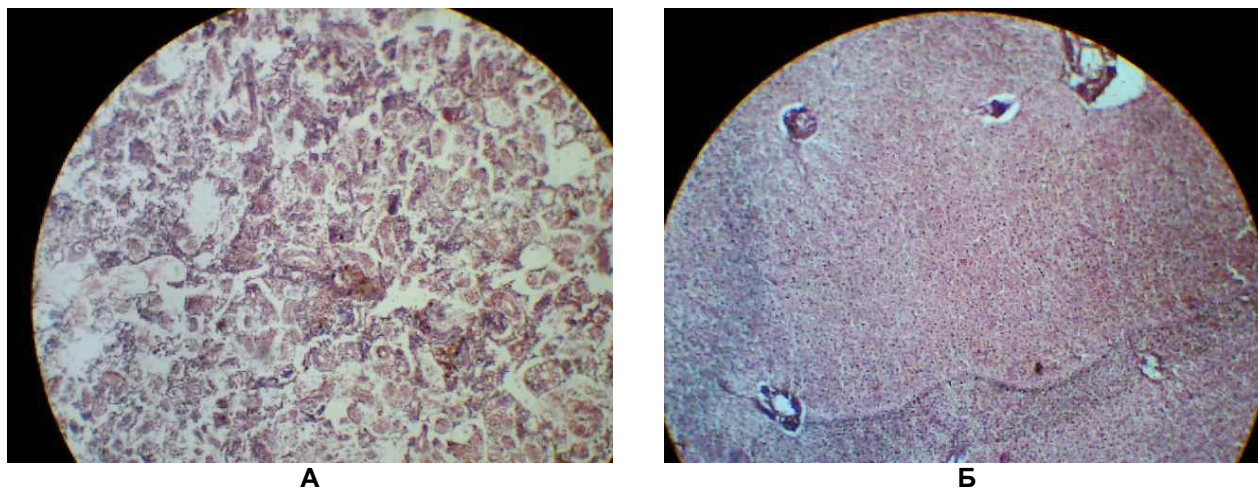


Рис. 2. Печень двухлетки карпа: А – контроль; Б – под действием 2,4-Д на 14-е сутки эксперимента

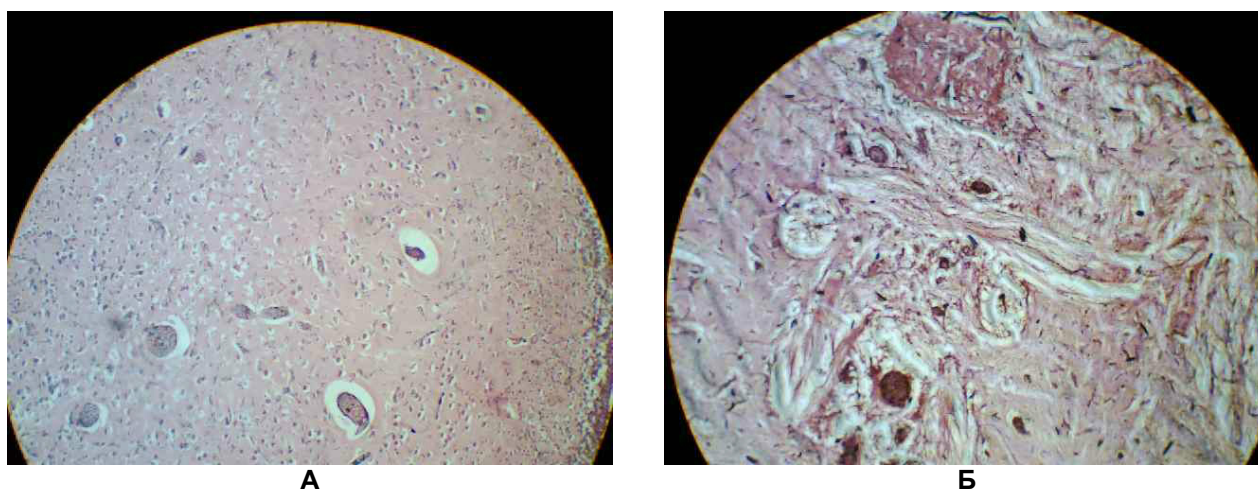


Рис. 3. Мозг двухлеток карпа: А – контроль, Б – под действием 2,4-Д на 14-е сутки эксперимента

Интересна динамика содержания азота в крови сеголеток карпа на протяжении эксперимента (табл. 2). Так, на седьмые сутки инкубации рыб снижение содержания азота в крови происходит только под влиянием зенкора, на 14-е сутки уже под влиянием обоих гербицидов, а на 21-е сутки количество азота возрастает в 1,9 и в 1,8 раза соответственно. В состав небелкового азота крови входит главным образом азот конечных продуктов обмена простых и сложных белков. Карпы относятся к аммонотеликам, т.е. главным продуктом обмена азотистых веществ у них является аммиак, который переносится кровью в виде безвредных амидов глутаминовой и аспарагиновой кислот (глутамина, аспарагина). Такой низкий уровень содержания азота в крови двухлеток карпа ($0,022 \pm 0,00$) г/л под действием раундапа свидетельствует о дистрессе. Для сеголеток по содержанию азота в крови под действием гербицидов на 21-е сутки проведения эксперимента можно говорить об эустрессе и формировании адаптации. Возможно, это связано с химической структурой гербицидов: они оба содержат в своём составе азот.

г%

г%

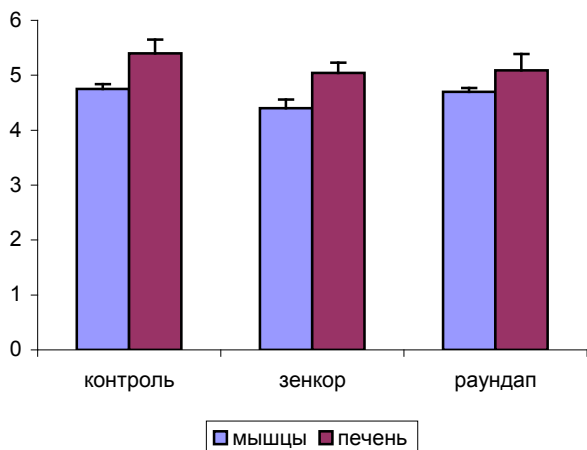


Рис. 4. Содержание белка в тканях мальков карпа в условиях гербицидной нагрузки (14 суток), $M \pm m$, $n=6$

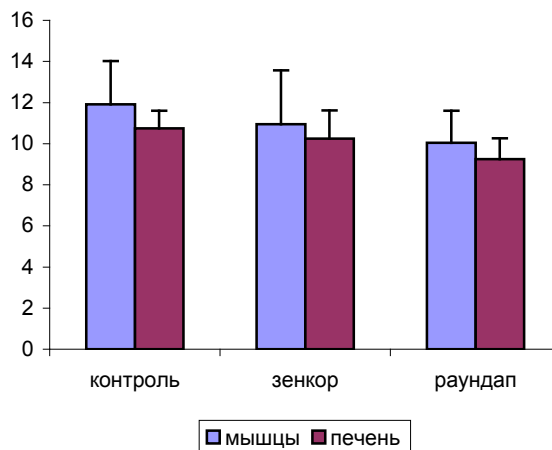


Рис. 5. Содержание белка в тканях сеголеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (14 суток), $M \pm m$, $n=6$

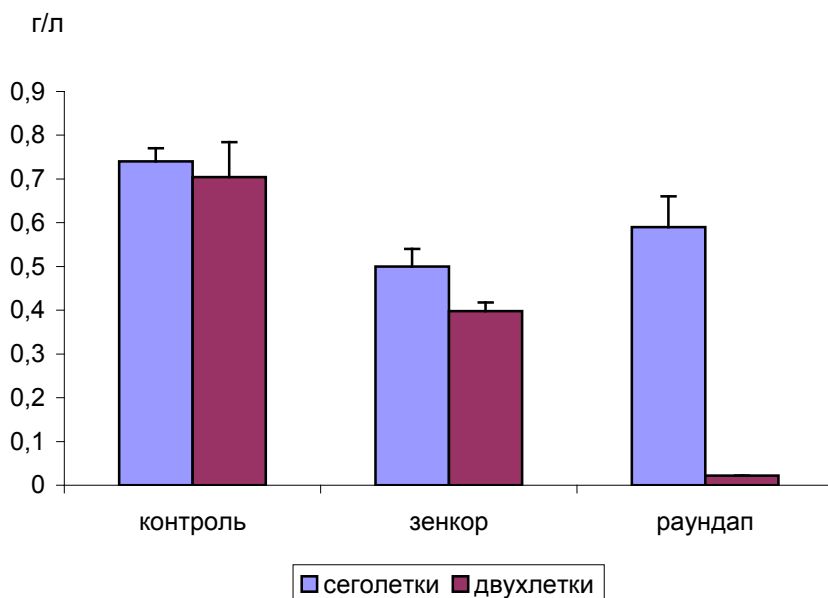


Рис. 6. Содержание азота в крови сеголеток и двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (14 суток), $M \pm m$, $n=6$

Таблица 2.

Динамика содержания азота в крови сеголеток карпа в условиях гербицидной нагрузки, $M \pm m$, $n=6$

Содержание азота, г/л	Контроль	Зенкор	Раундап
7 суток инкубации	4,88±0,68	2,00±0,44*	4,78±0,75
14 суток эксперимента	0,74±0,04	0,50±0,04*	0,59±0,01*
21 сутки эксперимента	0,77±0,04	1,44±0,08*	1,39±0,32*

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

Вызывают интерес данные по содержанию неорганического фосфора в сыворотке крови сеголеток и двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (рис. 7, 8). Так, если у сеголеток намечается только тенденция к увеличению уровня фосфора в сыворотке крови под действием изучаемых гербицидов, то для двухлеток эти различия в результатах достоверны. Под действием зенкора происходит увеличение в 3,56 раза, под действием раундапа в 2,6 раза. Возможно, такие изменения связаны с избыточной агрессивностью и подвижностью рыб под действием зенкора,

которая приводит к расходованию макроэргических соединений и увеличению уровня неорганического фосфора. Сравнивая показатели сеголеток и двухлеток, следует отметить, что у последних более высокие энергетические затраты и поэтому выше уровень фосфора в сыворотке крови рыб.

мкмоль/мл

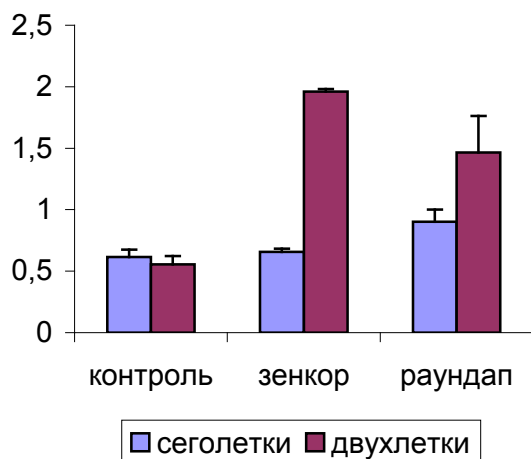


Рис. 7. Содержание фосфора в крови сеголеток и двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (14 суток), $M \pm m$, $n=6$

мкмоль/мл

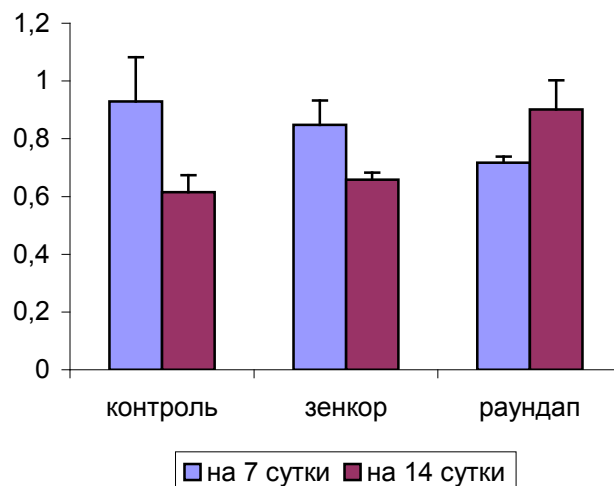


Рис. 8. Динамика содержания фосфора в крови сеголеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (14 суток), $M \pm m$, $n=6$

Таким образом, изменения содержания общего белка и его фракций в органах двухлетки карпа (биохимический уровень) соответствуют уровню поражения органа рыб, исходя из оценки гистологических препаратов. Поведенческие физиологические реакции сеголеток, двухлеток карпа соответствуют изменению содержания фосфора в сыворотке крови (активное плавание – увеличение энергозатрат – количественный рост неорганического фосфора в сыворотке крови), что и происходит под действием зенкора. Невозможность адаптации на одном уровне – органном (разрушение мышечных волокон под действием раундапа, гепатоцитов под действием раундапа и 2,4-Д, клеток мозга – под действием 2,4-Д) приводит к формированию адаптации на другом – биохимическом (увеличение содержания водорастворимых белков – ферментов). Среди трёх изучаемых возрастных групп рыб наиболее чувствительными к действию гербицидов являются двухлетки карпа.

Список литературы

- Брагинский Л.П. Пестициды и жизнь водоёмов. – К.: Наукова думка, 1972. – 228с.
 Врочинський К.К. Пестициди і охорона водних ресурсів. – К.: Урожай, 1987. – 160с.
 Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. Патология крови рыб. – К.: Фирма «ИНКОС», 2006. – 206с.
 Жиденко А.А., Коваленко Е.М. Вплив зенкору на динаміку гістологічних змін в органах коропа // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2006. – № 3–4 (30). – С. 60–65.
 Коваленко О.М., Жиденко А.О. Гістологічні зміни в органах риб під впливом пестицидів // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск «Гідроекологія». – 2005. – №3 (26). – С. 208–210.
 Мельничук С.Д., Щербань Э.П., Лоханская В.И. Оценка токсичности гербицидов на основе глифосата методом биотестирования на ветвистоусых рачках // Гидробиол. журн. – 2007. – Т.43, №1. – С. 84–95.
 Ронин В.С., Старобинец Г.М., Утевский Н.Д. Руководство к практическим занятиям по методике клинических лабораторных исследований. – М.: Медицина, 1977. – 335с.
 Сидоров В.С. Аминокислоты рыб // Биохимия молоди пресноводных рыб. – Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1985. – С. 103–137.
 Физиология адаптационных процессов. – М.: Наука, 1986. – 635с.
 Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение, 1975. – 318с.
 Хочачка П.В., Сомеро Д.Н. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 568с.

Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Зависимость выживаемости молоди карпа в условиях зимовки от содержания свободных аминокислот и белков в мышечной ткани рыб // Рыб. хоз-во. – 1989. – №43. – С. 24–29.

Lowry O.H., Lopez S.A. Determination of inorganic phosphate in the presence of labeling ester // J. Biol. Chem. – 1946. – Vol.162, №21. – P. 421–428.

Вплив гербіцидів на структурний метаболізм коропа (*Cyprinus carpio* L.) різного віку А.О.Жиденко

Вивчали вплив гербіцидів, у кількості 2 ГДК (гранично допустимі концентрації), на зміни вмісту речовин, зв'язаних зі структурним метаболізмом, в органах коропа різного віку. Зміни вмісту загального білка і його фракцій в органах двохліток коропа (біохімічний рівень) відповідають рівню поразки цього органу риб, виходячи з оцінки гістологічних препаратів. Поведінкові фізіологічні реакції відповідають зміні вмісту фосфору в сироватці крові (активне плавання – збільшення енерговитрат – кількісний ріст неорганічного фосфору в сироватці крові), що і відбувається під дією зенкору. Неможливість адаптації на одному рівні – органному (руйнування м'язових волокон під дією раундапу, гепатоцитів під дією раундапу і похідних 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, клітин мозку – під дією 2,4-Д) приводить до формування адаптації на іншому – біохімічному (збільшення вмісту водорозчинних білків – ферментів). Серед трьох досліджуваних вікових груп риб найбільш чутливими до дії гербіцидів є двохлітки коропа.

Ключові слова: *гербіциди, мальки, цьоголітки, двохлітки, короп, м'язи, печінка, мозок, кров, білок, азот, фосфор.*

Influence of herbicides on different age carp's (*Cyprinus carpio* L.) structural metabolism A.A.Zhidenko

The influence of herbicides in double maximum concentration (maximum permissible concentration) on changes of content of the substances connected to a structural metabolism in bodies of different age carp is studied. Changes in common protein and its fractions in bodies of two-year-old carp (at a biochemical level) correspond to the level of damage suffered by the fish's body according to the histologic preparation estimation. Behavioural physiological reactions of a carp correspond to change in the content of phosphorus in blood whey (active sailing – increased power consumption – quantitative growth of inorganic phosphorus in blood whey), that actually occurs under the influence of zenkor. The impossibility of adaptation at the organ's level (due to destruction of muscular fibres under the impact of round-up, hepatocytes under the influence of round-up and derivatives of 2,4-dichlorophenoxyacid, brain cells when influenced by 2,4-D) results in formation of adaptation at the biochemical level (increase in water-soluble fibers – enzymes). Among three studied age groups are: newly-hatched fish, this year's brood, two-year-old carp. The latter appears to be the most sensitive to the action of herbicides.

Key words: *herbicides, newly-hatched fish, this year's brood, two-year-old carp, muscles, liver, brain, blood, protein, nitrogen, phosphorus.*

Представлено М.Ю.Евтушенком
Рекомендовано до друку А.Ю.Утєвським