

УДК 632.954 + 597.551.2:577.124

О. Б. Мехед, А. А. Жиденко

**ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ ГЕРБИЦИДАМИ
ЗЕНКОРОМ И РАУНДАПОМ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В
ПЕЧЕНИ РЫБ СЕМЕЙСТВА CYPRINIDAE**

Изучены активность ферментов, содержание глюкозы и общих липидов в печени белого амура (*Stenopharyngodon idella* Val.), карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) и белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) при воздействии гербицидов зенкора и раундапа.

Ключевые слова: карп чешуйчатый, белый толстолобик, белый амур, зенкор, раундап, ферменты, глюкоза, липиды.

Интенсификация сельского хозяйства предусматривает использование всё большего арсенала химических веществ, в частности широкого спектра гербицидов, которых в настоящее время применяется около 150. Для каждой культуры ассортимент рекомендованных препаратов значительно уже, но и он может превышать десяток наименований [8]. Отличительной особенностью пестицидов в целом и гербицидов в частности является невозможность прекращения их циркуляции, то есть перемещения на значительное расстояние от мест применения, и накопление в окружающей среде в виде устойчивых соединений. В связи с этим изучение особенностей обмена веществ в тканях гидробионтов в условиях загрязнения воды этими веществами становится всё более актуальным. Л.О. Горбатюк в одном из выводов обзорной статьи [1] утверждает, что, несмотря на большой массив экспериментальных данных, физиолого-биохимические аспекты токсического влияния пестицидов на рыб теоретически осмыслены ещё недостаточно. Наши предыдущие исследования освещают вопросы накопления пестицидов в органах и тканях [4, 12] и механизмы их воздействия на организм рыб [4, 11]. Кроме того, при определении устойчивости рыб к токсическим веществам необходимо принимать во внимание действие экологических факторов [10], важнейшими из которых являются температура, химический состав воды и тип питания. Ранее было изучено влияние сырой нефти на активность пищеварительных ферментов карповых рыб в зависимости от типа питания [6].

Целью данной работы было исследование токсического воздействия гербицидов на активность ферментов, содержание общих липидов и глюкозы в печени рыб семейства карповых в зависимости от типа питания.

© О. Б. Мехед, А. А. Жиденко, 2013

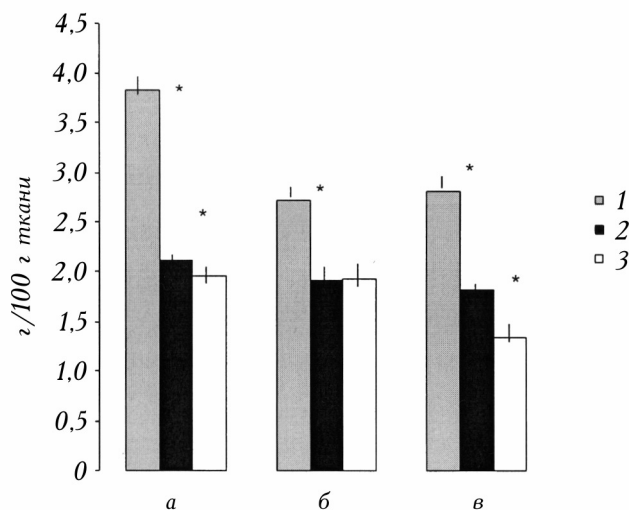
Материал и методика исследований. Исследования проводили в январе — феврале 2005—2010 гг. на сеголетках толстолобика белого (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.), амура белого (*Ctenopharyngodon idella* Val.) и карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) массой 100—150 г. Рыб группами по пять особей содержали в течение 14 сут в аквариумах объемом 200 дм³ с отстоянной водопроводной водой. Гидрохимические показатели прудов, из которых отбирали рыб, и условия в аквариумах не отклонялись от рыбоводных норм (рН $7,30 \pm 0,27$, содержание кислорода — $5,6 \pm 0,4$ мг/дм³), температура воды 4—8°C соответствовала естественной, что достигалось расположением аквариумов в непосредственной близости от открытых окон лаборатории. Во время экспериментов рыб не кормили. Содержание гербицидов, равное двум предельно допустимым концентрациям (раундап — 0,04 мг/дм³, зенкор — 0,2 мг/дм³), поддерживали путем внесения рассчитанных количеств 36%-ного раствора раундапа и 70%-ного порошка зенкора. Зенкор — метрибузин (4-амино-6-третбутил-3(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4Н)-он), раундап — глифосат, фосулен (N-фосфометилглицин, действующее вещество — глифосат), оба гербицида разрешены к применению в Украине [1, 8]. Контролем служили соответствующие показатели рыб, содержащихся в аквариумах без добавления гербицидов.

Для исследования активности ферментов гомогенат печени готовили на 0,22 М сахарозе в соотношении 1:10. Активность изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) определяли спектрофотометрически в митохондриальной фракции, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) — в цитоплазматической [14]. Содержание белка устанавливали по методу Лоури [16], содержание суммарных липидов — по методическим рекомендациям [7]. Активность липазы определяли микрометодом [5], в качестве субстрата использовали суспензию молочного жира. Содержание глюкозы в тканях устанавливали глюкозооксидазным методом в соответствии с инструкцией к набору кат. № НР009.02. Данные обработаны статистически с помощью Microsoft Excel, достоверное различие между средними арифметическими величинами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

У контрольных групп карпа и белого амура содержание липидов в печени было практически одинаковым, а у белого толстолобика этот показатель был значительно выше (рис. 1), что согласуется с литературными данными [13]. Возможно, это связано с типом питания — последний является фитопланктофагом. Минимальная активность липазы была отмечена у карпа, максимальная — у толстолобика (рис. 2). Таким образом, у исследованных рыб контрольных групп содержание липидов и активность фермента прямо пропорциональны, что не соответствует биохимической закономерности — увеличение активности фермента должно приводить к уменьшению содержания исходного субстрата. Вероятно, это обусловлено высокой скоростью реакций ресинтеза липидов.

Под влиянием гербицидов общее количество липидов в печени рыб достоверно снижалось, за исключением воздействия зенкора на карпа. Наибо-



1. Содержание общих липидов в печени белого толстолобика (а), карпа (б) и белого амура (в) под воздействием гербицидов. Здесь и на рис. 2—6: 1 — контроль; 2 — раундап; 3 — зенкор ($M \pm m, n = 5$); * различия между группами достоверны.

лее значительно содержание липидов снижалось под действием зенкора в печени толстолобика (51%) и белого амура (52%). Влияние раундапа было менее выраженным (см. рис. 1). Наименьшие изменения в содержании общих липидов происходили в печени карпа — на 30 и 29% под воздействием соответственно раундапа и зенкора. Результаты предыдущих исследований [3, 4] показали увеличение содержания липидов в сыворотке крови карпа под воздействием гербицида 2,4-Д, что может быть объяснено их ролью в

кумуляции пестицидов. Активность липазы в печени амура и карпа при воздействии исследованных гербицидов достоверно снижалась (рис. 2). В то же время у толстолобика зенкор вызывал увеличение этого показателя вдвое, то есть катаболизм липидов интенсифицировался, что подтверждает специфическое действие зенкора как гетероциклического соединения на организм толстолобика. Наиболее негативно гербициды влияли на липидный обмен белого амура — активность липазы под воздействием раундапа снижалась практически в семь, а зенкора — в 4,7 раза. Таким образом, фермент оказался гораздо чувствительнее к действию раундапа.

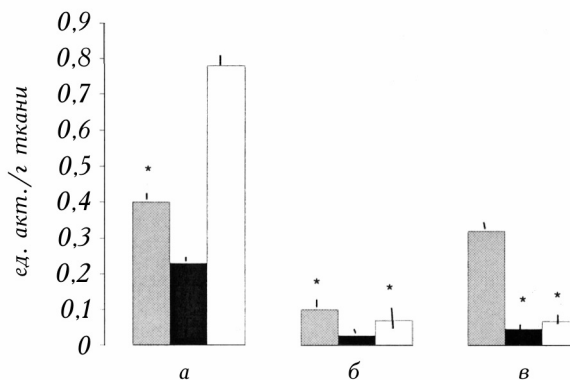
В обзоре, посвящённом физиолого-биохимической реакции рыб на действие пестицидов [1], показаны необратимые изменения липидного обмена у рыб различного возраста под воздействием токсикантов, что проявлялось в изменениях пластического обмена и морфометрических показателей. Ранее мы приводили данные, свидетельствующие об активации энергетического обмена у карпа при одновременном действии зенкора и низких температур [10].

При воздействии раундапа содержание глюкозы в печени карпа превысило контрольное значение в три раза (рис. 3), что подтверждает данные об активном участии белков этого органа в энергетическом обмене [2, 4]. Зенкор оказывал противоположное действие, вызывая практически двукратное снижение этого показателя. Ранее было установлено, что под воздействием указанного гербицида количество гликогена в печени рыб снижалось [4], при этом содержание отдельных фракций белков менялось незначительно [2]. Последнее позволило сделать вывод о большем участии углеводных компонентов в энергетическом обмене.

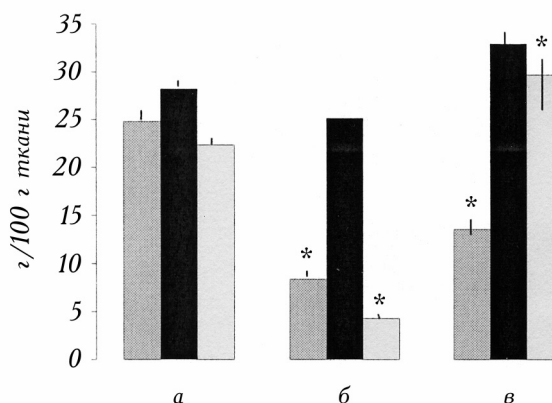
Под воздействием раундапа содержание глюкозы в печени толстолобика увеличилось на 14%, а зенкора — снизилось на 10%. У белого амура этот показатель увеличился соответственно в 2,4 и 2,2 раза. Известно, что содержание глюкозы в тканях рыб поддерживается за счёт глюконеогенеза, гликогенолиза и межтканевого переноса. В условиях эксперимента проникновение глюкозы в организм рыб из окружающей среды исключалось. Как было показано ранее [11], под воздействием ряда гербицидов, в частности 2,4-Д, в организме рыб происходит активация энергетического обмена, а под воздействием зенкора — истощение энергетических ресурсов. Изменения содержания глюкозы в тканях можно объяснить обменными превращениями и её участием в ряде метаболических систем, что приводит к повышению активности соответствующих ферментов.

Скорость гликолиза в норме согласуется со скоростью функционирования цикла лимонной кислоты: в клетке до пирувата расщепляется ровно столько глюкозы, сколько необходимо для того, чтобы обеспечить его «топливом» [9]. Это объясняется тем, что гликолиз ингибируется высоким содержанием АТФ и NADH, то есть компонентами, общими для гликолитической и дыхательной стадий окисления глюкозы. Поскольку определённую роль в этом процессе играет и концентрация цитрата [9], возникла необходимость определения активности отдельных ферментов цикла Кребса (ЦТК), который является эволюционно более молодым и чувствительным к действию токсических веществ по сравнению с гликолизом.

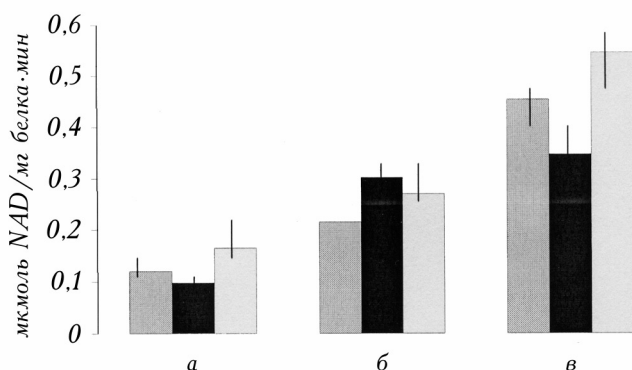
Исследованные гербициды существенно изменяли активность ферментов углеводного обмена в печени рыб (рис. 4—6). Так, под воздействием раундапа активность ЛДГ в печени карпа недостоверно возросла, а у толстолобика и белого амура — снижалась соответственно на 18 и 14% по



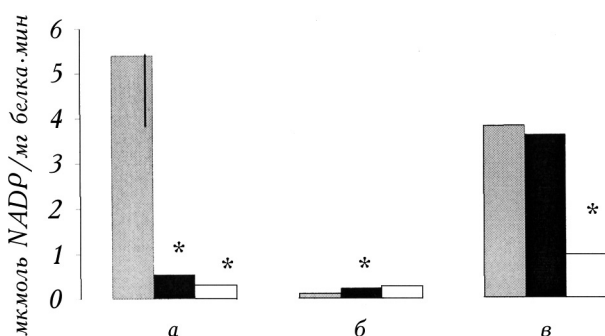
2. Активность липазы в печени белого толстолобика (а), карпа (б) и белого амура (в) под воздействием гербицидов.



3. Содержание глюкозы в печени белого толстолобика (а), карпа (б) и белого амура (в) под воздействием гербицидов.



4. Активность лактатдегидрогеназы в печени толстолобика (а), карпа (б) и белого амура (в) под воздействием гербицидов.



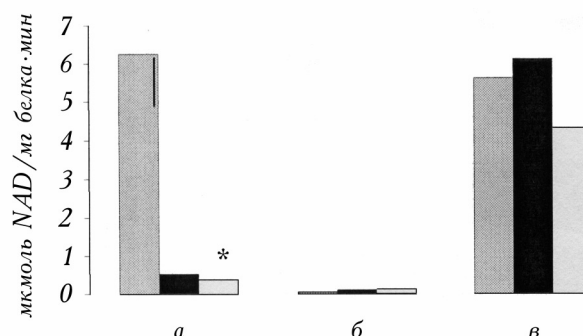
5. Активность изоцитратдегидрогеназы в печени толстолобика (а), карпа (б) и белого амура (в) под воздействием гербицидов.

сравнению с контролем. Под воздействием зенкора этот показатель у всех исследованных рыб незначительно возрастал. Эти результаты подтверждают стабильность реакций гликолиза как наиболее древнего пути окисления углеводов субстратов в неблагоприятных экологических условиях.

В печени толстолобика и белого амура активность ферментов ЦТК под воздействием гербицидов значительно снижалась: ИЦДГ у толстолобика под воздействием зенкора — в 17,6 раза, а раундапа — почти в 10 раз, МДГ — соответственно в 16,6 и 11,8 раза (см. рис. 5, 6). Это может объясняться особенностями типа питания, поскольку направленность метаболических путей и активность ферментов в печени рыб зависит от природы поступающих питательных веществ.

Белый толстолобик питается планктонными водорослями, поэтому негативное воздействие гербицидов связано с углеводным обменом в печени. Для белого амура — исключительно растительноядной рыбы — также характерно преобладание углеводного направления метаболизма и сходная реакция на воздействие гербицидов (снижение активности ферментов ЦТК в печени). Степень влияния зенкора была значительно больше, чем раундапа, что объясняется их химической природой. Водорастворимый раундап, вследствие быстрого проникновения в организм, активнее влияет на приспособление макромолекулярных компонентов гепатоцитов, что выражается в незначительном отклонении активности ферментов (ИЦДГ) от контроля или некотором его превышении (МДГ). Возможно, таким образом формируется компенсаторный вид адаптации в печени белого амура к действию раундапа.

В печени карпа действие гербицидов активирует ферменты ЦТК (см. рис. 4—6). Возможно, это связано с характером его питания — всеядный карп потребляет зообентос, зоопланктон, перифитон, детрит и другие кормовые объекты, содержащие большее количество белков и липидов, чем углеводов [13]. Кроме того, установлено, что у таких рыб, как карп, участие белков и свободных аминокислот в энергетическом обмене может достигать 50—90% [15]. Как было показано ранее [4], именно белковый обмен в тканях карпа наиболее чувствителен к воздействию раундапа.



6. Активность малатдегидрогеназы в печени белого толстолобика (а), карпа (б) и белого амура (в) под воздействием гербицидов.

Заключение

Адаптация рыб к условиям окружающей среды приводит к изменениям внутриклеточных биоэнергетических процессов, что выражается в интенсивности генерирования энергии. Проведённые исследования служат доказательством адаптивных перестроек обмена веществ, направленных на выживание рыб в условиях гербицидного загрязнения. Повышение активности катаболических ферментов может обеспечивать исходными субстратами анаболические процессы и энергией — адаптацию гидробионтов к воздействию токсикантов или выведение их метаболитов из организма. Характер токсического влияния зависит от биологических особенностей вида и химических свойств гербицидов. Обмен липидов в организме толстолобика испытывает меньшее негативное воздействие (увеличение активности липазы), чем в организме карпа и белого амура. Однако результаты энзимоиндикации свидетельствуют о большем ингибировании активности ферментов цикла Кребса у белого толстолобика (влияние зенкора и раундапа) и белого амура (влияние зенкора) по сравнению с карпом, что связано с характером их питания.

**

Досліджено активність ферментів, вміст глюкози та загальних ліпідів у печінці білого амура (*Stenopharyngodon idella* Val.), коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) та товстолобика білого (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) за дії гербицидів зенкору і раундапу.

**

Paper deals with activity of some enzymes, content of glucose and total lipids in liver of the grass carp (Ctenopharyngodon idella Val.), scaly carp (Cyprinus carpio L.) and silver carp (Hypophthalmichthys molitrix Val.) under impact of herbicides zenkor and roundup.

**

1. Горбатюк Л. О. Физиолого-біохімічна реакція риб на дію пестицидів (огляд) // Гидробиол. журн. — 2010. — Т. 46, № 2. — С. 83—94.
2. Жигенко А. А. Влияние гербицидов на структурный метаболизм карпа (*Cyprinus carpio* L.) разного возраста // Вісн. Харк. нац. ун-ту. Сер. біологія. — 2007. — Вип. 6, № 788. — С. 86—92.
3. Жигенко А. А. Гербицидное загрязнение водоемов: методы его биотестирования и снижения негативного влияния на гидробионты // Информ. листок ОП ЦНТЭИ. — Чернигов, 2008. — № 7-2008.
4. Жигенко А. О. Морфологічні адаптації різновікових груп *Cyprinus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — Одеса, 2009. — 40 с.
5. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
6. Кравецкий П. А. Влияние нефтяной интоксикации на гидролитическую функцию пищеварительного тракта карповых рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. — Петрозаводск, 2010. — С. 83—84.
7. Кривобок М. Н. Определение жира в теле рыб // Руководство по методике исследования физиологии рыб. — М.: Изд-во АН СССР, 1962. — С. 134—143.
8. Кучер Н. Все о гербицидах, или как выбрать стратегию защиты посевов [Электронный ресурс] // Зерно. — 2010. — № 05. — Режим доступа к журн. <http://zerno-ua.com/?p=9808>.
9. Ленинджер А. Л. Основы биохимии. — М.: Мир, 1985. — 368 с.
10. Мехег О. Б., Яковенко Б. В., Жигенко А. О. Вплив зенкору на вміст глюкози та активність ферментів глюконеогенезу в тканинах коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) при різних температурах // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 3. — С. 99—103.
11. Мехег О. Б. Вплив пестицидного забруднення водного середовища на іхтіологічні показники та метаболічні перетворення в організмі коропа: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2005. — 20 с.
12. Мехег О. Б. Накопление гербицидов группы 2,4-Д в организме карпа разного возраста // Гидробиол. журн. — 2006. — Т. 42, № 3. — С. 61—66.
13. Справочник по физиологии рыб / Под ред. А. А. Яржомбека. — М.: Агропромиздат, 1986. — 192 с.
14. *Biochemica information*. — Boehringer Manneheim GmbH, 1975. — Bd. 1, 2. — 167 S.
15. Creach Y. Protein and free amino acid of carp tissues during prolong starvation // Arch. Sci. Physiol. — 1966. — Vol. 20, N 1. — P. 115—121.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951.— Vol. 193, N 1. — P. 265—275.