

УДК 591.3:597.55.2 (574.2:577.151)

О. М. Водяницький, О. С. Потрохов, О. Г. Зіньковський

**ЕМБРІОНАЛЬНИЙ І РАННІЙ ПОСТЕМБРІОНАЛЬНИЙ
РОЗВИТОК КОРОПА ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ
ЕНЕРГЕТИЧНОГО І ПЛАСТИЧНОГО ОБМІНУ ЗА ДІЇ
КОЛИВАНЬ ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМУ
ВОДОЙМИ**

Досліджено вплив коливань температури і вмісту розчиненого кисню у воді на проходження ембріонального та раннього постембріонального розвитку коропа. Встановлено, що при нетиповому підвищенні температури води у період нересту та зниженні вмісту розчиненого кисню життєздатність ембріонів зменшується. Ці умови викликають затримку проходження ембріональних стадій розвитку і змінюють масово-розмірні характеристики личинок. Температурний чинник суттєво впливає на активність ключових ферментів, а енергетичний обмін при зниженні вмісту розчиненого кисню частково спрямовується з аеробного на анаеробний. Зі зростанням температури води знижується активність протеаз, які безпосередньо впливають на органогенез ембріонів.

Ключові слова: короп, ембріональний розвиток, температура води, вміст розчиненого кисню, активність ферментів.

Останнім часом у зв'язку з кліматичними змінами спостерігається значне зростання температури води у водоймах [11]. У багатьох річках вона збільшилась на 4—5°C, що суттєво змінило умови існування риб. Підвищений температурний фон не може не позначитись на хімічному складі води, екологічному стані водойм та на проходженні фізіолого-біохімічних процесів у гідробіонтів [2, 4, 7, 8]. Безперечно, температурний режим водойми впливає і на проходження раннього ембріогенезу риб.

Здатність риб жити у певному температурному інтервалі є еволюційно сформованою адаптацією. Поряд з пристосуванням до термічних умов особливе значення має їх здатність протидіяти різким короточасним або тривалим змінам температури [9, 10, 12].

Фізіологічні реакції організму мають вирішальне значення для процесу адаптації риб до швидко виникаючих змін температурного режиму та різних коливань інших екологічних чинників у природних водоймах. Проте ефективність цих реакцій помітно знижується, коли виникає необхідність пристосування до більш тривалих температурних змін, які розвиваються протягом кількох діб або тижнів (наприклад, при температурному забрудненні во-

© О. М. Водяницький, О. С. Потрохов, О. Г. Зіньковський, 2016

дойм, при тривалому перевищенні температурних норм даного регіону), або при багатомісячних сезонних змінах [4, 15, 16]. У цих випадках істотного значення набуває біохімічний рівень реакцій організму і механізм компенсаторної біохімічної адаптації, які забезпечують нормальну життєдіяльність риб у широкому діапазоні температур і їх виживання при екстремальних температурах.

Найбільш показовими є дослідження, які проводяться на ранніх етапах розвитку риб. Ікра та личинки дуже вразливі до впливу негативних чинників через те, що їх системи захисту знаходяться на стадії розвитку. У той же час нехарактерні температури, які призводять до істотних змін газового режиму, викликають порушення поділу клітин, процесів диференціації органів і тканин і негативно впливають на нормальний хід ембріогенезу у цілому.

Тому метою наших досліджень було визначити ступінь впливу температурного режиму водойми на розвиток ембріонів коропа і активність ферментних реакцій в ікрі та личинках риб.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили на Білоцерківській експериментальній гідробіологічній станції Інституту гідробіології НАН України протягом травня, тобто під час нересту коропа у природних водоймах. В експериментах використовували ікру, ембріони та личинок коропа, який є представником аборигенної іхтіофауни.

Нами були відібрані три водойми, які розрізнялися за температурними умовами, а відтак і кисневим режимом. Всі дослідні водойми наповнювалися водою з р. Рось. Вода р. Рось та у дослідних водоймах характеризувалася наступними гідрохімічними показниками: рН — 8,2—8,3, твердість — 6,1—6,3 мг-екв/дм³, вміст кальцію — 57,8—66,1 мг Ca²⁺/дм³, магнію — 34,0—35,2 мг Mg²⁺/дм³, хлору — 30,1—39,2 мг Cl⁻/дм³; азоту амонійного — 0,28—0,51 мг N/дм³, нітритів — 0,06—0,11 мг N/дм³, нітратів — 0,80—1,2 мг N/дм³, фосфатів — 0,054—0,062 мг P/дм³, ПО — 8,0—9,1 мг O/дм³, БО — 18,5—19,1 мг O/дм³. Гідрохімічні показники встановлювали за стандартними методами, вміст розчиненого кисню вимірювали о четвертій годині ранку методом Вінклера [5].

Штучно запліднену ікру коропа після її знеклеювання молоком та відмивання водою розміщували у водоймі у сітчастих контейнерах з вічком № 38 з метою максимального наближення до умов природного нерестовища. Паралельно ікру інкубували в лабораторії за постійних температурних умов.

Зразки матеріалу для біохімічного аналізу відбирали вранці о 6—9 год. Активність лужної фосфатази встановлювали з використанням набору реактивів «Лужна фосфатаза» (Філісіт-Діагностика, Україна), активність ЛДГ — стандартного набору «ЛДГ» (Філісіт-Діагностика, Україна). Активність сукценатдегідрогенази встановлювали за [1]. Активність Na, K-активуємої, Mg-залежної АТФ-ази вимірювали за приростом неорганічного фосфору у середовищі інкубації [3], активність протеаз — імуноферментним методом [6]. Отримані дані оброблені статистично за допомогою Statistica 5.5 і Eraprobitanalysis program used for calculating LC/EC values (Version 1.5).

Результати досліджень та їх обговорення

Відомо, що температура впливає на метаболізм, формоутворення, темп індивідуального розвитку і визначає тривалість етапів ембріогенезу риб [13]. Процеси метаболізму у них відбуваються у певних температурних межах та специфічному оптимумі для кожного виду. Кращі результати інкубації ікри отримують тоді, коли у першій половині ембріогенезу діють низькі температури, а в другій — підвищені, але не вище оптимальних. Низькі температури оптимальної зони сприяють росту зародків риб, а підвищені дещо знижують інтенсивність росту, але прискорюють їх розвиток, при цьому раніше настає пульсація серця зародка і спостерігається вища швидкість пульсації. Зростання температури, особливо під час формування залоз вилуплення, обумовлює вихід ембріонів з оболонок на більш ранніх стадіях розвитку [14].

Середньодобова температура води у досліджених водоймах відрізнялась на 0,5—0,8°C (рис. 1), при цьому у ранковий та вечірній час різниця збільшувалась до 1,0—1,2°C. Під час проведення дослідження температура води у всіх водоймах змінювалось від 19,3 до 29,4°C, у стаціонарних умовах її підтримували на рівні 22,0—22,5°C.

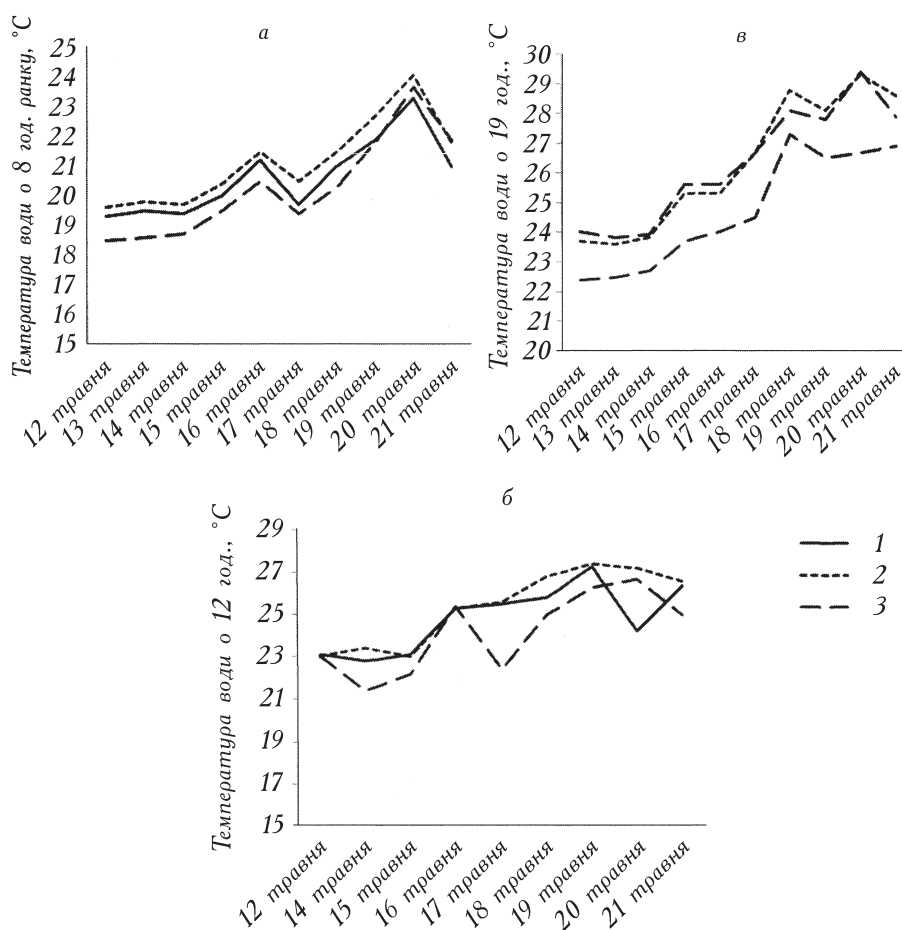
Середня температура води вранці у водоймах № 1, 2 і 3 становила відповідно 20,6, 21,1 і 20,2°C, ввечері відповідно 26,3, 26,4, 24,7°C, сума тепла під час спостереження становила відповідно 223,5, 228,3 і 217,4 градусо-днів.

У найбільш прогрітій водоймі (№ 2) на четверту годину ранку на нерестовищах відмічалось суттєве зниження вмісту кисню у воді — до 2,5—3,6 мг/дм³ (рис. 2). У той же час у водоймі № 1 він знижувався до 2,7—4,1 мг/дм³, а у водоймі № 3 не був нижчим за 4,5—5,6 мг/дм³. У стаціонарних умовах вміст кисню у воді був на рівні 7,5—10,2 мг/дм³.

Через істотну різницю у температурному режимі змінювалась швидкість проходження ембріональних стадій розвитку коропа. Під час масового вилуплення передличинок у стабільних температурних і кисневих умовах на природних нерестовищах ембріони знаходилися на стадії рухливого ембріону (вищі температури води) або початку пігментації очей, відділення хвостового стебла (середній і нижчий температурні режими). Розвиток ікри у природних умовах затримувався на 20—24 год. Таким чином, через коливання температури води протягом доби, незважаючи на те, що загальна сума тепла була вищою на експериментальних нерестовищах, ніж у лабораторних умовах, спостерігалось уповільнення швидкості проходження ембріональних стадій. Навіть несуттєва середньодобова різниця між дослідними водоймами (0,5—0,8°C) призводила до уповільнення ембріогенезу риб на 4—6 год.

Ікра коропа досить стійко витримує передранкове зниження вмісту розчиненого кисню у воді. Вживання ікри знижувалось на 6,7—10,5% за першу та на 8,8—19,3% за другу добу порівняно з стаціонарними умовами.

Відмічена істотна різниця довжини та маси передличинок з досліджених водойм. Так, при найвищому температурному режимі середня довжина личинок становила 7,4 мм, маса 1,2 мг (табл. 1). Для них характерне більш



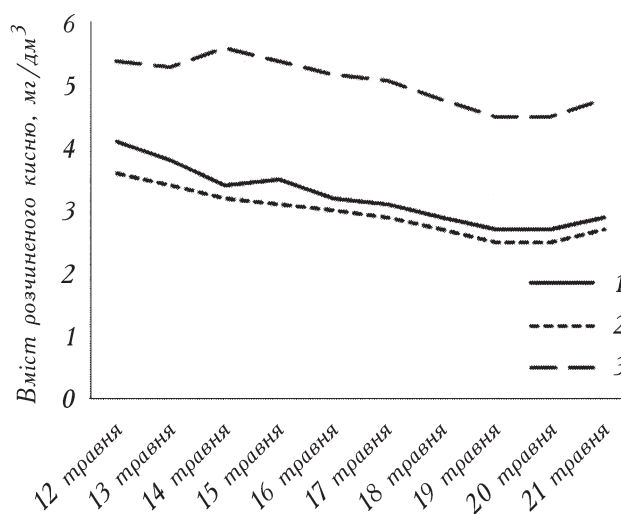
1. Температура води у досліджених водоймах (о 8-й (а); 12-й (б); 19-й (в) годині) під час спостереження за розвитком ікри коропа. Тут і на рис. 2, 5—7: 1, 2, 3 — номери водойм.

швидко проходження ембріональних стадій розвитку. У найбільш прохолодній водоймі середня довжина передличинок досягала 9,4 мм, а маса 1,5 мг. Безперечно, такі відмінності між личинками не можуть не позначитися на їх життєздатності на наступних стадіях розвитку.

Встановлена вірогідна залежність між масою передличинок коропа і температурними умовами досліджених водойм (рис. 3, 4). Також відмічена суттєва різниця маси передличинок при температурі води 20,4—21,6°C і 22,0—22,7°C, що більшою мірою свідчить про фізіологічний стан плідників коропа за різних температурних умов.

За стабільних температурних і кисневих умов активність ЛДГ ікри коропа була найнижчою порівняно з умовами, наближеними до природних. У більш прохолодній водоймі (№ 3) при досить високому вмісті кисню активність ЛДГ протягом всього ембріогенезу була меншою. З підвищенням

температури оточуючого середовища її активність в ікрі зростала в 1,71—1,89 разу (рис. 5). Досить високі значення відмічені на перших етапах ембріонального розвитку протягом двох діб, а на заключних етапах вони знижувались у два рази. Безумовно, в умовах низького вмісту розчиненого кисню у воді вже на ембріональному етапі розвитку застосовується гліколіз для підтримки енергетичного балансу і, відповідно, активність зростає ЛДГ.

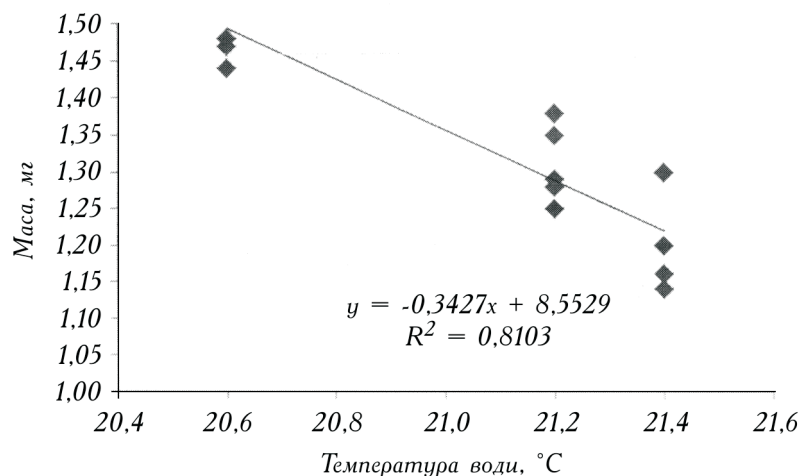


2. Вміст розчиненого кисню у воді о 4-й годині ранку.

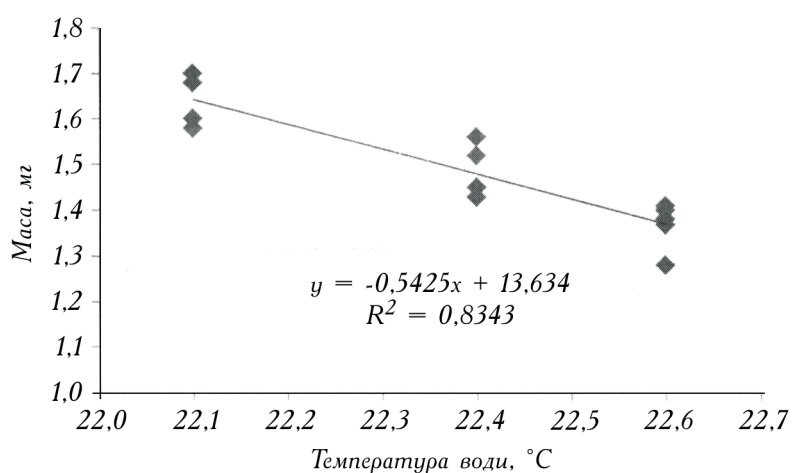
Для ембріонів коропа характерна коливальна зміна активності СДГ. Протягом початкових етапів (перша доба) вона максимальна, на другу добу цей показник зменшується у 3—10 раз, а на третю знов зростає, але не досягає рівня першої доби (рис. 6). У водоймі № 1 (середній температурний режим) активність СДГ завжди була нижчою, ніж в інших, тобто для енергетичного забезпечення переважно застосовувався гліколіз. У двох інших водоймах відмічена пряма залежність між температурою води і активністю цього фермента. Наші дослідження вказують на істотне застосування вуглеводів у розвитку ембріонів риб незалежно від температурного і кисневого режиму водойми. На останніх етапах ембріогенезу найвища активність СДГ відмічена у зародків, що розвивались за стабільних умов, розвиток яких був

1. Маса личинок коропа та їх виживання за різних температурних режимів

Середня температура води, °С	Маса личинок, мг			Вживання личинок за весь період, %	
	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>t_{st}</i>	<i>M</i>	<i>m</i>
Початок травня					
20,6	1,49	0,02	—	79,2	1,2
21,2	1,31	0,02	6,36	72,1	3,1
21,4	1,20	0,03	3,05	68,7	2,7
Кінець травня					
22,1	1,64	0,03	—	83,1	2,4
22,4	1,49	0,03	5,00	76,5	1,8
22,6	1,37	0,02	3,33	74,2	2,7



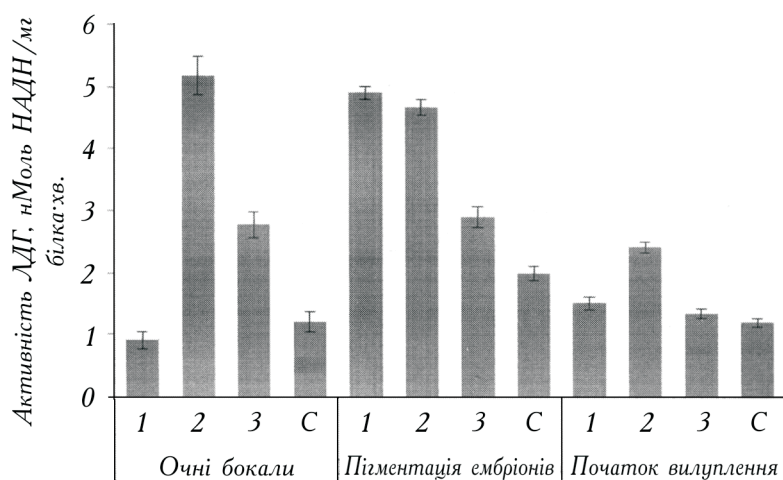
3. Залежність між масою личинок коропа і температурою води (20,4—21,6°C).



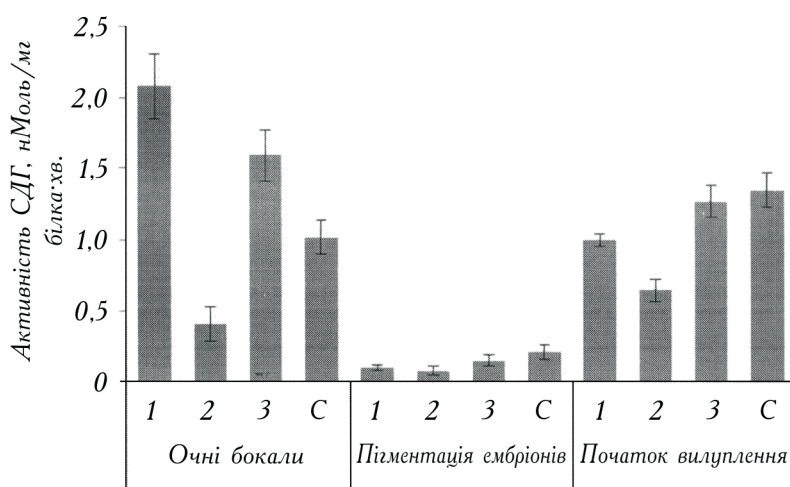
4. Залежність між масою личинок коропа та температурою води (22,0—22,7°C).

прискореним порівняно з ембріонами, що перебували у природних водоймах.

АТФаза бере активну участь у мінеральному обміні між внутрішнім та оточуючим середовищем, забезпечуючи енергетику цього процесу. Найбільш високі рівні активності АТФази спостерігалися протягом другої доби, у першу і третю вона була у три — п'ять раз нижчою (рис. 7). За температури 18,6—23,3°C істотних відмінностей цього показника не відмічено. У той же час при максимальному прогріві води (до 27,4°C) активність АТФази різко зростала, що свідчить про посилення обміну речовин між зовнішнім та



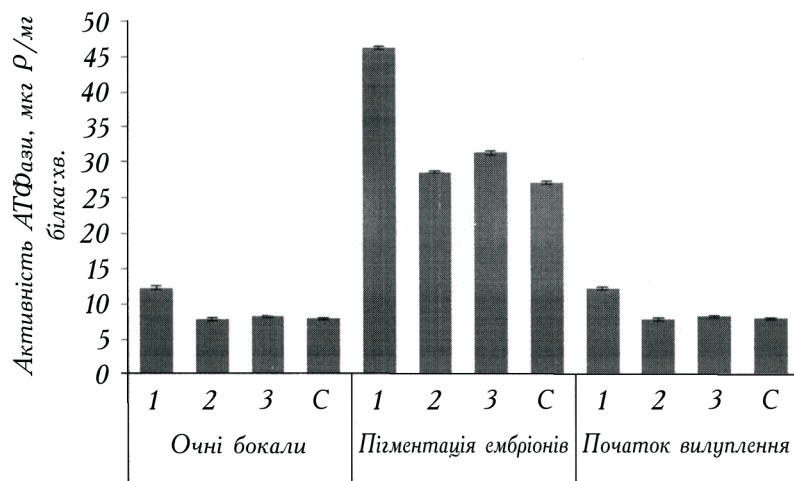
5. Активність ЛДГ личинок коропа за різних умов. Тут і на рис. 6, 7: С — лабораторні умови; $M \pm m$, $n = 7$.



6. Активність сукцинатдегідрогенази за різних умов ембріонального розвитку коропа.

внутрішнім середовищем ікрички і між ембріоном та жовтком. Отже, протягом ембріонального розвитку коропа температура води і кількість розчиненого в ній кисню суттєво впливають на активність АТФази та інших ферментів.

Активність протеаз ембріонів коропа також істотно залежить від температури оточуючого середовища. З її підвищенням активність цієї групи ферментів значно знижується. На другу добу на стадії пігментації ембріонів ак-



7. Активність АТФази за різних умов ембріонального розвитку коропа.

тивність протеаз з підвищенням температури знижується на 11,1—47,1%. У стабільних умовах та при нижчій температурі (водойма № 3) цей показник протягом всього ембріонального розвитку суттєво не змінювався. Висока активність протеаз свідчить про рівень катаболізму білків, насамперед запасних. Якщо підвищена активність фермента за стабільних умов пов'язана з більшою швидкістю проходження ембріогенезу, то при сприятливому режимі природної водойми вона забезпечує відсутність порушень ембріогенезу. При низьких рівнях активності протеаз та при вищих енерговитратах в умовах підвищеної температури води та зниженні вмісту розчиненого кисню у передранкові години відмічена значно більша кількість випадків ембріопатій.

Висновки

Коливання температури і вмісту розчиненого кисню у воді за межі норми уповільнюють ембріональний розвиток коропа порівняно зі стабільними оптимальними умовами.

При коливальному режимі температури води на нерестовищах з перевищенням її оптимальних значень маса та довжина личинок коропа зменшуються.

За зростанням активності ЛДГ в ембріональних тканинах можна судити про погіршення кисневих умов у водоймі. Ембріони активніше застосовують гліколіз для підтримки енергетичного балансу.

Активність сукценатдегідрогенази в ембріонах підвищується при збільшенні температури води та зменшується при погіршенні кисневих умов. При цьому витрачається значна кількість запасних енергоємних речовин, що може негативно позначитися на фізіологічному стані зародків і суттєво знизити вихід життєздатних личинок при перевищенні оптимальних температурних умов.

Підвищення активності АТФази за несприятливих умов середовища, особливо низького вмісту розчиненого кисню у воді, істотно збільшує обмін речовин між зовнішнім та внутрішнім середовищем.

Перевищення температурного оптимуму та зниження вмісту розчиненого кисню істотно зменшує активність протеаз ембріонів риб, що у свою чергу викликає уповільнення проходження ембріональних стадій розвитку і появу аномальних зародків, знижуючи життєздатність личинок.

**

Исследовано влияние колебаний температуры и содержания растворенного кислорода в воде на прохождение эмбрионального и раннего постэмбрионального развития карпа. Установлено, что при нетипичном повышении температуры воды в период нереста и снижении содержания растворенного кислорода жизнеспособность эмбрионов уменьшается. Эти условия вызывают задержку прохождения эмбриональных стадий развития и меняют массо-размерные характеристики личинок. Температурный фактор существенно влияет на активность ключевых ферментов, а энергетический обмен при снижении содержания растворенного кислорода частично переключается с аэробного на анаэробный. С ростом температуры воды снижается активность протеаз, которые непосредственно влияют на органогенез эмбрионов.

**

The influence of temperature fluctuations and dissolved oxygen content on embryonic and early postembryonic development of carp is investigated. It was found that the atypical increase water temperature over the spawning period and reducing the dissolved oxygen decreases vitality of embryos. This conditions delay of the embryonic stages, changes the weight and size of larvae, affects the activity of key enzymes and energy metabolism. Increase of water temperature decreases the activity of proteases, which directly affect the embryo's organogenesis.

**

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. — М.: Наука, 1965. — 544 с.
2. Вайнерт Э., Вальтер А., Ветцель Т. и др. Биоиндикация загрязнения наземных экосистем. — М.: Мир, 1988. — 350 с.
3. Кондрашова М.Н., Лесогорова М.Н., Шноль С.Э. Метод определения неорганического фосфора по спектрам поглощения в ультрафиолете // Биохимия. — 1965. — Т. 30, вып. 3. — С. 567—572.
4. Корниенко Г.Г., Бойко Н.Е., Бугаев Л.А. и др. Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-черноморского бассейна. Методическое руководство. — Ростов-на-Дону: Эверест, 2005. — 105 с.
5. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / За ред. В.Д. Романенка. — К.: Логос, 2006. — 408 с.
6. Пат. 2373538 Российская Федерация, МПК G01N33/53, G01N33/573. Способ определения IgG-протеиназной активности / Тюрин Ю.А., Ку-

- ликов С.Н., Фассахов Р.С., Долбин Д.А., Баязитова Л.Т. (РФ); № 2008113407/13; заявл. 28.03.2008; опубл. 20.11.2009, Бюл. № 32. — 5 с.
7. Романенко В.Д. Основы гидроэкологии. — Киев: Генеза, 2004. — 664 с.
 8. Шатуновский М.И. О физиолого-биохимических индикаторах состояния рыб в водоемах-охладителях энергетических объектов // Методы биоиндикации окружающей среды в районах АЭС. — М., 1988. — С. 27—100.
 9. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptations. — Princeton: University Press, 1984. — 355 p.
 10. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. — Oxford: Oxford University Press, 2002. — 356 p.
 11. Janauer G.A. Aquatic vegetation in river flood plains: climate change effects, river restoration and ecohydrology aspects // Climate change. Inferences from paleoclimate and regional aspects. — New York: Springer, 2012. — P. 149—156.
 12. Khillare Y.K., Wagh S.B. Effect of cold stress on the glycogen and ascorbic acid content of *Barbus stigma* (Ham.) // Geobios (India). — 1989. — Vol. 16, N 1. — P. 47—48.
 13. Lemly A.D. Winter stress syndrome: an important consideration of hazard assessment of aquatic pollutants // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 1996. — Vol. 34, N 3. — P. 223—227.
 14. Storey K.B., Storey J.M. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation, and estivation // Rev. Biol. — 1990. — Vol. 65. — P. 145—174.
 15. Tatrai I., Penczak T. Influence of temperature of rearing on nitrogen metabolism of juvenile bream (*Abramis brama*) // Comp. Biochem. Physiol. B. — 1985. — Vol. 82, N 1. — P. 125—129.
 16. Tripathi G., Verma P. Sex-specific metabolic changes in the annual reproductive cycle of a freshwater catfish // Ibid. — 2004. — Vol. 137, N 1. — P. 101—106.