И.К. Газимагомедова, М.М. Рабаданова

Физиолого-биохимические показатели рыб в раннем онтогенезе при нефтяном загрязнении водной среды

Дагестанский государственный университет; Россия, 367001, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а; kurbanova_i9@mail.ru

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по изучению физиолого-биохимических показателей организма рыб в условиях нефтяного загрязнения водной среды. Исследованы эмбриогенез, аномалии развития, рост, поведенческие реакции, сердечный ритм, содержание общего белка, изменение активности лизосомальных протеиназ в теле молоди кутума на ранних стадиях онтогенеза (0+). Выявлены изменения всех исследованных показателей рыб под воздействием нефти в диапазоне концентраций 0,1–40 мг/мл. Реагирование белкового обмена на нефтяное загрязнение выражалось либо увеличением общего белка, либо его снижением по сравнению с контролем, то есть имело фазовый характер. Показано снижение содержания общего белка у молоди кутума при продолжительном воздействии нефти и сравнительно высокая активность кислых эндопротеиназ лизосом в раннем развитии (молодь 0+), что указывает на ведущую роль кислых пептид-гидролаз в деградации белка, необходимого для обеспечения аминокислотами и пептидами для поддержания гомеостаза организма молоди в период, когда происходит переход на экзогенное питание. Активность пептид-гидролаз лизосом у рыб в контроле возрастает по мере «взросления», что указывает на интенсификацию протеолиза, связанную с ускорением темпов роста по мере развития молоди.

Таким образом, приспособление, лежащее в основе всех адаптационных связей в организме, может осуществляться за счет биологических механизмов, включающих изменение морфологических, физиологических и поведенческих реакций гидробионтов.

Ключевые слова: *кутум, нефтяное загрязнение, эмбриогенез, рост и развитие, белок, пептид-гидролазы лизосом.*

Основной причиной экологической напряженности в природных водоемах, в частности Каспийском море, является техногенное загрязнение, связанное с высоким уровнем урбанизации прибрежных зон, промышленными и бытовыми стоками, нефтяными разработками на шельфе и дне водоема.

Нефтяные углеводороды стали уже традиционными загрязнителями данного водоема. Так, по данным ДФ КаспНИРХ уже в течение более 20 лет содержание нефтепродуктов в прибрежной зоне составляет от 1 ПДК (0,05 мг/л) до 8 ПДК, а в устьевой зоне реки Терек загрязнение доходило до 40 ПДК [1, 2].

Качественные изменения условий обитания гидробионтов сказываются на всех звеньях экосистемы, особенно подвержены отрицательному воздействию токсикантов рыбы, так как являются одним из конечных звеньев в пищевых цепях водных биоценозов. Аккумулируясь в тканях рыб, токсиканты изменяют метаболизм и процессы жизнедеятельности, как следствие снижается экологическая устойчивость и биоразнообразие экосистемы, сокращаются промысловые уловы рыб. Накопившийся за последние десятилетия экспериментальный материал однозначно свидетельствует о том, что химическое загрязнение водной среды вызывает глубокие изменения биохимического состава тканей и метаболизма у рыб задолго до их гибели [3, 4, 5, 6].

Ответом организма на любое изменение среды обитания является развитие неспецифического адаптационного синдрома, позволяющего корректировать метаболизм при интоксикации и поддерживать нормальную жизнедеятельность.

Однако резистентность рыб к токсичным веществам претерпевает существенные изменения в процессе онтогенеза. Наименьшая устойчивость к неблагоприятным факторам среды отмечена в эмбриональный период развития рыб [5, 7]. Обычно высокая лабильность к изменившимся условиям проявляется в переломные или критические периоды онтогенеза, когда индивидуальная адаптация порой может не справиться со стрессором и тогда механизмы отбора срабатывают жестче. Поэтому правильно оценить интегральный уровень загрязнения водной среды и определить ПДК для токси-кантов позволяет комплексная диагностика интоксикации организма на начальных стадиях онтогенеза с учетом не отдельных параметров, а целого ряда морфофункциональных и биохимических критериев.

Карповые рыбы являются удобными и широко применяемыми тест-объектами, которые считаются более устойчивыми к токсическому воздействию среды по сравнению с другими семействами [5]. Одним из ценных промысловых видов рыб является кутум (*Rutilus frisii kutum* К.), эндемик Каспия.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния нефтяного загрязнения водной среды на физиолого-биохимические показатели кутума в раннем онтогенезе. В модельных опытах исследовано хроническое влияние различных концентраций нефти на эмбриональное развитие, выживаемость, поведение, рост, содержание общего белка, активность лизосомальных кислых пептид-гидролаз.

Материал и методы

Объектами исследования были – оплодотворенная икра, предличинки, личинки и молодь кутума. В качестве токсиканта использовали сырую нефть в концентрациях 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 40 мг/л (ПДК = 0,05 мг/л). Для поддержания концентрации токсиканта в аквариумах растворы с нефтью обновляли каждую неделю. Контрольные объекты на соответствующих стадиях раннего онтогенеза содержали в чистой воде без добавления нефти.

Оплодотворенную икру кутума привозили с Терского осетрового завода Республики Дагестан, икрометание у кутума происходит в конце апреля. Икру инкубировали при разных концентрациях нефти и в воде без добавления токсиканта в аквариумах по 50 шт. при температуре +18–20 °С.

Через 5–6 суток, после завершения эмбрионального развития, выклюнувшихся в чистой воде предличинок по 20–30 шт. пересаживали в аквариумы с разными концентрациями сырой нефти. Через 2 суток после выклева предличинки перешли на экзогенное питание, то есть стали личинками. После 14 суток от выклева, с момента появления чешуи, они приобретают вид взрослой рыбы и до середины лета являются мальками. С момента выклева инкубация в аквариальных условиях при постоянной аэрации и температуре воды +20–23 °С продолжалась в течение 70 суток. Кормили личинок и мальков живым трубочником.

Ежедневно вели наблюдения и учет за развитием эмбрионов при помощи бинокулярной лупы и светового микроскопа. Учитывали выживаемость, сроки выклева, наличие аномалий развития, линейный рост, частоту сердечных сокращений (ЧСС), поведение у предличинок и личинок. Длину тела измеряли сантиметровой линейкой, ЧСС – с помощью секундомера.

Личинки и мальки на 10, 20, 30 и 70-е сутки экспозиции в нефтяной среде использовали для биохимических анализов. Для этого, используя тела рыб с удаленными внутренностями, готовили 1% водный гомогенат. В гомогенатах при температуре 20–23 °С определяли активность кислой пептид-гидролазы модифицированным методом Ансона [9] по гидролизу 2% раствора гемоглобина в 0,2 М буфере по Лурье (рН 3,8) и выражали в мкг тирозина на 1 мг белка ферментного препарата за 1 ч инкубации. Общий белок в гомогенатах определяли методом Лоури [8].

Данные статистически обработаны методом малой выборки по t-критерию Стьюдента [10]. Различия считали достоверными при значениях $P \leq 0,05$ и ниже. Построение диаграмм осуществлено при помощи пакета Excel 7,0.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты выявили тератогенные эффекты при нефтяном загрязнении среды с первых же дней экспозиции икры, которые подчиняются закону «доза – эффект», то есть, чем выше концентрация нефти, тем сильнее они были выражены. Стадия гастрюляции как один из критических периодов развития оказалась наиболее чувствительной, низкая резистентность зародышей характеризовалась повышенной гибелью зародышей, чем на других этапах эмбриогенеза. Выживаемость икры также зависела от концентрации нефти: максимальная выживаемость в нефтяной среде отмечена в растворе с 0,05 мг/л нефти – 68 %; для сравнения, в контроле – 90 %.

При воздействии нефти в концентрациях от 0,1 до 1,0 мг/л происходило запаздывание выклева предличинок кутума в сравнении с контролем на 1–2 сутки из-за уплотнения оболочки икры. При концентрации нефти 40 мг/л развитие эмбрионов вначале заметно отставало, затем приостанавливалось, после чего происходила постепенная гибель эмбрионов; мертвый выклев составил всего 2,5 %, а в остальных случаях наблюдались некротические процессы в неразвивающихся зародышах под уплотненной оболочкой икры.

Чем выше концентрация нефти, тем скорее наступала полная гибель предличинок кутума после выклева, только при концентрациях нефти 0,05 мг/л за период исследования (2,5 месяца), как и в контроле, гибель не отмечалась. При более высоком содержании нефти в водной среде летальность составила: при концентрациях 0,1; 0,2; 0,5 мг/л – 43–50 %, при 1,0 мг/л – 38 %, при 40 мг/л – 65 %, при 80 мг/л – 82 %. Сроки наступления полной гибели эмбрионов и личинок (в сутках) с момента начала развития икры в нефтяной среде находятся в прямой зависимости от концентрации нефти: LK_{100}^{13} – 40 мг/л, LK_{100}^{15} – 0,5 и 1,0 мг/л, LK_{100}^{23} – 0,2 мг/л.

Во всех вариантах, кроме контроля, действие нефти на икру вызвало появление аномалий развития кутума, их число возрастало в растворах с большей концентрацией токсиканта. Среди аномалий преобладали водянка перикардия и сердце в виде трубки – 47 % от общего числа уродств; полости в желточном мешке – 30 %; искривление хорды – 16 %.

Эмбрионы из аквариумов с разным содержанием нефти отличались не только морфологически. Выявлены разные показания ЧСС, однако изменения сердечного ритма, говорящие о нарушении обменных процессов в организме рыб, прямо зависели в большей степени от функционального состояния эмбрионов и предличинок, чем от концентрации нефти, т.е. отличались у рыб с аномалиями и нормальным строением (рис. 1).

У аномальных эмбрионов сердечный ритм вдвое замедлен по сравнению с контролем, отмечалось значительное урежение ЧСС со временем (брадикардия), что с при-

ближением летального исхода составляло 40–50 сокр/мин (для сравнения, в контроле за время опыта средняя величина равнялась 105–125 сокр/мин).

Рис. 1. Сердечный ритм эмбрионов (до 6 суток от оплодотворения) и предличинок кутума (после 6 суток от оплодотворения) при развитии в нефтяной среде

У предличинок из аквариумов с нефтью, которые не имели внешних морфологических аномалий, сердечный ритм сначала был уреженным, чем у контрольных особей, но уже с 10-х суток от выклева ЧСС у этих групп отличалась незначительно.

Исследование линейного роста личинок кутума в условиях нефтяного загрязнения водной среды показало, что его угнетение отмечается еще при эмбриональном и раннем постэмбриональном развитии (рис. 2).

Рис. 2. Динамика линейного роста личинок кутума, развивающихся в нефтяной среде (мм)

Ко времени выклева предличинки, а затем личинки и молодь отличались меньшей длиной тела, чем в контроле. Ингибирование линейного роста на начальных сроках после выклева при концентрациях нефти 0,1–1,0 мг/л не столь выражено, как у рыб из раствора с 40 мг/л нефти, у которых линейный рост отставал от контрольных личинок на 16–27 % (рис. 2). При дальнейшей экспозиции в нефтяной среде отставание в росте у мальков становилось более выраженным.

Резкое снижение сердечного ритма из-за снижения активности обмена веществ и роста приводило к смерти в условиях продолжительного воздействия нефти.

Поведение – важный показатель высших регуляторных систем организма, интегральный показатель, в первую очередь состояния нервной системы. Поведение молоди рыб при нефтяном стрессе отличалось разнообразными неспецифическими реакциями, которые совпадают с общими стереотипами поведения в токсических условиях: перевозбуждение, заторможенность, подергивание тела, нарушения координации движений – плавание на боку и по спирали, анорексия, заглатывание с поверхности воды воздуха и капелек нефти, расстройства сенсорной чувствительности и полная утрата реагирования. Симптомы отравления усугублялись с ростом концентрации нефти в водной среде, а также во всех вариантах опыта отличалось поведение аномальных и нормальных рыб.

Наблюдения показали, что хроническое воздействие относительно невысоких концентраций нефти (0,05–0,2 мг/л) на эмбрионов и предличинок кутума и 0,5 мг/л на молодь кутума не приводит к отклонениям в поведении рыб по сравнению с контролем. При концентрации нефти 40 мг/л отмечались необратимые изменения в поведении и жизнедеятельности рыб в целом, ведущие к ранней гибели.

У подопытных кутумов в нефтяной среде активность пищевого поведения была нормальной. Следовательно, замедление роста у рыб при нефтяном загрязнении происходило за счет изменения направленности обменных процессов на обеспечение индивидуальной адаптации к изменившимся условиям среды.

Чтобы выявить наличие метаболических изменений, приведших к ингибированию линейного роста, определяли количественное содержание общего белка и активность кислых лизосомальных протеаз в теле мальков кутума.

Выявлены изменения белкового обмена при влиянии нефти, которые имели фазовый характер, соответствующий стадиям развития токсического стресса. При хроническом загрязнении водной среды нефтью отмечалось снижение содержания общего белка в теле мальков кутума и увеличение кислой пептид-гидролазной активности (табл. 1).

Динамика общего белка имеет вид волнообразной кривой: его снижение на 10-е сутки опыта в пределах от 10 до 30 % относительно контроля сменяется увеличением на 20-е и 30-е сутки и вновь снижается при пролонгированной экспозиции в нефтяной среде. Повышение белка может быть вызвано усилением синтеза стрессовых белков, накоплением стабильных метаболитов окислительной модификации аминокислот, индукцией высокомолекулярных белков [12].

Таблица 1.

Динамика общего белка ($M \pm m$, мг белка/г сырой ткани) и активность кислой пептид-гидролазы ($M \pm m$, мкМоль тирозина/мг белка) в теле мальков кутума при воздействии нефти

Концентрация нефти, мг/л	Экспозиция, сутки			
	10	20	30	70

	Общий белок			
Контроль	262,8 ± 9,9	213,0 ± 0,5	194,5 ± 8,7	306,0 ± 17,8
0,05	182,5 ± 7,4*	218,5 ± 2,9	178,0 ± 4,5	308,0 ± 6,0
0,1	233,5 ± 4,7*	217,0 ± 3,1	220,0 ± 2,3*	235,7 ± 7,1*
0,5	183,3 ± 0,6*	229,5 ± 5,1*	191,0 ± 4,0	263,0 ± 4,7
1,0	188,7 ± 5,5*	226,8 ± 0,7*	230,5 ± 6,0*	256,0 ± 3,2*
	Активность кислой пептид-гидролазы			
Контроль	0,212 ± 0,004	0,250 ± 4·10 ⁻⁴	0,276 ± 0,001	0,282 ± 0,001
0,05	0,295 ± 0,001*	0,259 ± 0,001*	0,265 ± 0,008	0,265 ± 0,003*
0,1	0,219 ± 0,001	0,259 ± 0,002*	0,288 ± 0,005	0,367 ± 0,001*
0,5	0,294 ± 0,001*	0,234 ± 0,001*	0,286 ± 0,003	0,318 ± 0,004*
1,0	0,282 ± 0,001*	0,235 ± 2·10 ⁻⁴ *	0,250 ± 0,001	0,371 ± 0,002*

Примечание. * – различия достоверны в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

На 70-й день воздействия концентраций нефти 0,1; 0,5 и 1,0 мг/л содержание белка в теле мальков кутума снижалось соответственно на 23,0; 14,0 и 16,3 %; лишь при концентрации нефти 0,05 мг/л уровень белка соответствовал контрольному уровню (табл. 1). Такую картину можно считать сигналом о начавшихся деструктивных процессах в тканях, на что указывает отчетливое увеличение активности лизосомальных пептид-гидролаз на 30-е и 70-е сутки влияния нефти, за исключением концентрации нефти 0,05 мг/л.

Динамика активности кислой пептид-гидролазы в теле кутума при воздействии нефти также имела фазовый характер, с тенденцией к повышению активности на 10-е сутки опыта (на 38,7 и 46,5 % при концентрациях нефти 0,5 и 1,0 мг/л соответственно), с затухающей амплитудой на 20-е сутки. При пролонгированной интоксикации активность фермента увеличивалась и к 70-м суткам превышала контрольные значения, особенно при концентрациях нефти в среде 0,5 и 1,0 мг/л – на 12,8 и 31,6 % соответственно.

Известно, что скорость роста рыбы, ее двигательная активность и обеспеченность энергетическими субстратами детерминированы интенсивностью расщепления белка в скелетных мышцах, составляющих до 75 % живого веса рыбы [11]. Регуляция скорости деградации белка может значительно изменить скорость роста и накопления белковой массы, поэтому характеристика протеолитических механизмов очень важна для понимания ростовых процессов [12, 13].

Заключение

Полученные результаты подтверждают эмбриотоксичность нефти, высокую чувствительность рыб на ранних стадиях онтогенеза к присутствию нефти в воде в концентрациях, превышающих 0,1 мг/л (2 ПДК). Даже при относительно невысоких концентрациях нефти при всех изученных концентрациях, кроме 0,05 мг/л, отмечались нарушения роста, развития, поведения, метаболизма, что иллюстрирует целесообразность принципа комплексности тестов при эколого-биохимическом мониторинге водоемов.

Характер наблюдаемых изменений белкового обмена свидетельствует о том, что на определенных этапах воздействия нефтяного загрязнения в организме рыб начинают преобладать катаболические процессы, обусловленные деградацией белков. Чередова-

ние возрастания и снижения содержания белка может свидетельствовать об интенсификации использования белков при нефтяном токсикозе для активизации защитных реакций организма. Динамика кислой пептид-гидролазной активности и содержание белка находятся в обратной зависимости между собой и отражают один из механизмов ингибирования роста при нефтяной интоксикации рыб.

Повреждающее воздействие токсикантов на рыб отражается перестройкой метаболизма (изменяется соотношение энергетического и пластического обменов в пользу первого), нарушением регуляции, накоплением аутоксина, возникновением широкого спектра патологий как в клетке, так и на уровне всего организма, ведущих к снижению жизнедеятельности. В основе этих неспецифических изменений, свидетельствующих об угнетении пластического обмена, лежат нарушения окислительно-восстановительных процессов в клетках организма рыб [12, 13, 14].

Обнаруженные нами неспецифические изменения в метаболизме белков отражают взаимодействие двух процессов – поражения и компенсаторно-адаптивного ответа биологической системы и свидетельствуют о развитии патологии в условиях нефтяного загрязнения.

При длительной интоксикации рыб нефтью подобные метаболические сдвиги могут привести к нарушению адаптационного потенциала организма. Для более точной оценки токсических эффектов следует использовать широкий диапазон тест-критериев.

Литература

1. Абдусаматов А.С., Дохтукаева А.М., Додурханова Л.А., Гайрабекова Р.Х. Химическое загрязнение мелководной прибрежной опресненной зоны и шельфовой западной части Каспийского моря и его воздействие на биологическое разнообразие // Материалы XIV Международной научной конференции «Биологическое биоразнообразие Кавказа и юга России». – Махачкала, 2012. – С. 19–25.
2. Гераскин П.П. Влияние загрязнения Каспийского моря на физиологическое состояние осетровых рыб // Известия самарского научного центра РАН. – 2006. – Т. 8, № 1. – С. 273–282.
3. Исуев А.Р., Габибов М.М., Гусейнова С.А. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности сеголеток русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* как показатель загрязнения нефтью окружающей водной среды // Вопросы ихтиологии. – 2000. – Т. 20, № 4. – С. 551–559.
4. Курбанова И.К., Исуев А.Р., Габибов М.М. Влияние нефтяного загрязнения водной среды на некоторые показатели белкового обмена мальков кутума *Rutilus frisii kutum* (Cypriniformes, Cyprinidae) // Вопросы ихтиологии. – 2004. – Т. 44, №5. – С. 700–708.
5. Мусаев Б.С., Курбанова (Газимагомедова) И.К., Магомедгаджиева Д.Н., Мурарова Г.Р. и др. Динамика активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в крови сеголеток карпа при хроническом воздействии ионов кадмия и марганца // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1 (5). – С. 1321–1323.
6. Цветков И.Л. Биохимические параметры стресс-редуцирующей реакции гидробионтов при интоксикации // Автореф. дис. д. б. н. – М., 2009. – 37 с.
7. Carls M.G., Rice S.D., Hose J.E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil. Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*) // Environ. Toxicol. and Chem. – 2005. – V. 18, № 3. – P. 481–493.
8. Lowry D.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folinphenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.

9. Алексеев Л.П. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Современные методы в биохимии. – Т. 2. – М.: Медицина, 1968. – С. 112–137.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
11. Ling C., Min Z., Li S. Identification and expression analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) // Fish & Shellfish Immunology. – Vol. 31. Issue 6. 2011. – P. 1270–1277.
12. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Сидоров В.С. Биохимическая индикация токсических воздействий на рыб // Актуальные проблемы водной токсикологии. – Борок, 2004. – С. 81–97.
13. Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Ефремов Д.А., Веселов А.Е. Активность лизосомальных протеиназ (катепсинов В и D) в мышцах молоди (1+, 1+, 2+) атлантического лосося из реки Варзуга // Труды Карельского научного центра РАН. – 2015. – № 11 – С. 85–91.
14. Лысенко Л.А., Кайыярйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Немова Н.Н. Роль внутриклеточных протеиназ в развитии патологии мышечной ткани у рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: сб. научных статей. – Петрозаводск, 2010. – Т. 1. – 320 с.

Поступила в редакцию 15 ноября 2016 г.

UDC 577.1:597: 574.24:591.133.11

DOI: 10.21779/2542-0321-2016-31-4-106-113

Physiological and biochemical parameters of fish in early ontogenesis at oil pollution of the water environment

I.K. Gazimagomedova, M.M. Rabadanova

*Dagestan State University; Russia, 367001, Makhachkala, M. Gadzhiyev st., 43a;
kurbanova_i9@mail.ru*

The results of the experimental studies on physiological and biochemical parameters of fish under the influence of oil are presented. The embryogenesis, developmental abnormalities, growth, behavior, heart rate, content of total protein, lysosomal protease activity in body kutum early in the ontogeny, main lysosomal proteolytic enzymes were investigated. Deviations from control of all these parameters at oil contamination of water environment, except for the option of 0,05 mg/l are revealed.

The reacting of protein metabolism on oil contaminating was expressed either by augmentation of total protein, or its lowering, as contrasted to by control, that is had phase character. A decrease of the contents of protein in tissues of fish under the influence of oil and relatively high activity of the main lysosomal aspartate type endoprotease at the early stage of kutum development (0+) was shown. It points to the leading role of this enzyme in complete protein degradation required to supply amino acids and peptides to maintain the homeostasis in juveniles as they move on to the mixed feeding mode.

This fact indicates the intensification of proteolysis due to increasing growth rates. The appliance underlying all adaptive connections in organisms can implement at the expense of biological gears including modification of morphological, physiological and behavioural responses of hydrobionts.

Keywords: *kutum; oil pollution; embryogenesis; growth and development; protein; lysosome; peptid-hydrolasees.*

Received 15 November, 2016