

На правах рукописи

ТАКШЕЕВ Сергей Артурович

**СОСТОЯНИЕ РЫБНОЙ ЧАСТИ СООБЩЕСТВА
КОСТОМУКШСКОГО ХВОСТОХРАНИЛИЩА И
ЕГО ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

03.00.04 – биохимия

03.00.10 - ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Петрозаводск
2005**

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии
Института биологии Карельского научного центра
Российской Академии Наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
Высоцкая Римма Ульяновна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Аврова Наталия Федоровна
доктор биологических наук, профессор
Шатуновский Михаил Ильич

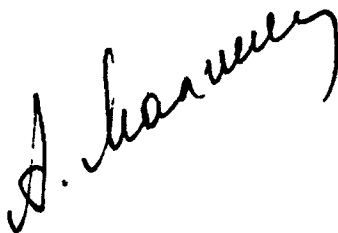
Ведущая организация: Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН

Защита состоится « 10 » ноября 2005 года в 14 часов на заседании диссертационного совета КМ 212.087.01 при Карельском государственном педагогическом университете по адресу: 185035, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17, ауд. 113 главного корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского государственного педагогического университета.

Автореферат разослан « 7 » октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



А.И. Малкиель

2006-4
19611

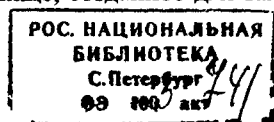
2194745

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Водные экосистемы представляют собой крайне уязвимый элемент биосферы. К настоящему времени в результате многофакторного антропогенного воздействия трансформированы экосистемы почти всех крупных рек и озер. Рыбы, как важнейший и самый чувствительный их компонент, являются наиболее подходящими объектами исследования, позволяющими оценить процессы трансформации водоемов, поскольку показатели состояния популяций и организмов рыб отражают состояние окружающей среды (Лукьяненко, 1983; 1987; Моисеенко, 1997; Кашулин, 2000). Использование биохимических показателей значительно расширяет возможности изучения как самих рыб, так и среды их обитания. Важная роль в клеточных адаптациях к изменению факторов внутренней и внешней среды, в том числе в осуществлении защитных функций организма, принадлежит лизосомальным ферментам (Высоцкая, 1999).

Экологическая биохимия рыб – наука о биохимических основах взаимодействия рыб со средой, центральной задачей которой является изучение биохимических механизмов адаптаций рыб и прогнозирование судьбы конкретной популяции при изменении условий обитания (Лукьяненко и др., 1991). В процессе разработки методологических основ эколого-биохимического мониторинга природных популяций, как одного из основных направлений изучения экологической биохимии рыб, профессором В.С. Сидоровым была предложена система эколого-биохимического тестирования и мониторинга (ЭБХМ) водоемов по состоянию обитающих в нем рыб и сформулированы ее основные принципы (Сидоров, 1987). В дальнейшем эта система совершенствовалась и апробировалась на различных объектах (Сидоров, Такшеев, 1988; Сидоров и др., 1990; 1995; 1998; Сидоров, Немова, 2000; Сидоров, 2001). Для оценки состояния организмов рыб в условиях токсического воздействия был предложен биохимический интегральный индекс (Сидоров и др., 2001, 2003). В итоге был сформулирован единый комплексный подход – биохимическая индикация состояния рыб (Немова, Высоцкая, 2004).

Деятельность горнопромышленного комплекса приводит к изменению основных физико-химических условий водной среды, таких как минерализация, ионный состав, прозрачность, pH. Увеличивается количество микроэлементов, в том числе тяжелых металлов, способных включаться в пищевые цепи и аккумулироваться биотой. Строительство и пуск в 1982 г. на северо-западе Карелии горно-обогатительного комбината (ГОК) по добыче и обогащению железорудного сырья привело к преобразованию озера Костомукшского в хвостохранилище, созданное для захороне-



ния отходов – хвостов обогащения и оборотного водоснабжения комбината. Это повлекло за собой техногенную трансформацию водных экосистем, как самого озера, так и региона и привело к необходимости изучения происходящих изменений.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы явилась оценка состояния рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища с использованием ихтиологических и биохимических методов. Были поставлены следующие задачи:

- изучить состав рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища;
- исследовать некоторые биологические показатели массовых видов рыб, обитающих в водоеме;
- определить содержание в органах и тканях рыб хвостохранилища ряда тяжелых металлов и оценить их возможную роль в токсичности техногенной воды;
- изучить активность лизосомальных и некоторых цитоплазматических ферментов у рыб в натурных исследованиях и аквариальных экспериментах;
- оценить возможность использования изучаемых ферментов для целей эколого-биохимического мониторинга и тестирования водоемов по состоянию обитающих в них рыб.

Научная новизна. Впервые установлен видовой состав и исследованы некоторые биологические показатели рыб, обитающих в техногенном водоеме - Костомукшском хвостохранилище. Определено содержание в органах и тканях рыб ряда тяжелых металлов и оценена их роль в токсичности техногенной воды хвостохранилища.

Впервые исследовано влияние воды с минеральным типом загрязнения на ферментативные системы рыб. Проведено изучение активности ряда лизосомальных и цитоплазматических ферментов в органах и тканях рыб хвостохранилища и в аквариальных экспериментах. Показано, что степень воздействия техногенной воды зависит от вида рыбы, ее биологических особенностей, стадии онтогенеза. Апробирован предложенный ранее методологический подход (принципы и методы эколого-биохимического тестирования и мониторинга) для анализа состояния рыб техногенного водоема.

Практическая значимость работы. Результаты работы и сделанные на их основе выводы могут быть использованы для проведения мониторинговых и природоохранных мероприятий в условиях антропогенного воздействия, в частности, при анализе ситуации в водоемах, подвергающихся минеральному загрязнению, регламентации техногенной нагрузки на экосистемы, диагностики состояния рыб и других гидробионтов.

Положения, выносимые на защиту.

- Преобразование озера Костомукшского в хвостохранилище привело к сокращению видового разнообразия и ухудшению биологических показателей рыбной части сообщества.

- Тяжелые металлы не играют ведущей роли в токсичности техногенной воды хвостохранилища.

- Воздействие техногенной воды приводит к перестройке метаболизма рыб, в которую вовлекаются ферментные системы, в том числе лизосомальная, гидролитические ферменты которой и некоторые цитоплазматические ферменты проявляют высокую чувствительность к данному типу загрязнения.

- Уровень активности этих ферментов может служить дополнительным биохимическим критерием для оценки состояния рыб в природных и экспериментальных условиях.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на III Всесоюзной конференции «Проблемы экологии Прибайкалья» (Иркутск, 1988), 2 Международной научно-практической конференции «Экология и охрана окружающей среды» (Пермь, 1995), VII съезде Гидробиологического общества РАН (Казань, 1996), Международном симпозиуме «Экология, физиология и биохимия осетровых рыб» (Борок, 1997), I Международной конференции Баренц-Арктического региона «Биоиндикация и оценка повреждения организмов и экосистем» (Петрозаводск, 1997), Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 125-летию И.И. Спрыгина (Пенза, 1998), Международной конференции «Экологические проблемы бассейнов крупных рек-2» (Тольятти, 1998), Международном семинаре, посвященном памяти акад. Е.М. Крепса (Мурманск, 1999), II (XXV) Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» (Петрозаводск, 1999), V Международной конференции «Освоение Севера и проблемы природовосстановления» (Сыктывкар, 2001), Международной конференции «Биоразнообразие Европейского Севера» (Петрозаводск, 2001), Всероссийской конференции «Современные проблемы водной токсикологии» (Борок, 2002), Международной конференции «Экологические проблемы Северных регионов и пути их решения» (Апатиты, 2004), Международной конференции «Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества)» (Петрозаводск, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 7 статей и 15 тезисов докладов.

Благодарности. Считаю своим долгом выразить глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН за практическую помощь, внимание и поддержку. Особая благодарность моему научному руководителю д.б.н. Р.У. Высоц-

кой и профессору Н.Н. Немовой. Благодарю к.б.н. В.Я. Первозванского (лаборатория экологии рыб и водных беспозвоночных) и к.б.н. Ю.А. Фсклова (СевНИИРХ ПетрГУ) за постоянное внимание и консультации, а также к.б.н. И.Н. Заличеву (СевНИИРХ) за организацию аквариальных экспериментов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 27 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, методической части, 3 глав результатов исследований, заключения, выводов, приложения. Список цитируемой литературы включает 230 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы изложены современные представления о предмете и методах экологической биохимии рыб, рассматривается комплексная система эколого-биохимического тестирования и мониторинга в том числе роль лизосомальных ферментов в адаптациях рыб к некоторым абиотическим и антропогенным факторам водной среды.

Глава 2. Объекты и методы исследований

Объектами исследований были рыбы, обитающие в хвостохранилище (бывшее озеро Костомукшское) и контрольных водоемах, не подвергающихся непосредственному техногенному воздействию - озерах Верхнее Куйто и Кимасозеро (рис.1).

Воздействие Костомукшского ГОКа на экосистемы водоемов обусловлено техногенными водами, поступающими в озерно-речную систему реки Кенти (бассейн р. Кемь). Хвостохранилище Костомукшского ГОКа образовано в котловине озера Костомукшского, верхнего водоема системы реки Кенти, путем намыва дамбы и используется в качестве отстойника оборотной воды и захоронения отходов производства (хвостов обогащения). Химический состав минералов хвостов, вследствие выщелачивания различных компонентов, непосредственно влияет на гидрохимические показатели воды хвостохранилища и озер, расположенных ниже. Кроме того, сооружение хвостохранилища привело к изменению гидрологического режима и гидробиологии верхнего участка системы и, прежде всего, самого озера Костомукшского (Пальшин и др., 1994; Лозовик и др., 2001).

Химический состав воды хвостохранилища к настоящему времени достаточно подробно изучен (Феоктистов, Сало, 1990; Морозов, 1998; Лозовик и др., 2001). К 2000 г. общая минерализация воды хвостохранилища достигла 500 мг/л, концентрация ионов калия - 130, натрия - 13, кальция - 26, магния - 12, хлоридов - 7, сульфатов - 114, гидрокарбона-

тов – 145, нитратов – 6 мг/л. Высокий уровень pH (8,5) представляет собой геохимический барьер для миграции тяжелых металлов в воду хвостохранилища (Современное состояние.. 1998).

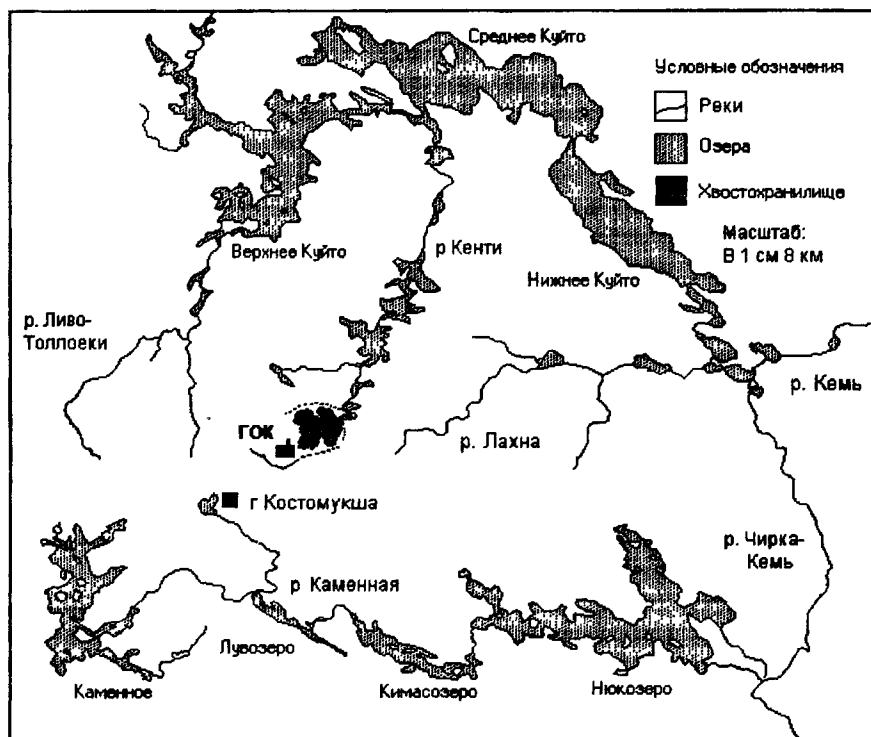


Рис. 1. Карта - схема района исследований.

Особенностью техногенной воды Костомукшского хвостохранилища является преимущественно минеральный тип загрязнения, с чем связаны повышенная минерализация, высокая концентрация ионов калия, anomальное соотношение основных ионов, щелочная среда и наличие мелкодисперсной минеральной взвеси.

В работе дана общая характеристика состава ихтиофауны района исследований. Приводится список рыб и их классификация по Г.В. Никольскому (1980).

Сбор материала. Основой работы послужили собственные экспедиционные сборы автора на хвостохранилище и контрольных водоемах, проводившиеся ежегодно летом (август) с 1993 по 1997 г. и в 2001 г. В качестве орудий лова применялся стандартный набор одностенных став-

ных жаберных сетей длиной 30 м, высотой 1,8 м с ячейей 18 - 60 мм. Методика сбора и обработки материала была общепринятой (Правдин, 1966). Определяли длину (ad), массу, пол, стадию зрелости, упитанность и возраст рыб. При определении возраста рыб применяли методику Чугуновой (1959) и Правдина (1966). Для дальнейшего биохимического анализа рыбу замораживали в широкогорлом сосуде Дьюара в жидком азоте и отправляли в лабораторию. Для аквариальных экспериментов использовали окуня (*Perca fluviatilis* L.) и радужную форель (*Parasalmo mykiss* Walb.) а также икру радужной форели и сига (*Coregonus lavaretus* L.), инкубировавшуюся в опытах до стадии личинки.

Определение тяжелых металлов. Тяжелые металлы в наших образцах органов и тканей рыб определяли, используя атомно-абсорбционный спектрофотометр АА-855 фирмы «Yanaco» (Япония) в Полярном институте рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИПРО, Мурманск). Ртуть определяли с использованием анализатора «Юлия 5-К» методом атомной абсорбции холодного пара в Институте биологии внутренних вод им. Д.И. Папанина РАН (ИБВВ РАН, Борок).

Определение активности ферментов. После размораживания органы и ткани рыб измельчали и гомогенизировали в изотонической среде – 0,25 М растворе сахарозы с 0,001 М ЭДТА, pH 7,4, при температуре 2 - 4° С (Покровский, Тутельян, 1976). Для выявления общей активности ферментов в пробы добавляли неионный детергент тритон X-100. Гомогенаты центрифугировали при 12000 об/мин на центрифуге с охлаждением в течение 30 мин.

Определение активности кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) проводили по методу Баррета и Хита (1980), используя в качестве субстрата специфичный для лизосомальной формы фермента субстрат - β-глицерофосфат, оценивая активность по количеству образовавшегося в результате реакции неорганического фосфата (мкг Р в мин/мг белка) (Kahovcova, Odavic, 1969). Активность β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) выявляли по реакции с п-нитрофенил-β,D-глюкопиранозидом (Покровский и др., 1971), β-галактозидазы (КФ 3.2.1.23) – с п-нитрофенил-β,D-галактопиранозидом, (Баррет, Хит, 1980). Активность глюкозидаз выражали в мкМ п-нитрофенола/мг белка/мин. Активность кислых нуклеаз определяли спектрофотометрически (в условных единицах ΔE₂₈₀/мг белка/мин): кислой ДНКазы (КФ 3.1.4.6) – по методу А.А. Покровского и А.И. Арчакова (1968), кислой РНКазы (КФ 3.1.4.23) – по методу А.П. Левицкого с соавт. (1973). Активность щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) выявляли по расщеплению п-нитрофенилфосфата натрия (в мкМ п-нитрофенола/мг белка/мин) (Bessey et al., 1946). Альдозазную активность (фруктозодифосфатальдозаза) (КФ 4.1.2.13) определяли спектрофотометрически (в условных единицах ΔE₅₃₆)

— с использованием фруктозо-1,6-дифосфата в качестве субстрата, (Филиппович и др., 1982). Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури (в мг/г ткани) (Lowry et al., 1951), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Полученные результаты обрабатывали статистически общепринятыми методами, оценивая достоверность различий по *t* критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Рыбы Костомукшского хвостохранилища

О составе ихтиофауны и состоянии рыбной части сообщества хвостохранилища ничего не было известно, поскольку ихтиологические работы на нем не проводились. Наши исследования с 1993 по 1997 гг. и в 2001 г. позволили выяснить видовой состав рыб, населяющих его в настоящее время, и провести их предварительный ихтиологический и биохимический анализ.

Видовой состав. По нашим данным, в хвостохранилище обитает только два массовых вида рыб - плотва (*Rutilus rutilus* L.) и щука (*Esox lucius* L.). Налим (*Lota lota* L.) и уклейка (*Alburnus alburnus* (L.)), обнаруженные нами в 1994 г, впоследствии не встречались. В водоеме отсутствует окунь, обязательный компонент ядра всех ихтиоценозов Северо-Запада (Жаков, 1984), и ерш, которые обитают в нижележащих озерах системы реки Кенти. По нашим данным, окунь отсутствует также и в хвостохранилище Ковдорского ГОКа, близком по ряду гидрохимических параметров к Костомукшскому. Техногенная вода хвостохранилища токсична для икры сига, что было показано нами в аквариальных экспериментах (см. главу 5).

Некоторые биологические показатели. На ихтиологический анализ рыба отлавливалась в 1995 и 2001 годах. В работе анализируется динамика роста плотвы и щуки. Сравниваются темпы линейного роста и роста массы рыб хвостохранилища, озера В. Куйто (наши данные) и ряда других водоемов Карелии. Темп роста плотвы хвостохранилища в 1995 г. оказался ниже, чем у плотвы водоемов региона. Ее масса и особенно длина также несколько ниже, что связано с худшим ростом в первые три года жизни. В 2001 г. темп роста плотвы увеличился, особенно у старших возрастных групп (рис.2). В 1995 г. темп роста щуки хвостохранилища был существенно ниже, чем в карельских водоемах, данные по которым имеются. К 2001 г., он значительно вырос, хотя и не достиг величин, характерных для водоемов со средним темпом роста щуки (рис.3). Упитанность плотвы хвостохранилища (по Фультону) в 2001 г. была выше, чем в 1995 г. и выше, чем в контроле (оз. В. Куйто). Некоторое улучшение ростовых

характеристик связано со стабилизацией гидрохимического режима хвостохранилища и увеличением прозрачности, которая, по нашим наблюдениям, с 1994 по 2001 г. возросла в 4 раза (с 0,4 до 1,5 м).

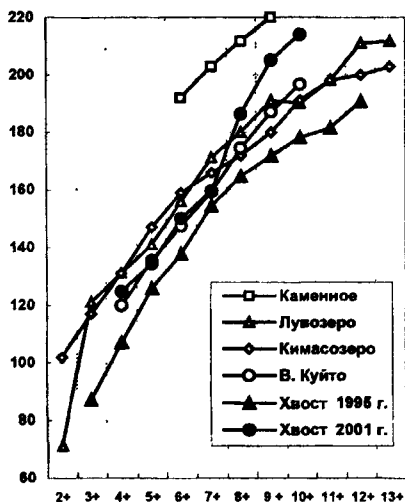


Рис. 2. Линейный рост плотности хвостохранилища и некоторых озер региона (мм)

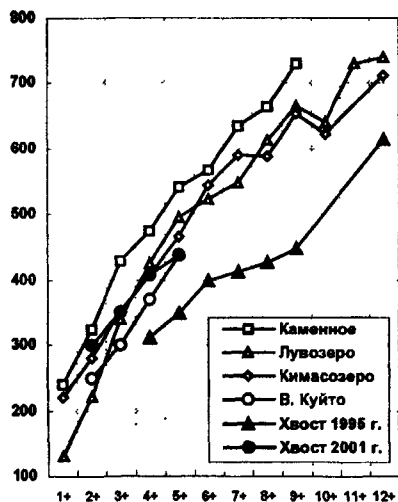


Рис. 3. Линейный рост щуки хвостохранилища и некоторых озер региона (мм)

Анализ соотношения полов у плотвы в регионе (бассейн реки Каменной), выявил во всех водоемах наличие большого количества самок (62 – 75 %) (Первозванский, 1986). Это связано с неодинаковой длительностью жизни особой разного пола. В младших возрастных группах преобладают самцы, в старших – самки. По нашим данным, самок было 84% как в хвостохранилище среди плотвы в 1995 г., так и в оз. В. Куйто в 2001 г., хотя преобладание самцов в младших возрастных группах отмечено лишь для контрольного водоема. В 2001 году в хвостохранилище нами среди 100 экземпляров отловленной разновозрастной плотвы был обнаружен только 1 самец (т.е. самок 99%). При увеличении техногенного воздействия на водоем появление большого количества самок может быть также связано с меньшей устойчивостью самцов (Лукин и др., 1984; Лукин, Кашулин, 1991).

Возрастной состав плотвы в опытных уловах также можно рассматривать как показатель ухудшения условий обитания в хвостохранилище, о чем говорит преобладание в нем младших возрастных групп рыб по сравнению с оз. В. Куйто и исчезновение старших возрастных групп к 2001 г. (рис.4). Изменение возрастной структуры в сторону омоложения стада рыб может происходить в связи с ухудшением качества

воды, а хроническая интоксикация ведет к повышенной элиминации старших возрастных групп.

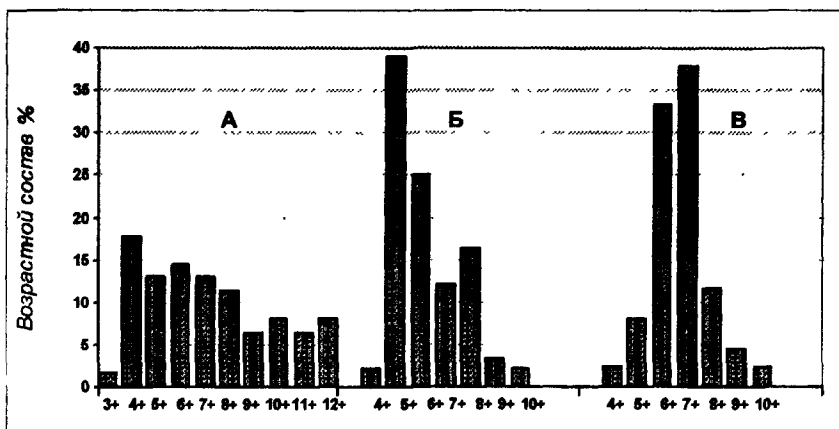


Рис. 4 Возрастной состав плотвы в опытных уловах (%): А – хвостохранилище 1995 г, Б – хвостохранилище 2001 г, В – В. Куйто 2001 г.

Изменения биологических и популяционных показателей, если не известны их причины, не могут быть однозначно интерпретированы без комплексной информации о состоянии организма. Такую информацию можно получить, используя данные биохимических, токсикологических, гистологических и ряда других методов исследования.

Глава 4. Содержание тяжелых металлов в органах и тканях рыб

На начальном этапе исследований (1993 – 1997гг.) не было известно содержание тяжелых металлов (ТМ) в воде хвостохранилища, официальные данные были опубликованы только в 2001 году. Мы предполагали наличие высоких концентраций ТМ, особенно группы железа (хром, кобальт, никель), что обычно для техногенных вод горнорудных производств. Определение ТМ в органах и тканях рыб хвостохранилища и контрольного водоема – озера Верхнее Куйто проводилось в 1996 г. Получены данные по содержанию цинка, меди, хрома, кобальта и кадмия в мышцах плотвы, в мышцах и печени щуки, а также ртути в мышцах щуки. Сводные данные представлены на рис.5.

Концентрация ТМ в воде хвостохранилища (в скобках средняя концентрация в мкг/л) убывает в следующей последовательности: Ti(25)>Mo(10,5)>Ni (3,4)>Cr (2,5)>Zn(1,3)>Cu(1,0)> Hg (0,5)>Pb(0,3) = Co (0,3)>Cd (0,03) (Лозовик и др., 2001).

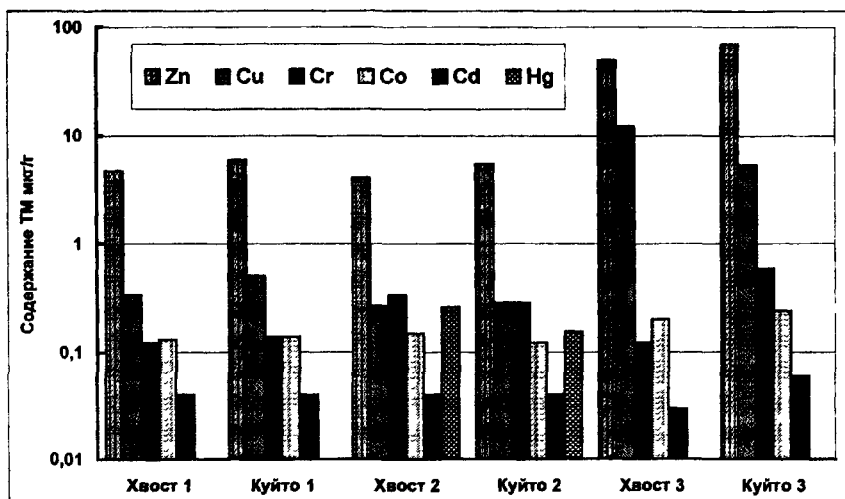


Рис. 5. Содержание тяжелых металлов в органах и тканях рыб хвостохранилища (Хвост) и озера В. Куйто (Куйто) в мкг/г сырого веса (логарифмическая шкала) 1 – плотва, мышцы; 2 – щука, мышцы; 3 – щука, печень.

Следует отметить, что концентрации практически всех ТМ в хвостохранилище ниже предельно допустимых концентраций для воды рыбохозяйственных водоемов (ПДК_{рбхз}). Близко к ПДК содержание меди ($1,0 \pm 0,7$ мкг/л, ПДК 1 мкг/л), а явное превышение ПДК только по молибдену (10,5 мкг/л, ПДК 1 мкг/л). Присутствует ртуть (0,5 мкг/л, ПДК 0,01 мкг/л).

В органах и тканях рыб хвостохранилища нами была обнаружена следующая последовательность в порядке убывания концентраций ТМ (в мкг/г сырого веса):

Плотва, мышцы: $Zn (4,7) > Cu (0,34) > Cr (0,13) > Co (0,12) > Cd (0,04)$

Щука, мышцы: $Zn (4,1) > Cu (0,3) = Cr (0,3) > Co (0,15) > Cd (0,04)$

Щука, печень: $Zn (49,6) > Cu (12,0) > Co (0,2) > Cr (0,12) > Cd (0,03)$

Такое распределение для изученных металлов в органах и тканях рыб типично вообще, и наблюдается у рыб в относительно чистых районах, например в бассейне реки Печера (Лукин и др., 2000).

Содержание всех исследованных металлов в мышцах и печени рыб хвостохранилища не превышает такового в контрольном водоеме, кроме содержания меди в печени щуки (12,0 и 5,4 мкг/г) и ртути в мышцах щуки (0,260 и 0,155 мкг/г сырого веса соответственно). Причем эти концентрации существенно ниже наблюдающихся в загрязняемых ТМ регионах (Моисеенко, 1997; Кашулин и др., 1999). Незначительное повышенное

содержание ртути в мышцах щуки, вероятно, связано с наличием ее в воде, так как в хвостохранилище отсутствуют условия для метилирования ртути и дальнейшего поступления в пищевые цепи ($\text{pH} < 5$ и высокое содержание органики) к тому же ее концентрация у щуки в кислых карельских озерах обычно выше (0,3 – 0,7 мкг/г) (Комов и др., 2004).

Несмотря на поступление в хвостохранилище значительных объемов минеральных веществ, в том числе и тяжелых металлов, существенного повышения концентрации последних в органах и тканях рыб не наблюдается. Это феномен можно объяснить наличием геохимического барьера в виде высокого уровня pH, при котором ТМ характеризуются очень низкой подвижностью, оставаясь в твердой фракции отходов и не переходя в воду хвостохранилища или выпадают в осадок. Тяжелые металлы, вероятно, не являются ведущим фактором токсичности для рыб Костомукшского хвостохранилища. Тем не менее, нельзя полностью исключить вклад отдельных ТМ в токсичность техногенной воды. Определенную опасность для нижележащих водоемов системы может представлять мелкодисперсная взвесь хвостов обогащения, из которой в условиях понижения pH могут выщелачиваться тяжелые металлы.

Глава 5. Активность лизосомальных и некоторых цитоплазматических ферментов у рыб в натуральных и аквариальных экспериментах

Лизосомам отводится одна из ведущих ролей в механизмах клеточной защиты. Гидролитические ферменты, способные расщеплять основные биополимеры живых организмов, являются биохимическим инструментом для осуществления лизосомами своих функций. Так как патологический процесс, вызванный в организме каким либо токсическим веществом или физическим фактором, проходит стадию разрушения (повреждения) внутриклеточных структур, очевидно, что в ликвидации этих аварийных очагов принимают участие лизосомы. Наибольшая активность лизосомальных ферментов рыб характерна для органов, в которых активно происходят процессы гидролитического расщепления, обезвреживания и выведения из организма чужеродных и токсических веществ: печени, почек, жабр, селезенки (Высоцкая, 1999).

В исследуемом материале мы определяли активность ряда лизосомальных ферментов - кислой фосфатазы, гликозидаз (β -глюкозидазы и β -галактозидазы), кислых нуклеаз (ДНКазы и РНКазы) и цитоплазматических ферментов – щелочной фосфатазы и альдозазы. Изучаемые ферменты являются составной частью разрабатываемой в лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН системы эколого-биохимического мониторинга и тестирования водоемов по состоянию обитающих в них рыб.

Лизосомальные ферменты, а также щелочная фосфатаза, как биохимические показатели, по степени изменчивости относятся к группе наиболее изменчивых, адекватно реагирующих на действующие факторы, т.е. адаптивных. Уровень нормальной вариабельности таких показателей (за которой начинается зона патологических изменений) был определен на основании многолетнего изучения активности этих ферментов у рыб в природных водоемах и эксперименте и обычно колеблется в диапазоне от минус 60 до плюс 100% от контрольного (Сидоров, 1983; Немова, Высоцкая, 2004). Лизосомальные ферменты разных органов и тканей неодинаково реагируют на воздействие одного и того же фактора вследствие энзиматической гетерогенности в них лизосом и разного уровня активности ферментов (тканеспецифичность). Изменения в функционировании лизосомального аппарата клетки являются одной из ранних неспецифических реакций при стрессе, а характер адаптивных метаболических изменений активности лизосомальных ферментов отражает динамику его развития.

5.1. Натурные исследования

Проведено сравнительное изучение активности ферментов в органах и тканях плотвы и щуки Костомукшского хвостохранилища и контрольного озера Кимасозеро (рис. 6, 7).

Значительное уменьшение по сравнению с контролем активности гликозидаз, а также альдолазы (на 40%) в мышцах и печени плотвы свидетельствуют о существенных изменениях в углеводном и энергетическом обмене, о падении уровня катаболизма углеводов, в котором принимают участие все три фермента, и о снижении интенсивности гликолиза в мышцах, а, возможно, и в печени (рис. 6). Это подтверждается данными, полученными в нашей лаборатории. В мышцах плотвы хвостохранилища в различной степени снижается активность всех ферментов углеводного обмена (изоферменты лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, цитохром с оксидаза). Активность многих из этих ферментов снижается и в печени плотвы (Груздев и др., 1998; Мещерякова, 2004). Вероятно, плотва хвостохранилища испытывает состояние хронической гипоксии, которая сопровождается значительным снижением окислительных процессов и усилением анаэробного метаболизма. Переключение с аэробного расщепления углеводов на гликолитический путь – пример биохимической адаптации организма в ответ на гипоксию или токсическое воздействие.

С другой стороны, активность кислых нуклеаз, кислой и щелочной фосфатаз во всех органах плотвы из хвостохранилища выше, чем в контроле, что служит косвенным показателем усиления биосинтетических и репарационных процессов в организме рыб. При этом в почках и особенно в жабрах наблюдается повышение активности практически всех лизо-

сомальных ферментов, причем многих более чем на 100%. Это свидетельство активации лизосомального аппарата и преобладания катаболических процессов в большинстве органов и тканей плотвы, т.е. мобилизации внутренних резервов на поддержание уровня метаболизма в условиях микробного загрязнения данного типа.

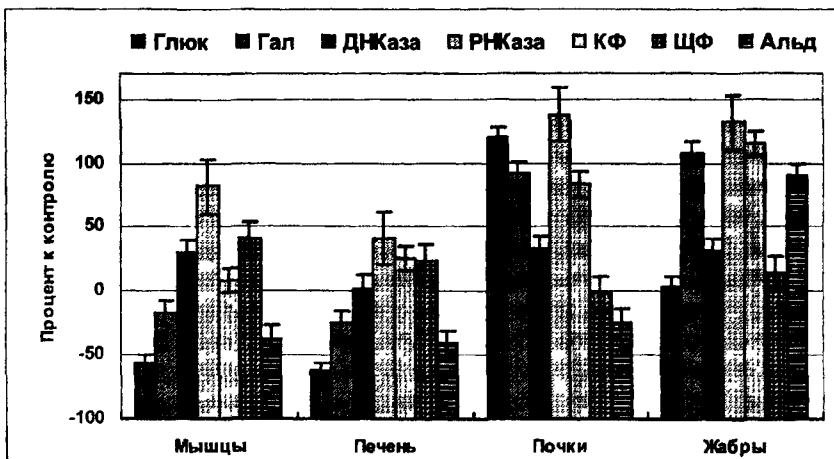


Рис. 6. Активность ферментов в органах и тканях плотвы хвостохранилища.

Здесь и далее условные обозначения Глюк - β -глюкозидаза, Гал - галактозидаза, КФ - кислая фосфатаза, ЩФ - щелочная фосфатаза, Альд - альдолаза. Активность везде в соответствующих единицах на 1 мг белка в % к контролю (контроль 0%).

Самая высокая активность всех ферментов наблюдалась в селезенке плотвы хвостохранилища (на графике не отражена и у щуки не изучалась). Кислая и щелочная фосфатаза превышала контрольный уровень на 200%, галактозидаза и РНКаза на 300%. Это связано с активным фагоцитозом, поскольку селезенка является местом деструкции старых эритроцитов и других поврежденных клеточных элементов.

У щуки хвостохранилища динамика изменения активности изучаемых ферментов по сравнению с контролем близка к подобной динамике у плотвы (особенно в жабрах и почках), что говорит о сходстве биохимических механизмов адаптации к условиям существования в данном водоеме (рис. 7). Лишь активность β -глюкозидазы в мышцах щуки превышает контрольный на 450%, что может быть связано с необходимостью использования резервных источников углеводов на энергетические цели в условиях гипоксии. В печени щуки активность большинства ферментов близка к контрольному уровню.

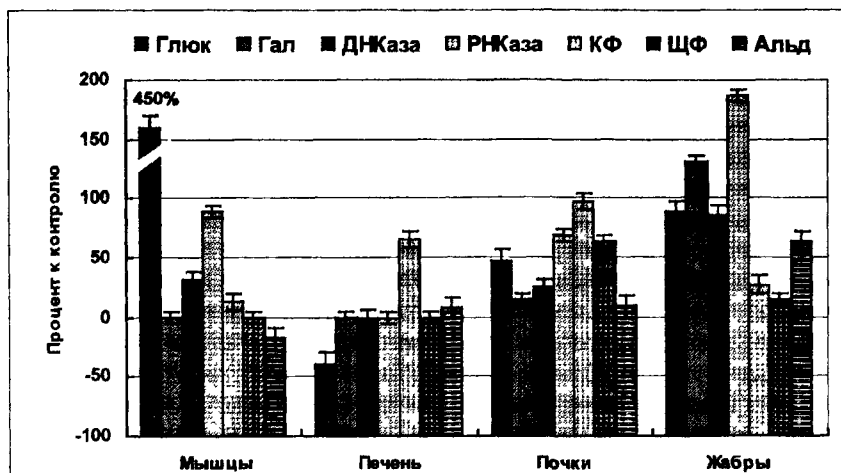


Рис. 7. Активность ферментов в органах и тканях щуки хвостохранилища

Самая высокая активность (не считая селезенки плотвы) всех изученных ферментов наблюдается в жабрах плотвы и щуки. Мы предполагаем, что жабры рыб в хвостохранилище испытывают максимальную нагрузку. В почках щуки и особенно плотвы, также происходит активация лизосомального аппарата. Минимальные изменения наблюдаются в печени щуки.

Отсутствие видимых морфологических изменений у рыб хвостохранилища и не выходящие за пределы нормы биологические показатели свидетельствуют о том, что динамика активности изученных ферментных систем носит адаптивный характер.

Мы предполагаем, что одной из причин негативного воздействия техногенной воды хвостохранилища на природные популяции рыб в условиях невысоких концентраций тяжелых металлов является минеральная взвесь. Мелкодисперсные взвеси обогатительного производства представляют особую опасность, так как они способны мигрировать на значительные расстояния, а наиболее мелкие фракции размером менее 0,2 мкм, проникают сквозь клеточные мембраны (Моисеенко, 1997). Такая взвесь может угнетать дыхание (гипоксия) и усвоение пищи (Алабастр, Ллойд, 1984). Кроме того, снижение прозрачности ухудшает зрительную оценку кормовых объектов рыбами, по крайней мере хищными (щука). Многие из эффектов на организменном и тканевом уровне, выявленные нами, могут быть объяснены именно воздействием взвеси. С другой стороны, повышенная минерализация, высокая концентрация калия, нарушение соотношения основных ионов в воде, щелочная среда могут оказывать токсическое воздействие на рыб, тем более, что это доказано для многих видов

планктонных ракообразных и моллюсков (Регеранд, Дубровина, 1995; Дубровина, 1999; Пименова 2002; Калинкина, 2003).

Несмотря на изменения метаболизма у плотвы и у щуки, механизмы гомеостаза как на уровне тканей и клеток (биохимические), так и на уровне организма (физиологические и поведенческие) позволяют рыбам успешно существовать в техногенном водоеме, что свидетельствует об их высоком адаптивном потенциале. Критерием успеха в данном случае служит сам факт выживания и размножения популяций обоих видов в течение 20 лет в крайне неблагоприятных условиях водоема, дно которого представляет собой техногенный субстрат, а вода – техногенный продукт, многократно прошедший сложный технологический цикл.

5.2 Аквариальные эксперименты

В аквариальных экспериментах проведено изучение воздействия различных разбавлений техногенной воды хвостохранилища на окуня и радужную форель, а также на икру сига и радужной форели, инкубировавшихся до стадии личинки. Определялась активность тех же ферментов. Контроль – в воде озера Кимасозеро. Личинки для определения активности ферментов гомогенизировались целиком, без разделения на органы и ткани.

Окунь и радужная форель.

Неразбавленная вода хвостохранилища была для окуня токсична. Активность ферментов определялась только у рыб, начиная с пятикратного разбавления воды для мышц и с 25-кратного для печени и жабр.

У окуня в аквариальном эксперименте наблюдалась очень низкая активность всех изучаемых ферментов во всех органах и тканях при всех разведениях техногенной воды, что говорит о крайне негативном воздействии ее компонентов на данный вид рыб (рис.8). Только высокие значения активности щелочной фосфатазы в мышцах (сотни процентов) свидетельствуют о каких то аварийных метаболических перестройках. Крайне низкая активность альдолазы и других ферментов может свидетельствовать об угнетении энергетических процессов во всех тканях.

У окуня в тканях происходит угнетение функционирования всего лизосомального аппарата и, как следствие, подавление всех катаболических процессов, связанных с ним, что приводит к невозможности использования внутренних резервов на экстренные энергетические и пластические нужды. По нашему мнению, в опыте у окуня наблюдается стадия истощения в развитии стрессовой реакции, вызванной техногенной водой. Дальнейшее существование окуня даже в разбавленной воде хвостохранилища вызывает серьезные сомнения. Отсутствие окуня в хвостохранилище и озере Окуневом, куда также поступает техногенная вода, подтверждает это предположение.

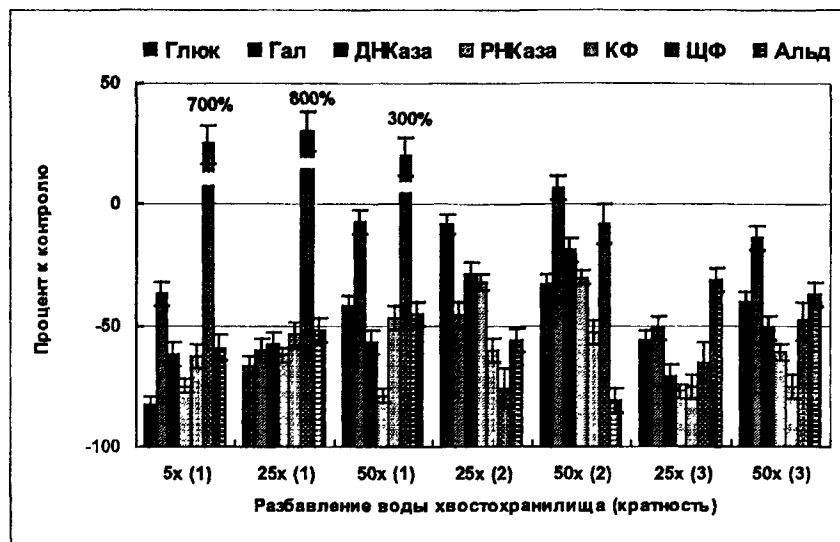


Рис. 8. Активность ферментов в мышцах (1), печени (2) и жабрах (3) окуня

Активность ферментов в мышцах радужной форели в неразбавленной воде хвостохранилища и при ее различных разбавлениях по сравнению с контролем демонстрирует сложный характер изменений с тенденцией стабилизации при уменьшении концентрации техногенной воды (рис. 9). Нормализуется активность гликозидаз (особенно β -галактозидазы) а также фосфатаз и альдолазы. Общее увеличение активности нуклеаз при всех разбавлениях, скорее всего связано с адаптивными перестройками обмена. В жабрах радужной форели в неразбавленной техногенной воде и при пятикратном разбавлении изменения ферментативной активности невелики. Достоверно повышена только активность глюкозидазы и кислой фосфатазы в первом варианте.

Для радужной форели техногенная вода не является остротоксичной, тем не менее значительные колебания активности лизосомальных ферментов в мышцах свидетельствуют о ее неблагоприятном воздействии на рыб даже при разбавлении в 5 и 10 раз.

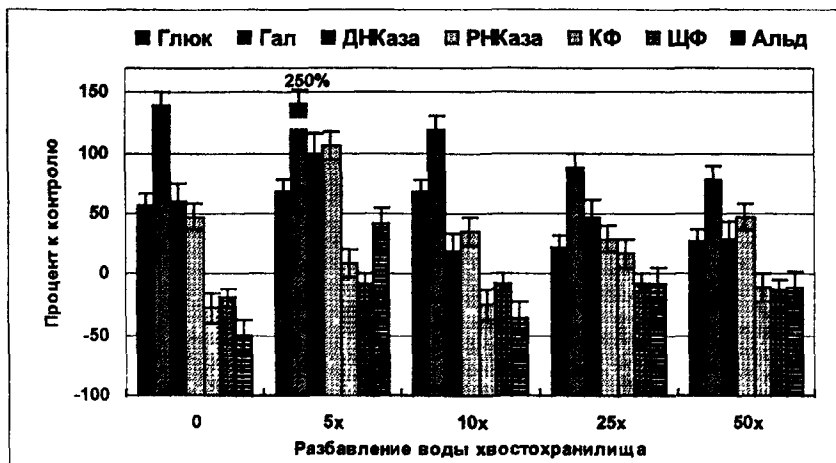


Рис. 9. Активность ферментов в мышцах радужной форели

Личинки сига и радужной форели.

У личинок радужной форели уровень кислой фосфатазы и РНКа-зы достоверно не отличается от контроля (рис. 10). Активность остальных ферментов по сравнению с контролем демонстрирует некоторое угнетение (а для глюкозидазы стимуляцию) с тенденцией стабилизации при разбавлении техногенной воды. Явная стабилизация (возврат к контрольным значениям) наблюдается для глюкозидазы и для альдолазы. При разбавлении техногенной воды более чем в 5 раз, ее воздействие на активность ферментов личинок радужной форели незначительно

Икра сига при инкубации в неразбавленной воде погибла полностью. Во всех остальных вариантах выклюнулись нормальные личинки. Ферментативная активность в гомогенатах претерпевала определенную динамику, по всей видимости, не связанную с концентрацией техногенной воды (рис. 10). По нашему мнению, эти колебания ферментативной активности отражают нормальную вариабельность изучаемых биохимических показателей и не демонстрируют ни стрессового воздействия, ни активных адаптивных перестроек, хотя наблюдается некоторое падение активности глюкозидазы.

Полученные в аквариальных экспериментах данные были использованы в комплексной оценке воздействия техногенной воды ГОКа наряду с другими биохимическими показателями (биохимический индекс). При этом были подтверждены полученные результаты об относительной устойчивости личинок к техногенной воде (Сидоров и др., 2003).

Воздействие воды хвостохранилища и ее различных разбавлений в опыте вызывает у разных видов рыб на разных стадиях онтогенеза раз-

личные реакции от полной гибели до отсутствия достоверных биохимических изменений в организме, что свидетельствует о видоспецифичности и стадиспецифичности воздействия техногенной воды.

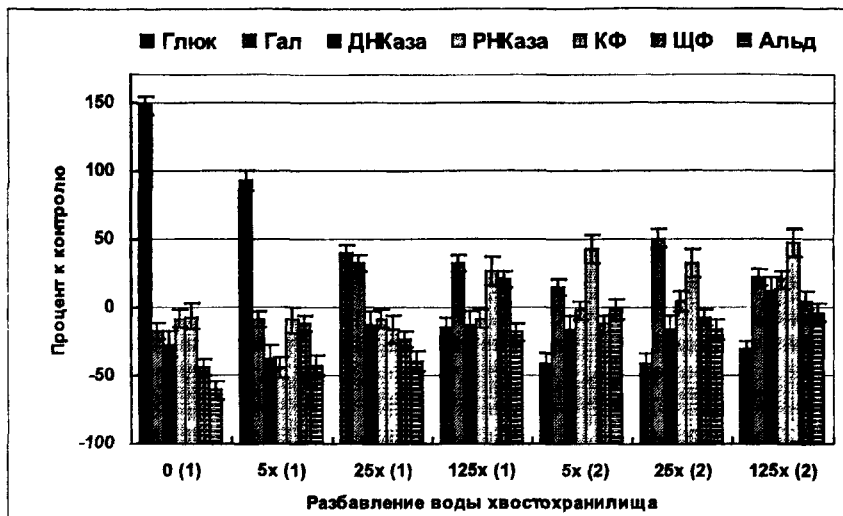


Рис. 10 Активность ферментов личинок радужной форели (1) и сига (2).

Изменения активности лизосомальных и ряда других изучаемых ферментов представляют собой весьма чувствительные биохимические показатели, позволяющие диагностировать возникающие изменения в организме рыб до наступления видимых (морфологических и физиологических) признаков патологии.

На основании анализа имеющихся данных нельзя выделить какой либо один фактор как основной в негативном воздействии техногенной воды хвостохранилища на рыб. Можно предположить, что воздействие оказывает комплекс факторов, причем значимость их в токсичности техногенной воды может меняться в зависимости от видовых и экологических особенностей рыб, а также стадии онтогенеза.

Выводы

1. В рыбной части сообщества озера Костомукшского после преобразования его в хвостохранилище под влиянием техногенной воды наблюдается сокращение видового разнообразия. В хвостохранилище установлено наличие только двух массовых видов рыб – плотвы и щуки.

2. Выявлены изменения некоторых биологических показателей рыб, обитающих в Костомукшском хвостохранилище, по сравнению с озерами региона: низкий темп роста, особенно у щуки, изменение соот-

ношения полов у плотвы в сторону преобладания самок. В то же время наблюдается некоторое улучшение ростовых характеристик плотвы и щуки в 2001 г. по сравнению с 1995 г.

3. Показано, что тяжелые металлы не аккумулируются в органах и тканях и не представляют серьезной опасности для рыб, поскольку существующий в хвостохранилище геохимический барьер препятствует миграции металлов из отходов (хвостов обогащения) в воду.

4. Лизосомальные и цитоплазматические ферменты рыб обнаруживают высокую чувствительность к комплексному воздействию техногенной воды хвостохранилища. В натуральных и аквариальных экспериментах выявлена зависимость реакции со стороны указанных ферментных систем от вида рыб и стадии онтогенеза.

5. Активность изученных ферментов в адаптивном ответе на воздействие данного антропогенного фактора определялась тканеспецифичностью и их ролью в определенных путях метаболизма. Наиболее значительные сдвиги активности показаны для ферментов углеводного обмена (лизосомальных гликозидаз и альдолазы), что свидетельствует об адаптивных перестройках энергетического обмена.

6. Определение активности лизосомальных ферментов в комплексе с другими показателями предлагается использовать в системе эколого-биохимического мониторинга и тестирования для оценки состояния рыб в водоемах, подвергающихся антропогенному воздействию.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. *Сидоров В.С., Такшеев С.А.* Некоторые принципы эколого-биохимического мониторинга водоемов // Проблемы экологии Прибайкалья. Тез. докл. III Всесоюзн. конф. Иркутск, 1988, с. 16.

2. *Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Кирилук С.Д., Такшеев С.А.* Принципы и методы эколого-биохимического мониторинга водоемов // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 1990, с. 5-27.

3. *Яковлева К.Е., Высоцкая Р.У., Васильева Т.С., Такшеев С.А., Камишлов И.М., Лукьяненко В.В.* Содержание гликогена в печени волжских осетров в норме и при расслоении мышц // Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани. Рыбинск, 1990, с.193-195.

4. *Высоцкая Р.У., Такшеев С.А., Яковлева К.Е., Ломаева Т.А., Кузьмин Е.В., Васильев А.С.* Активность лизосомальных ферментов в органах осетра и стерляди в норме и при расслоении мышц // Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани. Рыбинск, 1990, с.224-229.

5. Сидоров В.С., **Такшеев С.А.**, Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Юровицкий Ю.Г. Принципы и методы эколого-биохимического тестирования водоемов // Экология и охрана окружающей среды. 2-я междунар. науч.-практ. конф. Тез. докл. Ч. 1. Изд-во Пермского гос. пед. ун-та, Пермь, 1995, с. 15-16.
6. Лизенко Е.И., Сидоров В.С., Лукьяненко В.И., Регеранд Т.И., Гурьянова С.Д., Васильева Т.С., **Такшеев С.А.** Общая характеристика липидного состава липопротеидов сыворотки крови осетровых (*Acipenseridae*) // Вопросы ихтиологии. 1995, т.35, № 4, с.553-557.
7. Сидоров В.С., Смирнов Л.П., Груздев А.И., **Такшеев С.А.** Экологическая биохимия. (Современные направления и значение для гидробиологии) // VII съезд Гидробиол. общ-ва РАН. Тез. докл. Т.3. Казань, 1996, с. 76 – 78.
8. Высоцкая Р.У., Сидоров В.С., Ломаева Т. А., **Такшеев С.А.** Диагностическая роль лизосомальных ферментов у рыб при токсикогенном воздействии // Экология, физиология и биохимия осетровых рыб. Тез. докл. (материалы) междунар. симп. Борок, 1997, с.19-21.
9. Сидоров В.С., Немова Н.Н., Смирнов Л.П.,... **Такшеев С.А.**, и др. Новая рациональная система эколого-биохимического тестирования и мониторинга водоемов // Биоиндикация и оценка повреждения организмов и экосистем. Тез. докл. Материалы I междунар. конф. Баренц-Арктического региона. Петрозаводск, 1997, с.147-148.
10. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Богдан В.В., Крупнова М.Ю., **Такшеев С.А.**, Васильева О.Б. К проблеме использования биохимических методов в мониторинге и тестировании природных экосистем и биологических ресурсов // Материалы всеросс. научно-практической конф., посвященной 125-летию И.И. Спрыгина. Пенза, 1998, с.61-64.
11. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., **Такшеев С.А.** Эколого-биохимический мониторинг и тестирование водоемов // Экологические проблемы бассейнов крупных рек – 2. Тез. докл. междунар. конф. Тольятти, 1998, с. 165-166.
12. Высоцкая Р.У., **Такшеев С.А.** Оценка экологического состояния водоема по активности ферментов в тканях рыб в условиях техногенного загрязнения // Адаптации животных и растений к условиям Арктических морей. Тез. докл. междунар. семинара, посвященного памяти академика Е.М. Крепса. Кольский НЦ РАН, Апатиты, 1999, с. 22-27.
13. Сидоров В.С., Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., **Такшеев С.А.** Экологическая биохимия рыб на пороге XXI века // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. Материалы II (XXV) междунар. конф. Петрозаводск: Изд. Петр ГУ, 1999, с. 288-290.

14. Богдан В.В., Зекина Л.М., **Такшеев С.А.**, Еремеев В.И., Сидоров В.С. Желчнокислотный состав желчи у щуки *Esox lucius* L. при техногенном воздействии // Вопросы ихтиологии. 2000, т.40, № 5, с. 573-576.
15. Сидоров В.С., **Высоцкая Р.У.**, Немова Н.Н., **Такшеев С.А.** Интегральный биохимический индекс стресса у рыб // Освоение Севера и проблемы природовосстановления. Тез. докл. V междунар. конф. Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 2001, с. 225-227.
16. Сидоров В.С., Немова Н.Н., **Высоцкая Р.У.**, **Такшеев С.А.** Вариабельность интегрального биохимического индекса стресса (БИС) у рыб // Биоразнообразие Европейского Севера. Тез. докл. междунар. конф. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2001, с.161.
17. **Высоцкая Р.У.**, Крупнова М.Ю., Ломаева Т. А., **Такшеев С.А.** Влияние компонентов буровых растворов на активность лизосомальных и оксидантных ферментов камбалы // Современные проблемы водной токсикологии. Тез. докл. Всеросс. конф. Борок: ИБВВ РАН, 2002, с. 30 – 31.
18. **Высоцкая Р.У.**, Крупнова М.Ю., Кяйвярйнен Е.И., Немова Н.Н., Морозов Д.Н., **Такшеев С.А.** Влияние экологических условий на активность гидролитических ферментов наваги и трески Белого моря // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных. Сб. трудов. Апатиты: Изд. Кольского НЦ РАН, 2003, с. 299 – 305.
19. Сидоров В.С., Немова Н.Н., **Высоцкая Р.У.**, **Такшеев С.А.** Вариабельность интегрального биохимического индекса у рыб под влиянием техногенных вод горнообогатительного комбината // Экология. 2003, т. 4, с. 280-285.
20. **Такшеев С.А.** Содержание некоторых тяжелых металлов в печени и мышцах рыб Костомукшского хвостохранилища // Экологические проблемы Северных регионов и пути их решения. Материалы междунар. конф. Часть 1. Изд-во Кольского НЦ РАН, Апатиты, 2004, с. 215 – 216.
21. Немова Н.Н., Богдан В.В., Смирнов Л.П., **Такшеев С.А.** Биохимия изучения влияния ртути на рыб // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения. Материалы междунар. конф. Ч 1. Апатиты: Кольский НЦ РАН, 2004, с. 197 – 198.
22. **Высоцкая Р.У.**, Амелина В.С., Ломаева Т.А., **Такшеев С.А.**, Немова Н.Н., Влияние кислотности и ртутного загрязнения на активность ферментов в тканях окуня *Perca fluviatilis* L. // Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества). Материалы междунар. конф. Ч. 1. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2005, с. 85-88.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99 Подписано в печать 05.10.05
Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура «Times» Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,2. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Изд. № 65. Заказ № 528

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский отдел

№ 18 5 12

РНБ Русский фонд

2006-4

19611