

УДК [597.551.2:546.171.1]:574.64

Ю. Н. Красюк

### **ТОКСИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КАРПА ПРИ РАЗНОЙ НАГРУЗКЕ СОЕДИНЕНИЯМИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО АЗОТА**

В работе рассмотрено влияние ряда концентраций  $\text{NH}_4^+$  (0,5, 5,0, 50,0 мг  $\text{N}/\text{дм}^3$ ) и  $\text{NO}_2^-$  (0,8, 8,0, 80,0 мг  $\text{N}/\text{дм}^3$ ) на резистентность карпа, предварительно содержавшегося длительный период при повышенной концентрации аллохтонного азота. Отмечено, что наиболее толерантными к действию данных концентраций были карпы из прудов с наибольшим содержанием минерального азота.

**Ключевые слова:** карп, резистентность, аммонийный азот, нитритный азот, индекс селезенки, индекс печени, гемоглобин, метгемоглобин.

Увеличение антропогенного влияния на водные экосистемы обострило проблему выживания гидробионтов в неблагоприятных гидрохимических условиях. Среди значительного количества токсикантов, влияющих на жизнедеятельность рыб, наиболее распространенными являются азотсодержащие соединения, обладающие широким спектром токсического действия. Основным источником их поступления в водоемы являются сточные воды промышленных и сельскохозяйственных предприятий. Увеличение концентрации аммиака, аммонийного и нитритного азота в прудовых хозяйствах происходит также вследствие нарушения условий внесения кормов, удобрений, увеличения плотности посадки рыб и тому подобного, что вызывает изменение их физиологического состояния, а следовательно, негативно влияет на процессы их роста, развития и размножения [2, 19].

Катаболизм азотистых соединений (аминокислот, пуринов, пиримидинов и др.) зачастую приводит к образованию аммиака — хорошо растворимого токсичного продукта, который легко диффундирует из организма в окружающую среду в виде  $\text{NH}_4^+$ , в основном через хлоридные клетки эпителия жабр [8]. Такое выведение токсиканта позволило рыбам выработать ряд приспособлений к изменяющимся условиям среды, а в целом повысить резистентность организма. Однако при увеличении содержания неорганического азота в среде обитания баланс между эндогенным и экзогенным аммиаком может быть нарушен, в результате чего ионы  $\text{NH}_4^+$ , содержащиеся в крови рыб, служат вторичным источником аммиака. Повышение концентрации токсиканта в крови рыб вызывает трансформацию гемоглобина в функционально неактивную метформу. Происходит защелачивание внутри-

© Красюк Ю. Н., 2009

клеточной жидкости эритроцитов и, как результат, — денатурация белковой части молекулы гемоглобина [5, 7, 16].

К токсикантам, обладающим выраженным гемолитическим действием, относятся также нитриты, которые при высоких концентрациях в воде проникают через эпителий жабр рыб и накапливаются в плазме крови, вызывая острую токсикацию организма [1, 20].

Целью нашей работы было изучение особенностей токсикорезистентности двухлеток карпа, предварительно содержавшихся в прудах с повышенной концентрацией соединений минерального азота ( $\text{NH}_4^+$  5—29 ПДК<sub>рыбохоз.</sub>, а  $\text{NO}_2^-$  18—198 ПДК<sub>рыбохоз.</sub>), к кратковременному воздействию на них различных концентраций  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$  (10—1000 ПДК<sub>рыбохоз.</sub>).

**Материал и методика исследований.** Экспериментальные исследования проведены в биотехнологическом комплексе Института гидробиологии НАН Украины. Объектами исследований были двухлетки карпа (средний вес рыб —  $119,2 \pm 7,7$  г), которые находились в течение 5 месяцев в прудах Белоцерковской экспериментальной гидробиологической станции (условно обозначенных как контрольный пруд (№ 1), пруд со средней (№ 2) и с высокой (№ 3) нагрузкой (табл. 1), под воздействием повышенных концентраций аллохтонного азота [9].

При проведении экспериментальных исследований рыбы из трех прудов были помещены на 96 ч в аквариумы (объем 100 дм<sup>3</sup>), содержащие аммонийный (0,5, 5,0, 50,0 мг N/дм<sup>3</sup>) и нитритный (0,8, 8,0, 80,0 мг N/дм<sup>3</sup>) азот в воде. Для создания необходимых условий использовали хлорид аммония и нитрит натрия — вещества, легко растворимые в воде. Поддержание заданных концентраций аммония и нитритов осуществлялось путем ежедневной замены воды на 0,5 объема аквариума. Концентрация  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$  в контрольных емкостях соответствовала рыбоводным нормативам и не превышала 0,10 и 0,01 мг N/дм<sup>3</sup> соответственно. С целью установления токсикорезистентности рыб определяли их выживаемость, морфофизиологические показатели (индексы селезенки и печени), содержание общего гемоглобина и долю метгемоглобина в крови [3, 6, 10, 15]. Полученные данные обработаны статистически с помощью программы Statistica 5.5.

### ***Результаты исследований и их обсуждение***

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что рыбы, находившиеся в прудах с различным уровнем загрязнения аммонийным и нитритным азотом (табл. 1, 2), обладали различной резистентностью к последующему воздействию высоких концентраций изучаемых токсикантов в воде.

Наиболее чувствительными к негативному влиянию аммонийного азота оказались двухлетки карпа из контрольного пруда, содержание азота в котором было в пределах нормы. При концентрации  $\text{NH}_4^+$  50,0 мг N/дм<sup>3</sup> (96 ч экспозиции) выживаемость рыб составляла 23,6%. У рыб из пруда со средней нагрузкой жизнестойкость была значительно выше и составляла 47,7%, а

**1. Содержание ионов аммония и аммиака (мг N/дм<sup>3</sup>) в прудах за период июль — октябрь 2004 г.**

Месяцы	Пруд 1		Пруд 2		Пруд 3	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>3</sub>
Июль (T <sub>воды</sub> = 22°C, pH = 8,1)	0,2	0,01	4,9	0,27	16,3	0,89
Август (T <sub>воды</sub> = 24°C, pH = 7,5)	0,3	0,01	13,7	0,23	15,0	0,25
Сентябрь (T <sub>воды</sub> = 15°C, pH = 7,7)	0,3	< 0,01	14,3	0,19	16,8	0,23
Октябрь (T <sub>воды</sub> = 9,5°C, pH = 7,8)	0,3	< 0,01	27,9	0,25	29,2	0,26

**2. Содержание нитрит-ионов (мг N/дм<sup>3</sup>) в прудах за период июль — октябрь 2004 г.**

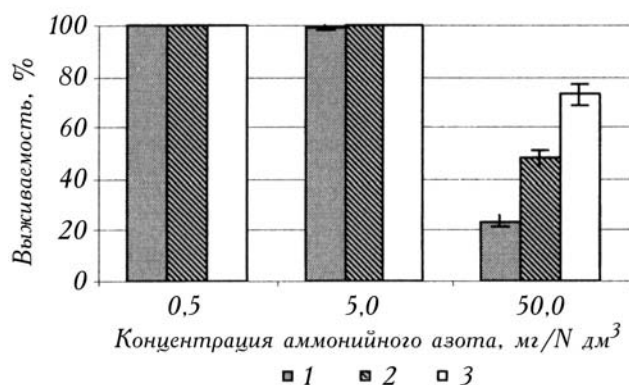
Месяцы	Пруд 1	Пруд 2	Пруд 3
Июль (T <sub>воды</sub> = 22°C, pH = 8,1)	< 0,01	11,6	15,8
Август (T <sub>воды</sub> = 24°C, pH = 7,5)	< 0,01	2,9	3,3
Сентябрь (T <sub>воды</sub> = 15°C, pH = 7,7)	< 0,01	1,9	2,3
Октябрь (T <sub>воды</sub> = 9,5°C, pH = 7,8)	0,01	1,4	1,8

наиболее устойчивыми (72,7%) были двухлетки карпа, находившиеся в пруду с высоким содержанием соединений минерального азота, что свидетельствует об их более высокой резистентности к данным соединениям (рис. 1).

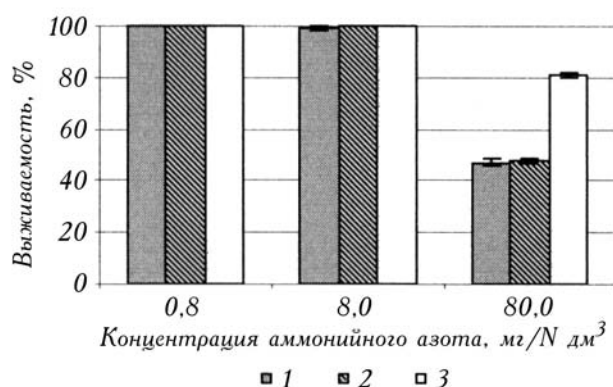
Очевидно, высокая устойчивость двухлеток карпа, предварительно находившихся в третьем пруду, к воздействию NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 50,0 мг N/дм<sup>3</sup> связана с активизацией процессов детоксикации, транспорта и экскреции соединений азота. Учитывая то, что основным путем детоксикации аммиака у аммонителеских животных является синтез глутамина, способствующий выведению NH<sub>4</sub><sup>+</sup> из организма, у адаптированных особей он происходит более активно [14, 22].

Наибольшая устойчивость двухлеток карпа к действию нитрит-ионов также характерна для рыб, находившихся в пруду с более высоким содержанием неорганического азота, по сравнению с рыбами из прудов со средней нагрузкой и контрольного. Так, при 96-часовой экспозиции (концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 80,0 мг N/дм<sup>3</sup>) выживаемость карпа из этого пруда была выше соответственно на 40,8 и 41,4% (рис. 2).

Можно предположить, что повышенная устойчивость двухлеток карпа, предварительно находившихся в пруду с более высоким содержанием минерального азота, к токсическому действию NO<sub>2</sub><sup>-</sup> связана с увеличением метаболических процессов в организме, а именно — активным синтезом гемоглобина и ускоренным распадом метгемоглобина в процессе лизосомального протеолиза [21]. Известно, что в процессах детоксикации в организме принимают активное участие селезенка и печень рыб. Основным кроветворным органом, где происходит эритропоэз, является селезенка. При дей-



1. Влияние аммонийного азота на выживаемость двухлеток карпа ( $n = 5$ ). Здесь и на рис. 2—4: 1 — пруд 1; 2 — пруд 2; 3 — пруд 3.



2. Влияние нитритного азота на выживаемость двухлеток карпа ( $n = 5$ ).

ствии  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$  и недостатке кислорода в крови усиливается синтез эритроцитов, что приводит к увеличению массы селезенки. Как результат повышения процессов детоксикации данных соединений и их метаболитов возрастает индекс печени рыб [12, 18].

Как видно из результатов наших исследований, у двухлеток карпа, находившихся на протяжении 5 мес в прудах с различной степенью нагрузки неорганическим азотом, индексы селезенки и печени повышались с ростом содержания ионов аммония и нитритов в воде (табл. 3).

Так, индексы органов рыб, содержащихся в прудах с высокой и средней концентрацией аммонийного и нитритного азота, были значительно выше индексов органов рыб из контрольного пруда.

Отмечено существенное увеличение индекса селезенки двухлеток карпа — в 2,3 и 1,3 раза соответственно, а также увеличение в 1,4 раза индекса печени рыб из этих же прудов по сравнению с рыбами из контрольного пруда.

Негативное влияние высоких концентраций неорганического азота в прудах, вызывающее рост индексов селезенки и печени рыб, также проявилось при 96-часовой экспозиции в среде с содержанием  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$ , превышающим ПДК<sub>рыбхоз.</sub> в 10, 100, 1000 раз. Обращает на себя внимание тот факт, что повышение концентраций ионов аммония, а также нитрит-ионов в воде опытных аквариумов вызывало увеличение индексов селезенки и печени двухлеток карпа из контрольного пруда. Воздействие на них аммонийного азота в концентрации 0,5, 5,0 и 50,0 мг N/л приводило к увеличению индекса селезенки на 44,1, 52,0 и 76,5%, а печени — на 6,5, 12,5 и 16,5% по

**3. Изменение индексов селезенки и печени двухлеток карпа под действием аммонийного и нитритного азота ( $M \pm m, n = 5$ )**

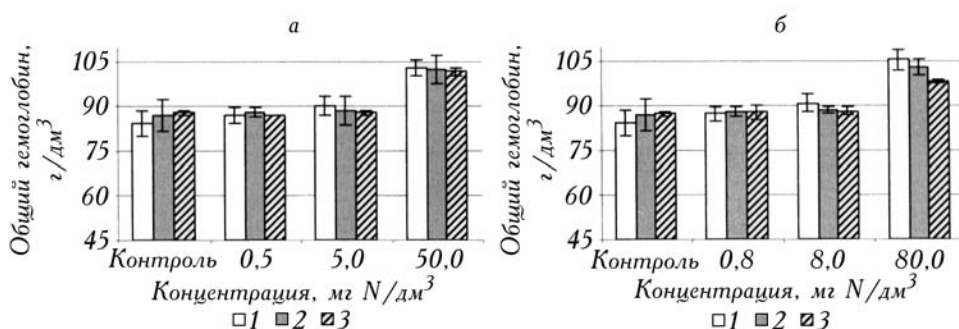
Концентрация азота, мг N/дм <sup>3</sup>	Индекс селезенки, %			Индекс печени, %		
	Пруд 1	Пруд 2	Пруд 3	Пруд 1	Пруд 2	Пруд 3
Контроль	0,34 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,78 ± 0,01	2,00 ± 0,14	2,80 ± 0,02	2,84 ± 0,28
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>						
0,5	0,49 ± 0,01*	0,43 ± 0,01	0,80 ± 0,03	2,13 ± 0,15	2,80 ± 0,06	2,84 ± 0,12
5,0	0,52 ± 0,01*	0,44 ± 0,01	0,80 ± 0,01	2,25 ± 0,38	2,81 ± 0,16	2,87 ± 0,18
50,0	0,60 ± 0,01*	0,44 ± 0,01	0,81 ± 0,02	2,33 ± 0,10	2,81 ± 0,02	2,87 ± 0,18
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>						
0,8	0,38 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,77 ± 0,01	2,06 ± 0,07	2,81 ± 0,09	2,84 ± 0,62
8,0	0,46 ± 0,01*	0,46 ± 0,02	0,78 ± 0,03	2,24 ± 0,35	2,83 ± 0,30	2,84 ± 0,07
80,0	0,59 ± 0,01*	0,46 ± 0,02	0,79 ± 0,02	2,61 ± 0,30*	2,83 ± 0,31	2,85 ± 0,14

\*  $p < 0,05$ .

сравнению с контролем. При концентрациях нитритного азота 0,8, 8,0, 80,0 мг N/дм<sup>3</sup> индекс селезенки у рыб был больше, чем у контрольных, соответственно на 11,8, 35,3, 73,5%, а индекс печени — на 3,0, 12,0, 30,5%. В то же время, индексы исследуемых органов двухлеток карпа из прудов со средним и высоким содержанием минерального азота оставались на уровне показателей контрольных рыб, что может свидетельствовать об их более высокой степени адаптации (см. табл. 3).

Проведенные гематологические исследования показали, что уровни общего гемоглобина и доля в нем метгемоглобина у двухлеток карпа из прудов с различной нагрузкой минеральным азотом находились в пределах нормы [13, 17]. После 96-часовой экспозиции в среде, содержащей NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0,5 и 5,0 мг N/дм<sup>3</sup>), у карпов из контрольного пруда наблюдали тенденцию к увеличению содержания в крови общего гемоглобина соответственно на 2,9 и 6,0% по сравнению с контролем, в отличие от практически не изменившихся показателей крови у рыб из прудов со средним и высоким содержанием неорганического азота. Подобные результаты получены при действии на карпа нитрит-ионов в концентрации 0,8 и 8,0 мг N/дм<sup>3</sup>.

Значительное увеличение содержания общего гемоглобина наблюдалось у рыб всех групп лишь при воздействии высоких концентраций NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (50,0 мг N/дм<sup>3</sup>) и NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (80,0 мг N/дм<sup>3</sup>) (рис. 3 а, б), что может свидетельство-



3. Влияние неорганического азота на содержание общего гемоглобина в крови двухлеток карпа ( $n = 5$ ): *а* — при действии  $\text{NH}_4^+$ ; *б* — при действии  $\text{NO}_2^-$ .

вать об ответной реакции организма на критические концентрации соединений минерального азота.

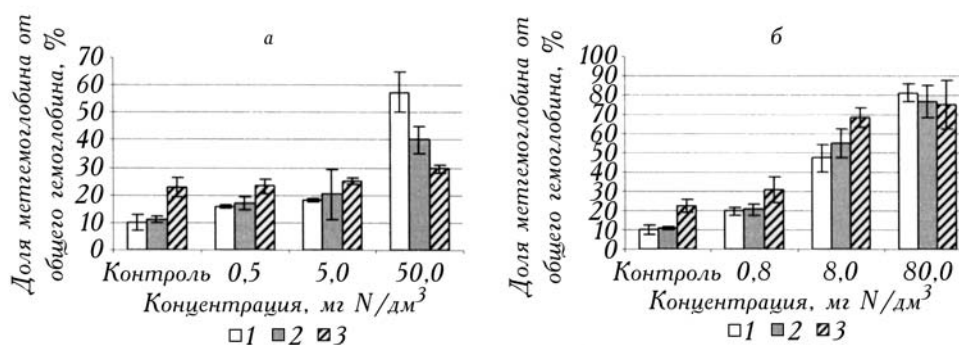
Как известно из литературных данных, негативное воздействие минерального азота на организм рыб проявляется в трансформации гемоглобина крови в метгемоглобин — функционально неактивную форму [6].

У более адаптированных к соединениям азота рыб наблюдался лишь незначительный рост доли метгемоглобина от общего гемоглобина в крови. У карпов, содержащихся в пруду с высоким содержанием аммонийного и нитритного азота, дальнейшее действие  $\text{NH}_4^+$  в концентрации 0,5 и 5,0 мг N/дм³ не приводило к существенному увеличению содержания метгемоглобина, и только под влиянием высокой концентрации  $\text{NH}_4^+$  (50,0 мг N/дм³) доля метгемоглобина от общего гемоглобина возросла на 30,4% по сравнению с контролем. В то же время даже влияние низкой концентрации  $\text{NH}_4^+$  (0,5 мг N/дм³) на двухлеток карпа из контрольного пруда и пруда со средней концентрацией минерального азота сопровождалось увеличением доли метгемоглобина в крови рыб по сравнению с контролем на 58,8 и 41,1 % соответственно. При действии высокой концентрации  $\text{NH}_4^+$  (50,0 мг N/дм³) доля метгемоглобина от общего гемоглобина в крови карпов возрастала соответственно в 3,4 и 5,8 раза (рис. 4, *а*).

Увеличение концентрации нитрит-ионов в воде также вызывало значительный рост доли метгемоглобина от общего содержания гемоглобина в крови рыб во всех исследуемых группах (рис. 4, *б*). При этом следует отметить, что наибольшее увеличение содержания неактивной формы гемоглобина наблюдалось в крови рыб из контрольного пруда, а более низкие значения, но также превышающие норму, — у двухлеток карпа из пруда с высоким содержанием неорганического азота. Известно, что содержание метгемоглобина в норме составляет 8,8% и может достигать 35—50% от общего содержания гемоглобина при многих патологиях и токсикозах [5, 11, 17].

Под действием  $\text{NO}_2^-$  в концентрации 0,8 мг N/дм³ содержание метгемоглобина в крови рыб из контрольного пруда (1) было на 80,4% выше по срав-





4. Влияние неорганического азота на содержание метгемоглобина, % от общего гемоглобина в крови двухлеток карпа ( $n = 5$ ).

нению с контролем. Влияние данной концентрации  $\text{NO}_2^-$  на рыб из прудов 2 и 3 вызывало увеличение содержания метгемоглобина соответственно на 71,2 и 36,7% по сравнению с контролем. При действии высокой концентрации (80,0 мг N/дм<sup>3</sup>) нитрит-ионов на двухлеток карпа из всех трех прудов количество метгемоглобина в крови было соответственно в 5,8, 3,2 и 1,3 раза выше, чем в контроле. Очевидно, концентрация  $\text{NO}_2^-$  80,0 мг N/дм<sup>3</sup> являлась той критической, при которой даже адаптированные рыбы не могли поддерживать гомеостаз в организме на определенном уровне и нивелировать токсическое действие.

### Заключение

Установлено, что длительная (5 мес) адаптация рыб к среде с повышенным уровнем неорганического азота способствует возрастанию их резистентности к последующему воздействию высоких концентраций  $\text{NH}_4^+$  (50,0 мг N/дм<sup>3</sup>) и  $\text{NO}_2^-$  (80,0 мг N/дм<sup>3</sup>), что подтверждается более низким показателем их смертности.

Отсутствие изменений в величине индексов селезенки и печени у рыб из прудов со средним и высоким содержанием неорганического азота при дальнейшем воздействии  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$  (в концентрациях, превышающих ПДК в 10, 100 и 1000 раз) свидетельствует об их более высокой степени резистентности по сравнению с рыбами из контрольного пруда, что также подтверждается менее значительным ростом уровня содержания гемоглобина и метгемоглобина в крови рыб.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о более высокой токсикорезистентности рыб, предварительно адаптированных к высоким концентрациям  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$  в воде. Можно предположить, что у этой группы рыб защитные механизмы выражались в более высокой степени детоксикации этих веществ и их производных, а также в активации процессов их выведения из организма во внешнюю среду [4].

\*\*

У роботі було розглянуто вплив  $\text{NH}_4^+$  (0,5, 5,0, 50,0 мг N/дм<sup>3</sup>) та  $\text{NO}_2^-$  (0,8, 8,0, 80,0 мг N/дм<sup>3</sup>) на токсикорезистентність коропа, який попередньо утримувався в ставках з різною концентрацією мінерального азоту у воді. Встановлено, що більші високу стійкість до цих сполук проявляли риби, які були адаптовані до високих концентрацій неорганічного азоту.

\*\*

The influence of  $\text{NH}_4^+$  (0,5, 5,0, 50,0 mg N/dm<sup>3</sup>) and  $\text{NO}_2^-$  (0,8, 8,0, 80,0 mg N/dm<sup>3</sup>) on toxic resistance of carp was investigated. The fishes was kept during period in ponds with a different concentration of mineral nitrogen in water. It was discovered that the higher resistance to mentioned compounds was showed by the fishes which were adopted to higher concentration of inorganic nitrogen.

\*\*

1. Великий Н.Н., Коробов В.Н., Климошин Н.И. и др. Система красной кровяной клетки периферической крови карпа в условиях нитритной интоксикации // 8-ая Науч. конф. по экол. физиологии и биохимии рыб: Тез. докл., Петрозаводск, 30 сент. — 3 окт. 1992 г. — Петрозаводск, 1992. — Т. 1. — С. 54—55.
2. Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. — Кишинев: Штиинца, 1989. — 144 с.
3. Голодец Г.Г. Лабораторный практикум по физиологии рыб. — М.: Пищепромиздат, 1955. — 90 с.
4. Грубинко В.В. Адаптационные реакции рыб к действию аммиака водной среды: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Киев, 1995. — 44 с.
5. Грубинко В.В., Смольский А.С., Коновец И.Н. и др. Гемоглобин рыб при действии аммиака и солей тяжелых металлов // Гидробиол. журн. — 1995. — Т. 31, № 4. — С. 82—87.
6. Камшилов И.М. Методика определения функциональных свойств гемоглобина у рыб (влияние метгемоглобина и АТФ) // Биология внутр. вод. — 2001. — № 1. — С. 96—101.
7. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. Изд. 2-е, перераб. и доп. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. — 320 с.
8. Матей В.Е. Функциональная морфология жаберного эпителия пресноводных костистых рыб // Физиология, биохимия и токсикология водных животных. Тр. ИБВВ. — Л.: Наука, 1990. — Т. 60, Вып. 57. — С. 104—141.
9. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / За ред. В. Д. Романенка. — К.: Логос, 2006. — 408 с.
10. Методика морфо-физиологических и биохимических исследований рыб. — М.: ВНИРО, 1972. — 118 с.
11. Общий курс физиологии человека и животных. Кн. II. Физиология висцеральных систем / А. Д. Ноздрачев, И. А. Баженов, Ю. И. Баранникова и др. — М.: Высш. шк., 1991. — 528 с.
12. Потрохов А.С., Зиньковский О.Г., Кириций Т.Я., Худияш Ю.Н. Изменение ряда морфологических показателей карпов под воздействием повышенной концентрации минерального азота в воде // Гидробиол. журн. — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 81—90.



13. *Справочник по физиологии рыб* / Ред. А.А. Яржомбек. — М.: Агропромиздат, 1989. — 192 с.
14. *Сравнительная физиология животных* / Ред. Л.Проссер. — М.: Мир, 1977. — 606 с.
15. *Стенко М.И. Кровь* // Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. — М.: Медицина, 1975. — С. 5—135.
16. *Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб*. — М., 1962. — Т. 1. — 443 с.
17. *Штерман Л.Я. О метгемоглобине в крови*. — М., 1970. — Т. 10, № 5 (64). — С. 923—934.
18. *Doblender C., Lackner R. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1996. — Vol. 1289, N 2. — P. 270—274.
19. *Israeli-Weinstein D., Kimmel E. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress* // *Aquaculture.* — 1998. — Vol. 165, N 1—2. — P. 81—93.
20. *Jensen F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals* // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology.* — 2003. — Vol. 135, N 1. — P. 9—24.
21. *Madison B.N., Wang Y.S. Haematological responses of acute nitrite exposure in walleye (*Sander vitreus*)* // *Aquat. Toxicol.* — 2006. — Vol. 79, N 1. — P. 16—23.
22. *Walsh P.J., Veauvy C.M., McDonald M.D. et al. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy* // *Comparative Biochem. Physiol. A Mol. Integrative Physiol.* — 2007. — Vol. 147, N 2. — P. 332—343.