



# ДЕЙСТВИЕ СУЛЬФАТА МЕДИ И НИТРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ ЛИЧИНОК ЧЕРНОМОРСКОЙ АТЕРИНЫ (*Atherina hepsetus* L.)

ШАХМАТОВА О.А. – канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории фиторесурсов, отдел Биотехнологий и фиторесурсов, ИнБЮМ НАНУ (г. Севастополь)

Представлены результаты лабораторных экспериментов по воздействию сернокислой меди и нитрата натрия в концентрациях 0,01; 0,1 и 5,0 мг/л и 0,05; 8,82; 25,64 мкМ/л соответственно на личинок черноморской атерины *Atherina hepsetus* L. при времени экспозиции 2 и 12 час. Выявлено достоверное увеличение активности каталазы личинок атерины при действии сернокислой меди и нитратов в исследуемых концентрациях при 2-х - часовом воздействии и в концентрации 8,82 мкМ/л при экспозиции 12 час.

**А**НТРОПОГЕННОЕ воздействие на прибрежные акватории существенно изменяет химический состав поверхностных вод. В этих условиях возрастает роль и значение лабораторных токсикологических исследований, которые позволяют прогнозировать экологические последствия нарушения качества водной среды. Среди биоиндикаторов эвтрофикации акваторий рыбы считаются наиболее подходящими объектами для оценки возможного действия на человека веществ антропогенного происхождения, присутствующих в воде, при этом наиболее чувствительными считаются ранние онтогенетические стадии их развития [1, 2]. Сернокислая медь и нитрат натрия являются важными компонентами хозяйственно-бытовых, сельскохозяйственных и ливневых стоков. Поэтому изучение действия кон-  
кретных составляющих общего антропогенно-

го загрязнения представляет определенный практический интерес.

В черноморских акваториях для выявления степени эвтрофирования наиболее загрязненной прибрежной зоны довольно часто используют показатели антиоксидантной системы личинок атерины *Atherina hepsetus* L., отличающихся устойчивостью к комплексным токсическим воздействиям [3 - 5].

Антиоксидантная ферментативная система рыб активируется при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды [2, 6], а ферментом, наиболее чувствительным к воздействию загрязнения на гидробионтов, считается каталаза [2, 7]. Следует отметить, что данные по воздействию меди и нитратов на активность каталазы рыб немногочисленны [8, 9], а для личинок практически отсутствуют. Поэтому целью данной работы было изучение влияния сульфата меди и нитрата натрия на активность каталазы (АК) личинок атерины в лабораторных условиях.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на личинках черноморской атерины (снетка) *A. hepsetus*, размер которых составлял 8,0 - 8,5 мм. Личинок отлавливали сачом в условно чистом районе на открытом взморье акватории б. Круглая [10] и помещали в литровые кристаллизаторы с растворами сернокислой меди и нитрата натрия, приготовленными на морской воде из десятиметровой зоны на 2 и 12 час. Контрольные личинки находились в морской воде без токсикантов.

Эксперимент повторяли с интервалом в 5 дней, отбирали по 6 - 8 личинок средней мас-



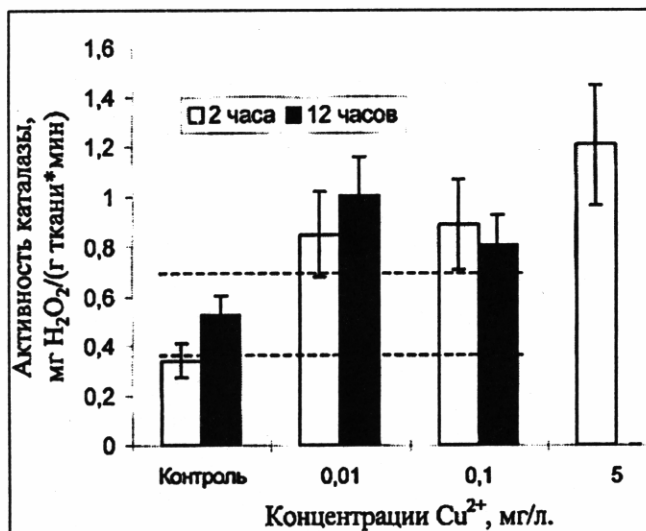
сой 100 мг, гомогенизировали их на холоду с физраствором, 10% экстракт белков получали центрифугированием при 5000 об/мин. Активность каталазы (мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /г сырой ткани\*мин) определяли по количеству разложившейся перекиси водорода [11]. Результаты обработаны статистически, разброс данных представлен на рисунках стандартным отклонением.

Для эксперимента были взяты сублетальные 0,01 и 0,1 мг/л и заведомо летальная 5,0 мг/л концентрации сернокислой меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) [12 - 14]. Концентрации нитрата натрия ( $\text{NaNO}_3$ ) составляли 0,05, 8,82, 25,64 мкМ/л. В этом диапазоне находились значения, которые были определены нами в природной среде [15].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении мониторинговых работ в акватории Севастополя в качестве условной нормы были рассчитаны значения АК у личинок снетка, выловленных на открытом взморье б. Круглая. Условно нормальные значения АК личинок находились в интервале 0,25 – 0,75 мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /г ткани\*мин и являлись минимальными по сравнению с АК личинок, отобранных в более загрязненных акваториях. АК личинок снетка увеличивалась с возрастанием степени загрязнения акваторий [5, 16]. Этими данными мы воспользовались при анализе результатов лабораторного эксперимента.

Результаты по определению каталазной активности личинок атерины при действии сернокислой меди в течение 2 и 12 часов представлены на рис. 1. При 2-х часовой экспози-

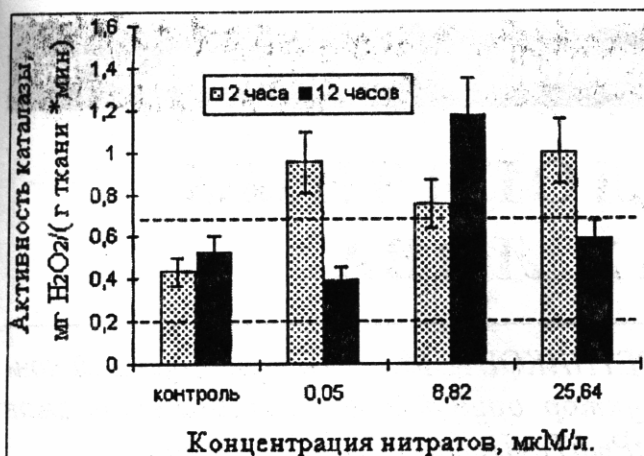


**Рисунок 1.** Изменение активности каталазы (мг  $\text{H}_2\text{O}_2$  /г ткани\*мин) личинок *Atherina hepsetus* при интоксикации различными концентрациями меди.

ции АК контрольных личинок составляла  $0,35 \pm 0,04$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /г ткани\*мин, а при 12-часовой -  $0,57 \pm 0,05$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /(г ткани\*мин), что совпадает с условно нормальными значениями АК, полученными ранее. Эти величины АК у личинок в контроле входят в интервал условно нормальных значений активности каталазы 0,25 - 0,75 мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /(г ткани\*мин), рассчитанный ранее и соответствующий их нормальному функционированию [5]. Экспозиция в течение 2-х часового воздействия сернокислой меди показала достоверное увеличение АК в тканях личинок снетка, особенно при действии концентрации 5,0 мг/л - в 3,8 раза по сравнению с контролем. Влияние концентраций меди 0,01 и 0,1 мг/л выражалось в достоверном увеличении АК личинок по сравнению с контрольными значениями - в 2,5 и в 2,8 раза соответственно ( $P = 0,95$ ), что свидетельствует о быстром отклике антиоксидантной системы на токсическое воздействие.

Увеличение времени действия сернокислой меди до 12-часов вызвало 100% гибель личинок в концентрации 5,0 мг/л и достоверное усиление АК при действии концентрации 0,01 мг/л: в 2 раза и в 1,65 раза по сравнению с контролем при концентрации 0,1 мг/л ( $P = 0,95$ ). Полученные результаты не противоречат литературным данным, при этом на высокую чувствительность каталазы рыб к ионам сернокислой меди указывают некоторые исследователи [8]. Отмечено также увеличение общей антиоксидантной активности тканей рыб при воздействии меди, что свидетельствует о токсическом стрессе, который испытывают гидробионты [17]. Обнаружено также влияние меди в концентрациях 8 - 15 мкг/л в течение 48 ч на активность каталазы у рыбы-зебры (*Danio rerio*), которое выражалось не только в увеличении активности каталазы, но также и в экспрессии генов, отвечающих за ее синтез. Это свидетельствует не только об увеличении активности защитного фермента, но и его количества, что является адаптационным механизмом противодействия оксидативному стрессу [18].

Влияние исследуемых концентраций нитратов на каталазную активность черноморского снетка представлено на рис. 2. Диапазон изменения АК у контрольных личинок составляет 0,45 - 0,58 мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /(г ткани\*мин) при экспозиции 2 и 12 ч, что совпадает с интервалом условно нормальных значений активности каталазы 0,25 - 0,75 мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /(г ткани\*мин), соответствующим нормальному функционированию личинок [5].



**Рисунок 2.** Изменение активности каталазы (мг H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / г ткани \* мин) личинок *Atherina hepsetus* при интоксикации различными концентрациями нитратов в течение 2 и 12 часов.

2-часовая экспозиция вызывала возрастание тренда активности фермента при действии исследуемых концентраций нитрата натрия в 2,4, 1,9 и 2,5 раза соответственно, но при увеличении сроков воздействия до 12 ч ответ не был столь однозначным. Влияние концентраций 0,05 и 25,64 мкМ/л в течение 12 ч не приводило к существенным изменениям в АК: ее значения находились в границах условной нормы. Это, вероятно, связано с метаболическими процессами адаптации личинок к увеличению концентрации нитратов. Достоверное увеличение АК в этом временном интервале отмечено только при концентрации 8,82 мкМ/л и составило 100% от контрольных значений, что свидетельствует о том, что данная концентрация является токсической.

Данные по влиянию нитратов на антиоксидантную систему рыб отсутствуют, воздействие нитроароматических соединений на пресноводных рыб выражается в сильнейшем токсическом стрессе, метаболически выражающемся в увеличении свободнорадикальных продуктов. Это стимулирует активность супероксиддисмутазы, нейтрализующей свободные радикалы и каталазы, разрушающей перекись водорода, что препятствует дальнейшему развитию токсического оксидативного стресса [19].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние сернокислой меди и нитрата натрия на личинок черноморской атерины *Atherina hepsetus* в лабораторном эксперименте. Выявлено достоверное увеличение активности каталазы личинок при действии сер-

нокислой меди в концентрациях 0,01, 0,1 и 5 мг/л при 2-х и 12-часовом воздействии. Концентрация 5,0 мг/л вызывала 100% гибель личинок при времени воздействия 12 часов.



Установлено, что воздействие нитрата натрия в концентрациях 0,05, 8,82 и 25,64 мкМ/л вызывает достоверное увеличение активности каталазы личинок черноморского снетка при 2-часовой экспозиции. Концентрация 8,82 мкМ/л в интервале времени 12 часов стимулировала активность каталазы в этот период в 2 раза по сравнению с контрольными значениями. Показано, что все изученные концентрации токсикантов являются действующими, то есть вызывают у личинок токсический оксидативный стресс.

При исследовании комплексного загрязнения прибрежных акваторий в качестве биомаркера может быть использована активность каталазы личинок атерины *Atherina hepsetus* L.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Mourente G., Tocher D.R., Diaz E. Relationships between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae//AquaCulture. - 1999. - 179, N 1 - 4. - P. 309 - 324.
2. Peters L.D., Porte C., Livingstone D.R. Variation of Antioxidant Enzyme Activities of Sprat (*Sprattus sprattus*) larvae and Organic contaminant Levels in Mixed Zooplankton from the Southern Sea / Marine Pollution Bul. - 2001. - 42, N11. - P. 1087 - 1095.
3. Руднева-Титова И. И. Соотношение активности антиоксидантных ферментов и процессов перекисного окисления липидов в эмбриогенезе черноморского бычка-кругляка//Онтогенез. - 1994. - 25, N3. - С. 13 - 20.
4. Руднева И.И., Залевская И.Н. Личинки атерины (*Atherina hepsetus* L.) как биоиндикаторы загрязнения прибрежных акваторий Черного моря//Экология. - 2004. - N2. - С.107 - 112.
5. Шахматова О.А. Активность каталазы личинок рыб как показатель качества морской среды//Экология моря. - 2000. - N51. - С. 52 - 54.
6. Winstone G. W., Di-Giulio R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms//Aquat. Toxicol. - 1991. - 19, N 2. - P. 137 - 161.
7. Алешко С.А. Активность антиоксидантных ферментов и уровень перекисного окисления липидов у рыб и двусторчатых моллюсков из залива Петра Великого (Японское море)//Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы второй научной конференции с участием стран СНГ (11-14 сентября 2007 г.). - Петрозаводск, 2007. - С. 13 - 14.
8. Колупаев Б. И., Путинцева В. А. Активность дыхательных ферментов у рыб в токсической среде//Гидробиол. журн. - 1986. - 22, N2. - С. 66 - 68.
9. Аеус Ю.В., Грубинко В.В. Активность антиоксидантной системы карпа при действии ионов тяжелых металлов//Гидробиол. журн. - 1998. - 34, N2. - С. 59 - 63.
10. Павлова Е. В., Мурина В. В., Куфтаркова Е. А. Гидрохимические и биологические исследования в бухте Омега (Черное море, Севастопольский рейд)/Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа: сб. науч. тр. МГИ НАН Украины. - Севастополь, 2001. - Вып.2. - С. 159 - 176.
11. Березов Т.Т. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. - М.: Медицина, 1976. - С. 81 - 83.
12. Грищенко Л.И., Акбаров М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства/Справочник. - М.: Колос. - 1999. - 234с.
13. Коваленко Ф. Особенности метаболических процессов в организме рыб под влиянием сублетальных концентраций меди и цинка//Гидробиол. журн. - 2004. - 40. - N 4. - С. 80 - 87.
14. Amantha S., Artis E.M., Dalto H., Vanchini B. Copper acculation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Curvier 1832 (Teleostei, Carangidae)//Pan-American Journal of Aquatic Sciences. - 2008. - 3(3). - P.384 - 390.
15. Шахматова О. А., Парчевская Д. С. Активность каталазы и контроль качества воды//Альгология. - 2000. - 10, N 3. - С. 355 - 361.
16. Шахматова О.А. Активность антиоксидантной системы некоторых черноморских гидробионтов в прибрежной акватории Севастополя: Автореф. дис... канд.биол. наук. - Севастополь, 2004. - 21 с.
17. Companelia L., Costanza M., Conti M.E. The influence of copper ions on antioxidant activity: preliminary study//International Journal of Environmental and Health. - 2007. - 1, N2. - P. 328 - 340.
18. Craig P.M., Chris M., Wood M., Grant D. McClelland. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*)//American Journal of Physiology. - 2007. - 293, N5. - P.1882 - 1892.
19. Washburn P.S., Di-Giulio R. T. Nitroaromatic stimulation of superoxid production in free species of freshwater fish//Mar. Environ. Reseach. - 1988. - 24, N 1 - 4. - P. 291 - 294.