

ВЛИЯНИЕ **МЕДИ** на ИОННЫЙ ОБМЕН у ОКУНЯ *Perca fluviatilis* L. при ПОРОГОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ КАТИОНОВ в ПРЕСНОЙ ВОДЕ

Показано, что минимальные концентрации натрия, калия, кальция, магния в воде, необходимые для поддержания ионного баланса между организмом окуня и средой, составляют 0,0045-0,0051, 0,0128-0,0147, 0,0006-0,0007, 0,0004-0,0005 ммоль/л, соответственно. Добавка раствора меди в экспериментальную среду при пороговых концентрациях ионов усилила в 5 раз потери натрия из организма рыб, не влияя при этом на обмен кальция и магния. Полученные результаты не подтверждают высказываемую в литературе гипотезу о конкуренции ионов меди и кальция за кальциевые насосы в жаберном эпителии гидробионтов.

Введение

Основными источниками поступления ионов меди в природные водоемы являются промышленные комплексы, связанные с добычей и производством цветных металлов. Кроме того, сульфат меди используется как альгицид в борьбе с водорослями, а в аквакультуре с заболеваниями рыб, вызванными простейшими микроорганизмами. В небольших количествах медь является необходимым элементом для нормального протекания многих биохимических процессов в организме животных [1, 2] и растений [3]. Однако при определенных концентрациях ионов меди в водной среде они становятся токсичными для организмов [1, 4, 5]. В природных водоемах концентрация меди колеблется от 0,001 до 0,98 мг/л [6].

В.И. Мартеньянов*,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

А.С. Маврин,

научный сотрудник, ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

Полагают, что тяжелые металлы [7-10], включая ионы меди [11-13], нарушают ионный баланс между организмом и средой, вызывая снижение устойчивости гидробионтов. Анализируя применяемые в этих работах методики было показано [14], что манипуляционные процедуры с объектом в ходе проведения экспериментов вызывали изменения, перекрывающие эффекты изучаемого фактора. В связи с этим, невозможно отделить реакции, обусловленные изучаемым фактором от таковых, которые вызваны манипуляциями с объектом в ходе проведения экспериментов. Механизм влияния тяжелых металлов на организм гидробионтов остается неясным. Нами [14] было дано обоснование простого способа, позволяющего оценить эффект изучаемого фактора, не тревожа животных.

Показано, что токсический эффект неблагоприятных факторов усиливается при снижении минерализации воды [13, 15]. В связи с этим, наибольший повреждающий ущерб наносится водным экосистемам северных широт, имеющих низкую минерализацию воды и наличие промышленных комплексов по добыче цветных металлов. До сих пор остается неясным, какие концентрации меди в воде являются необходимыми для жизнедеятельности гидробионтов, а с каких начинает проявляться токсический эффект. Мы полагаем, что для решения данных проблем повреждающий эффект меди необходимо оценивать у гидробионтов при минимальной минерализации пресной воды.

Цель исследования — изучить влияние ионов меди на ионный баланс между организмом окуня *Perca fluviatilis* и средой при пороговых концентрациях ионов натрия, калия, кальция, магния в пресной воде.

*Адрес для корреспонденции: martem@ibiw.yaroslavl.ru

Таблица 1

Концентрация катионов в плазме крови окуня и речной воде (р. Ильдь)

Показатель	Плазма, ммоль/л	Содержание катионов в речной воде, ммоль/л	Градиент плазма/среда
Натрий	150,8±0,8	0,3	503
Калий	4,5±0,5	0,05	90
Кальций	3,5±0,09	1,2	3
Магний	0,47±0,08	0.48	1

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на окуне *Perca fluviatilis* L. отловленного 03.03.2011 г. в р. Ильдь.

Пробы крови на анализ брали сразу после поимки удочкой, когда исследуемые показатели еще не успевают существенно измениться из-за стресса, вызванного отловом [16]. При взятии проб рыб каудэктомировали, кровь собирали в пробирки и помещали в поролоновый штатив, находящийся в термосе с водой, смешанной со льдом. В лаборатории кровь центрифугировали при 6000 об./мин в течение 15 мин. После этого пипеткой отбирали 0,05 мл плазмы и разводили её в 5 мл бидистиллированной воды.

Другая часть улова доставлялась в лабораторию. Рыбы массой 5-7 г помещались в аквариумы и в течение 10 сут акклиматизировались к лабораторным условиям. После акклиматизации рыб отлавливали, промывали в дистиллированной воде и помещали по 1 особи в отдельные аквариумы, в количестве 10 штук, наполненные по 10 л дистиллированной воды. Свежая дистиллированная вода имела кислую реакцию. Снятие кислотности осуществляли за счет пропускания через воду воздуха в течение 2-3 сут до посадки рыб. Подачу воздуха продолжали в ходе всего эксперимента. Сразу после помещения рыб в индивидуальные емкости из них с суточными интервалами времени отбирали пробы воды для анализа в ней содержания натрия, калия, кальция, магния методом пламенной спектрофотометрии. Спустя 12 сут от начала эксперимента, когда содержание ионов в экспериментальной воде установилось на стабильных уровнях, в каждый аквариум добавили раствор хлористой меди до конечной концентрации 0,16 мг/л. Такая концентрация ионов меди в воде была выбрана для того чтобы получить повреждающий эффект ее действия на организм. После добавки меди через каждый час из аквариумов отбирали про-

бы воды на анализ катионов. Температура воды в аквариумах в ходе эксперимента медленно колебалась между 14 и 15 °С.

Концентрацию натрия и калия в пробах определяли в воздушно-пропановом пламени на спектрофотометре Flapho-4 («Carl Zeiss», Германия). Содержание кальция и магния определяли в воздушно-ацетиленовом пламени на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-1 («Carl Zeiss», Германия). Концентрация катионов в плазме крови и в пробах воды выражена в ммоль/л. Скорость обмена ионов между организмом рыб и средой рассчитывали по ранее предложенной формуле [14].

Данные обрабатывали статистически. В табл. 1 и на рис. 1 результаты представлены средними значениями и их стандартными отклонениями.

Результаты и их обсуждение

Содержание катионов в речной воде и плазме крови окуня, отловленного в природных условиях, представлены в табл. 1. Наиболее существенные различия между внутренней и внешней средой наблюдались в концентрации ионов натрия и калия.

После помещения рыб в дистиллированную воду в течение первых 5-8 сут наблюдалось постепенное повышение концентрации различных ионов в воде (рис. 1), свидетельствуя об их утечке из организма. Потеря ионов из организма окуней совершалась с начальными скоростями 0,1±0,01, 0,02±0,01, 0,004±0,0006, 0,0011±0,0001 ммоль/100 г сырой массы за 1 ч, соответственно, для натрия, калия, кальция и магния. Наиболее высокие потери наблюдались для натрия, которые были больше в 5, 25 и 91 раз, соответственно, по отношению к калию, кальцию и магнию. Уровень магния начал повышаться в воде на 4 сут и достиг стабильных пороговых значений на 10 сут эксперимента. При этом магний терялся из организма окуня с более низкой скоростью по отношению к другим ионам. Просматривается закономерность — чем выше градиент какого-либо иона между организмом и средой, тем больше скорость потерь.

На 6-10 сут эксперимента содержание натрия, кальция, магния в дистиллированной воде стабилизировалось в узкой зоне концентраций 0,0045-0,0051, 0,0006-0,0007, 0,0004-0,0005 ммоль/л, соответственно (на рис. 1 ограничены сплошными линиями от-

носителю оси абсцисс), указывая на достижение ионного баланса между организмом и средой. Концентрация калия в экспериментальной среде повышалась в течение 12 сут, не достигнув стабильного порогового значения. Пороговые концентрации для ионов кальция и магния близки между собой, но на порядок ниже по сравнению с таковыми для натрия. Хуже всего окунь способен извлекать из воды ионы калия. Требуется более высокие концентрации этого элемента в воде по сравнению с магнием, кальцием и натрием. Минимальные концентрации катионов в воде, при которых достигается ионный баланс между организмом и средой, являются предельными для выживания окуня. При содержании электролитов в воде ниже пороговых, рыбы погибают вследствие обезсоливания организма.

При пороговых концентрациях ионов в воде системы ионной регуляции организма функционируют в предельном режиме. При таких условиях на 12 сут эксперимента в каждый аквариум добавили раствор хлористой меди до конечной концентрации ионов меди в воде 0,16 мг/л (на рис. 1 отмече-

Ключевые слова: окунь, пороговые концентрации катионов, натрий, калий, кальций, магний, медь

но стрелкой) и затем с интервалами в 1 ч из аквариумов отбирали пробы воды на анализ содержания катионов. Спустя 4 ч погибла 1 особь, а через 6 ч остальные 9 рыб в пределах 20-30 мин.

Ионы меди вызвали резкое усиление утечки натрия из организма окуня с начальной скоростью $0,51 \pm 0,08$ ммоль/100 г час, приводя к повышению концентрации этого элемента в экспериментальной воде (рис. 1). Скорость потерь ионов натрия из организма в ответ на действие меди в 5 раз больше по сравнению с таковой, полученной в начале эксперимента при помещении рыб в дистиллированную воду. Эти результаты указывают на то, что растворенные в воде ионы меди вызывают, главным образом, повышение проницаемости жаберного эпителия для натрия, в результате чего усиливается его утечка из организма. Если бы ионы меди ингибировали только натриевые насосы, не оказывая влияния на проницаемость, то скорость утечки натрия из организма была бы равной таковой, полученной при помещении рыб в дистиллированную воду. Отмечается, что ионы меди ингибируют также активный

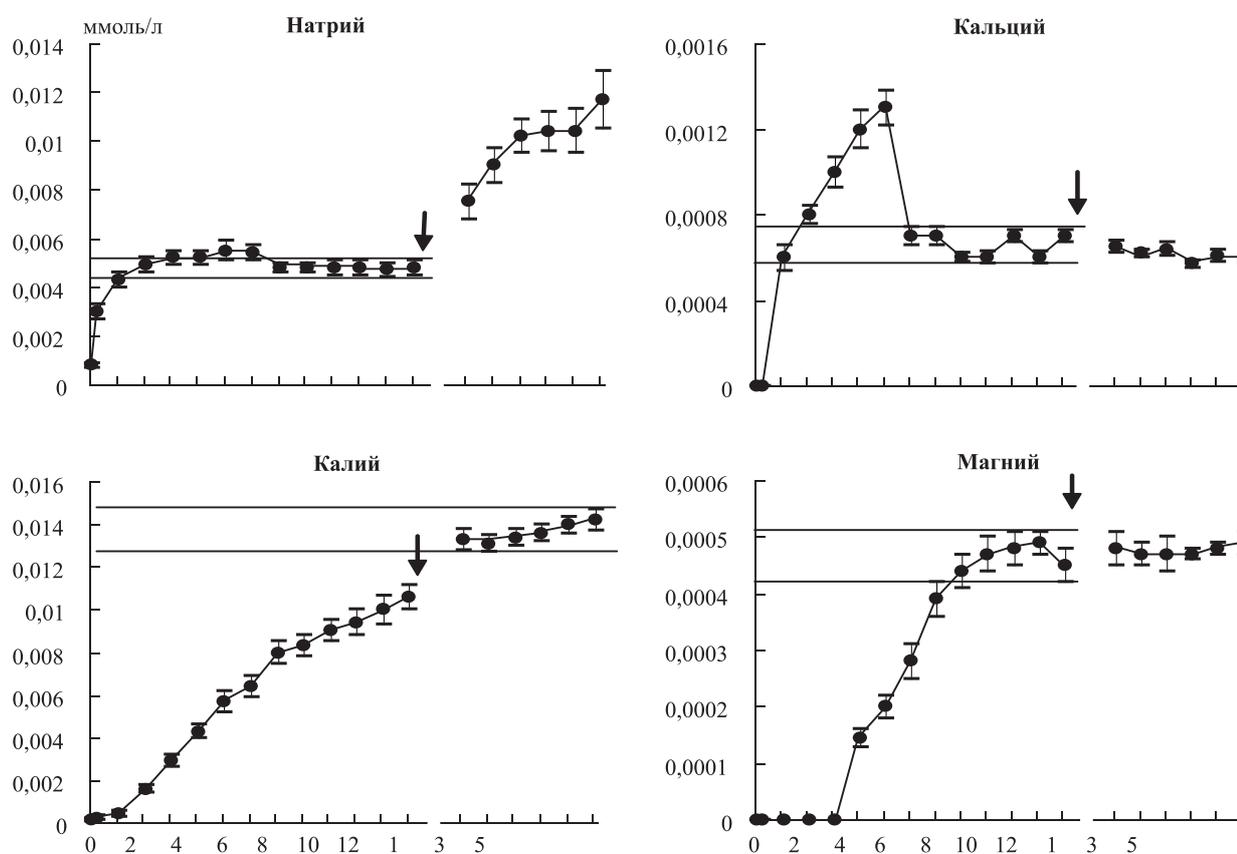


Рис. 1. Динамика обмена ионов между организмом окуня и средой в ответ на помещение рыб в дистиллированную воду и при действии меди. По оси абсцисс — время; ординат — концентрация ионов в среде.

транспорт натрия в жаберном эпителии рыб [12]. Следует отметить, что через 3 ч от начала воздействия защитные системы организма пытались предотвратить утечку натрия. Однако вскоре адаптивные механизмы были истощены, в результате чего наблюдалось дальнейшее усиление выхода натрия из организма перед его гибелью.

Преобладание утечки натрия из организма рыб во внешнюю среду в ответ на действие меди приводит к обессоливанию плазмы крови и тканей. На микижи *Oncorhynchus mykiss* Walbaum было показано, что при концентрации меди в воде 0,55 мкмоль наблюдалось снижение натрия и хлора в плазме крови и тканях рыб [5].

В течение первого часа действия меди утечка калия из организма резко возросла до $0,42 \pm 0,1$ ммоль/100 г час, превышая начальную скорость в дистиллированной воде в 21 раз. В последующий период уровень калия в воде стабилизировался в узкой зоне концентраций 0,013-0,015 ммоль/л, отражая поддержание баланса этого иона между организмом и средой вплоть до гибели животных. Данные свидетельствуют о том, что медь, повысив проницаемость жаберного эпителия для калия, ускорила достижение пороговых значений для этого иона. Остается не ясным, проявился бы эффект меди на обмен калия при его пороговых концентрациях в воде.

После добавки раствора меди в экспериментальную среду содержание кальция и магния в воде оставалось стабильным в ходе опыта, указывая на отсутствие влияния меди на обмен этих двухвалентных ионов между организмом и средой (рис. 1). Получено, что при концентрации меди более 20 мкг/л снижалось поступление кальция в организм семги *Salmo salar* L. [11]. Предположили, что это обусловлено конкуренцией между ионами меди и кальция за кальциевые насосы в жаберном эпителии рыб. Если это имеет место, то должно наблюдаться преобладание утечки кальция из организма над его транспортом вследствие отсутствия захвата определенной части ионов кальция кальциевыми насосами из-за связывания их с медью. В таком случае в воде должна бы повышаться концентрация кальция. Наши данные показывают, что уровень кальция в воде остается стабильным после добавки раствора меди в среду. Это доказывает, что кальциевые насосы полностью компенсируют потерю кальция и, следовательно, не принимают

участия в транспорте ионов меди, т.е. ионы меди не конкурируют с ионами кальция за кальциевые насосы.

Другие авторы [17] в ответ на действие меди зарегистрировали усиление потерь ионов кальция из организма кумжи *Salmo trutta* L. Отрицательный баланс ионов кальция между организмом рыб и средой [11, 17], как было показано [14], может вызываться манипуляционными процедурами с объектом во время измерения показателя, а не действием изучаемого фактора. Наши данные, полученные без применения манипуляций с объектом во время взятия проб воды, свидетельствуют об отсутствии какого-либо влияния меди на обмен ионов кальция и магния между организмом рыб и средой.

Таким образом, ионы меди существенно (до 5 раз) увеличивают проницаемость жаберного эпителия к натрию, вызывая его утечку из плазмы крови рыб. В этом случае отходящая от жабр кровь имеет пониженную концентрацию солей. В результате создается осмотический перепад между кровью и внутриклеточной жидкостью, который способствует перемещению воды в ткани, вызывая их разбухание. Можно предполагать, что такие нарушения в конечном итоге могут привести к гибели организма. Возможно также, что ионы меди, проникая через поверхность жаберного эпителия в кровь, оказывают повреждающее действие на биохимические процессы внутри организма. Для выяснения этого необходимо проведение дополнительных исследований.

Заключение

Содержание натрия, калия, кальция, магния в плазме крови окуня, отловленного в природных условиях, поддерживалось на уровнях $150,8 \pm 0,8$, $4,5 \pm 0,5$, $3,5 \pm 0,09$, $0,47 \pm 0,08$ ммоль/л, соответственно. Показано, что минимальные концентрации натрия, калия, кальция, магния в воде, необходимые для поддержания ионного баланса между организмом окуня и средой, составляют 0,0045-0,0051, 0,0128-0,0147, 0,0006-0,0007, 0,0004-0,0005 ммоль/л, соответственно. Добавка раствора меди в экспериментальную среду при пороговых концентрациях ионов вызвала усиление потери натрия из организма рыб, не влияя при этом на обмен кальция и магния. Предложенный метод, исключая манипуляции с гидробионтами, позволяет оценивать эффекты только изучаемых факторов.

Литература

1. Алабастер Д. Критерии качества воды для пресноводных рыб / Д. Алабастер, Р. Ллойд. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 344 с.
2. Watanabe T. Trace minerals in fish nutrition / T. Watanabe, V. Viron, S. Satoh // *Aquaculture*. 1997. V. 151. P. 185-207.
3. Островская Л.К. Физиологическая роль меди и основы применения медных удобрений. Киев: УАСХИ, 1961. 285 с.
4. Murai T. Effects of dietary copper on channel catfish / T. Murai, J. W. Andrew, R. G. Smith // *Aquaculture*. 1981. V. 22. P. 353-357.
5. Kamunde C.N. Interaction of dietary sodium chloride and waterborne copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): copper toxicity and sodium and chloride homeostasis / C.N. Kamunde, S. Niyogi, C. M. Wood // *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 2005. V. 62. P. 390-399.
6. Руднева Н.А. Тяжелые металлы и микроэлементы в гидробионтах Байкальского региона. Улан-Уде: Мир, 2001. 135 с.
7. Hogstrand C. Effects of zinc on the kinetics of branchial calcium uptake in freshwater rainbow trout during adaptation to waterborne zinc / C. Hogstrand, R. W. Wilson, D. Polgar, C. M. Wood // *J. Exp. Biol.* 1994. V. 186. P. 55-73.
8. Reader J. P. Effects of aluminum and pH on calcium fluxes, and effects of cadmium and manganese on calcium and sodium fluxes in brown trout (*Salmo trutta* L.) / J. P. Reader, R. Morris // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1988. V. 91. № 2. P. 449-457.
9. Rogers J. T. Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / J. T. Rogers, M. Patel, K. M. Gilmour, C. M. Wood // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005. V. 289. R463-R472.
10. Spry D.J. Ion flux rates, acid-base status, and blood gases in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed to toxic zinc in natural soft water / D.J. Spry, C. M. Wood // *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1985. V. 42. № 8. P. 1332-1341.
11. Виноградов Г.А. Обмен кальция и натрия у рыб при вариации концентраций ионов алюминия, меди, кадмия, магния и водорода // *Биол. внутр. вод: Информ. бюл.* 1992. № 91. С. 60-68.
12. Lauren D.J. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Saimo gairdneri* Richardson. Modulation by water hardness and pH / D.J. Lauren, D.G. McDonald // *J. Comp. Physiol. B.* 1985. V. 155. P. 635-644.
13. Sawyer M. D.J. The effect of calcium concentration on the toxicity of copper, lead and zinc to yolk-sac fry of brown trout, *Salmo trutta* L. in soft, acid water / M.D.J. Sawyer, J.P. Reader, R. Morris // *J. Fish Biol.* 1989. V. 35. P. 323-332.
14. Мартемьянов В.И. Методы оценки воздействия неблагоприятных факторов среды на гидробионты по показателям ионного обмена // *Вода: химия и экология*. 2013. № 3. С. 52-63.
15. Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
16. Мартемьянов В.И. Стресс как источник ошибок при эколого-физиологических и биохимических исследованиях рыб // *Оценка погрешностей методов гидробиологических и ихтиологических исследований* / Под ред. А.В. Монакова, А.Г. Поддубного. Рыбинск: ИБВВ АН СССР. 1982. С. 124-134.
17. Sayer M. D.J. Effect of six trace metals on calcium fluxes in brown trout (*Salmo trutta* L.) in soft water / M.D.J. Sayer, J.P. Reader, R. Morris // *J. Comp. Physiol. [B]*. 1991. V. 161. P. 537-542.

V.I. Martemyanov, A.S. Mavrin

CUPRUM INFLUENCE ON ION EXCHANGE OF PERCH *Perca fluviatilis* L. UNDER THRESHOLD CONCENTRATIONS OF CATIONS IN FRESH WATER

It was shown that in water minimal concentrations of sodium, potassium, calcium, magnesium required for support of ion exchange between perch organism and environment are 0.0045-0.0051, 0.0128-0.0147, 0.0006-0.0007, 0.0004-0.0005 mmol/L, respectively. Addition of cuprum solution to experimental medium with threshold ions concentrations increased sodium losses from fish organism but did not affect on calcium and magnesium exchange. Obtained results do not prove given in literature hypothesis on cuprum and calcium competition for calcium pumps in branchial epithelia of hydrobionts.

Key words: perch, threshold concentrations of cations, sodium, potassium, calcium, magnesium, cuprum