

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ воздействия неблагоприятных ФАКТОРОВ СРЕДЫ на ГИДРОБИОНТЫ по ПОКАЗАТЕЛЯМ ИОННОГО ОБМЕНА

На основе сравнительного анализа показано, что методы, используемые для оценки характера и степени влияния различных факторов на гидробионты по показателям ионного обмена между организмом и средой, имеют ряд серьезных недостатков. Дано обоснование использования наиболее простого, удобного, экономичного и информативного способа на основе определения чистого потока ионов между организмом и средой за счет измерения содержания электролитов в пробах воды, отбираемых из экспериментальной емкости. Из-за неограниченной возможности частоты отбора проб воды, метод позволяет на индивидуальных животных, не тревожа их, оценить направление, закономерности, величину, цикличность и продолжительность изменений показателя от начала любого воздействия, включая антропогенные факторы, и до завершения адаптации к новым условиям.

Введение

Обмен многих веществ между гидробионтами и средой осуществляется через жабры. Они имеют обширную поверхность с густой сетью капилляров, отделенных от внешней среды одним слоем высокопроницаемых клеток. Это позволяет растворенному в воде кислороду легко проникать в кровь. Однако такая структура жабр имеет негативные последствия для водно-солевого обмена. Содержание различных ионов во внутренней среде пресноводных рыб существенно выше, чем в пресной воде. В силу этого обстоятельства создаются ионные градиенты, обуславливающие диффузию электролитов из крови через поверхность жабр во внешнюю среду. Некоторая часть ионов удаляется из организма рыб с мочой и через покровы тела. Этим негативным процессам противостоят определенные структуры

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

и системы, обеспечивающие регуляцию проницаемости и активность различных АТФаз, которые осуществляют транспорт ионов из внешней среды в кровь, сопряженный с удалением из организма конечных продуктов жизнедеятельности ионов аммония, водорода, бикарбоната [1]. В результате регуляции проницаемости, транспорта ионов в жабрах, а также соответствующей работы почки содержание различных электролитов во внутренней среде гидробионтов поддерживается на определенных относительно стабильных уровнях, обеспечивая осмотический, ионный и кислотно-щелочной баланс организма.

Показано [1-23], что неблагоприятные факторы, в том числе антропогенного характера, повреждают жаберный эпителий, усиливая утечку из организма разных ионов, приводя к нарушению водно-солевого баланса и снижению устойчивости гидробионтов. Методики по изучению обмена ионов между организмом гидробионтов и средой различаются между собой по ис-

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

пользованию дорогостоящего оборудования и реактивов, количества животных, необходимых для проведения экспериментов, трудоемкости при проведении опытов и обработке проб, осуществления различных манипуляций во время проведения экспериментов, которые вызывают стресс у исследуемого объекта, влияя на результат исследования.

Целью работы является анализ применяемых методик и обоснование использования простого и удобного способа, позволяющего на одной выборке, не тревожа животных, оценивать качество и степень влияния различных факторов на гидробионты на основе определения чистого потока ионов между организмом и средой за счет измерения содержания электролитов в пробах воды, отбираемых из экспериментальной емкости. По полученным данным можно оценивать качество водной среды.

Результаты и их обсуждение

Показатели ионного обмена между гидробионтами и средой

Обмен вещества между гидробионтами и водой описывают тремя параметрами: поток (потери) ионов из организма во внешнюю среду (V_o в отечественной литературе, f_{out}, J_{out} в зарубежных работах); поток (активный транспорт) в организм (V в отечественной литературе, f_{in}, J_{in} в зарубежных работах); чистый (результатирующий) поток (V_c в отечественной литературе, f_{net}, J_{net} в зарубежных работах), представляющий разность между потерями из организма и активным транспортом в организм. Потоки ионов чаще всего рассчитывают в виде скорости, иногда выражают как содержание вещества на массу организма. Все три параметра связаны между собой единой формулой:

$$V_c = V_o - V. (1)$$

В связи с этим, как правило, два каких-либо параметра выявляют на основе экспериментальных данных, а третий определяют расчетным путем. При изучении кинетических характеристик обмена ионов между гидробионтами и средой применяют изотопный анализ, изотопный анализ в сочетании с методами пламенной спектрофотометрии, либо только методы пламенной спектрофотометрии.

Изотопный анализ

Этим методом регистрируют поток (потери) меченого иона из гидробионтов в воду

(V_o, f_{out}, J_{out}) и поток (активный транспорт) из среды в организм (V, f_{in}, J_{in}). Чистый поток (V_c, f_{net}, J_{net}) иона между организмом и средой рассчитывают по формуле (1), измерив V_o и V с помощью радиоактивных изотопов, или определяют экспериментально методом пламенной спектрофотометрии по изменению концентрации исследуемого иона в пресной воде экспериментальной емкости или в целом животном.

При определении потери меченого иона из организма животные, акклиматизированные к разным условиям, включая неблагоприятные, извлекаются из аквариумов и инъецируются раствором с изотопом [21]. В течение определенного периода времени (4-16 ч) метке дают возможность распределиться внутри организма. Затем животных перемещают в определенные объемы чистой воды и в ходе экспозиции (2-4 ч) измеряют изменение радиоактивности в животном, либо в пробах воды. Потери рассчитывают на основе убыли метки из организма, либо ее накопления в воде экспериментальной емкости. Некоторые авторы [21] используют формулы, которые включают оба параметра — изменение радиоактивности в целом организме и пробах воды.

Другой способ, который применяется крайне редко, основан на том, что акклиматизированные к определенным условиям животные извлекаются из аквариумов и помещаются в емкости с раствором изотопа. В течение длительного периода (от 3 и более часов) происходит насыщение организма меченым ионом [18-20]. Затем гидробионты промываются в течение 12-15 ч чистой проточной водой. После этого измеряют убыль радиоактивности в животном.

При определении потока иона, направленного в организм, акклиматизированных к каким-либо условиям животных извлекают из аквариумов и помещают на 2-12 ч в небольшие индивидуальные емкости с раствором изотопа. Затем гидробионтов умерщвляют. Скорость поглощения рассчитывают по накоплению изотопа в теле (или измельченных тканях всего организма) или убыли метки в воде экспериментальной емкости [9-23]. Некоторые исследователи [24, 25] регистрируют активный транспорт иона из внешней среды на основе повышения уровня изотопа в крови. При этом необходимо знать объем, в пределах которого происходит распределение метки. Это пространство определяют специальным способом [24].

При применении изотопного анализа для расчета скорости потерь и активного транс-

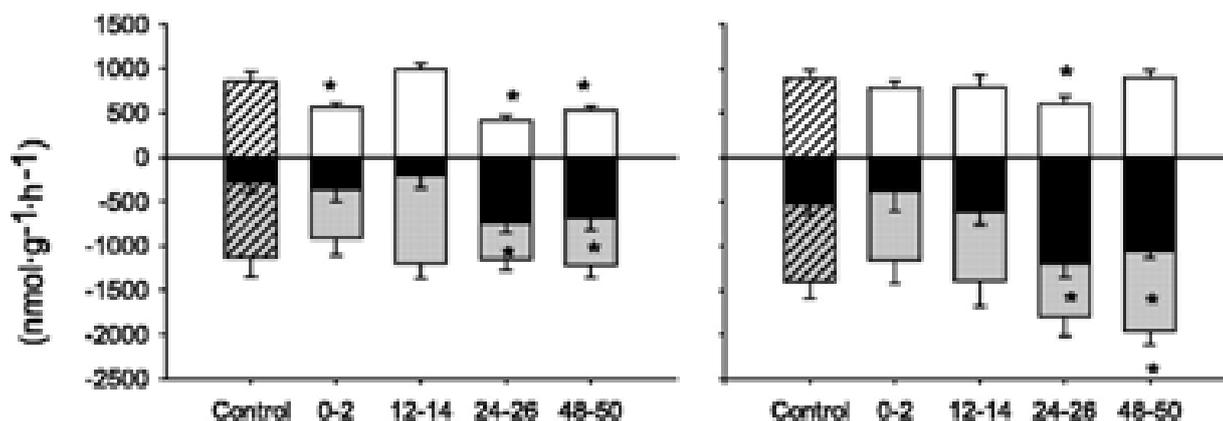


Рис. 1. Динамика скоростей обмена ионов натрия между организмом радужной форели и средой в ответ на действие разных концентраций (2,4 $\mu\text{моль/л}$, слева и 1,2 $\mu\text{моль/л}$, справа) свинца [22].

По оси абсцисс: время, ч; ординат — скорость активного транспорта из среды в организм (положительные значения), скорость потерь из организма в среду (максимальные отрицательные значения), чистая скорость (разность между потерями и активным транспортом, черные колонки).

порта используют множество различных формул. Многие из них включают параметры, связанные с определением общей концентрации исследуемого иона либо в воде, либо в организме, либо в крови. Поэтому возникает дополнительная надобность в использовании методов пламенной спектрофотометрии.

Чистый поток иона между организмом и средой (V_c) рассчитывают, измерив V_o и V_s с помощью радиоактивных изотопов, а также определяют методами пламенной спектрофотометрии по изменению общей концентрации исследуемого иона в пресной воде экспериментальной емкости или в целом животном.

Методы изотопного анализа имеют ряд серьезных недостатков, которые более наглядно можно продемонстрировать на конкретных примерах. На рис. 1 представлены данные [22] по изменению потоков ионов натрия между организмом радужной форели *Oncorhynchus mykiss* и средой, полученные в ответ на действие 2,4 $\mu\text{моль/л}$ (левая часть рисунка) и 1,2 $\mu\text{моль/л}$ (правая часть рисунка) растворенного в воде свинца. До измерения потоков иона натрия и хлора контрольные группы содержались в чистой воде, а экспериментальные выборки находились в течение, соответственно, 0, 12, 24, 48 ч в пресной воде с добавками в нее свинца. Затем каждая группа рыб (по 8 особей) была перенесена в отдельные пластмассовые емкости, наполненные по 3 л искусственной

пресной водой с добавками радиоактивного хлористого натрия. Через 2 ч экспозиции животных забили, а по накоплению изотопов в целой рыбе определили скорость их поступления в организм (на рис. 1 светлые колонки, имеющие положительные значения). Общую концентрацию натрия в воде экспериментальных емкостей измерили методами пламенной спектрофотометрии, а по изменению уровня ионов в среде определили чистую скорость обмена этого катиона между организмом и средой (черные колонки на рис. 1). Скорость потери ионов из организма рыб (серые колонки на рис. 1) оценили расчетным путем.

Приведенные данные (рис. 1) показывают, что даже у контрольных групп наблюдался ионный дисбаланс: чистая скорость (черные колонки) имела отрицательные значения, показывая, на какую величину скорость потери натрия из рыб преобладала над скоростью поступления этого иона в организм. обессоливанием гидробионтов. Свинец усиливал чистую скорость потери натрия из рыб (степень обессоливания организма). Является неожиданным, что более низкая концентрация тяжелого металла (1,2 $\mu\text{моль/л}$) увеличивала потери натрия из организма в большей степени (рис. 1, правая часть) по сравнению с действием более высокого (2,4 $\mu\text{моль/л}$) уровня свинца (рис. 1, левая часть). Остается непонятным влияние свинца на изученные показатели рыб в зависимости от его концентрации в воде.

На наш взгляд, это обусловлено тем, что различные манипуляционные процедуры (в зарубежной литературе обозначается термином «хендлинг»), осуществляемые с объектом в ходе проведения опытов, вызывают стресс у гидробионтов, который существенным образом влияет на действие изучаемого фактора и может служить источником ошибок [26].

Влияние хендлинга на ионные потоки между организмом гидробионтов и средой показано многими исследователями. В качестве примера приведем результаты исследований двух работ. В ответ на перемещение ювенильных особей радужной форели из большого аквариума в маленькие емкости [21] концентрация натрия в целом организме существенно снижалась в течение

5 ч, указывая на обессоливание животных (рис. 2 а). В наших опытах [8] лещи *Abramis brama*, отловленные из бассейна и помещенные в 6 л емкости, наполовину заполненные пресной водой, теряли из организма в течение 4-6 ч ионы натрия, в результате чего его концентрация во внешней среде увеличивалась (рис. 2 б). В дальнейшем уровень натрия в воде снижался, указывая на преобладание транспорта этого иона в организм. Эффект зависел от плотности посадки рыб. Чем выше была плотность посадки, тем больше терялось электролита из организма, а последующий восстановительный процесс был выражен в меньшей степени.

Сравнение результатов, полученных на радужной форели (рис. 2 а) и леще (рис. 2 б) разными способами (определение концен-

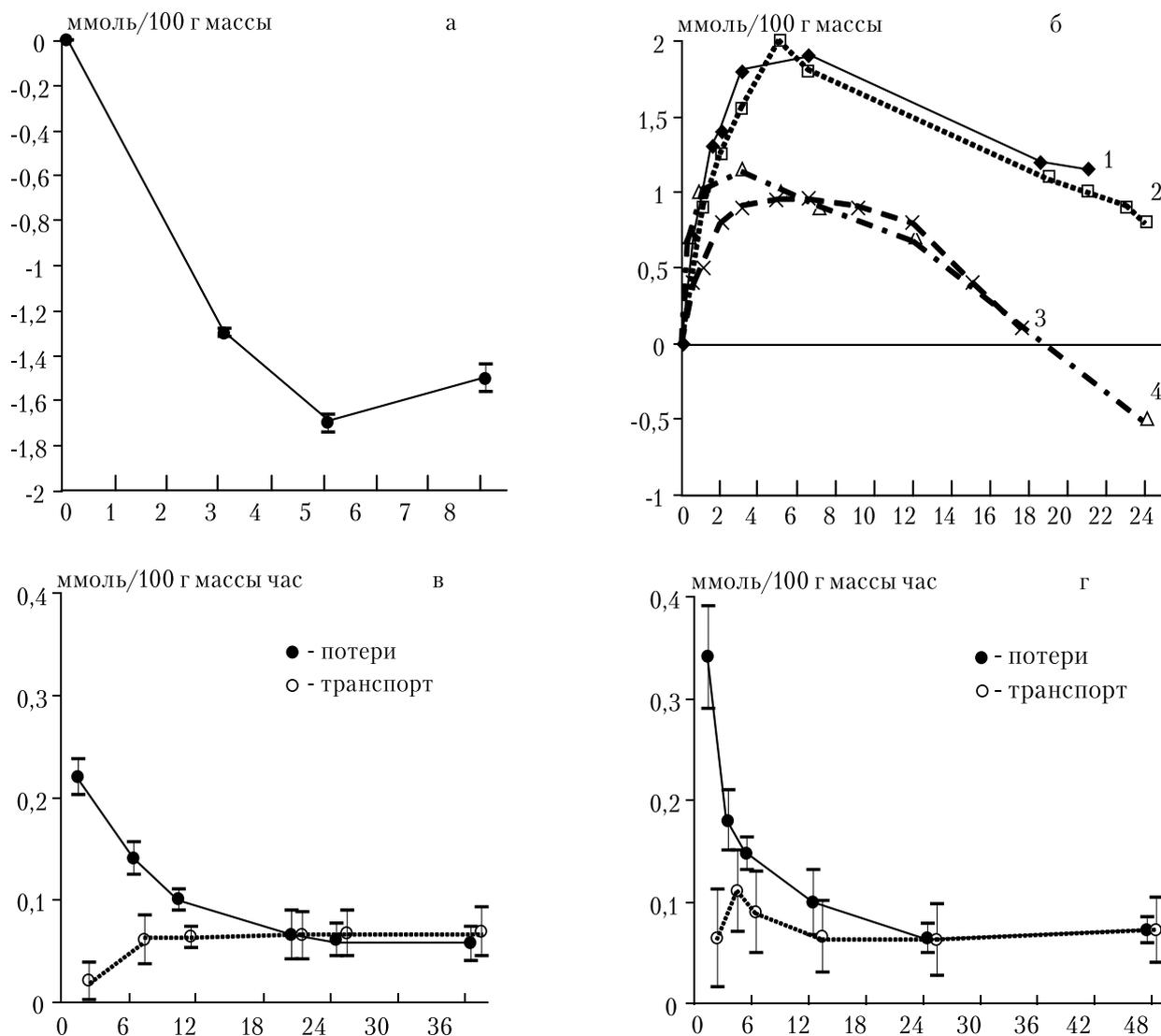


Рис. 2. Динамика обмена ионов натрия между организмом рыб и средой в ответ на различные воздействия.

По оси абсцисс — время, ч; ординат — изменение содержания натрия в организме радужной форели (а) и в экспериментальной емкости с лещами (б) на 100 г сырой массы; скорости потерь и транспорта (в, г).

трации ионов натрия в целой рыбе и в воде экспериментальной емкости), показывает, что изменения чистого потока ионов натрия между организмом и средой у 2-х видов являются сходными как по продолжительности, так и величине. Расчеты результатов, представленных на *рис. 2 а, б*, показывают, что в первые 3 ч от начала перемещения рыб из большой емкости в маленькие радужная форель и лещ теряли из организма ионы натрия с одинаковой чистой скоростью, которая составила в среднем около 0,4 ммоль/100 г массы в час. Эта величина чистой скорости потерь более чем в 2 раза выше таковой, полученной для радужной форели в опытах со свинцом (*рис. 1*). Этот сравнительный анализ показывает, что в ответ на манипуляционные процедуры с объектом, которые являются неотъемлемой частью при проведении экспериментов, изменения ионных потоков между организмом гидробионтов и средой могут перекрывать эффекты изучаемого фактора.

Изотопный анализ, в сочетании с методом пламенной спектрофотометрии применен при изучении влияния закисления среды [11, 14-20], тяжелых металлов [12, 13, 22, 23, 27, 28], нагрузки в виде плавания [9, 21], изменения температуры [10, 29], лабораторных манипуляций [9, 21]. Эти данные показывают, что неблагоприятные воздействия усиливают утечку различных ионов из гидробионтов, приводя к нарушению ионного баланса и снижению устойчивости организма. Однако, как было показано выше, очень трудно отделить друг от друга эффекты, обусловленные изучаемым фактором от таковых, которые вызваны манипуляциями с объектом в ходе эксперимента.

Методы пламенной спектрофотометрии

Помещая гидробионты на определенное время (10-15 мин) в дистиллированную воду или раствор, не содержащий исследуемый элемент, определяют потери (V_o, f_{out}, J_{out}) по накоплению иона в среде. Затем раствор в емкостях заменяют пресной водой, в которой животных выдерживают в течение 15-30 мин. По изменению концентрации исследуемого иона в пресной воде определяют чистый поток (V_c, f_{net}, J_{net}) между организмом и средой. Поступление электролита в организм, характеризующее собой активный транспорт (V, f_{in}, J_{in}), выявляют расчетным путем: $V = V_o - V_c$. При использовании этих способов концентрацию ионов в воде определяют методами пламенной спектрофотометрии.

Ключевые слова: гидробионты, натрий, калий, кальций, магний

Эти приемы применены при изучении влияния pH среды [1, 3, 4, 6, 7], тяжелых металлов [1, 3], хлорорганических соединений [4] изменения температуры [1, 30], отлова и лабораторных манипуляций [5]. На основе сравнительного анализа было показано [1], что данные, полученные изотопным анализом, соответствуют результатам с применением методов пламенной спектрофотометрии.

Однако методы с использованием радиоактивных изотопов требуют дорогого специального оборудования и опасны как для самого исследователя, так и изучаемого объекта. Кроме того, они более трудоемки при изучении динамических характеристик во времени в ответ на воздействия, поскольку для регистрации показателя в какой-либо исследуемый интервал требуется отдельная выборка. В результате для проведения какого-либо эксперимента требуется много выборок и, соответственно, большое количество гидробионтов. При этом животных умерщвляют с целью определения радиоактивности в целом организме. Как правило, при использовании изотопного анализа требуется дополнительно подключать методы пламенной спектрофотометрии.

Более простым, лишенным выше перечисленных недостатков, является определение кинетических характеристик ионного обмена между организмом гидробионтов и средой методами пламенной спектрофотометрии в сочетании с использованием дистиллированной и пресной воды. При этом достаточно одной выборки животных, чтобы изучить параметры ионного обмена от начала какого-либо воздействия и до завершения адаптации к новым условиям. Однако, в данном случае, как и при изотопном анализе, существенным недостатком является влияние на результат исследования сопутствующих в ходе эксперимента манипуляций с животными.

В опытах [1] девятииглая колюшка *Pungitius pungitius* L. была акклиматизирована к нейтральной (pH 7) пресной воде. После закисления среды до pH 5 рыб отловили из аквариума и поодиночке поместили на 10 мин в маленькие емкости с дистиллированной водой для определения общей потери ионов натрия из организма (*рис. 2 в*, черные маркеры). Чтобы определить поток ионов натрия, направленный в организм (*рис. 2 в*, светлые маркеры), дистиллированную воду в сосудах заменили на пресную, в которой рыб выдержали в течение 15 мин. После этой процедуры животных возвратили в ис-

ходный аквариум с подкисленной водой. Впоследствии процедуры с перемещением гидробионтов из большой емкости в маленькие с дистиллированной и пресной водой, а затем обратно в аквариум использовались в интервалы времени 6, 10, 20, 26 и 36 ч. Сразу после воздействия скорость потерь ионов натрия была очень высокой и постепенно снижалась во времени, достигая равновесия с активным транспортом этого катиона через 20 ч акклимации. Видно, что данный метод включает в себя многочисленные перемещения во времени одних и тех же особей в дистиллированную, пресную и исходную среду.

В других экспериментах было показано [5], что эти многочисленные манипуляции с объектом исследования оказывают существенное влияние на показатели ионного обмена между организмом и средой. Плотва *Rutilus rutilus* L. была отловлена неводом, а затем через 20 мин индивидуальных особей поместили на 15-30 мин в небольшие сосуды с раствором хлористого кальция для определения общей скорости потери ионов натрия (рис. 2 г, темные маркеры, соединенные сплошными линиями). Затем индивидуальные рыбы были перемещены на 15-30 мин в небольшие объемы пресной воды для получения данных, необходимых для расчета скорости транспорта (рис. 2 г, светлые маркеры, соединенные штриховыми линиями). После этого животных вернули в аквариум. В последующих экспериментах манипуляции с перемещением рыб в маленькие объемы с различными растворами и обратно в аквариум были осуществлены

в течение 42-часового периода многократно. Скорость утечки ионов натрия из организма плотвы в начальный период была максимальной и постепенно снижалась, достигая равновесия с активным транспортом к концу первых суток акклимации. В дальнейшем применяемые манипуляции не оказывали влияния на изучаемые показатели, свидетельствуя о тренированности рыб. Сравнение результатов, полученных на девятииглой колюшке в опытах со смещением рН среды на фоне многочисленных перемещений рыб (рис. 2 в) и плотве с применением только манипуляционных процедур (рис. 2 г) показывает, что наблюдаемые изменения кинетических характеристик обмена натрия являются сходными как по величине, так и продолжительности. В связи с этим, у девятииглой колюшки невозможно отделить изменения показателей, связанных со сдвигом рН воды от таковых, обусловленных манипуляционными процедурами с объектом исследования.

В связи с этим, важной задачей является разработка способа, который позволял бы оценивать влияние неблагоприятных факторов на ионный обмен между организмом гидробионтов и средой в чистом виде, не тревожа животных. Эта задача выполнима на основе определения чистого потока вещества между гидробионтами и средой за счет измерения уровня электролитов в пробах воды экспериментальной емкости.

Теоретическое обоснование метода

Находясь в пресной воде, гидробионты, с одной стороны, теряют электролиты из ор-



ганизма, с другой стороны, компенсируют потери за счет их активного транспорта из внешней среды. В норме при относительно постоянных природных или лабораторных условиях водные животные находятся со средой в состоянии ионного баланса (равновесия) — скорость потерь и поглощения ионов равны ($V_o = V$) между собой, в результате чего чистый поток между организмом и средой отсутствует ($V_c = 0$), позволяя поддерживать содержание ионов внутри гидробионтов на стабильном уровне. При таком устойчивом состоянии содержание электролитов в воде экспериментальной емкости, где находятся животные, не изменяется во времени.

Различные воздействия, сдвигая ионное равновесие между организмом и средой в ту или иную сторону, изменяют концентрацию

электролитов в воде экспериментальной емкости. В случае преобладания выхода иона из организма над его поступлением ($V_o > V$), в воде экспериментальной емкости будет наблюдаться увеличение содержания элемента. И, наоборот, в случае преобладания транспорта иона в организм над его выходом ($V_o < V$), уровень вещества в воде будет уменьшаться.

Количество электролита, перераспределенного между организмом гидробионтов и окружающей водой за определенный промежуток времени в ответ на какое-либо воздействие, можно рассчитать по следующей формуле:

$$\Delta C = (C_t - C_{t-1})W \times \frac{100}{m}, \quad (2)$$

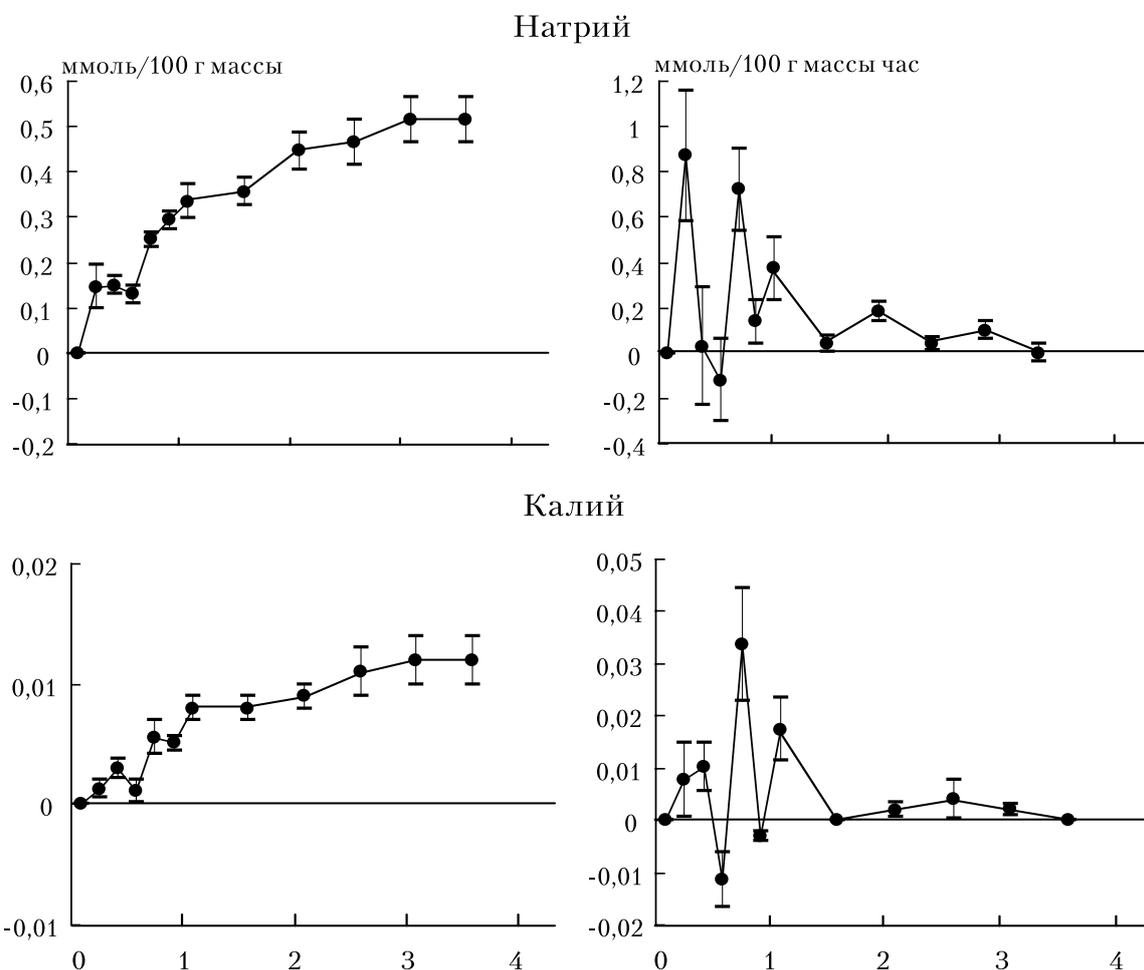


Рис. 3. Динамика содержания (слева) и чистой скорости (справа) перераспределения ионов натрия и калия между организмом леща и средой в ответ на отлов неводом, 30 мин транспортировку и в ходе акклимации к лабораторным условиям.

По оси абсцисс — время, ч; ординат — концентрация (слева) и чистая скорость перераспределения ионов между организмом и средой.

где ΔC — количество перераспределенного между гидробионтом и средой иона на 100 г массы тела за интервал времени $t - t_{-1}$; C_t — концентрация иона в пробе воды в момент времени t ; C_{t-1} — содержание иона в пробе воды, взятой в предыдущий период времени t_{-1} ; m — масса животных в граммах; W — объем воды в литрах. Эта формула показывает, какое количество того или иного иона 100 г массы организма в виде чистого (результатирующего) потока теряет во внешнюю среду (в случае $C_t > C_{t-1}$) или поглощает на 1 л воды (в случае $C_t < C_{t-1}$) за интервал времени $t - t_{-1}$. При $C_t = C_{t-1}$ достигается ионный баланс (равенство скоростей потери и поглощения иона). Убрав в формуле 1 коэффициент 100, данные будут выражены на 1 г массы, а вместо 100 вставив 1000, расчет будет сделан на кг массы. Такой перерасчет часто необходим при сравнительном анализе, поскольку в литературе встречается разный расчет на массу организма.

По количеству перераспределенного между организмом и средой иона за интервал времени $t - t_{-1}$ можно рассчитать чистую (результатирующую) скорость (V_c) по следующей формуле:

$$V_c = \frac{\Delta C}{t - t_{-1}} \cdot (3)$$

Эта формула дает расчет чистой скорости потерь (при $C_t > C_{t-1}$) или поглощения (при $C_t < C_{t-1}$) того или иного иона за период времени $t - t_{-1}$, выраженный в ч.

Таким образом, по изменению концентрации какого-либо иона в определенном объеме пресной воды, где находится животное, можно определить в виде чистого (результатирующего) потока количество (формула 2) и скорость (формула 3) перераспределяемого между организмом и средой электролита от начала какого-либо воздействия и до завершения адаптации к новым условиям. Эти теоретические обоснования были проверены экспериментальным путем.

Сразу после 10 мин притонения невода, осуществленного в канале около ихтиологического корпуса ИБВВ РАН, отобрали 12 особей двухлетних лещей массой 51,3-131 г и поодиночке поместили в пластиковые емкости, наполненные по 1 л речной воды, содержащей 0,26 ммоль/л натрия и 0,09 ммоль/л калия. Спустя 1 мин, а затем в ходе кратковременной (около 15-20 мин) транспортировки и в последующий

период акклимации в лаборатории, из каждой емкости с 5-10 мин интервалами осуществляли отбор проб воды, в которой на пламенном спектрофотометре Flapho-4 измеряли концентрацию ионов натрия и калия. Рассчитывали количество (формула 2) и скорость (формула 3) чистого потока перераспределяемых между организмом рыб и средой электролитов. В лаборатории в каждую индивидуальную емкость с рыбой подавался воздух для насыщения воды кислородом. Температура воды в ходе опыта колебалась в пределах 16,5-18,3 °С.

В норме, в природных условиях, гидробионты находятся в состоянии ионного баланса со средой обитания. Отлов и кратковременная транспортировка смещали равновесие в сторону преобладания выхода ионов из организма лещей, в результате чего содержание натрия и калия увеличивалось течение первых 2,5 ч в воде экспериментальных емкостей (рис. 3, слева). В последующий период акклимации в лабораторных условиях содержание этих ионов во внешней среде стабилизировалось на определенных уровнях, свидетельствуя о достижении ионного баланса.

Чистая скорость перераспределения ионов натрия и калия между организмом лещей и средой изменялась во времени в виде затухающего гармонического колебания (рис. 3, справа). Максимальная скорость потери натрия из организма наблюдалась в первые 10 мин после отлова рыб, затем в пределах 20 мин следовало ее резкое снижение до минимального значения, которое в последующие 10 мин вновь увеличивалось, но уже на меньшую величину. Через 2,5 ч после отлова лещей результирующая скорость обмена натрия между организмом и средой достигала нулевого значения (состояние баланса), оставаясь относительно постоянной в последующий период акклимации рыб к лабораторным условиям.

Чистая скорость перераспределения ионов калия между организмом лещей и средой изменялась во времени в виде 3 пиков (рис. 3). Из них второй пик имел максимальную величину. Через 2,5 ч после отлова лещей, как и в случае с натрием, чистая скорость для калия стабилизировалась около нулевой линии (состояние баланса).

Данные показывают, что в начальный период неблагоприятного воздействия наблюдается повышение концентрации натрия и калия в воде экспериментальной емкости с рыбой (рис. 3), свидетельствуя

о преобладании выхода этих ионов из организма, приводящего к нарушению ионного баланса. Утечка ионов натрия из организма 2-хлетних лещей наблюдалась в пределах 2,5 ч (рис. 3), тогда как у рыб старшего возраста (рис. 2 б) продолжалась в течение 3-6 ч и зависела от плотности посадки. При более частом взятии проб воды из экспериментальной емкости удастся зарегистрировать, что чистая скорость обессоливания организма рыб изменяется в переходный период в виде затухающего гармонического колебания (рис. 3, справа).

Накопление ионов во внешней среде, свидетельствующее об обессоливание организма рыб при стрессе, происходит в течение определенного периода времени. Можно рассчитать усредненное количество (ΔC_{δ}) теряемого иона и чистую скорость (V_{δ}) этого процесса за весь период потерь:

$$\Delta C_{\delta} = (Ct_p - Ct_0)W \times \frac{100}{m} \quad (4)$$

$$V_{\delta} = \frac{\Delta C_{\delta}}{t_p - t_0} \quad (5)$$

В этих формулах Ct_0 — исходная концентрация вещества в воде, Ct_p — концентрация иона в пробе воды, взятой в момент окончания утечки (точка перегиба кривой на рис. 2 а), $t_p - t_0$ — промежуток времени от начала опыта (t_0) и до окончания утечки иона (t_p).

Средняя чистая скорость потери, соответственно, натрия и калия в переходный период составила у 2-хлеток леща $0,335 \pm 0,035$ и $0,0079 \pm 0,0016$ ммоль/100 г массы. ч. Максимальная скорость утечки ионов натрия из организма лещей имела значения $0,87 \pm 0,29$ ммоль/100 г. ч (первый пик на рис. 3), а калия $0,0269 \pm 0,016$ ммоль/100 г массы. ч (второй пик на рис. 3). Расчеты показывают, что максимальная скорость чистой потери ионов натрия из организма рыб была больше усредненной в 2,6 раза, а для калия в 3,4 раза. Максимальная и усредненная чистая скорость утечки ионов калия из организма лещей была гораздо меньше, соответственно, в 32,5 и 42,4 раза по сравнению с таковыми для натрия. Это показывает, что обессоливание организма рыб в начальный период стресса происходит, главным образом, за счет потери ионов натрия.

Примененный подход удобно использовать для изучения влияния на ионный баланс гидробионтов любых факторов в за-

висимости от силы и продолжительности действия. Одиночные особи, а слишком мелкие гидробионты группами, помещаются в отдельные емкости с известным объемом пресной воды и акклимируются при постоянных условиях до достижения между организмом и средой ионного баланса. Критерием установления ионного баланса служит отсутствие изменений во времени концентрации электролитов в воде, где находятся животные. В этот момент оказывается то воздействие, влияние которого требуется изучить. В экспериментальных емкостях, не тревожа гидробионтов, несложно изменить рН воды, кислородный режим, температуру, добавить любое химическое вещество или комплекс соединений, некачественную воду и пр. Сразу после воздействия из емкостей отбирают пробы воды с любыми требуемыми интервалами времени. В отбираемых пробах воды измеряется концентрация ионов, а по формулам рассчитывается количество (2) и чистая скорость (3) перераспределяемого между организмом и средой электролита.

Предлагаемый способ, не тревожа объект, позволяет зарегистрировать динамику изменений исследуемого показателя у индивидуальных особей от начала любого воздействия и до завершения адаптации к новым условиям. Неограниченная возможность частого отбора проб воды из экспериментальной емкости позволяет точно определить амплитуду, продолжительность и цикличность изменений в переходный период. При этом характер направления изменений является критерием для оценки качества фактора. Если воздействие смещает ионный баланс в сторону преобладания выхода электролитов из организма, то оно является неблагоприятным для исследуемого объекта. Поскольку обессоливание организма приводит к снижению устойчивости гидробионтов, то при падении содержания солей во внутренней среде животных ниже толерантного уровня они погибают. Добавка солей натрия и кальция в воду препятствует обессоливание организма, способствуя выживанию гидробионтов в экстремальных условиях [31]. Преобладание входа электролитов в организм свидетельствует о стимулирующем характере воздействия на защитные системы гидробионтов. Такой фактор является благоприятным для объекта и может использоваться как адаптоген для нейтрализации последствий негативных воздействий.

Заключение

Методы, используемые для оценки характера и степени влияния различных факторов на гидробионты по показателям ионного обмена между организмом и средой, имеют ряд серьезных недостатков. Радиоактивный анализ требует дорогого специального оборудования и опасен для исследователя и изучаемого объекта. При регистрации показателя в какой-либо интервал времени необходима отдельная выборка животных, причем их умерщвляют с целью определения радиоактивности в целом организме. Для проведения эксперимента требуется много выборок и, соответственно, большое количество гидробионтов. Метод трудоемкий, а данные фрагментарны. При использовании изотопного анализа требуется дополнительно подключать методы пламенной спектрофотометрии. Методы пламенной спектрофотометрии в сочетании с использованием дистиллированной и пресной воды более просты. Достаточно одной выборки животных, чтобы изучить параметры ионного обмена от начала какого-либо воздействия и до завершения адаптации к новым условиям. Однако в данном случае, как и при изотопном анализе, существенным недостатком является влияние на результат исследования сопутствующих в ходе эксперимента манипуляций с животными.

Наиболее простым, удобным, экономичным и информативным способом для оценки качества и степени влияния различных факторов на гидробионты является определение чистого потока ионов между организмом и средой за счет измерения содержания электролитов в пробах воды, отбираемых из экспериментальной емкости. Из-за неограниченной возможности частоты отбора проб воды метод позволяет на индивидуальных животных, не тревожа их, оценить направление, закономерности, величину, цикличность и продолжительность изменений показателя от начала воздействия и до завершения адаптации к новым условиям.

Литература

1. Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
2. Виноградов Г.А. Адаптация водных животных с различными типами осморегуляции к понижению рН внешней среды // Физиология и паразитология пресноводных животных / Под ред. Н.В. Буторина, Б.А. Флерова. Л.: Наука. 1979. С. 17-25.
3. 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.
4. Виноградов Г.А. Влияние солей аммония и закисления среды на метаболические процессы у пресноводных животных. 2. Исследование $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ и H^+/Na^+ обмена в жабрах рака и колюшки / Г.А. Виноградов, Е.С. Даль, В.Т. Комов // Биол. внутр. вод: Информ. бюл. 1982. №56. С. 56-60.
5. Виноградов Г.А. Ионный обмен пресноводных рыб при стрессе / Г.А. Виноградов, А.К. Клерман // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27. №2. С. 307-312.
6. Виноградов Г.А. Особенности ионного обмена пресноводных моллюсков в условиях высокой концентрации ионов водорода и низкой минерализации внешней среды / Г.А. Виноградов, А.К. Клерман, В.Т. Комов // Экология. 1987. №3. С. 81-84.
7. Виноградов Г.А. Особенности ионной регуляции окуня *Perca fluviatilis* (Percidae) в связи с проблемой закисления водоемов / Г.А. Виноградов, В.Т. Комов // Вопр. ихтиологии. 1985. Т. 25. №1. С. 137-144.
8. Мартемьянов В.И. Динамика концентрации электролитов у пресноводных рыб при стрессе // Пресноводные гидробионты и их биология / Под ред. А.В. Монакова. Л.: Наука. 1983. С. 237-248.
9. Gonzalez R.J. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish / R.J. Gonzalez, D.G. McDonald // J. Exp. Biol. 1992. V. 163. P. 317-332.
10. Gonzalez R.J. Ionoregulatory responses to temperature change in two species of freshwater fish / R.J. Gonzalez, D.G. McDonald // Fish. Physiol. Biochem. 2000. V. 22. P. 311-317.
11. Hobe H. Mechanisms of acid-base and ionoregulation in white suckers (*Catostomus commersoni*) in natural soft water. II. Exposure to a fluctuating ambient pH regime / H. Hobe, B.R. McMahon // J. Comp. Physiol. [B]. 1988. V. 158. P. 67-79.
12. 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.
13. Lauren D.J. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Modulation by water hardness and pH / D.J. Lauren, D.G. McDonald // J. Comp. Physiol. [B]. 1985. V. 155. P. 635-644.
14. McDonald D.G. The effects of H^+ upon the gills of freshwater fish // Can. J. Zool. 1983. V. 61. P. 691-703.

15. McDonald D.G. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. I. Branchial and renal net ion and H⁺ fluxes // *J. Exp. Biol.* 1983. V. 102. P. 123-140.
16. McDonald D.G. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. II. Branchial ionoregulatory mechanisms / D.G. McDonald, R.L. Walker, P.R. Wilkes // *J. Exp. Biol.* 1983. V. 102. P. 141-155.
17. McWilliams P.G. Effects of pH on sodium uptake in Norwegian brown trout (*Salmo trutta*) from an acid river // *J. Exp. Biol.* 1980. V. 88. P. 259-267.
18. McWilliams P.G. The effects of pH and calcium concentrations on gill potentials in the brown trout, *Salmo trutta* / P.G. McWilliams, W.T.W. Potts // *J. Comp. Physiol.* 1978. V. 126. P. 277-286.
19. Packer R.K. Effects of low environmental pH on blood pH and sodium balance of brook trout / R.K. Packer, W.A. Dunson // *J. Exp. Zool.* 1970. V. 174. №1. P. 65-71.
20. Packer R.K. Anoxia and sodium loss associated with the death of brook trout at low pH / R.K. Packer, W.A. Dunson // *Comp. Biochem. Physiol.* 1972. V. 41A. P. 17-26.
21. Postlethwaite E.K. Mechanisms of Na⁺ and Cl⁻ regulation in freshwater – adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress / E.K. Postlethwaite, D.G. McDonald // *J. Exp. Biol.* 1995. V. 198. №2. P. 295-304.
22. 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.
23. 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.
24. Mayer N. Sodium space in fresh-water and sea-water eels / N. Mayer, J. Nibelle // *Comp. Biochem. Physiol.* 1969. V. 31. №4. P. 553-556.
25. Mayer N. Kinetics of the mineral balance in the eel *Anguilla anguilla* in relation to external salinity changes and intravascular saline infusions / N. Mayer, J. Nibelle // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. V. 35. №3. P. 553-556.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Maetz J. Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish *Carassius auratus*. Effects of ammonia loading and temperature changes // *J. Exp. Biol.* 1972. V. 56. P. 601-620.
30. Виноградов Г.А. Влияние экологических факторов на показатели водно-солевого обмена дрейссены *Dreissena polymorpha* (Pall.): эффект изменения температуры воды / Г.А. Виноградов, В.И. Мартемьянов, Н.Б. Щеглова // *Биология внутренних вод.* 2004. №1. С. 62-66.
31. Мартемьянов В.И. Влияние солености на пресноводных рыб // *Зоол. ж.* 1989. Т. 68. №5. С. 72-81.



V.I. Martem'yamov

BASED ON ION EXCHANGE DATA METHODS FOR ASSESSMENT OF UNFAVORABLE ENVIRONMENT EXPOSURE ON AQUATIC ORGANISMS

It was shown based on a comparison analysis that based on data of ion exchange between organism and environment methods used for character and factor efficiency assessments have many serious problems. Arguments for using a simple, accessible, cost-effective and informative technology were given. The method is based on definition of clean ion flow between an organism and environment measuring electrolyte content in water sampling from an experimental reservoir. This method is capable to estimate direction, regularities, value, circularity and time of changes of the flow for individual animals during their adaptation to new environment.

Key words: aquatic organisms, sodium, potassium, calcium, magnesium