

ВЛИЯНИЕ НАКОПЛЕННОЙ РТУТИ НА ГИДРОЛИЗ УГЛЕВОДОВ В КИШЕЧНИКЕ ОКУНЯ ИЗ ВОДОЕМОВ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ pH ВОДЫ

Г. А. Пенькова

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия
e-mail: gusev.sun@mail.ru

В настоящее время водоемы северо-западной части России испытывают значительные антропогенные нагрузки. Ртуть рассматривается как один из самых опасных элементов, оказывающих токсическое действие на гидробионтов. Высокие уровни накопления ртути (1–3 мг/кг) неоднократно регистрировались в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России (Степанова, Комов, 2002). Доминирующим фактором в повышении биодоступности ртути при очень низком содержании ее в абиотических компонентах системы является закисление воды. Попадая с атмосферными осадками в те водоемы, где низкие значения pH создают благоприятные условия для интенсивного протекания процессов метилирования, и пройдя по трофической цепи, ртуть аккумулируется в мышцах рыб в концентрациях, значительно превышающих содержание металла в воде (Степанова, Комов, 2002). Накопление ртути вызывает значительные изменения белкового, пептидного и липидного обменов (Немова, 2005), вследствие чего снижается темп роста рыб, нарушаются процессы созревания гонад, воспроизводства. В организм рыб она поступает преимущественно с пищей, однако действие этого металла на пищеварительные ферменты рыб в настоящее время изучено крайне слабо, причем имеющиеся сведения касаются главным образом неорганической формы ртути (Sastri, Gupta, 1980). Вместе с тем ртуть, поступающая в организм пресноводных рыб, преимущественно находится в более токсичной и легко аккумулируемой метилированной форме. При ацидификации водоемов уровень аккумуляции ртути в тканях рыб существенно возрастает, а её содержание в кишечнике приближается к максимальному, отмеченному для мышечной ткани (Степанова, Комов, 2002). Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, для оценки физиолого-биохимического состояния рыб особую актуальность представляет изучение влияния накопленной в организме ртути на гидролиз углеводных компонентов корма в кишечнике рыб.

В связи с тем, что окунь *Perca fluviatilis* L. часто является единственным видом, обитающим в озерах с pH воды < 4,5, цель работы состояла в изучении влияния накопленной ртути на активность карбогидраз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике окуня из водоемов Европейской части России с нейтральным и кислым значением pH воды.

Рыбы отловлены в летне-осенний период 2005–2007 г.г. из водоемов Европейской части России, расположенных на территории Вологодской, Новгородской, Рязанской, Псковской, Ярославской областей и республики Карелия. Масса окуней из водоемов с нейтральным значением pH воды составляла 80–130 г, длина тела 16–19 см, из кислых водоемов – 20–54 г и 11–16 см соответственно. Для определения ферментативной активности использовали суммарные гомогенаты слизистой оболочки кишечника от 9–20 рыб, приготовленные на растворе Рингера для холоднокровных животных (110 mM NaCl, 1,9 mM KCl, 13 mM CaCl₂, pH 7,4). Активность ферментов определяли при 20°C, pH 7,4. Активность карбогидраз: амилалитическую активность (АА), отражающую суммарную активность α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20, и активность сахаразы КФ 3.2.1.48 определяли модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). Кинетические характеристики гидролиза крахмала и сахарозы – значения константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V_{max}) определяли графическим методом Лайнуивера-Берка, строя для каждой повторности графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в координатах двойных обратных величин. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA, LSD тест) при $p = 0.05$.

Водоемы с нейтральным значением pH воды. Минимальный уровень накопления ртути в мышечной ткани 0,08 мг/кг отмечен у рыб из оз. Татарское, максимальный 0,29 мг/кг – у окуней из оз. Полистовское (см. табл.).

Активность карбогидраз и кинетические характеристики гидролиза углеводов (Km) в кишечнике окуня с различным содержанием ртути в мышечной ткани из водоемов с нейтральным (pH 6.8–7.8) и кислым (pH 4.5–5) значением pH воды

Водоем	Hg в мышцах, мг/кг	Активность карбогидраз, мкмоль/(г·мин)		Km гидролиза	
		АА	сахараза	крахмала, г/л	сахарозы, ммоль
pH воды 6.8–7.8: оз. Татарское, Рязанская обл.	0.08 ± 0.02 ^a	1.45 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	13.8 ± 0.16 ^a
оз. Валдай, Новгород. обл.	0.10 ± 0.02 ^a	1.40 ± 0.03 ^a	0.53 ± 0.03 ^b	2.3 ± 0.1 ^b	18.6 ± 0.12 ^a
оз. Белое, Вологод. обл.	0.11 ± 0.01 ^a	1.66 ± 0.05 ^b	0.76 ± 0.02 ^b	3.9 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.6 ^b
Моложский плес Рыбинск. в-ща, Ярослав. обл.	0.21 ± 0.01 ^b	1.55 ± 0.03 ^b	0.43 ± 0.02 ^b	3.1 ± 0.2 ^b	4.3 ± 0.1 ^b
оз. Полистовское, Псковская обл.	0.29 ± 0.01 ^b	2.68 ± 0.17 ^b	0.29 ± 0.02 ^г	3.2 ± 0.28 ^b	9.4 ± 0.5 ^a
pH воды 4.5–5.0: оз. Роговское, Новгород. обл.	0.18 ± 0.02 ^a	2.17 ± 0.08 ^a	0.46 ± 0.01 ^a	2.5 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a
оз. Вегарусъярви, Карелия	0.26 ± 0.02 ^b	1.66 ± 0.05 ^b	0.87 ± 0.09 ^b	4.2 ± 0.2 ^b	4.1 ± 0.3 ^b
оз. Дубровское, Вологод. обл.	0.33 ± 0.04 ^b	1.96 ± 0.05 ^a	0.54 ± 0.02 ^b	2.9 ± 0.2 ^{a,b}	—
оз. Чудское, Новгород. обл.	0.36 ± 0.04 ^b	2.03 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.01 ^г	3.3 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^b
оз. М. Горецкое, Новгород. обл.	0.49 ± 0.02 ^b	1.52 ± 0.01 ^b	0.28 ± 0.01 ^д	4.5 ± 0.1 ^{b,г}	2.8 ± 0.1 ^b
оз. Б. Горецкое, Новгород. обл.	0.86 ± 0.15 ^г	2.24 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.02 ^д	3.5 ± 0.1 ^b	5.6 ± 0.2 ^г

Примечание. Разные надстрочные индексы в столбце указывают на статистически достоверные отличия показателей внутри группы рыб из водоемов с нейтральным или кислым значением pH, $p < 0.5$.

У рыб с большим накоплением ртути АА достоверно выше, для сахаразы подобной закономерности не выявлено. Изменения V_{max} гидролиза крахмала и сахарозы совпадают с изменениями активности соответствующих ферментов. Самые низкие значения Km гидролиза крахмала отмечены у рыб с минимальным накоплением ртути. Увеличение содержания ртути в мышцах сопровождается ростом значений этого показателя в 1.5–2 раза, что свидетельствует о снижении фермент-субстратного сродства. В то же время, наиболее высокие значения Km гидролиза сахарозы отмечены у рыб с наименьшим накоплением ртути. Повышение содержания ртути сопровождается достоверным снижением значений Km, что отражает увеличение сродства ферментов к субстрату и свидетельствует об адаптивных изменениях этого показателя у рыб при повышении содержания ртути в организме.

Водоемы с кислым значением pH воды. Если в водоемах с нейтральным значением pH воды уровень накопленной в мышцах ртути не превышал 0.29 мг/кг, то у окуня из кислых озер Новгородской обл. он достигал 0.86 мг/кг (оз. Большое Горецкое). С ростом содержания ртути активность сахаразы достоверно снижалась в 1.2–1.8 раза. Достоверное снижение уровня АА отмечено лишь при содержании ртути в мышцах 0.26 и 0.49 мг/кг у окуня из оз. Вегарусъярви и оз. Малое Горецкое. Изменение Km гидролиза крахмала и сахарозы в зависимости от содержания ртути в мышцах носит нелинейный характер. Максимальные значения Km гидролиза крахмала отмечены у окуня из оз. Вегарусъярви и оз. Дубровское при содержании ртути 0.26 и 0.33 мг/кг, Km гидролиза сахарозы – у рыб из оз. Большое Горецкое. Таким образом, уровень активности карбогидраз у окуня из водоемов с нейтральным и кислым значением pH воды довольно близок: АА варьирует от 1.4 до 2.7 мкмоль/(г·мин), активность сахаразы – от 0.2 до 0.9 мкмоль/(г·мин). В то же время динамика изменения сродства ферментов к субстрату (о котором судят по изменению Km) с ростом содержания ртути в мышцах рыб из водоемов с разным значением pH воды различна. Действительно, у рыб из водоемов с нейтральным значением pH воды значения Km гидролиза крахмала возрастают, а Km гидролиза сахарозы снижаются с ростом содержания ртути в мышцах, в то время как у окуня из кислых водоемов такой зависимости не выявлено.

Кроме того, на примере одноразмерных окуней (средняя длина 12.5 см, масса 30 г) из кислотных озер Новгородской области (Роговское, Чудское и М. Горьцкое) проведен дополнительный анализ зависимости активности карбогидраз и кинетических характеристик гидролиза крахмала и сахаразы от уровня накопления ртути в тканях кишечника. Содержание ртути в кишечнике рыб составляло 0.02, 0.05 и 0.09 мг/кг и положительно коррелировало с содержанием металла в мышечной ткани 0.18, 0.36 и 0.49 мг/кг влажной массы ткани у рыб из озер. Роговское, Чудское и М. Горьцкое соответственно. У рыб данной выборки по мере увеличения накопления ртути отмечено достоверное снижение АА и активности сахаразы в слизистой оболочке кишечника в 1.4–1.6 раза. Сравнение кинетических характеристик гидролиза крахмала позволило выявить прямую, а гидролиза сахаразы – обратную корреляцию между величиной K_m и уровнем накопления ртути в кишечнике окуня. Повышение содержания ртути сопровождалось увеличением значений K_m гидролиза крахмала в 1.3–1.8 раза. Значения K_m гидролиза сахаразы снижались в 1.4 раза, что свидетельствует о повышении фермент-субстратного сродства и адаптивных изменениях этого показателя. V_{max} гидролиза крахмала в кишечнике окуня с увеличением содержания ртути снижались не более чем в 1.2 раза, гидролиза сахаразы – повышалась в 1.6 раза. Важно отметить, что содержание ртути в кишечнике окуня исследованных кислотных озер не превышало 20% от содержания ртути в мышцах. Ранее, у окуня из озер с нейтральным значением pH воды, содержание ртути в кишечнике которых не превышало 25% ее содержания в мышцах, были отмечены аналогичные изменения уровня АА и кинетических характеристик гидролиза крахмала. В то же время у окуня из кислотных озер Вологодской обл., содержание ртути в кишечнике которых достигало 80% ее содержания в мышцах, отмечено увеличение сродства ферментов к субстрату при увеличении содержания ртути в организме, имеющее адаптивный характер (Голованова, Комов, 2005).

Установлено, что ионы Hg вызывают разнонаправленные изменения активности многих тканевых ферментов рыб, в том числе и внутриклеточных протеолитических ферментов и ферментов углеводного обмена (Немова, 2005). Хлорид Hg (0.3 мг/л) ингибирует активность ряда пищеварительных ферментов (амилазы, мальтазы, лактазы, липазы и трипсина) в кишечнике мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis*, но не изменяет активность мальтазы и лактазы в желудке, пилорических придатках и кишечнике пятнистого змееголова *Channa punctatus* (Sastri, Gupta, 1978). Изучение действия Hg, содержащейся в корме природного происхождения, на активность ферментов, обеспечивающих гидролиз белков и углеводов у различных гидробионтов (рыб, дафний, личинок хирономид) выявило разнонаправленное действие металла на ферменты цепи карбогидраз и протеаз у одного и того же вида, а также зависимость величины и направленности эффекта от вида гидробионтов и условий эксперимента (Голованова и др., 2002).

Таким образом, анализ активности карбогидраз и кинетических характеристик гидролиза дисахаридов у окуней из водоемов с различным уровнем pH воды выявил разнонаправленные изменения изученных показателей по мере накопления ртути в организме. Значения K_m гидролиза сахаразы у рыб из кислотных озер, отличающихся более высоким уровнем накопленной в организме ртути, могут быть в 4–9 раз ниже (сродство ферментов к субстрату выше), чем у окуня из водоемов с нейтральным уровнем pH воды, что, по всей вероятности, позволяет частично компенсировать неблагоприятное влияние факторов среды на скорость переваривания и усвоения углеводных компонентов пищи. Адаптивные изменения сродства ферментов к субстрату при повышении содержания ртути выявлены лишь для мембранного фермента сахаразы. При этом установлено, что содержание ртути в кишечнике рыб в большей мере, чем в мышечной ткани, определяет характер изменений кинетических характеристик гидролиза углеводов.

Автор выражает глубокую признательность В. А. Гремячих за определение содержания ртути.

Литература

- Голованова И. Л., Комов В. Т. 2005. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // *Вопр. ихтиологии*. Т. 45. № 5. С. 695–701.
- Голованова И. Л., Комов В. Т., Кузьмина В. В. 2002. Влияние повышенного содержания ртути в корме на активность карбогидраз и протеиназ у различных гидробионтов // *Биология внутр. вод*. № 1. С. 85–89.
- Степанова И. К., Комов В. Т. 2002. Биоценоотические закономерности накопления ртути в рыбе внутренних водоемов // *Экология*. № 4. С. 317–318.
- Немова Н. Н., 2005. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука. 164 с.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. 1969. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // *Исследование пищеварительного аппарата у человека*. Л.: Наука. С. 192–196.

Sastry K.V., Gupta P.K. 1978. In vitro inhibition of digestive enzymes by heavy metals and their reversal by chelating agent: Part I. Mercuric chloride intoxication // Bull. Environ. Contam. Toxicol. V. 20, №. 6. P. 729–735.

Sastry K. V., Gupta P. K. 1980. Changes in the activities of some digestive enzymes of *Channa punctatus*, exposed chronically to mercuric chloride // J. Environ. Sci. Health. V. 15, № 1. P. 109–120.

EFFECT OF ACCUMULATED MERCURY ON CARBOHYDRATES HYDROLYSIS IN THE PERCH INTESTINE FROM THE EUROPEAN RUSSIA WATER RESERVOIRS WITH DIFFERENT WATER pH LEVELS

G.A. Pen'kova

Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
Borok, Yaroslavl reg., Russia, e-mail: gusev.sun@mail.ru

Antropogenic acidification of water environment is one of the most urgent problems of the modern ecology. Mercury is believed to be one of the most dangerous elements, which has poisonous effect on hydrobionts. Analysis of carbohydrase activities and kinetic characteristics of disaccharides and polysaccharides hydrolysis in perch *Perca fluviatilis* L. from European Russia water reservoirs with neutral and acidic water pH showed multidirectional changes of these factors. Km of sucrose hydrolysis in fishes from acidic lakes (with higher level of accumulated mercury in organism) may be 4–9 times lower (affinity of enzymes to substrata is higher) than in perches from water reservoirs with neutral pH value. Adaptive increase of the affinity of enzymes to substrata with increase of mercury content may partially compensate adverse effects of environmental factors on the velocity of digestion and assimilation of carbohydrates. Furthermore it was established that mercury content in intestinal tract of fishes in greater degree than in muscular tissue determine the direction of changes of kinetic characteristics of carbohydrates hydrolysis.

МНОГОЛЕТНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИБРЕЖНОГО МЕЙОБЕНТОСА ОЗЕР КРИВОЕ И СТАРУШЕЧЬЕ (КАРЕЛИЯ)

В.А. Петухов

Учреждение Российской академии наук Зоологический институт РАН,
г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: vpetukhov@list.ru

На территории Карелии расположено более 60 тыс. озер, в основном представляющих собой небольшие лесные озера, входящие в группу димиктических олигоацидно-нейтральных низкоминерализованных водоемов. Озера Кривое и Старушечье, расположенные на побережье Кандалакшского залива Белого моря, имеют близкие значения по первичной продукции, но различаются гидрохимическими (рН, цветностью воды) и морфометрическими (глубина, площадь) характеристиками. Прибрежная зона (0–3 м) занимает в обоих озерах около 30% площади. Предполагается, что ввиду низкой продуктивности зообентоса центральной части озер, связанной прежде всего с их низкой трофностью, основная часть энергии экосистем передается через другие звенья, и в частности через сообщества мелководной зоны. В этой связи представлялось необходимым изучить структуру, оценить продуктивность мейобентоса мелководной зоны, в которой он, благодаря своей многочисленности, играет заметную роль. Некоторые данные по мейобентосу озер публиковались ранее (Berezina, Petukhov, 2005; Петухов, Березина, 2007).

Пробы мейобентоса отбирались в 2002–2008 годах на глубинах 0.3–0.5 м в прибрежных зонах озер. Грунты на станциях были представлены песками разной степени заиленности. Пробы отбирались почвенным стаканчиком. Часть проб фиксировали 4%-ным формалином, часть разбирали в живом виде. Пробу процеживали через сито с ячейей 90 мкм и просматривали под биноклем в камере Богорова. Видовое определение олигохет не проводили. Индивидуальная масса животных вычислялась по уравнению $W = gL^b$, где W – индивидуальная масса, мг (для Nematoda – мкг); L – длина тела, мм. Схема отбора проб на озерах – на рисунках 1, 2.