

УДК 576.895.122:594.3

А.П.Стадниченко, Г.Е.Киричук, К.В.Таран, Т.В.Пинкина

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА АММОНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ В ГЕМОЛИМФЕ КАТУШКИ ПУРПУРНОЙ (*MOLLUSCA, PULMONATA, BULINIDAE*) В НОРМЕ И ПРИ ИНВАЗИИ ТРЕМАТОДАМИ

В Центральном (Житомирском) Полесье особенности преобладающих грунтов таковы, что при внесении в них минеральных удобрений наибольшую прибавку к урожаю (33%) обеспечивают азотные удобрения, особенно нитрат аммония. Норма его применения составляет здесь 250 кг/га. Превышение ее, равно как и кратность внесения этого удобрения, обуславливает загрязнение почвенного покрова, из которого с талыми, дождевыми, а иногда и подземными водами нитрат аммония смывается в водотоки и водоемы. Его концентрация в водах санитарно-гигиенического и рыбохозяйственного назначения регламентируется предельно допустимой концентрацией, составляющей 45 мг/л (2,6 мг/л в виде NH_4^+).

Местами, однако, уровень допустимого загрязнения природных вод превышает во много раз (до 10—130 ПДК). В связи с этим представляло интерес выяснить степень токсичности нитрата аммония для наиболее обычных видов гидрофауны региона — пресноводных брюхоногих моллюсков в норме и при инвазии их партенитами и личинками трематод.

Материал и методика исследований. В р. Каменке в городской черте г. Житомира в августе 1997 г. был собран 191 экз катушки пурпурной *Planorbium purpura* (Müller, 1774). Животные инвазированы партенитами и церкариями *Pleurogenes* sp. (= *Cercaria armata* Siebold), локализованными в гепатопанкреасе хозяев. Выборка представлена одновозрастными особями (средний диаметр их раковин равен $28,76 \pm 0,16$ мм), выдержанными в лаборатории в течение двух недель. Животных в период акклиматизации подкармливали белокачанной капустой, морковь, сухим кормом для рыб.

Токсикологические опыты поставлены по методике В.А.Алексеева [1]. В основном опыте использовали три концентрации нитрата аммония — 2000, 4000 и 6000 мг/л (соответственно 44,4, 89,0 и 133,0 ПДК), приготовленные на дехлорированной отстаиванием (1 сут) водопроводной воде. Экспозиция составляла 2 суток. Через сутки растворы заменяли свежими. Условия опыта: температура — 20—23°C, содержание кислорода — 8,6—8,9 мг/л, pH 7,6, освещение естественное. Контролем служили животные, помещенные в дехлорированную водопроводную воду.

Гемолимфу получали методом прямого обескровливания непосредственно перед исследованием. Содержание в ней ионов Na^+ , K^+ и Cl^- устанавливали с помощью ион-селективного анализатора «Easylyte PLUS». Цифровые результаты эксперимента обработаны методами вариационной статистики по Деркачу [2].

Результаты исследований и их обсуждение

Наиболее распространенными катионами внутренней среды пресноводных брюхоногих моллюсков — пойкилоосмотических организмов являются Na^+ и K^+ , а анионами — Cl^- . Эти, равно как и другие неорганические ионы, определяют у животных, имеющих гипертоническую внутреннюю среду, уровень осморегуляции, участвуют в специфических реакциях, а также в поддержании биопотенциалов и возбудимости клеточных мембран [4]. Поскольку содержание Na^+ , K^+ , Cl^- в гемолимфе и тканевой жидкости моллюсков широко варьирует в зависимости от времени года, температуры среды, возраста и пола особей, а также их физиологического состояния, исследованию были подвергнуты одновозрастные (одноразмерные) животные.

Ионы натрия являются обязательным компонентом внутренней среды моллюсков. Падение в ней уровня их содержания ниже $0,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л неотвратно сопровождается гибелью животных [7]. У исследованных нами катушек контрольной группы концентрация ионов натрия в гемолимфе составляла в среднем 38,75—39,13 ммоль/л при размахе колебаний 32,60—44,40 (табл. 1).

1. Влияние трематодной инвазии и растворов нитрата аммония на содержание ионов Na^+ (ммоль/л) в гемолимфе катушки пурпурной

Объекты исследования	n	lim	$\bar{x} \pm m_x$	σ	V
Контроль					
Незараженные особи	20	32,60—44,40	39,13±0,67	3,07	7,95
Зараженные особи	10	34,10—42,30	38,75±0,78	2,47	6,37
2000 мг/л					
Незараженные особи	23	13,80—43,00	22,62±1,60	7,65	33,80
Зараженные особи	22	14,00—30,60	20,02±1,10	5,17	25,82
4000 мг/л					
Незараженные особи	29	11,40—24,00	17,73±0,56	2,99	16,86
Зараженные особи	21	13,50—37,10	19,64±1,12	5,12	26,07
6000 мг/л					
Незараженные особи	6	11,60—26,40	19,65±2,14	5,24	26,67
Зараженные особи	9	15,00—30,20	21,30±1,65	4,95	23,25

По рассматриваемому показателю статистически достоверные различия между свободными от заражения и инвазированными трематодами животными отсутствуют. Полагаем, что причиной этого является весьма умеренная интенсивность инвазии исследованных моллюсков. В их гепатопанкреасе обнаружены спороцисты с зародышевыми шарами и недавно начавшими формироваться церкариями, а также со «зрелыми» церкариями, вышедшими из спороцист, трематод одного вида *Pleurogenes* sp. Мариты ее являются кишечными паразитами водоплавающих и околоводных птиц. Случаи тотального паразитарного поражения гепатопанкреаса *P. rigriga* оказались крайне редкими (встречаемость не более 3,3%). Преимущественно наблюдалась инвазия слабой и средней тяжести. В первом случае в гепатопанкреасе моллюсков очаги поражения были весьма немногочисленными (1—3) и небольшого размера (1—1,5×2—3 мм), а во втором — партениты *Pleurogenes* sp. занимали до 20—30% объема инвазированного органа. Очевидно, такой уровень инвазии животных не нарушает те защитно-приспособительные меха-

низмы, которые позволяют им не только удерживать соли в своем организме, но и восполнять возможную их утечку.

В результате токсикологического опыта установлены такие значения основных токсикологических показателей: $LC_0 = 100$, $LC_{50} = 3000$, $LC_{100} = 6000$ мг/л. На основании действующей в настоящее время шкалы степени токсичности отравляющих веществ для водных животных [3] и с учетом полученных значений нитрат аммония для катушки пурпурной следует считать агентом комбинированного действия.

В среде, содержащей 2000 мг/л нитрата аммония, обнаружены статистически достоверные изменения ($P > 99,9\%$) уровня содержания иона Na^+ в гемолимфе всех без исключения подопытных животных в сторону его понижения. При этом и у незараженных, и у инвазированных трематодами особей катушки пурпурной концентрация Na^+ в их внутренней среде уменьшилась в среднем в 1,7 раза (при размахе колебаний 13,80—43,00 ммоль/л). Следовательно, в растворе, содержащем 2000 мг/л этого токсиканта, наблюдаются сбои в обеспечении защитными механизмами удержания Na^+ в организме катушки пурпурной.

У моллюсков, помещенных в среду, затравленную вдвое большей дозой нитрата аммония — 4000 мг/л, содержание Na^+ в гемолимфе продолжает падать в 2,0—2,5 раза против нормы ($P > 99,9\%$). Столь ощутимый сдвиг показателя указывает на то, что при этой концентрации токсиканта резко подавляются защитно-приспособительные механизмы у моллюсков, служащие для поддержания гомеостаза их внутренней среды; это в равной мере относится как к незараженным, так и к умеренно инвазированным трематодами особям.

При 6000 мг/л токсиканта содержание иона натрия в гемолимфе *P. purpura* остается у всех подопытных животных примерно на том же уровне, что и при 4000 мг/л (оно меньше нормы в 2,7 и 2,0 раза соответственно у зараженных и незараженных особей).

В отличие от Na^+ ионы калия преобладают не во внеклеточных жидкостях, а в цитоплазме клеток. В гемолимфе *P. purpura* в контроле среднее содержание K^+ составляет 1,36—1,50 ммоль/л (размах колебаний 1,14—1,88). Обнаружены статистически достоверные различия по этому показателю между незараженными и зараженными особями. Следовательно, при слабой и средней интенсивности трематодной инвазии содержание K^+ в клеточных элементах их гемолимфы падает ($P = 97,2$), что свидетельствует о нарушении проницаемости клеточных мембран. В пределах исследованной популяции индивидуальная изменчивость по этому признаку невелика, на что указывают невысокие значения коэффициента вариации (табл. 2).

В среде, содержащей 2000—6000 мг/л нитрата аммония, уровень K^+ во внутренней среде *P. purpura* резко возрастает (в 2,2—5,1 раза). При наименьшей из использованных нами концентраций этого токсиканта превышение нормы по K^+ во внутренней среде у незараженных особей составляет 2,0, а у зараженных — 2,7 раза ($P > 99,9\%$). Это означает, что в токсической среде механизмы, обеспечивающие поддержание концентрации K^+ в их гемолимфе на стабильном уровне, оказываются разбалансированными в сторону удержания этого иона и вследствие этого — значительного его накопления. При средней концентрации токсиканта содержание K^+ у зараженных особей составляет 6,8, а при наивысшей — около 7 ммоль/л.

2. Влияние трематодной инвазии и растворов нитрата аммония на содержание ионов K^+ (ммоль/л) в гемолимфе катушки пурпурной

Объекты исследования	n	lim	$\bar{x} \pm m_x$	σ	V
Контроль					
Незараженные особи	20	1,25—1,88	1,50 ± 0,04	0,20	13,30
Зараженные особи	10	1,14—1,62	1,36 ± 0,06	0,17	12,54
2000 мг/л					
Незараженные особи	23	1,56—5,89	3,37 ± 0,29	1,40	41,54
Зараженные особи	22	1,82—7,53	3,71 ± 0,31	1,47	39,62
4000 мг/л					
Незараженные особи	29	4,75—10,50	6,80 ± 0,25	1,37	20,15
Зараженные особи	21	4,24—10,22	6,80 ± 0,27	1,24	18,24
6000 мг/л					
Незараженные особи	6	4,85—16,00	7,74 ± 1,72	4,21	54,39
Зараженные особи	9	4,94—13,20	7,33 ± 0,85	2,55	34,79

Ионы хлора относятся к важным осмотически активным ионам гемолимфы моллюсков. Выявлено, что у незараженных *P. purpura* их концентрация составляет 76,82 ммоль/л (при размахе колебаний показателя 37,00—97,50), а у зараженных особей она в 1,75 раза ниже ($P > 99,9\%$), что обусловлено патогенным влиянием как слабой, так и умеренной трематодной инвазии на материальную кумуляцию анионов Cl^- в организме подопытных животных.

В опытных растворах нитрата аммония разной концентрации (2000—6000 мг/л) достоверные отличия между зараженными и незараженными особями отсутствуют, что объясняется, видимо, угнетающим действием токсиканта.

У незараженных особей при концентрации токсиканта 2000 мг/л наблюдается резкое уменьшение содержания ионов хлора по сравнению с контролем — в 1,6 раза ($P > 99,9\%$), а у зараженных особей такая тенденция не отмечена: показатель остается на том же уровне. При концентрации 4000 и 6000 мг/л кумуляция анионов увеличивается прямо пропорционально содержанию токсиканта (табл. 3).

3. Влияние трематодной инвазии и растворов нитрата аммония на содержание ионов Cl^- (ммоль/л) в гемолимфе катушки пурпурной

Объекты исследования	n	lim	$\bar{x} \pm m_x$	σ	V
Контроль					
Незараженные особи	20	37,00—97,50	76,82 ± 7,56	33,80	43,99
Зараженные особи	10	34,90—63,80	43,15 ± 2,53	7,98	18,49
2000 мг/л					
Незараженные особи	23	40,40—61,80	48,43 ± 1,27	6,07	12,53
Зараженные особи	22	41,10—59,40	49,19 ± 0,87	4,10	8,34
4000 мг/л					
Незараженные особи	29	51,90—72,40	63,61 ± 1,58	8,50	13,36
Зараженные особи	21	50,50—73,20	64,39 ± 1,19	5,47	8,50
6000 мг/л					
Незараженные особи	6	68,00—89,60	76,93 ± 38,4	9,41	12,23
Зараженные особи	9	56,80—112,60	85,60 ± 6,43	19,28	22,52

Заклучение

В гемолимфе моллюсков соотношение концентрации ионов натрия, калия и хлора должно быть постоянным. Изменения их содержания свидетельствуют о нарушении процессов осморегуляции, которые в норме обеспечиваются активной абсорбцией неорганических ионов из внешней гипотонической среды [6]. Предположение о том, что при инвазии почки моллюсков не справляются с выведением из организма избытка осмотически активных веществ [5], подтвердили наши исследования. Изменения концентрации ионов натрия, калия и хлора, которые возникают при действии токсиканта и инвазии, по нашему мнению, могут обуславливать не только нарушения циркуляции воды в организме животных, но и вызывать сдвиги кислотно-щелочного равновесия.

**

*Вивчено вплив нітрату амонію на вміст іонів Na^+ , K^+ та Cl^- в гемолімфі *Planorbarius purpura*, інвазованої партенітами трематод. Встановлено, що при збільшенні концентрації токсиканту від 2000 до 6000 мг/л вміст іонів Na^+ зменшується на 43—51%, іонів K^+ збільшується в 2,2—5,2 рази, а Cl^- у заражених особин збільшується в 2 рази, а у незаражених спочатку зменшується в 1,6 рази, а потім досягає значень контролю.*

**

*The paper investigates the influence of ammonium nitrate on the content of ions Na^+ , K^+ and Cl^- in hemolymph of *Planorbarius purpura* invaded by trematode parthenita. It was established that with increasing concentration of toxicant from 2000 to 6000 mg/l the content of ions Na^+ was decreased by 43—51 per cent, the content of ions K^+ was greater by 2,2—5,2 fold, and the concentration of ions Cl^- in infected individuals was twice as large, while in non-infected ones it decreased by 1,6 and then reached the control value.*

**

1. Алексеев В.А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. — 1981. — 17, № 3. — С. 92—99.
2. Деркач М.П. Элементи статистичної обробки результатів біологічного експерименту. — Львів: Вид-во Львів. ун-ту, 1963. — 66 с.
3. Мстелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. — М.: Колос, 1971. — 247 с.
4. Проссер Л., Браун Ф. Сравнительная физиология животных. — М.: Мир. — 766 с.
5. Стадниченко А.П. Изменение содержания некоторых неорганических ионов в гемолимфе пресноводных моллюсков при инвазии их партенитами трематод // Паразитология. — 1979. — 13, № 4. — С. 386—390.
6. Флоркэн М. Биохимическая эволюция. — М., 1947. — 175 с.
7. Grenway P. Solidum regulation in the freshwater mollusc *Limnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata) // J. Exp. Biol. — 1970. — 53, N 1. — P. 147—163.