

30к-1  
9371



ISSN 1810-5033

2/2018

Том 17

# НОВОСТИ

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ  
НАУК

# NEWS

OF BIOMEDICAL  
SCIENCES

УДК 556.5:556.114:001.891

А.А. ЧИРКИН, О.М. БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА, Е.О. ДАНЧЕНКО,  
Е.И. КАЦНЕЛЬСОН, Т.А. ТОЛКАЧЕВ

## МЕСТО БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ РАНЖИРОВАНИИ ВОДОЕМОВ

*Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, Витебск, Беларусь*

В статье изложен способ экологического ранжирования водоемов на основе использования биохимических методов исследования образцов воды, образцов прибрежных почв и обитающих в этих водоемах легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода. С помощью предлагаемого способа расширяются возможности биоиндикации водоемов, что позволяет совершенствовать оценку гидробиологического и гидрохимического статусов водоемов.

*Ключевые слова:* экология, биоиндикация, водоемы, биохимические исследования, легочные пресноводные моллюски

Согласно Водному кодексу Республики Беларусь (2015 г.) оценка гидробиологического и гидрохимического статусов водоемов аналогична практике Европейского союза (ЕС) и отвечает критериям Водной рамочной директивы ЕС. Основными компонентами, определяющими качество поверхностных вод, являются соединения, поступающие в составе бытовых, сельскохозяйственных и промышленных стоков. В 2020 году предусмотрен пересмотр Водной стратегии Республики Беларусь, что делает актуальным проведение дополнительных исследований по оценке экологического состояния водоемов. Целью работы явилось использование биохимических методов в гидробиологической и гидрохимической характеристике шести водоемов Витебской области.

**Материал и методы.** В качестве эталонного (модельного) водоема принято озеро Селявское Россонского района (д. Селявщина). Обследованы шесть водоемов Витебской области, отличающиеся по экологическим характеристикам: река Витьба, которая в черте города Витебска перегорожена плотиной, что сформировало выше по течению слабо проточный водоем длиной до 2 км с признаками антропогенного загрязнения и эвтрофикации; озеро Вордовье Дубровенского района (д. Ляды) имеет признаки загрязнения стоками животноводческого комплекса; озеро Малое Бешенковичского района (д. Соковоро) собирает стоки от населенных пунктов, ферм и автомагистрали Витебск-Минск; озеро Сенненское Сенненского района (г. Сенно) интенсивно загрязняется бытовыми и сельскохозяйственными стоками при недостаточности городских очистных сооружений; озеро Дубровское Ушачского района (д. Дубровка) и озеро Будовесть Шумилинского района (а/г Башни) отличаются чистой водой из-за низкого уровня промышленных и бытовых стоков.

Биохимическому исследованию подвергались образцы воды (семь катионов), почвы (три катиона и три ферментативные активности) и ткани легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода: обыкновенный прудовик (*Lymnaea stagnalis* L., переносчик кислорода медьсодержащий гемоцианин) и роговая катушка (*Planorbium corneum* L., переносчик кислорода железосодержащий гемоглобин). Определение ионов цинка проводили при помощи комплексонометрического титрования, ионов меди методом прямой фотометрии и железа (II) спектрофотометрическим методом [1, 2]. Количественный анализ катионов осуществляли при помощи метода капиллярного электрофореза на приборе «Капель 105» (Люмэкс, Россия) с кварцевым капилляром с детектированием при 267 нм. Пробы почвы, отобранные на глубине 20 см в десятиметровой прибрежной зоне водоемов, высушивали в термостате при 40°C 24 часа, измельчали в ступке и просеивали через сито (диаметр отверстий 1 мм). Соли металлов извлекали из образцов почвы 1М раствором HCl в соотношении между объемами почвы и раствора 1:10, время экстракции один час при периодическом взбалтывании [3]. Концентрацию  $\text{Cu}^{2+}$  определяли спектрофотометрическим методом, по окрашенным комплексам ионов металла с аммиаком [4]. Определение ионов цинка (II) проводили титриметрическим методом на основании образования

комплексов ионов металлов с аминополикарбоновыми кислотами [5]. Определение содержания в почве ионов  $Fe^{3+}$  оценивали спектрофотометрическим методом [6].

Гемолимфу получали посредством раздражения ноги лёгким покалыванием, что стимулирует рефлекс втягивания ноги в раковину и выделение гемолимфы из мантийной полости. Определение биохимических показателей в гемолимфе проводили с помощью стандартных биохимических реакций с использованием наборов реагентов НТПК «Анализ Х» (общий белок, мочевая кислота) и «Мочевина-01-Витал» (мочевина).

В гомогенате гепатопанкреаса определяли содержание белка, ДНК, РНК, гликогена, ТБК-позитивных веществ (малоновый диальдегид – МДА), восстановленного глутатиона и активности каталазы с помощью методов, описанных ранее [7-9].

Биохимические показатели, характеризующие экологическое состояние водоемов, разделены на шесть или семь рангов: от единицы (самое низкое значение показателя) до шести или семи (самое высокое значение показателя). Обследованные озера сравнивались по суммарной величине рангов группы показателей. Средняя величина каждого показателя определялась в восьми – десяти повторах, и сравнительный анализ производился методом параметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента. В таблицах не приведены значения t и P, поскольку каждый столбец цифр ранжировался по степени нарастания от единицы до шести, или семи.

**Полученные результаты и обсуждение.** На первом этапе работы вода водоемов была ранжирована по содержанию семи катионов в диапазоне от семи (в образцах воды самое низкое содержание каждого катиона) до 42 (в образцах воды самое высокое содержание каждого катиона) (таблица 1).

Табл. 1. Содержание катионов (мг/л) в природных водоемах Витебской области

Водоем	$Fe^{3+}$	$K^+$	$Ca^{2+}$	$Cu^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Na^+$	$Zn^{2+}$
р. Витьба	0,065	274,5	2965	3,103	714,1	2015	1,77
оз. Вордовье	0,028	363,2	1625	0,447	435,9	199	0,62
оз. Малое	0,101	633,7	1408	0,550	437,3	514	1,04
оз. Дубровское	0,060	121,5	962	0,435	250,5	158	0,56
оз. Будовесь	0,021	145,0	964	0,412	259,2	142	0,56
оз. Сенненское	0,060	87,73	1480	0,826	403,6	288	0,95
оз. Селявское	0,009	10,1	322	0,314	43,3	30,4	0,15

В результате водоемы были распределены в последовательности р. Витьба (38) > оз. Малое (32) > оз. Вордовье (24) > оз. Сенненское (23) > оз. Дубровское (13) > оз. Будовесь (11). Полученное распределение рангов соответствует приведенной выше макроэкологической характеристике озер. Наиболее высокие ранги для отдельных катионов были следующими: р. Витьба – медь, натрий, магний, кальций по шести и железо и цинк по пяти; оз. Вордовье – калий и кальций по пяти; оз. Малое – железо и калий по шести, натрий и магний по пяти; оз. Сенненское – медь – пять. Наиболее низкие ранги для отдельных катионов были следующими: оз. Будовесь – железо, медь, цинк, натрий по одному, магний и кальций по двум и калий трем; оз. Дубровское – цинк, магний, кальций по одному, медь, калий и натрий по двум, но железо – четыре.

На следующем этапе работы изучено содержание трех катионов и трех ферментативных активностей в образцах почвы, полученной в десятиметровой прибрежной зоне водоемов (таблица 2). В образцах почвы по шести изученным показателям диапазон рангов находился в пределах 6–36, и исследуемые водоемы распределились в последовательности: оз. Малое (28) > р. Витьба (24) > оз. Дубровское (23) > оз. Вордовье и оз. Сенненское (по 20) > оз. Будовесь (11).

Приведенный биохимический анализ почв береговой зоны обследуемых водоемов оказался менее информативным из-за меньших изменений суммарных рангов, хотя распределение озер по экологическому состоянию в основном сохранилось. Однако биохимическое исследование образцов прибрежной почвы оказалось полезным для анализа соответствия накопления катионов проявлению ферментативной активности почв. При сравнительном анализе рангов трех катионов (диапазон 3–18) и активности трех ферментов (диапазон 3–18) выявлены следующие соотношения (первая цифра ранг катионов, вторая цифра ранг ферментов): р. Витьба (12–12), оз. Дубровское (12–11), озеро Будовесь (7–4) и оз. Сенненское (8–10). Близкие ранги двух групп отличающихся показателей могут свидетельствовать об их взаимодействии. Полученные данные показывают, что уровень накопления катионов в образцах почвы сопряжен с повышением активности ферментов в них.

**Табл. 2.** Биохимическая характеристика почв прибрежной зоны водоемов (мг/кг почвы) ( $M \pm m$ )

Содержание катионов	Железо (мг/кг)	Медь (мг/кг)	Цинк (мг/кг)
р. Витьба	1,19±0,177	4,36±0,101	46,0±2,36
оз. Вордovie	0,55±0,080	2,78±0,192	107±0,45
оз. Малое	0,51±0,089	7,67±0,034	59,1±1,27
оз. Дубровское	0,72±0,128	2,36±0,062	135±1,72
оз. Будовeсть	0,44±0,050	5,49±0,837	31,4±0,60
оз. Сенненское	0,43±0,052	5,56±0,047	42,4±0,83
Активность ферментов	Каталаза, см <sup>3</sup> О <sub>2</sub> /г/мин	Протеазы, мг /10г/24ч	Уреаза, мг NH <sub>3</sub> / 10 г/ч
р. Витьба	2,62 ±0,082	1,53 ±0,015	105±0,34
оз. Вордovie	4,52 ±0,054	0,59 ±0,072	25,7±0,91
оз. Малое	6,56 ±0,085	6,47 ±1,640	44,2±0,68
оз. Дубровское	3,25 ±0,062	6,74 ±1,099	18,0±0,70
оз. Будовeсть	2,44 ±0,019	0,97 ±0,235	6,29±0,25
оз. Сенненское	3,64 ±0,037	1,28 ±0,105	51,9±0,74

На третьем этапе работы был проведен анализ 36 показателей, включающих результаты исследования химического состава воды, образцов прибрежной почвы и биохимических показателей гемолимфы и гепатопанкреаса моллюсков. Кроме материалов таблиц 1 и 2, в ранжирование озер включены данные биохимического исследования гемолимфы (таблица 3) и гепатопанкреаса (таблицы 4-5) двух видов легочных пресноводных моллюсков.

**Табл. 3.** Содержание общего белка, мочевины, мочевой кислоты и глюкозы в гемолимфе моллюсков, обитающих в обследуемых водоемах ( $M \pm m$ )

Водоем	Общий белок, мг/г	Мочевина, ммоль/л	Мочевая кислота, мкмоль/л	Глюкоза, ммоль/л
Прудовик обыкновенный				
р. Витьба	11,35±0,16	7,14±0,11	45,56±2,33	0,60±0,035
оз. Вордovie	10,05±0,18	8,22±0,12	54,58±1,74	0,51±0,042
оз. Малое	10,72±0,27	8,04±0,19	45,26±0,57	0,53±0,027
оз. Дубровское	9,95±0,65	7,42±0,13	48,04±2,02	0,55±0,047
оз. Будовeсть	11,80±0,30	7,86±0,11	50,12±1,60	0,80±0,034
оз. Сенненское	10,24±0,15	8,94±0,13	55,38±1,46	0,64±0,034
Катушка роговая				
р. Витьба	24,15±0,32	8,15±0,08	119,56±3,45	1,21±0,022
оз. Вордovie	25,02±0,44	7,35±0,04	129,66±4,45	0,96±0,045
оз. Малое	25,81±0,61	7,62±0,11	110,48±4,16	0,94±0,096
оз. Дубровское	23,55±0,83	7,43±0,12	127,92±4,07	0,85±0,088
оз. Будовeсть	26,67±0,66	7,72±0,11	132,87±4,32	1,54±0,086
оз. Сенненское	23,72±0,45	7,94±0,10	126,26±3,18	1,12±0,079

**Табл. 4.** Содержание нуклеиновых кислот, белка и гликогена (мг/г) в гепатопанкреасе моллюсков, обитающих в обследуемых водоемах ( $M \pm m$ )

Водоем	РНК	ДНК	Общий белок	Гликоген
Прудовик обыкновенный				
р. Витьба	7,06±0,16	2,09±0,04	186±8,8	26,21±0,182
оз. Вордovie	8,46±0,27	1,21±0,02	120±8,7	26,98±0,169
оз. Малое	7,82±0,26	1,79±0,03	150±9,7	27,13±0,218
оз. Дубровское	9,18±0,30	1,85±0,05	131±4,8	27,09±0,281
оз. Будовeсть	6,73±0,23	2,02±0,05	100±9,3	24,32±0,261
оз. Сенненское	7,37±0,18	1,72±0,04	160±5,7	26,15±0,138
Катушка роговая				
р. Витьба	7,44±0,35	1,67±0,09	135±7,3	20,88±0,244
оз. Вордovie	9,87±0,27	1,83±0,09	100±4,1	22,51±0,312
оз. Малое	7,47±0,49	1,93±0,16	122±4,9	22,22±0,331
оз. Дубровское	9,08±0,46	2,75±0,05	113±3,8	22,78±0,158
оз. Будовeсть	9,63±0,39	2,01±0,23	79±3,3	19,88±0,203
оз. Сенненское	12,83±0,44	1,73±0,12	243±3,4	20,14±0,174

**Табл. 5.** Содержание малонового диальдегида, восстановленного глутатиона и активность каталазы в гепатопанкреасе моллюсков, обитающих в обследуемых водоемах ( $M \pm m$ )

Водоем	МДА, нмоль/г	Каталаза, мкмоль/мин/г	Восстановленный глутатион, мкмоль/г
Прудовик обыкновенный			
р. Витьба	3,56±0,24	41,4±1,3	8,04±0,05
оз. Вордовье	2,67±0,18	29,6±1,7	7,56±0,17
оз. Малое	3,36±0,45	30,7±2,3	7,47±0,19
оз. Дубровское	3,83±0,50	33,2±1,8	8,16±0,23
оз. Будовесь	3,42±0,26	31,1±1,5	8,34±0,16
оз. Сенненское	2,87±0,27	29,4±1,4	7,32±0,07
Катушка роговая			
р. Витьба	4,36±0,25	31,2±1,2	7,22±0,08
оз. Вордовье	2,67±0,24	27,4±1,4	7,04±0,04
оз. Малое	3,68±0,31	29,5±1,3	7,02±0,07
оз. Дубровское	4,49±0,29	29,7±1,8	7,18±0,04
оз. Будовесь	3,34±0,30	26,7±3,8	7,14±0,06
оз. Сенненское	2,78±0,21	28,7±1,2	6,87±0,03

По суммарному анализу изменений 36 показателей (без учета их направленности) водоемы были распределены в последовательности: оз. Будовесь (23) > р. Витьба (21) > оз. Вордовье (18) > оз. Дубровское (17) > оз. Сенненское (13) > оз. Малое (11). По количеству повышенных показателей водоемы были распределены: р. Витьба (13) > оз. Дубровское (8) > оз. Малое и оз. Будовесь (по 6) > оз. Сенненское (4) > оз. Вордовье (2). По количеству сниженных показателей распределение озер оказалось иным: оз. Будовесь (17) > оз. Вордовье (16) > оз. Дубровское и оз. Сенненское (по 9) > р. Витьба (8) > оз. Малое (5). Анализ соотношения повышенных и сниженных показателей в каждом водоеме может явиться интегральной характеристикой «реактивности» водной экосистемы на внешнее воздействие. В частности, с избыточным содержанием меди в воде реки Витьба сопряжено у обитающих в ней обыкновенных прудовиков увеличение содержания ДНК, белка и активности каталазы в тканях гепатопанкреаса, что, вероятно, поддерживает жизнеспособность этих моллюсков с гемоцианиновым транспортом кислорода в загрязненной среде обитания. В то же время малое накопление железа в воде озера существенно не влияет на биохимические показатели тканей роговых катушек, имеющих гемоглобиновый транспорт кислорода. Эти данные могут подтверждать предположение о дивергенции катушек и прудовиков 182 миллиона лет тому назад с образованием медьсодержащего гемоцианинового транспортера кислорода из малоспецифичных тирозиназ в условиях снижения биодоступности кислорода в результате избыточной вулканической активности Тоарского периода [10, 11].

Специальный интерес для биоиндикации представляет сравнительный анализ изменений биохимических показателей в гемолимфе и гепатопанкреасе двух видов легочных пресноводных моллюсков, обитающих в разных водоемах. Однотипный характер изменений в тканях гепатопанкреаса выявлен у моллюсков из р. Витьба (снижение содержания мочевой кислоты, РНК и повышение активности каталазы), из оз. Вордовье (снижение содержания МДА и активности каталазы), из оз. Малое (снижение содержания мочевой кислоты), из оз. Дубровское (повышение содержания МДА), из оз. Будовесь (снижение содержания белка и гликогена) и из оз. Сенненское (снижение содержания МДА и восстановленного глутатиона). Противоположный характер изменений биохимических показателей в тканях гепатопанкреаса был выявлен у сравниваемых видов моллюсков в водоемах р. Витьба (содержание ДНК), оз. Будовесь (содержание гликогена), оз. Сенненское (содержание РНК). Кроме описанных общих изменений биохимических показателей у двух видов моллюсков обнаружены некоторые видовые особенности. Так у прудовиков из р. Витьба в гепатопанкреасе было повышено содержание белка, а у катушек – повышено содержание МДА, но снижен уровень гликогена. В гемолимфе прудовиков из оз. Вордовье снижены уровни белка и глюкозы и снижено содержание ДНК в гепатопанкреасе, а у катушек – повышено содержание гликогена в гепатопанкреасе. У прудовиков из оз. Малое снижено содержание белка в гемолимфе и повышено содержание гликогена в гепатопанкреасе, а у катушек в гепатопанкреасе снижено содержание РНК. У прудовиков из оз. Дубровское в гепатопанкреасе повышено содержание РНК и восстановленного глутатиона, а у катушек повышено содержание ДНК в гепатопанкреасе. У прудовиков из оз. Будовесь в гепатопанкреасе снижено содержание РНК, повышено содержание ДНК и восстановленного глутатиона, а у катушек в гемолимфе повышено содержание мочевой

кислоты, снижена активность каталазы в гепатопанкреасе. У прудовиков из оз. Сенненское повышено содержание мочевины и мочевой кислоты в гемолимфе и снижена активность каталазы в тканях гепатопанкреаса, а у катушек повышено содержание белка в гепатопанкреасе. Следовательно, использование в биомониторинге водных сред обитания двух видов моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода, может дать дополнительную полезную информацию для индивидуальной оценки экологического состояния каждого обследуемого водоема.

**Заключение.** В результате проведенных исследований описан способ экологического ранжирования водоемов на основе использования биохимических методов исследования образцов воды, образцов прибрежных почв и обитающих в этих водоемах легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода. Распределение рангов содержания семи катионов в образцах воды соответствует макроэкологической характеристике озер. Биохимическое исследование образцов прибрежной почвы (три катиона и три фермента) оказалось полезным для анализа соответствия накопления катионов проявлению ферментативной активности почв. В частности установлено, что уровень накопления катионов в образцах почвы сопряжен с повышением активности ферментов в них. Анализ соотношения повышенных и сниженных показателей в гемолимфе и гепатопанкреасе двух видов легочных пресноводных моллюсков, обитающих в каждом водоеме, может явиться интегральной характеристикой «реактивности» водной экосистемы на внешнее антропогенное воздействие.

#### Литература:

- [1]. Белицина Г.Д. Влияние тяжелых металлов на ферментативную активность почв. акцент. 1985. 182 с.
- [2]. Добровольский В.В. Современные проблемы биосферы. М.: Наука. 1992. 200 с.
- [3]. Зенова Г.М. Практикум по биологии почв. М.: Изд-во Моск. ун-та. 2001. 132 с.
- [4]. Вальков В. Ф., Казеев, С. И. Колесников В.С. Почвоведение: учебник для вузов. М.: ИКЦ «МарТ». 2004. 496 с.
- [5]. Орлов Д. С., Васильевская В.Д. Почвенно-экологический мониторинг и охрана почв. М.: Изд-во МГУ. 1994. 272 с.
- [6]. Звягинцев Д. Г. Биология почв. М.: МГУК. 2005. 241с.
- [7]. Lowry O.H. et. al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
- [8]. Blober G., Potter V.R. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and pools of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid // Biochem. Biophys. Acta. 1968. Vol. 166. P. 48–54.
- [9]. Чиркин А.А. и др. Содержание ДНК, РНК и белков в тканях легочных пресноводных улиток в зависимости от транспорта кислорода, сезона года и местообитания (научное исследование в рамках школьного филиала вузовской кафедры) // Біялогія і хімія. 2017. № 7(55). С. 52–61.
- [10]. Chirkin A.A., Dolmatova V.V., Balaeva-Tichomirova O.M. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbis cornutus* // The 3rd International symposium on EuroAsian Biodiversity. 05-08 July 2017, Minsk-Belarus: BSU, IPBB. P. 236
- [11]. Чиркин А.А., Долматова В.В. Биохимия и молекулярная биология. Сб. научных статей. Выпуск 1 Посттрансляционная модификация белков. Минск: «Беларуская навука», 2017. С. 48–59.

Поступила в редакцию: 22.03.2018 г.

A.A. CHIRKIN, O.M. BALAEVA-TIKHOMIROVA, E.O. DANCHENKO, E.I. KATSNELSON,  
T.A. TOLKACHEVA

## LOCATION OF BIOCHEMICAL RESEARCH IN ECOLOGICAL PROCESSING OF WATERS

*Vitebsk State University named after P.M. Masherova, Vitebsk, Belarus*

### Summary

The article describes the method of ecological ranking of reservoirs based on the use of biochemical methods for studying water samples, coastal soil samples and pulmonary freshwater mollusks inhabiting these reservoirs, which differ in the mechanisms of oxygen transport. With the help of the proposed method, the possibilities of bioindication of reservoirs are expanded, which makes it possible to improve the assessment of the hydrobiological and hydrochemical status of reservoirs.

**Keywords:** ecology, bioindication, water reservoirs, biochemical studies, pulmonary freshwater mollusks