

АБОРИГЕННІ ВИДИ РИБ ЯК ТЕСТ-ОБ'ЄКТИ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ СУЧАСНОГО СТАНУ ГІДРОЕКОСИСТЕМ

Н.М. Присяжнюк¹, О.І. Слободенюк¹, Н.Є. Гриневич¹, В.П. Бабань¹,
О.А. Кузьменко¹, А.В. Горчанок²

¹ Білоцерківський національний аграрний університет

² Дніпровський державний аграрно-економічний університет

Описано спосіб діагностики ранніх порушень у найбільш чутливих компонентах біотичних угруповань за використання морфологічних параметрів печінки кісткових риб як біотест-системи екологічного моніторингу. Продемонстровано можливість прогнозування впливу токсикантів на стан аборигенної іхтіофауни за морфометричними показниками внутрішніх паренхіматозних органів риб. Доведено, що протоплазматичні та гемолітичні токсиканти порушують клітинний метаболізм, викликаючи дистрофію, розпад еритроцитів і некробіоз клітин у печінці риб. Отримані результати можна використовувати для діагностики різних типів гідроекосистем. Встановлено, що вони можуть бути науковим підґрунтям збереження біологічного різноманіття екосистеми в умовах підвищеного антропогенного навантаження.

Ключові слова: антропогенне навантаження, гідроекосистема, іхтіофауна, аборигенні види риб, печінка, біомаркери, токсиканти, водойма, морфологічні параметри, забруднювальні речовини.

Моніторинг якості води є однією з найважливіших проблем сучасного суспільства. Антропогенне навантаження на навколишнє природне середовище щороку зростає, постійно збільшується не лише надходження шкідливих речовин, а й кількість нових токсикантів, які поки що неможливо виявити під час хімічного аналізу води [1]. Тому біотестування як альтернатива комплексних методів визначення якості води набуває вагомого значення. Біотестування дає змогу оцінити загальну токсичність досліджуваної проби [2].

Специфічна реакція тест-організмів на дію певного компонента виявляється у встановлених на практиці межах концентрації. Тому слід добирати оптимальний для відповідного об'єкта тест-організм, який буде водночас зручним і максимально інформативним [3].

Складовими елементами оцінки негативного впливу забруднювальних сполук як на організм риб, так і на гідроекосистему загалом є наслідки негативного впливу забруднювальних речовин на іхтіофауну в

розрізі різних рівнів біологічної організації та генетичні, молекулярні, біохімічні, фізіологічні, морфологічні, поведінкові реакції риб як відповідні біомаркери [4–6].

Взаємодія як певного організму риб, так і їх популяцій та угруповань з навколишнім природним середовищем ґрунтується на адаптаційних механізмах. Забруднення водного середовища спричиняє порушення їхнього функціонування, що супроводжується загибеллю клітин, пригніченням певних фізіолого-біохімічних процесів, а за подальшого наростання — загибеллю організму, зникненням із угруповань чутливих видів з переважанням толерантних до зміни продуктивних характеристик водойм [6–8].

На сьогодні об'єктами для біомоніторингових досліджень з оцінки якості водного середовища за станом показників використовують представників лососевих, сигових і харіусових риб, тобто риб з підвищеною токсикочутливістю, у яких процеси обміну речовин та накопичення токсинів у організмі протікають швидше. Кожна з цих груп має як низку переваг, так і недоліків, що визначають можливості та обмеження у виконанні тих чи інших завдань [2].

Показником фізичного стану організму є співвідношення розміру тіла (або певного органа) і маси особини. Зокрема, для визначення патологічних змін у функціях певного органа доцільно використовувати морфометричні показники, як-от: органосоматичні індекси — співвідношення маси певного органа до маси тіла та коефіцієнт вгодованості, виражений як відношення маси риби до її довжини [5]. Вказані біомаркери легко досліджуються, проте вони завжди залежать від сезонності та температури, від фізіологічного стану риб у той чи інший період. Тому процес ідентифікації чинника впливу на стан риб дещо ускладнюється. Проте можуть відбутися швидкі зміни в роботі внутрішніх органів, наприклад у печінці (гепатосоматичний індекс), у гонадах (гонадосоматичний індекс) чи в серцево-судинній системі.

Одним з біомаркерів є ріст риби, що обчислюється у спосіб вимірювання маси тіла за певний проміжок часу або за сталих умов утримання. Зниження темпу росту за впливу полутантів зумовлено зменшенням споживання енергії або зростанням її витрат рибами, щоб уникнути дії небезпечних сполук, для детоксикації ксенобіотиків та відновлення тканин [5]. Порушення дихальної функції, що призводить до зміни дихальних показників (споживання кисню, вміст газів у крові, парціальний тиск кисню в артеріальній крові, парціальний тиск вуглекислого газу, рН крові, проліферація клітин зябер), може також вказувати на вміст у водному середовищі забруднювальних речовин [6].

Традиційною групою біомаркерів є фізіологічні маркери, які налічують показники фізичного стану риб (коефіцієнт вгодованості, темп росту, органосоматичні індекси), респіраторні та серцево-судинні показники та гематологічні параметри. Кров — одна з найдоступніших для аналізу рідин організму риб, що дає змогу визначати в ній кількість кров'яних клітин, гемоглобіну, концентрацію іонів плазми, активність ферментів і гормонів, уміст токсикантів тощо. Забруднення середовища компонентами стічних вод та численними іншими

токсичними речовинами впливають на показники, як-от: кількість еритроцитів у одиниці об'єму крові, вміст гемоглобіну, концентрація натрію та калію у плазмі, вміст кров'яних ензимів, білка [2, 6].

Метою досліджень було визначення впливу змін гідрологічного режиму на стан об'єктів аборигенної іхтіофауни за морфометричними показниками печінки риби.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для дослідження використовували по 5 екземплярів дворічок аборигенних видів риб, однакових за характером живлення, серед яких: щука звичайна (*Esox lucius* L.), сом звичайний (*Siluris glanis* L.), судак (*Sander lucioperca*), окунь (*Perca fluviatilis*).

Вказані представники були виловлені у різних частинах середньої течії р. Рось. Одна група риб виловлювалась вище за течією від м. Біла Церква, друга — навпаки, нижче за течією від міста.

Печінку отримували шляхом анатомічного розтину від свіжовиловленої риби, яку для запобігання негативному впливу стрес-фактора попередньо присипляли розчином гіпнотодилу (5–10 мг/л). Порожнину тіла риби розтинали в трьох напрямках. Ножицями робили перший розріз черева паралельно середній лінії від анального отвору до основи грудних плавців; другим — розтинали м'язи черевної стінки дорсально від основи грудних плавців до початку спинних м'язів; третім — від початку спинних м'язів до анального отвору. Здійснюючи розтин порожнини тіла риби, фіксували відсутність або наявність рідини та газів.

Під час зовнішнього огляду печінки звертали увагу на колір, консистенцію, кровонаповнення, наявність крововиливів, новоутворень. Для промірів відокремлену печінку риб поміщали в кювету або в чашку Петрі. Лінійкою вимірювали довжину та ширину органа. Після цього орган зважували на електронних вагах ВЛКТ-500 г-М. Об'єм органа визначали за кількістю витісненої рідини. Для цього мірний циліндр заповнювали водою, записували початковий об'єм води, занурювали у воду орган та записували її кінцевий об'єм.

Для фіксації відбирали фрагменти печінки товщиною 0,3–0,5 см. Фіксацію матеріалу проводили в 10%-ому водному розчині нейтрального формаліну впродовж 24 год при кімнатній температурі. Після фіксації матеріал промивали впродовж 2 год проточною водою, зневоднювали спиртами зростаючої концентрації та заливали у парафін. Зрізи товщиною 10 мкм виготовляли на мікромомі МПС-2 та фарбували гематоксиліном і еозином. Виготовлені гістологічні препарати вивчали за допомогою мікроскопів Axiostarplus. Обчислення здійснювали за допомогою світлового мікроскопа «Біолам-Ломо», використовуючи окуляр-мікрометр гвинтовий МОВ-1-16^x [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами даних морфометричних аналізів вираховували середнє арифметичне, похибку середнього арифметичного, рівень вірогідності показників відповідно до вимог біометричних посібників [10].

За зовнішнім оглядом представники риб досліджуваних видів відповідали фізіологічній нормі (зміни забарвлення покриттів тіла, плавців та їх пошкодження не виявлено). Проте печінка риб мала незначні зміни. Морфометрію печінки риби, виловленої вище та нижче за течією р. Рось від

м. Біла Церква, оцінювали за абсолютною масою, печінково-соматичним індексом та діаметром центральних вен (табл. 1). Слід наголосити на істотних змінах гепато-соматичного індексу (%) у бік збільшення у *Silurus glanis*, *Sander lucioperca*, *Esox lucius*, *Perca fluviatilis* – на 3,72; 1,81; 2,07 та 3,04 відповідно, виловлених нижче за течією р. Рось від м. Біла Церква. Гепато-соматичний індекс (%) відобразив фізіологічний стан риби, що може бути результатом пристосувальних механізмів за антропогенного впливу.

У риби, виловленої нижче за течією р. Рось від м. Біла Церква, спостерігалось незначне збільшення печінки та злегка жовтувате забарвлення – маса печінки сома, судака, щуки та окуня була більшою на 12,6, 25,6, 17,4 та 20,8% відповідно порівняно з масою органу риб, виловлених за течією вище міста (рис. 1).

Гепато-соматичний індекс сома, судака, щуки та окуня, виловлених за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква, порівняно з індексом риби, виловленої за течією річки вище від міста, збільшився – на 40,9, 35,9, 28,5 та 33,9% відповідно (рис. 2).

Тому для з'ясування особливостей морфологічних змін печінки вивчали гістологічну структуру, морфометричні показники органа та клітин. Мікроскопічно печінка

Таблиця 1

Показники макроморфометрії печінки аборигенних видів риб р. Рось ($M \pm m$, $n = 5$)

Показники	Риба, виловлена вище за течією від м. Біла Церква				Риба, виловлена нижче за течією від м. Біла Церква			
	Сом	Судак	Щука	Окунь	Сом	Судак	Щука	Окунь
Абсолютна маса, г	32,48± 1,19	2,61± 0,35	8,06± 0,47	4,23± 0,41	37,18± 1,19	3,51± 0,74	9,76± 0,61	5,34± 0,83
Гепато-соматичний індекс, %	2,26± 1,21	1,16± 0,85	1,48± 0,36	2,01± 1,19	3,72± 1,26	1,81± 1,01	2,07± 1,02	3,04± 1,25
Діаметр центральних вен, мкм	19,16± 1,18	12,56± 0,71	9,48± 0,56	6,39± 0,31	20,82± 1,24	13,91± 0,83	10,84± 0,94	7,56± 0,64

Примітка: * – $p < 0,001$.

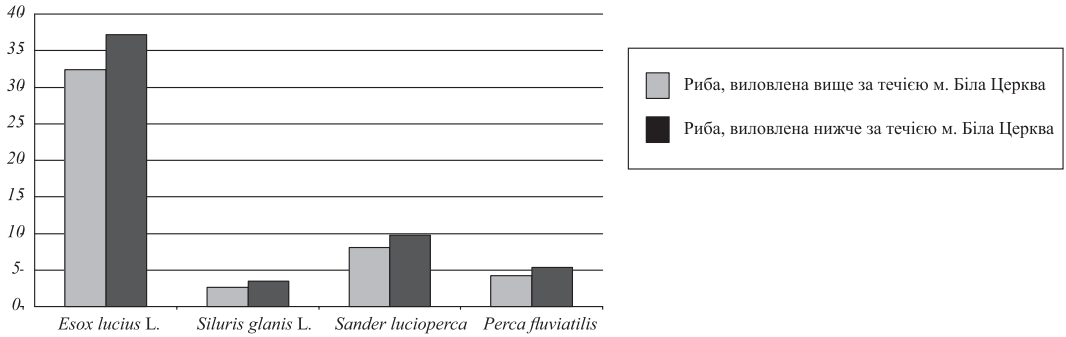


Рис. 1. Абсолютна маса печінки аборигенних видів риб, г

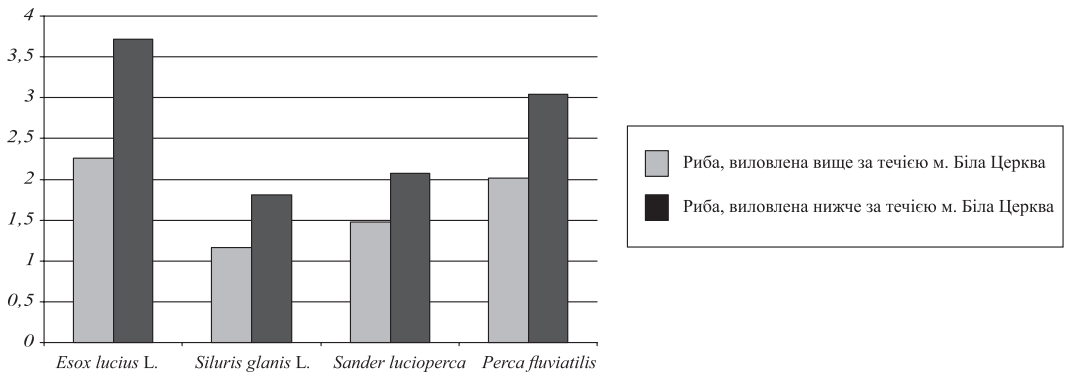


Рис. 2. Гепато-соматичний індекс аборигенних видів риб, %

досліджуваних риб складається з окремих печінкових частинок, а у риби, виловленої за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква, — зі значно розвиненою сполучною тканиною між часточками (табл. 2).

У риби, виловленої за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква, спостерігалось незначне потовщення капсули печінки внаслідок розростання сполучної тканини та розладів мікроциркуляції. Судини печінки були переповнені кров'ю, місцями судинні стінки просочені плазмоцидами. У центральній частині печінкових частинок були розширені синусоїди та периваскулярні простори. Навколо судин печінки були виявлені дрібні інфільтрати. Гепатоцити у кожній печінковій частинці утворюють більш-менш впорядковані ряди — печінкові пластинки (табл. 2), де більшість гепатоцитів мали включення адипоцитів у цитоплазмі.

У центрі печінкових частинок спостерігались печінкові клітини з великими вакуолями та ядром округлої форми, середнього та великого розміру. У субкапсулярній зоні печінки відзначено набухання гепатоцитів і лізис ядер.

Діаметр центральних вен сома, судака, щуки та окуня був більшим у риби, виловленої за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква — на 8, 9,7, 12,6 та 15,5% відповідно (рис. 3).

Поряд із тим спостерігались прояви компенсаторно-адаптаційних процесів у печінці досліджуваних риб: гіпертрофія ядер і ядерць гепатоцитів, гіперплазія ендотелію судин, збільшення кількості двоядерних гепатоцитів.

Збільшення кількості ядерць в ядрах гепатоцитів риб, виловлених за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква, засвідчило активізацію білоксинтетичної актив-

Таблиця 2

Показники мікрморфометрії печінки аборигенних риб р. Рось ($M \pm m, n = 5$)*

Показники	Риба, виловлена вище за течією від м. Біла Церква				Риба, виловлена нижче за течією від м. Біла Церква			
	Сом	Судак	Щука	Окунь	Сом	Судак	Щука	Окунь
Найширші частинки печінки, мкм	40,1± 0,17	36,8± 0,24	33,04± 0,07	12,6± 0,41	43,6± 0,12	39,1± 0,26	36,1± 0,37	15,9± 0,28
Ширина печінкових пластинок, мкм	4,6± 0,09	4,3± 0,18	4,02± 0,03	4,95± 0,23	6,1± 0,07	5,92± 0,15	5,76± 0,27	6,48± 0,42

Примітка: * $p < 0,001$.

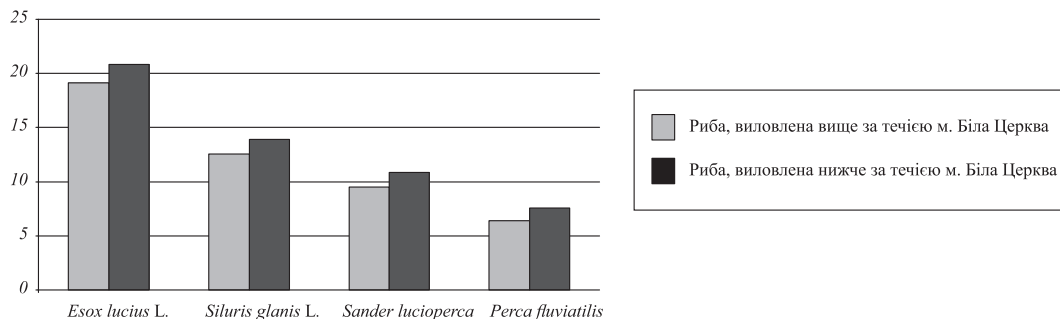


Рис. 3. Діаметр центральних вен аборигенних видів риб, мкм

ності клітин. Підвищення синтезу білків обумовлює накопичення пластичного матеріалу, посилення активності ферментів тощо. Подібна інтенсифікація метаболічних процесів сприяє збільшенню резистентності клітин і оптимальному розвитку клітинних і внутрішньоклітинних механізмів регенерації.

ВИСНОВКИ

Одними із біоіндикаторів погіршення екологічних умов водойми та тест-об'єктами для їх оцінки є представники аборигенної іхтіофауни.

Маса печінки сома, судака, щуки та окуня, виловлених за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква, була більшою — на 12,6, 25,6, 17,4 та 20,8% відповідно, порівняно з масою органа особин риб, виловлених за течією річки вище міста.

Гепато-соматичний індекс сома, судака, щуки та окуня, виловлених за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква, порівняно з індексом риби, виловленої за течією річки вище міста, збільшився — на 40,9, 35,9, 28,5 та 33,9% відповідно.

Діаметр центральних вен сома, судака, щуки та окуня був більшим у риби, виловленої за течією р. Рось нижче від м. Біла Церква на 8, 9, 7, 12,6 та 15,5% відповідно.

Отримані дані дали змогу визначити, що незначний вплив токсичних речовин у риб інтенсифікує процеси фізіологічної регенерації та функціональної активності гепатоцитів. Про це свідчить збільшення кількості ядерців в ядрах гепатоцитів та кількість двоядерних гепатоцитів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Scardi M. Monitoring methods based on fish / M. Scardi, L. Tancioni, S. Cataudella // Biological monitoring of rivers / [Eds. G. Ziglio, M. Siligardi, G. Flaim]. — Chichester: John Wiley & Sons, 2006. — P. 135–153.
2. Руднева И.И. Применения биомаркеров рыб для экотоксикологической диагностики водной среды / И.И. Руднева // Рыб. хоз-во Украины, 2006. — № 1. — С. 20–24.
3. Левич А.П. Теоретические и методические основы технологии регионального контроля природной среды по данным экологического мониторинга / А.П. Левич, Н.Г. Булгаков, В.Н. Максимов. — М.: НИА-Природа, 2004. — 271 с.
4. Van der Oost R. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review / R. Van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen // Environ. Toxicol. Pharmacol. — 2003. — Vol. 13. — P. 57–149.
5. Handy R.D. Biomarker approaches for ecotoxicological biomonitoring at different levels of biological organization / R.D. Handy, A.N. Jha, M.H. Depledge // Mc Graw Hill, New York. Chapter. — 2002. — No. 9. — P. 9.1–9.32.
6. Schlenk D. Biomarkers. The toxicology of fishes / D., Schlenk, R., Handy, & S., Steinert // CRC Press. — Boca Raton; London; New York, 2008. — P. 683–731.
7. Пат. № 119573 Україна МПК G01N 33/12 C12Q 1/12. Спосіб біоіндикації водойм / Н.М. Присяжнюк, Н.Є. Гриневич, Ю.В. Куновський, О.Р. Михальський; заявник і власник Білоцерківський національний аграрний університет. — № u 2017 04189; заявл. 27.04.2017; опубл. 25.09.2017, Бюл. № 18. — 4 с.
8. Ecotoxicology and innate immunity in fish / N.C. Bols, J.L. Brubacher, R.C. Ganassin [et al.] // Developmental and Comparative Immunol. — 2001. — Vol. 25. — P. 853–873.
9. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології: Навчальний посібник / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. — 2-е вид. — Житомир: Полісся, 2011. — 288 с.
10. Лакін Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакін. — М: Высш. школа, 1980. — 280 с.

REFERENCES

1. Scardi, M., Tancioni, L., Cataudella, S. (2006). Monitoring methods based on fish. *Biological monitoring of rivers*. G. Ziglio, M. Siligardi, G. Flaim (Eds.). Chichester: John Wiley & Sons [in English].
2. Rudneva, I.I. (2006). Primeneniya biomarkerov ryb dlia ekotoksikologicheskoi diahnostiki vodnoi sredy [Applications of fish biomarkers for ecotoxicological diagnostics of aquatic environment]. *Rybnoie hoziaystvo — Fish farming*, 1, 20–24 [in Russian].
3. Levich, A.P., Bulgakov, N.G., Maksimov, V.N. (2004). *Teoreticheskiye i metodicheskiye osnovy tekhnologii regionalnogo kontrolia prirodnoi sredy po dannym ekologicheskogo monitoringa* [Theoretical and methodological foundations of regional technology control environment according to ecological monitoring]. Moskva [in Russian].
4. Van der Oost, R. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13, 57–149 [in English].
5. Handy, R.D. (2002). Biomarker approaches for ecotoxicological biomonitoring at different levels of biological organization. *Mc Graw Hill, New York. Chapter 9*, 9.1–9.32 [in English].
6. Schlenk, D., Handy, R., & Steinert, S. (2008). *Biomarkers. The toxicology of fishes*. Boca Raton; London; New York: CRC Press [in English].
7. Prysiazhniuk, N.M., Grynevych, N.E., Kunovskii, Y.V., Michalsky, O.R. (2017). Sposib bioindykatsii vodoim [Method of bioindication of reservoirs]. *Patent No. 119573, MPK G01N33/12 C12Q1/12 (01st January 2006); 27th April 2017; 25th September 2017. Biul. No. 18. Ukraine* [in Ukrainian].
8. Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C. [et al.]. (2001). *Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunol*, 25, 853–873 [in English].
9. Goralsky, L.P., Khomich, V.T., Kononsky, O.I. (2011). *Osnovy histolohichnoi tekhniki i morfofunksionalni metody doslidzhen u normi ta pry patolohii* [Fundamentals of histological technique and morphological functional methods of research in norm and at pathology]. Zhytomyr: Polissya [in Ukrainian].
10. Lakin, G.F. (1980). *Biometriya* [Biometrics]. Moskva: Vysshaya shkola [in Russian].

Отримано 24.01.2019