

УДК 576.895.122.2:594.38

**ВЛИЯНИЕ НИТРАТА АММОНИЯ
НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ГЕМОЛИМФЫ КАТУШЕК
PLANORBARIUS CORNEUS (MOLLUSCA: BULINIDAE)
ИНВАЗИРОВАННЫХ ТРЕМАТОДАМИ (ECHINOSTOMATIDAE)**

© А. П. Стадниченко, Л. Д. Иваненко, Н. Н. Сластенко, Г. Е. Киричук,
Д. А. Антонюк, Р. С. Баранюк, Е. В. Кризская, Т. А. Мошковская,
О. С. Радкевич

Исследовано влияние различных концентраций (200, 700, 1200 мг/л) нитрата аммония — токсиканта комбинированного действия (нервно-паралитического, локального, гемолитического) — на *Planorbarius corneus* в норме и при инвазии *Echinoparyphium aconiatum*. Симптомами острого отравления являются кратковременное значительное возрастание беспорядочной двигательной активности моллюсков с дальнейшим прогрессирующим ослаблением этой функции вплоть до полного их обездвиживания и разрушение кожного эпителия с образованием кровоточащих язв. Следствием нарушения водного баланса является обезвоживание мягкого тела и сокращение объема гемолимфы. У отравленных нитратом аммония катушек концентрация гемоглобина в гемолимфе остается неизменной, но в обеспеченности этим дыхательным пигментом общей массы и массы их мягкого тела установлены статистически достоверные сдвиги.

Признаки отравления прежде всего обнаруживаются у инвазированных редиями *E. aconiatum* особей. У них же более тяжело протекает патологический процесс и более высока смертность.

На оподзоленных грунтах Украинского Полесья повышение урожайности сельскохозяйственных культур достигается внесением в них преимущественно азотных минеральных удобрений, в первую очередь — нитрата аммония. Оптимальная норма их для этого региона составляет 250 кг/га. Превышение последней, равно как и кратности применения в сочетании с нарушением сроков обработки полей, сопровождаются загрязнением почв нитратами, избыток которых вымывается из корневого слоя и попадает при этом как в грунтовые воды, так и в континентальные пресные водоемы — естественные и искусственные. Предельно допустимая концентрация (ПДК) нитратов в водах санитарно-гигиенического предназначения составляет 45 мг/л (10 мг/л по азоту), а NH_4^+ — 2.6 мг/л (2 мг/л). Однако при высоком уровне сельскохозяйственного загрязнения водоемов она нередко значительно превышает, в связи с чем концентрация NO_3^- и NH_4^+ в таких водоемах (особенно небольших стоячих) иногда выше ПДК на 1—2 порядка и более. При этом нитрат аммония, содержащий два активно действующих начала — ионы NH_4^+ и NO_3^- — и будучи токсикантом комбинированного действия (локального, нервно-паралитического и гемолитического), вызывает у пресноводных моллюсков развитие патологического процесса с обширной и многогранной симптоматикой. Влияние этого токсиканта на физико-химические свойства их гемолимфы в норме и при инвазии трематодами до настоящего времени не исследовались.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1218 экз. катушек роговых *Planorbarius corneus* (Linné, 1785), собранных в бассейне Среднего Днепра (Житомирская обл.) в 1977—1996 гг. Моллюски были спонтанно инвазированы редиями *Echinoparyphium aconiatum* Dietz, локализованными в их гепатопанкреасе. Интенсивность инвазии слабая и умеренная (небольшие и среднего размера изолированные друг от друга очаги). Подобные сведения о материале исследования представлены в табл. 1.

Ориентировочный и основной токсикологические эксперименты поставлены по методике Алексеева (1981). Первым опытом установлены значения основных токсикологических показателей — МПК (LC_0) = 100, ЛК₅₀(LC_{50}) = 1000 и ЛК₁₀₀(LC_{100}) = 10000 мг/л. Для затравливания среды во втором опыте использован нитрат аммония (ч. д. а.) в концентрациях 200, 700 и 1200 мг/л. Токсические среды приготавливали на дехлорированной отстаиванием (24 ч) водопроводной воде (температура 18—20°, рН 7.2—7.4, содержание кислорода 8.6—8.9 мг/л). Продолжительность опытов 48 ч (с заменой отработанных растворов свежеприготовленными через 24 ч). Все опыты сопровождались контролем.

Гемолимфу получали методом прямого обескровливания. Активную реакцию ее устанавливали с помощью индикаторной бумаги «Рифан» и отчасти потенциометрически. Содержание гемоглобина в плазме гемолимфы выявляли солянокислого-гематиновым методом по Сали в модификации Алякринской (1970).

Результаты обработаны методами вариационной статистики по Лакину (1973). Приняты нижеследующие критерии надежности сдвига (Шефтель, Сова, 1976): 1) для «жестких» показателей (V до 50 %) — 90 %; 2) для пластичных (V до 50 %) — 95 %; 3) для малоинформативных (V более 50 %) — 99 %. К показателям первой группы отнесена активная реакция гемолимфы, ко второй — концентрация в ней гемоглобина.

Таблица 1
Общие сведения о материале исследований
Table 1. General data on investigated material

Инвазия	Диаметр раковины, мм	Общая масса тела, мг	Масса мягкого тела, мг	Объем гемолимфы, мл
Контроль				
Нет	25.41 ± 0.43	2661 ± 157	1001 ± 54.1	0.58 ± 0.05
Есть	26.23 ± 0.58	2901 ± 166	1059 ± 53.2	0.60 ± 0.37
200 мг/л				
Нет	24.81 ± 0.46	2608.8 ± 131.1	764.6 ± 64.1	0.47 ± 0.04
Есть	24.05 ± 1.24	2353.3 ± 294.8	659.9 ± 170.7	0.4 ± 0.04
700 мг/л				
Нет	26.7 ± 0.27	3087.6 ± 86.7	790.1 ± 79.7	0.39 ± 0.05
Есть	23.52 ± 0.93	2291 ± 284.5	794.8 ± 105	0.44 ± 0.17
1200 мг/л				
Нет	23.97 ± 0.36	2406.1 ± 84.1	873.9 ± 48.8	0.44 ± 0.03
Есть	23.96 ± 0.62	2457 ± 22.4	873.6 ± 84.4	0.4 ± 0.23

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что содержание гемоглобина в плазме гемолимфы катушек рода *Planorbarius* составляет 0.7—2.17 г% (Borden, 1931; Алякринская, 1970; Стадниченко и др., 1980, 1993). Поскольку оно подвержено возрастной, сезонной и биотопической изменчивости, в опытах использованы одновозрастные животные (табл. 1) из сходных по условиям среды водоемов, добытые в сжатые сроки.

Концентрация гемоглобина в гемолимфе неинвазированных катушек контрольной группы составляет 1.37 ± 0.08 г% (размах колебаний от 0.66 до 2.2). Активная реакция ее слабощелочная (рН 6.71 ± 0.11) при размахе колебания от слабокислой (рН 5) до щелочной (рН 8).

У моллюсков, зараженных редиями *E. aconiatum*, содержание гемоглобина в гемолимфе составляет 1.07 ± 0.41 г% (амплитуда колебания показателя от 0.48 до 2). Концентрация в ней водородных ионов на уровне 6.78 ± 0.31 (6—8).

Оказалось, что в контрольной группе животных у инвазированных особей наблюдается сдвиг вправо в системе «гемоглобин—оксигемоглобин» (табл. 2), о чем свидетельствует понижение его концентрации в гемолимфе в сравнении с незараженными катушками на 21.9 %, а также падение уровня обеспеченности гемоглобином на 31.6 % их мягкого тела ($P = 97.4$ %). Следовательно, при относительно невысокой интенсивности заражения трематодами (1—17 очагов паразитарного поражения гепатопанкреаса площадью каждый не более $1—1.5 \times 1.5—2$ мм) вредоносному воздействию последних их хозяева-катушки противопоставляют повышение уровня общего обмена веществ, в том числе аэробного расщепления углеводов, на что красноречиво указывают характер и направление изменений значений обсуждаемых показателей.

В соответствии с действующей ныне классификацией токсических веществ по силе воздействия, оказываемого ими на организмы (Метелев и др., 1971), нитрат

Таблица 2

Влияние трематодной инвазии и различных концентраций нитрата аммония на содержание гемоглобина в гемолимфе и обеспеченность им тела катушек роговых

Table 2. The influence of the trematode infection and different concentrations of ammonium nitrate onto haemoglobin concentration in haemolymph and provision of the flat-coil body with haemoglobin

Инвазия	Содержание гемоглобина, г%	Обеспеченность гемоглобином общей массы тела, г/кг	Обеспеченность гемоглобином мягкого тела, г/кг
Контроль			
Нет	1.37 ± 0.08	5.95 ± 0.22	15.51 ± 1.27
Есть	1.07 ± 0.41	3.96 ± 0.67	10.61 ± 1.81
200 мг/л			
Нет	1.23 ± 0.1	5.09 ± 0.58	15.81 ± 1.54
Есть	0.86 ± 0.62	4.01 ± 1.11	11.18 ± 3.06
700 мг/л			
Нет	1.12 ± 0.06	2.55 ± 0.29	7.21 ± 0.81
Есть	1.07 ± 0.17	5.06 ± 0.57	14.76 ± 1.79
1200 мг/л			
Нет	1.15 ± 0.09	4.91 ± 0.4	12.65 ± 1.02
Есть	1.18 ± 0.58	5.39 ± 0.62	14.36 ± 1.89

аммония для катушек роговых является слаботоксичным соединением. Однако в среде, содержащей его в количестве 200 мг/л, у 12 % незараженных и 25 % зараженных трематодами особей развивается острое отравление. Минутная фаза безразличия, оно начинается непродолжительной фазой стимуляции¹ (6—11 мин), характеризующейся резким возрастанием беспорядочной двигательной активности катушек, сменяющейся последовательно наступающими одна за другой фазами депрессии, сублетальной и летальной. На депрессивной фазе (6—35 ч) стремительно прогрессирует угнетение двигательной активности животных, которые задолго до ее завершения полностью обездвиживаются. Как известно, такие симптомы (сначала резкое возбуждение, впоследствии — глубокое торможение) характерны для отравлений, обусловленных токсикантами нервно-паралитического действия. На депрессивной фазе отравления у катушек обнаруживаются и симптомы локального повреждения ионами аммония — набухание, сморщивание, а затем — расползание кожного эпителия с образованием кровотокающих язв.

Кроме того, при всех использованных в наших опытах концентрациях токсиканта у всех (без исключения) подопытных животных наблюдается нарушение водного баланса. Об этом свидетельствуют обезвоживание их мягкого тела на 12.8—23.6 % у незараженных катушек и на 17.5—37.7 % — у зараженных (P = 94.5 %), а также сокращение объема гемолимфы (на 19—32.8 и 26.7—33.3 % соответственно).

У инвазированных трематодами особей симптомы острого отравления проявляются значительно быстрее, чем у свободных от заражения животных, и намного скорее наступает гибель таких животных (через 18—35 и 36—48 ч соответственно). Исходя из этого, а также из неодинаковой выживаемости в токсических средах зараженных и незараженных катушек (75 и 88 %), можно заключить, что даже невысокая интенсивность инвазии редуциями *E. aconiatum* значительно ослабляет защитно-приспособительные возможности организма катушек. У особей, сохранивших жизнеспособность после 48-часового пребывания в затравленной среде, отмечены небольшие (точечные) повреждения кожного эпителия (в основном набухание, реже — сморщивание, крайне редко — деструкция). В активной реакции гемолимфы, в содержании в ней гемоглобина и в обеспеченности им как общей массы, так и массы мягкого тела статистически достоверных сдвигов не выявлено.

При 700 мг/л токсиканта в среде продолжительность периода возбуждения в 2—3.5 раза короче: угнетение двигательной активности катушек наступает через 1.7—5.5 мин. На фазе депрессии (4.5—25 ч) животные остаются полностью неподвижными. Не реагируют они и на механические раздражения. Это обусловлено нервно-паралитическим действием токсиканта, что вызывает нарушение чувствительности, с одной стороны (отсюда отсутствие реакции катушек уже через короткий отрезок времени нахождения в затравленной среде), а с другой — паралич мышц из-за блокады и полного торможения ганглиев, управляющих двигательной сферой подопытных животных. Появившиеся в первые 1—3 ч токсического воздействия на моллюсков точечные поражения кожи в дальнейшем быстро увеличиваются в размерах и, сливаясь, образуют обширные очаги поражения. Площадь таких расплывшихся участков кожи достигает 30—58 % от общей поверхности тела животных. Естественно, что при этом резко ухудшаются условия диффузного потребления катушками кислорода. Однако выдержавшие условия экстремальной среды особи не увеличивают интенсивность поглощения кислорода через легкое. Концентрация гемоглобина в их гемолимфе остается на прежнем уровне. Обеспеченность гемоглобином тотальной массы и массы мягкого тела у незараженных особей падает по сравнению с контролем в 2.3 и в 2.2 раза соответственно (P больше 99.9 %). Следовательно, и при этой концентрации токсиканта они противопоставляют его повреждающему действию повышение интенсивности общего обмена. У инвазированных трематодами моллюсков отмечены более слабые из-

¹ Фазность патологического процесса, вызванного отравлением, принята по Веселову, 1968.

Таблица 3

Влияние трематодной инвазии и различных концентраций нитрата аммония на активную реакцию (рН) гемолимфы катушки роговой

Table 2. The influence of the trematode infection and different concentrations of ammonium nitrate onto haemolymph activ reaction (pH) of flat-coils

Инвазия	Концентрация токсиканта, мг/л			
	0	200	700	1200
Нет	6.71 ± 0.11	6.27 ± 0.38	4.98 ± 0.49	6.86 ± 0.3
Есть	6.78 ± 0.31	5.25 ± 1.16	6.75 ± 0.27	7 ± 0.15

менения обсуждаемых показателей: обеспеченность гемоглобином общей массы тела сокращается у них в среднем на 30, а массы мягкого тела — на 40 %. Следовательно, у зараженных животных не срабатывает вышеупомянутый защитно-приспособительный механизм, направленный на сохранение гомеостаза их внутренней среды.

При концентрации 700 мг/л нитрата аммония в среде у животных наблюдается (табл. 3) подкисление гемолимфы ($P = 96.4 \%$), в то время как у инвазированных катушек она остается на уровне нормы. Можно предположить, что у первых из них действие токсического фактора сглаживается защитно-приспособительным механизмом (Биргер, 1979; Маляревская, 1977), основанным на частичном использовании ими анаэробного пути расщепления углеводов, при котором образуются продукты кислой природы. У зараженных же катушек, по-видимому, этот защитный механизм оказался блокированным.

В растворе нитрата аммония концентрацией 1200 мг/л у одной части особей (53 %) продолжительность фазы стимуляции сокращается до 30 с—1 мин, у другой же она полностью отсутствует. В последнем случае животные, помещенные в токсическую среду, немедленно подвергаются оцепенению. Обширные поражения кожных покровов развиваются при этом всего лишь за 1—2 ч с момента постановки опыта. Они охватывают до 60—75 % общей поверхности их тела, временами — до 80—95, а иногда даже до 100 %.

Содержание гемоглобина в гемолимфе у всех подопытных животных остается в норме. Но существенно возрастает обеспеченность им их общей массы и массы мягкого тела, что свидетельствует о значительном снижении ими интенсивности аэробного расщепления универсального энергетического субстрата — гликогена. Сохранение жизнеспособности некоторыми животными (19 %) до конца экспозиции (48 ч) и в течение последующих 12—25 ч связано, как нам представляется, с частичным «переключением» энергетического обмена с аэробного дыхания на гликолиз. Интересно, что при такой тяжести патологического процесса как у незараженных, так и у зараженных особей не нарушается функционирование буферных систем гемолимфы (активная реакция ее остается у них слабощелочной, как и у особей контрольной группы) (табл. 3).

Список литературы

- Алексеев В. А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. 1981. Т. 17, № 3. С. 92—100.
- Алякринская И. О. Количественная характеристика гемолимфы и гемоглобина роговой катушки *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) // Зоол. журн. 1970. Т. 49, № 3. С. 349—354.
- Биргер Т. И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. Киев: Наук. думка, 1979. 190 с.
- Веселов Е. А. Основные фазы действия токсических веществ на организмы // Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. по вопр. водн. токсикологии. М.: Наука, 1968. С. 15—16.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.

- Маляревская А. Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журн. 1977. Т. 21, № 3. С. 70—82.
- Метелев В. В., Канаев А. И., Дзасохова Н. Г. Водная токсикология. М.: Колос, 1971. 247 с.
- Стадниченко А. П., Иваненко Л. Д., Бургомистренко Л. Г. Изменение физико-химических свойств гемолимфы *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) при инвазии парthenитами *Cotylurus cornutus* (Trematoda, Strigeidae) // Паразитология. 1980. Т. 14, вып. 1. С. 66—70.
- Стадниченко А. П., Иваненко Л. Д., Василенко О. Ф., Зинич М. М., Вишневская А. Е., Киричук Г. Е., Мыслинская Л. Н., Семений Т. А. Влияние различных концентраций сульфата цинка на физико-химические свойства гемолимфы катушек *Planorbarius* (Mollusca: Bulinidae) в норме и при инвазии трематодами // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 5. С. 404—409.
- Шефтель В. О., Сова Р. Е. Критерий надежности как функция биологической значимости и варибельности признака // Применение математических методов оценки и прогнозирования реальной опасности накопления пестицидов во внешней среде и организме. Киев: АСХН УССР, 1976. С. 37—39.
- Borden M. A. A study of the respiration and of the function of haemolymph in *Planorbis corneus* and *Arenicola marina* // J. Marine Biol. Assoc. U. K. 1931. Vol. 17. P. 700—738.

Житомирский пединститут, 262008

Поступила 13.05.1997

AN INFLUENCE OF THE AMMONIUM NITRATE ONTO PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF HAEMOLYMPH OF THE FLAT-COIL *PLANORBARIUS CORNEUS* (MOLLUSCA: BULINIDAE) INFECTED WITH TREMATODES (ECHINOSTOMATIDAE)

A. P. Stadnichenko, L. D. Ivanenko, N. N. Slastenko, G. E. Kirichuk, D. A. Antonyuk, R. S. Baranyuk, E. V. Krizovskaya, T. A. Moshkovskaya, O. S. Radkevich

Key words: ammonium nitrate, haemolymph, *Planorbarius corneus*, Bulinidae, trematodes, Echinostomatidae.

SUMMARY

An influence of different concentrations of the ammonium nitrate (200, 700, 1200 mg/l) onto the flat-coil *Planorbarius corneus* infected with *Echinoparyphum aconiatum* parthenites and in a control was investigated. The beginning of poisoning of molluscs is demonstrated in increasing of moving activity, then their activity decreases and completely disappears. The molluscs loose the water, that appeared in decreasing of the soft body mass (by 12.8—37.7 %) and haemolymph volume (by 19—33.3 %). Symptoms of hard poisoning appeared earlier in infected flat-coils.