

УДК 591.111.05 : 576.895.122 : 594.38

**ВЛИЯНИЕ НИТРАТА АММОНИЯ
НА СОДЕРЖАНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА В ГЕМОЛИМФЕ
КАТУШКИ ПУРПУРНОЙ (MOLLUSCA: PULMONATA: BULINIDAE)
В НОРМЕ И ПРИ ИНВАЗИИ ТРЕМАТОДАМИ**

© А. П. Стадниченко, Г. Е. Киричук

Исследованы последствия одновременного воздействия различных концентраций нитрата аммония (2000, 4000, 6000 мг/л) и трематодной инвазии на содержание остаточного азота, мочевины и азота мочевины в гемолимфе пресноводного брюхоногого моллюска *Planorbarius purpura*.

Установлено, что физиологическая норма остаточного азота (ОА) в гемолимфе катушки пурпурной колеблется в пределах 10—29 ммоль/л. В контрольной группе животных содержание ОА у незараженных моллюсков на 17 % ниже, чем у зараженных, а мочевины и азота мочевины на 37 %.

Выяснено, что нитрат аммония для катушки пурпурной является реагентом слаботоксичным.

При воздействии токсиканта концентрацией 2000 мг/л явление гиперазотемии прослеживается как у неинвазированных, так и у инвазированных животных. Нарастание концентрации поллютанта (4000—6000 мг/л) по-разному влияет на исследуемые показатели. Так, у свободных от инвазии животных эти показатели опускаются до нормы, а у инвазированных уровень этих показателей понижается сначала до нормы (при 4000 мг/л), а потом при 6000 мг/л наблюдается незначительная гипоазотемия.

Загрязнение водной среды минеральными удобрениями из-за нарушения правил их транспортировки и применения сопровождается негативными изменениями структуры популяций пресноводных моллюсков. Это обусловлено возрастанием отхода животных, вызванного несовместимыми с жизнью нарушениями гомеостаза их внутренней среды, спровоцированными действием токсических факторов. О состоянии гомеостаза можно составить представление по уровню содержания остаточного азота (ОА) в гемолимфе этих гидробионтов, который зависит от накопления в ней различных токсических продуктов белкового обмена. Известно, что пресноводные легочные моллюски являются облигатными промежуточными хозяевами трематод, партениты (редии и спороцисты) и расселительные личинки (церкарии) которых локализуются преимущественно в гепатопанкреасе этих животных. В связи с этим интересно выяснить, какое действие оказывает инвазия на интенсивность белкового обмена при воздействии на пресноводных брюхоногих моллюсков токсическими средами разной концентрации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал: 92 экз. катушки роговой *Planorbarius purpura* (O. F. Müller, 1774), собранных вручную в июле—августе 1999 г. в р. Крошенка (окрест. Житомира, Соколовка). В лабораторию животных доставляли в полиэтиленовых пакетах (без воды). Токсикологические опыты поставлены по Алексееву (Алексеев, 1981). В качестве токсиканта использован нитрат аммония (аммоний нитрат NH_4NO_3 , ч. д. а.). Ориен-

тировочным опытом установлены значения основных токсикологических показателей — МПК (LC_0) = 1000 и ЛК₁₀₀ (LC_{100}) = 10 000 мг/л. Значение ЛК₅₀ (LC_{50}) = 5000 мг/л установили графически по методу Прозоровского (Прозоровский, 1960). Для основного опыта были избраны 3 концентрации, укладывающиеся в пределы МПК—ЛК₅₀: 2000, 4000, 6000 мг/л. Все растворы приготавливались на дехлорированной путем отстаивания (1 сут) водопроводной воде. Продолжительность экспозиции 2 сут. Через сутки среды заменяли свежеприготовленными. Все опыты сопровождалось контролем.

Гемолимфу получали прямым обескровливанием. Содержание в ней ОА устанавливали по цветной реакции с диацетилмонооксидом мочевины и азота мочевины уреазным методом (Колб, Камышников, 1976).

Зараженность моллюсков партенитами и личинками трематод выявляли путем микроскопирования (ув. 7×8) временных гистологических препаратов, изготовленных из тканей их гепатопанкреаса. Определение видовой принадлежности трематод осуществляли только на живом материале.

Цифровые результаты исследования обработаны методами вариационной статистики по Лакину (1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что у брюхоногих моллюсков компонентами ОА являются аммиак, мочевины, мочевиная кислота, пурины и аминокислоты (Baldwin, 1935, 1947; Needham, 1935; Jezewska, 1969; Jezewska e. a., 1963). Количественные отношения конечных продуктов азотистого обмена животных определяются доступностью воды. У аммонителлических гидробионтов, в том числе и у пресноводных брюхоногих моллюсков, преобладающей составной частью ОА является аммиак, на долю которого приходится в среднем около 70 % небелкового азота. Доля мочевиной кислоты составляет 56 %, аминокислот и пуринов — 2—3, а мочевины — 20—22 %. Следует отметить, однако, что эти животные не способны синтезировать мочевины посредством орнитинового цикла и образуют ее только из экзогенного орнитина, поступающего в их организм с пищей (Проссер, Браун, 1967). Большая часть продуктов их азотистого обмена легко диффундирует в водную среду через кожные покровы, остальное выделяется с мочой.

У *P. purpura* обследованной нами популяции физиологическая норма ОА колеблется в пределах 10—29 ммоль/л, составляя в среднем 15.29 ± 0.61 ммоль/л (табл. 1). Как правило, концентрация ОА в гемолимфе *P. purpura* возрастает в период интенсивного функционирования гонад, а также при обильном поедании этими животными богатой белками пищи (Стадниченко, 1977). Именно поэтому использованные в наших опытах животные были собраны в сжатые сроки.

В контрольной группе моллюсков помимо незараженных особей были представлены также *P. purpura*, инвазированные ридиями и церкариями Echinostomatidae sp. У них обнаружена гиперазотемия, обусловленная, как мы полагаем, двумя причинами. Во-первых, при инвазии наблюдаются дегенеративно-деструктивные и некротические процессы в пораженном трематодами гепатопанкреасе, что сопровождается поступлением в гемолимфу азотсодержащих продуктов распада белков. Во-вторых, при инвазии средней тяжести моллюски противопоставляют действию паразитарного фактора повышение уровня общего метаболизма. Следовательно, такие *P. purpura* потребляют больше пищи и больше образуют продуктов расщепления белка. Разница в содержании ОА между исследованными незараженными и зараженными особями составляет 17 % ($P = 94.5$ %), мочевины и азота мочевины — 37 (P больше 99.9 %). Приведенные данные, касающиеся мочевины и азота мочевины, отлично согласуются со сведениями о возрастании потребления пищи инвазированными особями. Например, у инвазированных трематодами катушек потребление кубышки возрастает в 1.4, кладофоры — в 1.5, ряски — в 3 раза (Стадниченко, 1977). Увеличение кормового рациона влечет за собой поступление в организм зараженных животных дополнитель-

Таблица 1
Влияние различных концентраций аммоний нитрата на содержание остаточного азота (ммоль/л) в гемолимфе *Planorbarius purpura* в норме и при инвазии трематодами

Table 1. The influence of different ammonium nitrate concentrations on the content of residual nitrogen (mmol/l) in the haemolymph of *Planorbarius purpura* in normal and the trematode-infected individuals

Инвазия	Статистические показатели			
	lim	$\bar{x} \pm m$	σ	CV
Контроль				
Нет	10.11—19.04	15.29 ± 0.61	3	19.62
Есть	14.58—19.04	17.79 ± 1.02	2.29	14
2000 мг/л				
Нет	16.06—28.56	19.53 ± 0.99	3.96	20.28
Есть	14.28—21.42	18.99 ± 1.6	3.19	16.8
4000 мг/л				
Нет	13.09—20.23	15.47 ± 0.5	2.08	14.45
Есть	14.28—19.04	17.1 ± 1.04	2.34	13.68
6000 мг/л				
Нет	14—18.12	16.04 ± 0.39	1.51	9.41
Есть	14—18.12	15.95 ± 0.79	1.78	11.15

ных количеств аргиназы — субстрата, за счет которого повышается уровень содержания в их гемолимфе мочевины (табл. 2), а значит, и азота мочевины (табл. 3).

По шкале токсичности отравляющих веществ для гидробионтов (Метелев и др., 1971) нитрат аммония для *P. purpura* является реагентом слаботоксичным. Это токсикант комбинированного действия (локального и нервно-паралитического), проникающий в организм моллюсков путем диффузии через покровы их тела. При этом при всех использованных в опытах концентрациях этого токсиканта (при 2000 мг/л — через 18 ч, при 4000 — через 12, при 6000 мг/л — через 6 ч) в наиболее уязвимых участках (околощупальцевые области и края дыхательного сифона) развиваются дегенеративно-деструктивные и некротические изменения мерцательного эпителия, который сперва набухает, а затем сморщивается и слущивается, что приводит к образованию многочисленных точечных язв и небольших кровотечений. Признаки нервно-паралитического действия на *P. purpura* этого токсиканта наблюдаются при 4000 и 6000 мг/л в среде. Это замедление двигательной активности моллюсков (особенно при большей из указанных концентраций) и ослабление их реакций на механическое раздражение (укол иглой). В случаях тяжелой инвазии (тотальное поражение гепатопанкреаса) вышеозначенные симптомы проявляются ранее во времени и, как правило, отчетливее выражены, чем у незараженных особей.

При 2000 мг/л нитрата аммония в растворах у всех подопытных моллюсков наблюдается гиперазотемия. Уровень ее, однако, различен у сравниваемых групп животных: если у незараженных особей он достигает 27.7, то у зараженных составляет всего лишь 8.6 % (Р больше 99.9 %). При затравливании животных более высокими концентрациями этой соли (4000 и 6000 мг/л) уровень азотемии у них снижается, и опять-таки по-разному у свободных от инвазии и инвазированных особей. У первых из них при 4000 мг/л токсиканта в среде он опускается до нормы и удерживается в этих пределах при повышении концентрации токсиканта до 6000 мг/л. У вторых —

Таблица 2

Влияние различных концентраций аммоний нитрата на содержание мочевины (ммоль/л) в гемолимфе *Planorbarius purpura* в норме и при инвазии трематодами

Table 2. The influence of different ammonium nitrate concentrations on the content of urea (mmol/l) in the haemolymph of *Planorbarius purpura* in normal and the trematode-infected individuals

Инвазия	Статистические показатели			
	lim	$\bar{x} \pm m$	σ	CV
Контроль				
Нет	1.41—6.02	3.67 ± 0.29	1.44	39.24
Есть	3.47—5.55	5.03 ± 0.42	1.03	20.48
2000 мг/л				
Нет	4.2—7.3	5.76 ± 0.45	1.8	31.25
Есть	3.1—6.8	5.45 ± 0.82	1.63	29.9
4000 мг/л				
Нет	2.78—6.4	3.9 ± 0.23	0.96	24.62
Есть	3.33—5.55	4.71 ± 0.47	1.06	22.51
6000 мг/л				
Нет	3.2—5.12	4.15 ± 0.18	0.69	16.63
Есть	3.2—5.12	4.12 ± 0.4	0.89	21.6

Таблица 3

Влияние различных концентраций аммоний нитрата на содержание азота мочевины (ммоль/л) в гемолимфе *Planorbarius purpura* в норме и при инвазии трематодами

Table 3. The influence of different ammonium nitrate concentrations on the content of urea nitrogen (mmol/l) in the haemolymph of *Planorbarius purpura* in normal and the trematode-infected individuals

Инвазия	Статистические показатели			
	lim	$\bar{x} \pm m$	σ	CV
Контроль				
Нет	0.97—2.68	1.73 ± 0.12	0.6	34.68
Есть	1.62—2.59	2.34 ± 0.2	0.48	20.51
2000 мг/л				
Нет	1.94—4.4	2.68 ± 0.21	0.85	31.72
Есть	1.55—3.1	2.55 ± 0.48	0.95	37.25
4000 мг/л				
Нет	1.29—2.84	1.82 ± 0.11	0.46	25.27
Есть	1.55—2.59	2.13 ± 0.21	0.46	21.6
6000 мг/л				
Нет	1.49—2.39	1.95 ± 0.09	0.33	16.92
Есть	1.54—2.39	1.92 ± 0.17	0.38	19.79

при средней из использованной в опытах концентраций нитрата аммония ОА снижается до уровня нормы, но при максимальной концентрации наблюдается гипозотемия, составляющая около 7 %. Как видим, общий характер изменения концентрации мочевины (и количества азота мочевины) во внутренней среде *P. purpura* аналогичны таковым ОА небелкового азота (табл. 1—3).

Своеобразный характер описанных выше изменений обусловлен фазностью вызванного отравлением животных патологического процесса. В развитии последнего отмечают 5 фаз (Веселов, 1968), три начальные из которых зарегистрированы в наших опытах: 1) фаза безразличных концентраций (до 1000 мг/л аммоний нитрата); 2) фаза стимуляции (при 2000 мг/л); 3) фаза депрессии (при 4000—6000 мг/л). Фаза стимуляции наблюдается при таком уровне концентраций токсиканта, при котором повреждающему воздействию затравленной среды организм противопоставляет активизацию всех его физиолого-биохимических процессов, ответственных за сохранение его жизнеспособности. У *P. purpura* эта фаза отмечена при 2000 мг/л нитрата аммония. Весьма показательным является то, что повышение концентрации ОА идет у них не столько за счет резидуального азота, сколько за счет мочевины, что свидетельствует об интенсификации потребления моллюсками пищи. Из приведенных в табл. 1—3 цифр вытекает, что стимуляция ярче выражена у незараженных особей, в то время как у зараженных трематодами наблюдается напряженность защитно-приспособительного процесса. При 6000 мг/л токсиканта в среде у инвазированных трематодами моллюсков отчетливо выражена фаза депрессии, при которой уровень гипозотемии составляет у них 3.73 %.

Следовательно, инвазированные животные являются менее устойчивыми относительно воздействия на них токсикантами. У них намного ранее во времени и при более низких концентрациях отравляющих веществ в среде проявляются симптомы отравления, а также стремительнее развивается патологический процесс. Тяжесть и продолжительность последнего прямо пропорциональна интенсивности инвазии.

Список литературы

- Алексеев В. А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. 1981. Т. 17, № 3. С. 92—100.
- Веселов Е. А. Основные фазы действия токсических веществ на организмы // Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. по вопр. возн. токсикол. М.: Наука, 1968. С. 15—16.
- Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. М.: Беларусь, 1976. 312 с.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.
- Метелев В. В., Канаев А. И., Дзасохова Н. Г. Водная токсикология. М.: Колос, 1971. 247 с.
- Прозоровский В. Б. О выборе метода построения кривой летальности и определения средней летальной дозы // Журн. общ. биол. 1960. Т. 21, № 3. С. 221—228.
- Проссер Л., Браун Ф. Сравнительная физиология животных. М.: Мир, 1967. 776 с.
- Стадниченко А. П. Изменение содержания небелкового азота в гемолимфе пресноводных моллюсков при инвазии их паразитами и личинками трематод // Материалы ВОГ. М.: АН СССР, 1977. Вып. 29. С. 147—153.
- Baldwin E. Problems of nitrogen catabolism in invertebrates, with a new method for its determination // Biochem. J. 1935. Vol. 29. P. 252—262.
- Baldwin E. Dynamic aspects of biochemistry. London and N. Y.: Cambr. Univ. Press, 1947. 250 p.
- Needham J. Problems of nitrogen catabolism in invertebrates. II. Correlation between weicotelic and habitat in the Phylum Mollusca // Biochem. J. 1935. Vol. 29. P. 238—251.
- Jezevska M. M. Koncowe produkty metabolizmu bialkowego u brzuchogów Gastropoda // Monogr. Biochem. 1969. N 21. P. 9—46.
- Jezevska M. M., Gorzkowski B., Heller J. Nitrogen compounds in the snail *Helix pomatia* // Acta Biochem. Polon. 1963. Vol. 10. P. 55—65.

Житомирский государственный педагогический университет
им. Ивана Франко, 262008

Поступила 9.03.2000

THE EFFECT OF AMMONIUM NITRATE ON RESIDUAL NITROGEN CONTENT
IN THE HAEMOLYMPH OF PLANORBARIUS PURPURA
(MOLLUSCA: PULMONATA: BULINIDAE)
IN NORMAL AND TREMATODE-INFECTED INDIVIDUALS

A. P. Stadnichenko, G. E. Kirichuk

Key words: Mollusca, *Planorbarius purpura*, metabolism, ammonium nitrate, trematode infection.

SUMMARY

The effect of the ammonium nitrate (concentrations 2000, 4000, 6000 mg/l) on the content of urea, urea nitrogen and residual nitrogen in the haemolymph of normal *Planorbarius purpura* and in trematode-infected individuals.

It is shown, that stimulation of metabolic processes is more expressed in uninfected specimens, while the trematode-infected ones, the protective process is strained. When the toxin concentration reaches 6000 mg/l, the trematode infected specimens enter the phase of depression with 3.73 % hyponitrogen level.
