

АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ У ТКАНИНАХ КОРОПІВ ЯК БІОМАРКЕР ГЕРБИЦИДНОГО ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМ

Т.В. МІЩЕНКО, А.В. ЗАВОРОТИНСЬКИЙ, А.О. ЖИДЕНКО

*Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка
14001, Україна, м. Чернігів, taimi@inbox.ru*

Встановлено зміни активності каталази у тканинах цьоголіток коропів під впливом раундапу відносно контролю, проведено кореляційний, дисперсійний, регресійний аналізи для виявлення взаємозв'язку між показниками активності ферменту і концентрацією гербицидів та прогнозування взаємозалежних змін цих величин. Найбільший зв'язок між корелюючими параметрами характерний для нирок, а тому у моніторингу забруднення водойм раундапом доцільно використовувати саме тканину цього органу. Виведено моделі лінійної регресії різної складності для розрахунку концентрації раундапу у воді за показниками активності каталази у тканинах коропів.

Ключові слова: короп, каталаза, раундап, кореляційний аналіз, дисперсійний аналіз, регресійний аналіз.

Вступ. Сьогодні існує потреба в оцінюванні наслідків антропогенних впливів на гідроекосистеми, причому необхідні результати не лише гідрохімічного аналізу, а й інтегральні, біологічні показники (Биологический..., 2007). Одним з важливих напрямків такого оцінювання є біоіндикація. Цей метод дозволяє оцінити екологічний стан середовища за реакціями організмів, що в ньому перебувають, на всіх рівнях їх біологічної організації. Переважна більшість методик біомоніторингу базується на використанні водних безхребетних (дафній, молюсків, гіллястовусих ракоподібних, фітопланктону, фітофільних макробезхребетних, зоопланктону та ін.), мікро- і макроводоростей, вищих водних рослин (Методи..., 2006; Перспективи..., 2008). Використання іхтіофауни розвинено значно гірше, хоча має свої переваги: відносно великі розміри об'єктів і тривалість життя, зручність використання, легкість визначення видової приналежності, можливість проведення досліджень з використанням мінімуму лабораторного обладнання, відносна легкість визначення структурних характеристик популяцій риб (Брагинский, Игнатюк, 2005). Взагалі, за умов комплексного використання природних вод та погіршення їх екологічного стану як тест-об'єкти доцільно використовувати організми, що інтегрують у собі особливості екосистеми, несприятливі ефекти комплексу різноманітних впливів, у тому числі токсичних, мають досить високу чутливість до змін умов середовища. Цим вимогам відповідають риби, що є кінцевим продуктом трофічних ланцюгів більшості водних екологічних систем (Котова и др., 1989). До того ж риби володіють резистентністю до сублетальних впливів різних речовин, можуть бути використані для прогнозування дії поллютантів на

водну екосистему і здоров'я людини, що вживає цю рибу в їжу (Кашулин и др., 1999).

Недоцільне використання пестицидів може призвести до значної трансформації екосистем. У невеликих кількостях вони пригнічують імунну систему організму, в більш високих проявляють мутагенний і канцерогенний ефекти (Broch at al., 2000; Tsui, Chu, 2003). Процеси пероксидного окислення ліпідів і стан антиоксидантної системи є інформативними показниками оцінки ступеня впливу токсикантів на організм, які можуть бути використані в розробці програм біомоніторингу. Метою нашого дослідження було виявлення найбільш показових маркерів забруднення водойм гербицидами за допомогою статистичних методів аналізу серед показників активності каталази у тканинах цьоголіток коропів під впливом гербициду раундап.

Об'єкт і методи. Дослідження проводилися на цьоголітках коропів (*Cyprinus carpio*), вирощених ВАТ «Чернігіврибгосп». Риба знаходилася в акваріумах ємністю 200 дм³ з відстояною водопровідною водою, яку постійно аерували і змінювали кожні три доби. Величина рН становила 7,50 ± 0,25, вміст кисню 5,6 ± 0,4 мг/дм³, температура відповідала природній (6,5-9,1 °С). Коропів розміщували з розрахунку 20 дм³ води на одну особину в трьох варіантах: 1) контроль (без внесення раундапу), 2) дія 1 ГДК раундапу (гранично допустима концентрація, 0,02 мг/дм³), 3) дія 2 ГДК раундапу. Діюча речовина раундапу – ізопропіламінна сіль гліфосату, 480 г/дм³, N-(фосфонометил)гліцин. Необхідну концентрацію гербициду створювали шляхом внесення розрахованої кількості 36% розчину раундапу і підтримували 14 діб. Активність каталази визначали у гомогенатах п'яти тканин: м'язів, печінки, мозку, зябер, нирок.

Визначення активності каталази проводили шляхом додавання до досліджуваної проби розчину пероксиду водню, реакцію зупиняли рівно через 10 хвилин внесенням розчину молібдату амонію. Через 5 хвилин додавали розчин трихлороцтової кислоти і центрифугували при 3000 об./хв. протягом 15 хвилин, після чого вимірювали оптичну густину досліджуваних та контрольної проб щодо відповідних нульових проб при 410 нм. Активність каталази розраховували за отриманими значенням оптичної густини (Агеев и др., 2008).

Статистичну обробку результатів проводили методами статистичного аналізу даних за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel (результати вважали достовірними і статистично значущими при $p \leq 0,05$): достовірне розходження між середніми арифметичними величинами показників експериментальних і контрольних груп коропів визначали за допомогою t-критерію Стюдента; зв'язок між показниками метаболізму коропів і концентрацією гербіцидів визначали за допомогою кореляційного аналізу даних; вплив концентрації гербіцидів на показники коропів перевіряли однофакторним дисперсійним аналізом; прогнозування залежності між величинами показників коропів і концентрацією гербіциду здійснювали за допомогою лінійного регресійного аналізу та множинного регресійного аналізу.

Результати та їх обговорення. Отримані результати визначення активності каталази за дії 2 ГДК раундапу показали наступне. Активність ферменту достовірно знижується в зябрах в 1,5 і нирках – у 2,3 рази щодо контролю, в інших досліджуваних тканинах достовірні зміни не відбуваються. При цьому концентрація продуктів ПОЛ в тканинах змінюється по-різному. Так, відбувається накопичення гідропероксидів ліпідів: збільшення в мозку в 1,9 рази, в зябрах – в 1,6 і нирках – в 1,6 рази щодо контролю, а в м'язах і печінці, навпаки, спостерігається зниження величини показника відповідно в 2,3 і 2,0 рази. Отже, для перших трьох тканин характерний розвиток ПОЛ на стадії утворення гідропероксидів

ліпідів, що може бути пов'язано зі зниженням активності каталази в зябрах і нирках. Відомо, що у тварин збільшення рівня поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) корелює з посиленням процесів ПОЛ. Риби є сприйнятливими до ПОЛ і більш залежними від антиоксидантного статусу організму, оскільки в складі ліпідів риб вміст ПНЖК вище, ніж у ссавців.

Для встановлення взаємозв'язку між показниками активності каталази у тканинах цьоголіток коропів і концентрацією гербіцидів (0 ГДК, 1 ГДК, 2 ГДК) та прогнозування подальших взаємозалежних змін цих величин нами були проведені кореляційний, дисперсійний і регресійний аналізи ($p < 0,05$). Кореляційний аналіз активності каталази у тканинах коропів та концентрації раундапу показав, що найбільший зв'язок між цими величинами характерний для нирок ($r = -0,972$, сильний негативний зв'язок) (табл. 1). Виходячи з цього, були проведені дисперсійний та регресійний аналізи для даного показника. Дисперсійний аналіз засвідчив, що дійсно, середні значення активності каталази в нирках залежать від концентрації раундапу ($p < 0,05$). Регресійний аналіз дозволяє спрогнозувати концентрацію раундапу у воді залежно від зміни активності каталази у нирках. Рівняння регресійної залежності має вигляд:

$$K_p = 0,07 - 0,23 * T_n, \quad (1)$$

де K_p – концентрація раундапу ($\text{мг}/\text{дм}^3$) у водному середовищі; T_n – активність каталази у нирках коропів ($\text{ммоль } \text{H}_2\text{O}_2/\text{см}^3 * \text{с}$). Величина адекватності регресійного рівняння $R^2 = 0,94$, що свідчить про високу апроксимацію.

Отже, з усіх досліджуваних тканин для моніторингу забруднення водою гербіцидом раундапу найбільш доцільно використовувати показник активності каталази у нирках цьоголіток коропів. Рівняння регресійної залежності дозволяє розрахувати вміст раундапу у воді за експериментально встановленим показником активності каталази у нирках коропів.

Табл. 1.

*Кореляційна матриця залежності між концентрацією раундапу ($\text{мг}/\text{дм}^3$) та активністю каталази у тканинах коропів ($\text{ммоль } \text{H}_2\text{O}_2/\text{см}^3 * \text{с}$)*

Tab. 1.

*The correlation matrix relationship between the concentration of roundup (mg/dm^3) and catalase activity in carp tissues ($\text{mmol } \text{H}_2\text{O}_2/\text{sm}^3 * \text{sec}$)*

	Раундап	М'язи	Печінка	Мозок	Зябра	Нирки
Раундап	1					
М'язи	0,463	1				
Печінка	-0,768	-0,483	1			
Мозок	-0,783	-0,289	0,562	1		
Зябра	-0,870	-0,314	0,756	0,703	1	
Нирки	-0,972	-0,358	0,748	0,762	0,860	1

Також був проведений множинний регресійний аналіз даних показників: залежна змінна – концентрація раундапу; незалежні змінні – показники активності каталази у м'язах, печінці, мозку, зябрах, нирках. Результати лінійного регресійного аналізу отримано за допомогою програми SPSS. Оскільки для виконання аналізу був обраний метод включення незалежних змінних в регресійну модель STEPWISE, в результаті отримано кілька регресійних моделей. Відповідно до мети дослідження, основним результатом аналізу є друга регресійна модель, яка включає дві незалежні змінні (табл. 2).

Табл. 2. *Зведена таблиця моделі* **Табл. 2.** *Summary of models*

Модель	<i>H</i>	<i>R</i> -квадрат	Скоригований <i>R</i> -квадрат	Стд. помилка оцінки
1	0,972 ^a	0,945	0,943	0,00395
2	0,980 ^b	0,960	0,958	0,00341

Примітка:

a. Предиктори: (конст) нирки

b. Предиктори: (конст) нирки, м'язи

c. Залежна змінна: концентрація раундапу

У зведеній таблиці моделі представлені показники, які характеризують якість побудованих регресійних моделей. Значення коефіцієнта детермінації (*H*) складає 0,980 (можливі значення від нуля до одиниці), що свідчить про наявність сильного лінійного взаємозв'язку між показником концентрації раундапу та активністю каталази у тканинах нирок та м'язів. Коефіцієнт *R*-квадрат складає 0,960. Це означає, що регресійна модель описує 96,0 % випадків, тобто концентрації раундапу у воді. Показники коефіцієнта детермінації та коефіцієнта *R*-квадрат для першої моделі нижчі, ніж для другої. Також значення стандартної помилки розрахунків першої моделі вище, ніж другої. Це вказує на доцільність включення в регресійну модель зазначених незалеж-

них змінних. Регресійні моделі, побудовані на основі отриманих даних, вірні для всієї генеральної сукупності в цілому.

Стандартизовані коефіцієнти регресії (Бета) показують відносну значимість незалежних змінних, включених в регресійну модель, тобто вони вказують на те, як сильно впливають досліджувані фактори (незалежні змінні) на стогову величину (залежну змінну) (табл. 3).

У нашому випадку найбільшу значимість має перша незалежна змінна (Бета = -0,924). Це означає, що практично концентрація раундапу визначається значенням активності каталази в нирках з поправкою на значення активності каталази в м'язах. У табл. 3 також представлені нестандартні коефіцієнти регресії (*B*). Вони є найбільш важливими показниками результатів аналізу, оскільки використовуються для побудови регресійної моделі (регресійного рівняння).

Результатом лінійного регресійного аналізу є модель лінійної регресії (регресійне рівняння):

$$Y=0,048-0,220*X_1+0,336*X_2, \quad (2)$$

де

Y – концентрація раундапу;

*X*₁ – значення активності каталази у нирках;

*X*₂ – значення активності каталази у м'язах.

Регресійна модель є універсальною, оскільки описує 96,0 % випадків, тобто концентрації раундапу. Вона може бути використана спеціалістами-екологами для прогнозування концентрації раундапу у воді на основі значень активності каталази в нирках та м'язах коропів.

Висновки. Таким чином, активність каталази у тканинах цього літоку коропів під впливом раундапу зазнає змін відносно контролю, що дозволило провести детальний статистичний аналіз для встановлення взаємозв'язку між показниками активності ферменту і концентрацією гербіцидів та прогнозування подальших взаємозалежних змін цих величин.

Табл. 3 *Коефіцієнти множинної лінійної регресійної моделі*

Табл. 3. *The indexes of multiple linear regression model*

Модель		Нестандартизовані коефіцієнти		Стандартизовані коефіцієнти	t	Знч.
		<i>B</i>	Стд. помилка	Бета		
1	(Константа)	0,065	0,002		32,786	0,000
	нирки	-0,231	0,010	-0,972	-24,108	0,000
2	(Константа)	0,048	0,005		9,298	0,000
	нирки	-0,220	0,009	-0,924	-24,834	0,000
	м'язи	0,336	0,094	0,133	3,569	0,001

a. Залежна змінна: концентрація раундапу

У результаті проведення кореляційного, дисперсійного та регресійного аналізів виявлено, що найбільший зв'язок між даними величинами характерний для нирок, залежність є суттєвою, а тому для моніторингу забруднення водою раундапом доцільно використовувати саме цю тканину. Виведено моделі лінійної регресії різної складності (в тому числі множинна регресійна модель з двома незалежними змінними), що дозволяють спрогнозувати концентрацію раундапу у воді за показниками активності каталази у певних тканинах і можуть бути використані з цією метою спеціалістами-екологами.

Список літератури:

1. Агеев В. О. Антиоксидантний та імунний статус молодняку ВРХ за дії пробіотичних препаратів БПС-44 та БПС-Л / В.О. Агеев, С.В. Дерев'яно, Г.М. Дяченко // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту ветеринар. медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, № 3. – Ч. 1. – С. 10–17.
2. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 288 с.
3. Брагинский Л.П. Визуально фиксируемые реакции пресноводных гидробионтов как экспресс-индикаторы токсичности водной среды / Л.П. Брагинский, А.А. Игнатюк // Гидробиологический журнал. – 2005. – Т.41. – №4. – С. 89–103.
4. Кашулин Н.А. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения / Н.А. Кашулин, А.А. Лукин, П.А. Амундсен. – Апатиты: Кол. Науч. Центр РАН, 1999. – 142 с.
5. Котова Л.И. Биологический контроль качества вод / Л.И. Котова, Л.П. Рыжков, А.В. Полина. – М.: Наука, 1989. – 144 с.
6. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О.М. Арсан, О.А. Давидов, Т.А. Дяченко та ін. – К.: ЛОГОС, 2006. – 408 с.
7. Перспективы использования характеристик особей, популяций и сообществ рыб в системе биоиндикации качества воды и состояния гидросистем / А.Г. Антоновский, В.А. Демченко, Н.А. Демченко, Н.Н. Сурядная // Вісник запорізького національного університету. – 2008. – №1. – С. 30–34.
8. Broct T.C.M. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides / T.C.M. Broct, J. Lahr, P. Van den Brink. – The Netherlands. Alterra-Report 088, Wageningen, 2000. – 237 p.
9. Tsui M.T. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors / M.T. Tsui, L.M. Chu // Chemosphere. – 2003. – V. 52. – P. 1189–1197.

CATALASE ACTIVITY IN CARP TISSUES AS BIOMARKER OF HERBICIDE WATER POLLUTION

T.V. Mishchenko, A.V. Zavorotynskyy, A.O. Zhidenko

Changes the activity of catalase in carp tissues under yearlings under the influence of roundup to control are examined, carried out the correlation, variance, regression analysis to identify the interrelation between enzyme activity and concentrations of herbicides and forecasting interrelated changes in these quantities. The biggest connection between correlating parameters is characterized for kidney, and therefore in monitoring water pollution roundup should be used this tissue of the body. Linear regression models of varying complexity to calculate the concentration of roundup in the water in indexes of catalase activity in tissues of carp is displayed.

Keywords: carp, catalase, roundup, correlation analysis, analysis of variance, regression analysis.

Отримано редколегією 30.05.2012