

С. В. Холодкевич, А. В. Иванов, В. В. Трусевич, Т. В. Кузнецова

Экотоксикологический биомаркер для биоиндикации состояния водных экосистем на основе оценки адаптационной способности обитающих в них двустворчатых моллюсков*(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)*

Проведено экотоксикологическое исследование, направленное на обоснование гипотезы о возможности использования времени восстановления паттернов частоты сердечных сокращений (ЧСС) и поведения (величины раскрытия створок (ВРС) двустворчатых моллюсков после стандартизованных стрессовых тест-воздействий в качестве биомаркеров для оценки состояния водных экосистем (Kholodkevich et al., 2011). Методологической основой исследования являлась оценка компенсаторных реакций ЧСС и ВРС черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. на стандартизованные тест-воздействия (быстрое экспериментальное изменение солёности среды их обитания в пределах толерантности вида), вызывающих осмотический стресс. С целью моделирования влияния загрязнения среды обитания на функциональное состояние животных подвергали воздействию ионов меди в концентрации 100 ПДК (500 мкг/л) в течение суток. Затем мидий отмывали в протоке чистой морской воды, после чего с помощью осмотического теста анализировали развитие компенсаторных ответов организма мидий, отражающих адаптивные способности моллюсков, через 8 и через 24 ч отмывания. Показано, что в чистой морской воде, а также после 24 ч отмывания у животных происходит быстрое (около 30 мин) восстановление паттернов ЧСС и ВРС после возобновления первоначальной солёности, в то время как после 8 ч отмывания длительность восстановительного периода составляет 4–5 ч. Полученные экспериментальные данные служат убедительным доказательством справедливости проверяемой гипотезы.

При сравнительных исследованиях кардиоактивности и движения створок моллюсков было обнаружено, что животные одного вида и возраста, отобранные из сходных биотопов, но с разным уровнем загрязнения, демонстрируют разное время восстановления ($T_{\text{восст}}$) паттернов кардиоактивности и поведения (движения створок) после стандартизованных стрессовых тест-воздействий [1]. Была выдвинута гипотеза о возможности использования показателя $T_{\text{восст}}$ в качестве биомаркера при оценках состояния (здоровья) водных экосистем. Цель проведенных нами экотоксикологических исследований состояла в обосновании этой гипотезы.

Материалы и методы. Методологической основой исследования является оценка компенсаторных реакций тест-организмов на стандартизованные тест-воздействия (например, быстрое изменение в пределах толерантности вида солёности воды), вызывающих осмотический стресс. Объектом исследования служили 2–3-летние черноморские мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. размером 55–60 мм, собранные в акватории Карадагского природного заповедника (Украина).

Неинвазивные измерения частоты сердечных сокращений (ЧСС), а также величины раскрытия створок (ВРС) проводили как описано в работе [2]. По результатам предвари-

тельных исследований из 16 животных была отобрана референтная группа из 10 животных, которые, во-первых, обладали устойчивым суточным ритмом по этим двум показателям, что достаточно убедительно свидетельствует об их хорошем функциональном состоянии, а во-вторых, давали однотипную реакцию на предложенные нами ранее тест-воздействия [1]. В качестве такого теста применяли гипо- и/или гиперосмотическое воздействие с быстрым изменением солености воды на 50%. В соответствии с этой методикой тестирования в аквариум с животными добавляли необходимое количество либо дистиллированной воды (гипоосмотический тест), либо раствор морской соли Красного моря (гиперосмотический тест). Через 1 ч после начала такого воздействия соленость возвращали к первоначальному значению. В компенсаторном ответе кардиосистемы и поведенческой реакции мидий на тест-воздействие (осмотический стресс) обращали внимание на временные характеристики развития реакции, а после снятия воздействия — на время возвращения ЧСС и характеристик движения створок мидий к первоначальному (до тестирования) паттерну, индивидуальному для особей.

С целью моделирования влияния искусственно вызванного ухудшения функционального состояния животных отобранная по приведенной выше методике референтная группа мидий подвергалась воздействию ионов меди (медный купорос) в концентрации 100 ПДК (500 мкг/л) в течение суток. Затем мидий отмывали в протоке чистой морской воды, после чего с помощью осмотического теста анализировали развитие компенсаторных ответов организма мидий, отражающих адаптивные способности моллюсков, через 8 и 24 ч отмывания.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования получены следующие данные по динамике изменения кардиоактивности и движения створок мидий. На рис. 1 приведены тренды усредненных по 10 мидиям ЧСС и ВРС референтной группы мидий в процессе гипоосмотического тестирования до (кривые 1) и после суточного воздействия 100 ПДК (500 мкг/л) Cu^{2+} и последующего отмыва чистой морской водой в течение 8 ч (кривые 2) и 24 ч (кривые 3). Из рис. 1 (кривые 1) видно, что в чистой морской воде у отобранных животных происходит быстрое восстановление паттернов ЧСС и ВРС после возобновления первоначальной солености (за 30 и 20 мин соответственно).

Реакция на загрязненность воды катионами меди проявилась у моллюсков с первых минут экспозиции. В частности, все животные продемонстрировали защитный рефлекс изоляции — створки всех мидий закрылись и оставались в таком состоянии практически все время экспозиции, демонстрируя время от времени кратковременные “всхлопывания” (приоткрывания), которые мы связываем с вентиляцией жабр и выбрасываниями продуктов метаболизма, аналогично указанному, например, в работе [3].

Предполагалось, что воздействие меди в концентрации 500 мкг/л в течение суток достаточно для того, чтобы привести к ухудшению функционального состояния животных и к снижению их адаптивных возможностей реагировать на изменения характеристик среды их обитания. В этом случае можно было бы ожидать существенного увеличения времени восстановления паттернов ЧСС и ВРС животных сразу после токсического воздействия меди, а после отмыва животных — частичного или полного восстановления фоновых паттернов активности. Именно такие эффекты наблюдались в наших экспериментах.

Гипоосмотическое тестирование позволило установить, что в результате токсического воздействия меди значительно увеличивается время восстановления фоновых паттернов активности (см. рис. 1, кривые 2) по сравнению с этими показателями до токсического воздействия (кривая 1). Длительность восстановительного периода увеличилась с 20–30 мин до 4–5 ч.

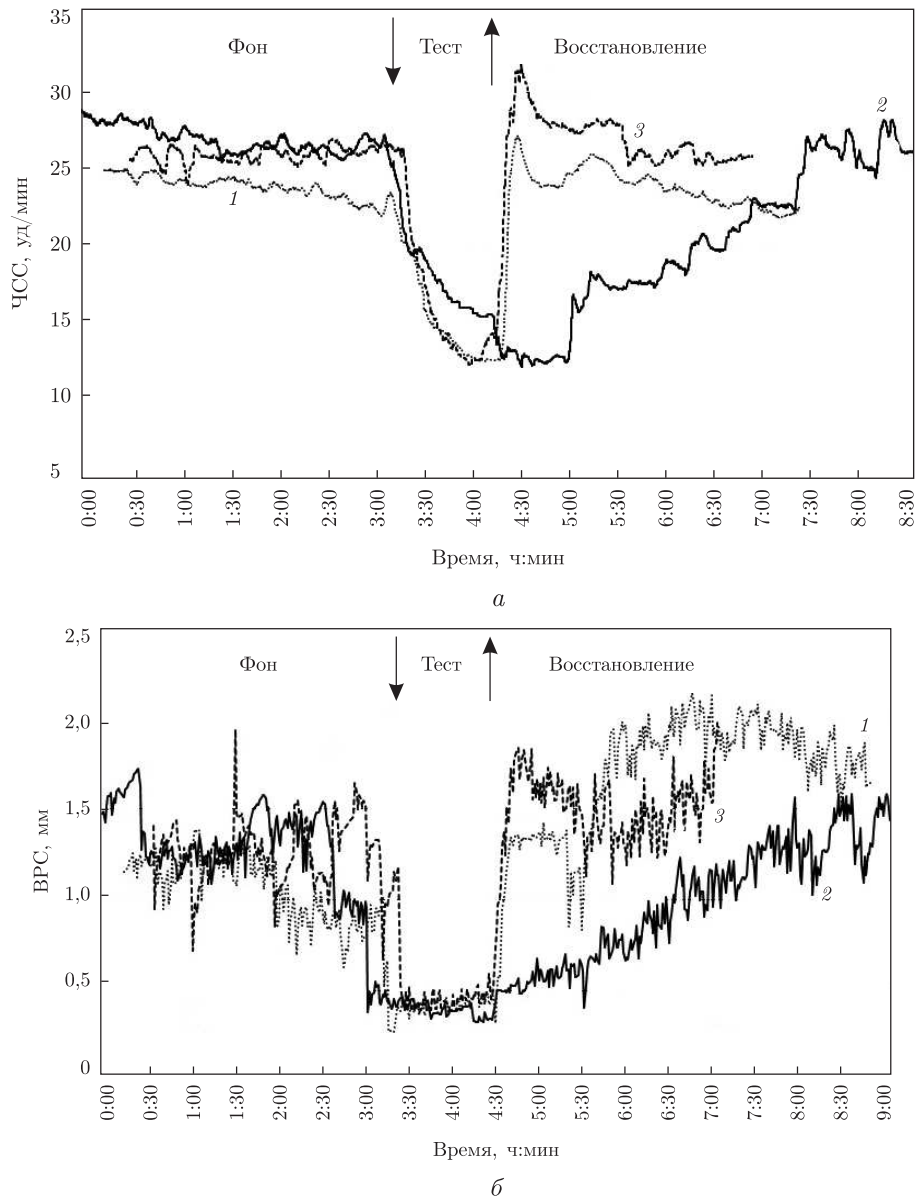


Рис. 1. Различия в скорости восстановления фоновых характеристик ЧСС (а) и ВРС (б). Гипоосмотическое тестирование.

1 — в норме; 2, 3 — отмывание в течение 8 и 24 ч соответственно после суточного воздействия на моллюсков ионов меди (500 мкг/л). Усредненные значения по 10 мидиям референтной группы. Стрелками на рисунке указано время начала снижения солености с 19 до 10‰ и последующего восстановления солености. По оси абсцисс — продолжительность проведения эксперимента

Отметим, что дальнейшее, более продолжительное пребывание животных в чистой морской воде приводило к практически полному восстановлению исходного, быстрого (около 0,5 ч) восстановления паттернов активности животных после гипоосмотического тест-воздействия (см. рис 1, кривые 3). Последующий мониторинг ЧСС и ВРС выявил наличие суточного ритма активности животных, нарушенного экспериментально вызванным загрязнением воды, что убедительно свидетельствует о восстановлении функционального состоя-

ния животных. Способность к восстановлению функционирования после кратковременного изменения качества среды обеспечивает моллюскам сохранение относительно стабильного уровня функциональной активности всего организма.

Приведенные в настоящей работе экспериментальные данные, на наш взгляд, служат убедительным доказательством справедливости проверяемой гипотезы о перспективности использования времени восстановления паттернов движения створок и показателей кардиоактивности моллюсков после стандартизованных стрессовых тест-воздействий как нового экотоксикологического биомаркера. Можно ожидать, что предложенный биомаркер, отражающий адаптивную способность тест-организма, ввиду достаточно высокой экспрессности и простоты проведения измерений, найдет широкое применение при решении задач оценок адаптивной способности двустворчатых моллюсков и состояния (здоровья) водных экосистем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-92424-BONUS_a.

1. Kholodkevich S. V., Ivanov A. V., Trusevich V. V., Kuznetsova T. V. New physiological biomarkers for express indication of aquatic ecosystems state on the base of adaptive capacities assessment of bivalves using standard test-stimuli // SETAC Europe 21th Annual Meeting, Milan, 15–19 May, 2011: Abstract Book. – P. 168–169.
2. Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Трусевич В. В., Куракин А. С., Иванов А. В. Особенности движения створок и кардиоактивности двустворчатых моллюсков при действии различных стрессоров // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2009. – 45, № 4. – С. 432–434.
3. Curtis T. M., Williamson R., Depledge M. H. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper // Mar. Biol. – 2000. – 136. – P. 837–846.

*Санкт-Петербургский научно-исследовательский
центр экологической безопасности РАН
Карадагский природный заповедник НАН Украины*

Поступило в редакцию 17.10.2011

С. В. Холодкевич, О. В. Иванов, В. В. Трусевич, Т. В. Кузнецова

Екотоксикологічний біомаркер для біоіндикації стану водних екосистем на основі оцінки адаптивної здатності існуючих в них двостулкових моллюсків

*Проведено екотоксикологічне дослідження для обґрунтування гіпотези про можливість використання часу відновлення патернів частоти серцевих скорочень (ЧСС) і поведінки (величини розкриття стулок (ВРС)) двостулкових моллюсків після стандартизованих стрессових тест-впливів як біомаркерів для оцінки стану водних екосистем (Kholodkevich et al., 2011). Методологічною основою дослідження була оцінка компенсаторних реакцій ЧСС і ВРС чорноморських мідій *Mytilus galloprovincialis* Lam. на стандартизовані тест-впливи (швидка експериментальна зміна солоності середовища існування в межах толерантності виду), що спричиняють осмотичний стрес. З метою моделювання впливу забруднення середовища існування на функціональний стан тварин піддавали дії іонів міді в концентрації 100 ПДК (500 мкг/л) протягом доби. Потім мідій відмивали у протоці чистої морської води та за допомогою осмотичного тесту аналізували розвиток компенсаторних відповідей організму мідій, які характеризували адаптивні здатності моллюсків через 8 та 24 год відмивання. Показано, що в чистій морській воді, а також після 24 год відмивання у тварин відбувається швидке (понад 30 хв) відновлення патернів ЧСС та ВРС після відтворення первісної солоності, тоді як після 8 год відмивання поновлення триває 4–5 год. Отримані експериментальні дані є переконливим доказом слушності перевіреної гіпотези.*

S. V. Kholodkevich, A. V. Ivanov, V. V. Trusevich, T. V. Kuznetsova

Ecotoxicological biomarker for the bioindication of aquatic ecosystem states on the base of adaptive capacity assessment of bivalves

*Ecotoxicological investigation aimed to prove the hypothesis of applicability of the recovery time for heart rate (HR) and behavior (value of valve gaping – VG) patterns after the removal of standard stress treatments as a new possible biomarker for aquatic ecosystem state assessment (Kholodkevich et al., 2011) is carried out. The object of the study was a group of 10 individuals of *Mytilus galloprovincialis* Lam. 55–60 mm in length. Methodological base of the study was the assessment of HR and VG compensatory responses of test-organisms under standard test-treatments (e. g., a rapid experimental change of the ambient sea water salinity in the range of species tolerance), which caused osmotic stress. To simulate the influence of a water contamination on organism's functional state, the reference group of mussels was exposed to the copper ion treatment in the 100-fold maximum allowable concentration (500 µg/l) during 1 day. After the exposure, mussels were purified by clean sea water and tested by means of the osmotic test-stimulus. Compensatory responses of mussels were analyzed, the attention was paid to adaptive responses after 8 and 24 h purification. Results showed that, in clean sea water as well as after 24 h purification followed by copper ion exposure, the tested mussels demonstrated a rapid (about 30 min) recovery time of HR and VG needed to reach their initial background values after the restoration of ambient salinity. In the case of 8 h purification, the recovery period ran up to 4–5 h. The obtained experimental data are considered to be a convincing argument for the promotion of the tested hypothesis.*