

УДК 595.143.6: 574.64

Л. В. Черная<sup>1</sup>, Л. А. Ковальчук<sup>1</sup>, Н. В. Микшевич<sup>2</sup>

**СЕЗОННАЯ БИОАККУМУЛЯЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ  
МЕТАЛЛОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКОЙ  
HIRUDO VERBANA SARENА**

Проведены исследования сезонной динамики содержания тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок *Hirudo verbana* Sarena и в донных отложениях р. Челбас (Краснодарский край). Изучена биоаккумуляционная активность пиявок к Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Cd, Pb. Отмечена высокая накопительная способность *H. verbana* к эссенциальному металлу Zn и к экотоксикантам Cd и Pb. Выявлены статистически достоверные корреляционные связи между концентрацией Cu, Fe, Ni, Cd, Pb в тканях пиявок и их содержанием в донных отложениях.

**Ключевые слова:** медицинские пиявки, тяжелые металлы, биоаккумуляция, сезонная изменчивость.

Медицинские пиявки (МП) — одни из немногих представителей пресноводного макрозообентоса, имеющих практическую значимость для человека благодаря своими уникальными лечебными свойствами [4, 5, 10], однако за последние десятилетия численность этих гидробионтов в природных популяциях существенно снизилась, что обусловлено как интенсивностью несанкционированного изъятия их из водных экосистем, связанной с высоким спросом пиявок на фармацевтическом рынке, так и с усилением антропогенной нагрузки в пределах их ареалов [6, 12, 22].

Приоритетными экотоксикантами, оказывающими негативное влияние на организм МП, являются тяжелые металлы (ТМ) [15], что было установлено экспериментально при воздействии экстремально высокой концентрации ионов Cu, Zn, Cd, Pb на природных особей МП, характеризующихся высокой биоаккумуляционной активностью [11, 21].

Меры по сохранению природных популяций МП в современных геохимических условиях должны иметь комплексный характер, включая не только экологический мониторинг их мест обитания, но и данные о содержании эссенциальных и токсичных элементов в их тканях в зависимости от абиогенных и биогенных факторов среды.

Биологический цикл МП напрямую связан с сезонной изменчивостью абиотической компоненты среды: весенняя активизация метаболических процессов в период выхода пиявок из зимнего анабиоза, летнее возрастание

© Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Н. В. Микшевич, 2018

процессов репродуктивной деятельности и увеличение мышечной массы, осеннее замедление скорости обменных процессов в организме при пониженной температуре среды обитания до низких положительных значений в период подготовки к зимнему анабиозу [18].

Цель данного исследования — изучение сезонного содержания тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок и оценка их биоаккумуляционной активности.

**Материал и методика исследований.** В исследованиях использованы взрослые особи медицинских пиявок *Hirudo verbana* Sagen, отловленные в р. Челбас (Краснодарский край, Каневской район) весной (первая декада мая; температура воды +10°C), летом (первая декада августа; +21°C) и осенью (последняя декада ноября; +2°C). Отлов и содержание животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми II Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (1986) [3].

Пробоподготовку образцов проводили в соответствии с требованиями МАГАТЭ и методическими рекомендациями, утвержденными МЗ РФ в 1999 г. Пробы донных отложений (ДО) отбирали из верхнего 10-см слоя дна на участках, где толщина водного слоя составляла 50—100 см, высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105°C, после чего измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. Для подготовки образцов тканей, пиявок, доставленных в лабораторию, освобождали от содержимого кишечника, промывали дистиллированной водой, высушивали при комнатной температуре.

Валовое содержание Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, Cd, Pb в донных отложениях и в тканях пиявок определяли атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре ААС-3 (основная погрешность по оптической плотности не превышает ± 5% от диапазона измерения) в пламени пропан — бутан и на приборе Analyst 100 фирмы Perkin Elmer [16].

Пробы ДО и кожно-мышечной ткани пиявок готовили способом мокрой минерализации в смеси азотной (HNO<sub>3</sub>) и хлорной (HClO<sub>4</sub>) кислот [2]. Ткани и донные отложения навеской 1 г помещали в колбу Кьельдаля. Добавляли 10 мл HNO<sub>3</sub> и через 10—20 мин прибавляли 3 мл HClO<sub>4</sub>, медленно нагревали до завершения реакции, после чего повышали температуру до 200°C. Раствор осторожно выпаривали до объема 2—3 мл, охлаждали. Добавляли 10—15 мл H<sub>2</sub>O. Фильтровали полученный раствор через стеклянный крупнопористый фильтр, предварительно промытый кислотой, в мерную колбу на 25—50 мл. Концентрацию металлов выражали в мкг/г сухой массы. Подготовлено и проанализировано 60 проб, проведено 420 элементопределений.

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием пакета лицензионных прикладных программ «Statistica v. 6.0.» (Stat Soft, Ink., 1984—2001). При оценке статистически значимых различий средних данных между группами использовали U-тест Манна — Уитни (при парном сравне-

нии) и Н-критерий Краскела — Уоллеса (при множественном сравнении). Для оценки связи между изучаемыми параметрами использовали ранговый корреляционный анализ Спирмена ( $r_s$ ). Различия между сравниваемыми выборками считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Результаты анализа показали, что содержание ТМ в ДО р. Челбас, независимо от сезона, располагается в едином убывающем ряду: Fe > Mn > Zn > Ni > Pb > Cu > Cd.

Согласно литературным данным [8, 9], фоновое содержание изучаемых ТМ в донных отложениях составляет: Cu — 4—50 мкг/г, Zn — 8—60, Mn — 70—400, Fe — 1000—18000, Cd — 0,1—1,2, Pb — 5—18, Ni — 0,7—15 мкг/г.

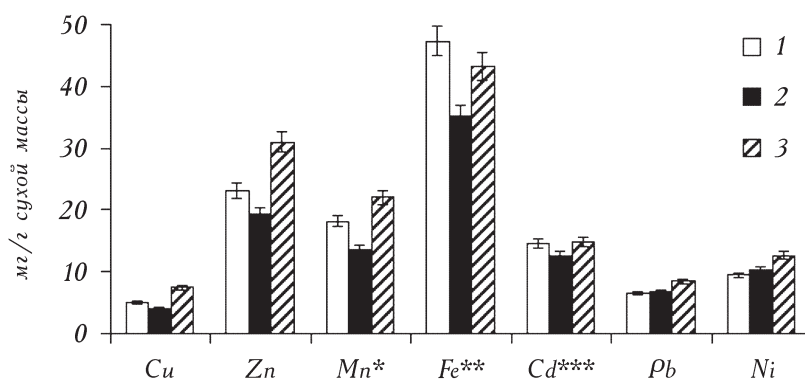
По нашим данным, содержание практически всех металлов во все сезоны соответствует фоновым показателям; незначительное превышение наблюдалось для Cd: весной его концентрация составила  $1,46 \pm 0,02$  мкг/г и осенью —  $1,49 \pm 0,02$  мкг/г. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о высоком уровне накопления токсичного Cd за последние годы не только в загрязненных, но и в фоновых водоемах [7, 14, 24]. Таким образом, принимая во внимание вышесказанное, реку Челбас можно считать экологически благополучным, фоновым водным объектом.

Показано, что сезонная динамика изучаемых ТМ в ДО имеет различный характер (рис. 1). Из рисунка видно, что сезонная изменчивость содержания Cu, Zn, Mn, Fe, Cd в ДО минимальна в летний период, а Pb и Ni — линейно возрастает от весны к осени.

Наибольшая сезонная изменчивость в ДО характерна для содержания Cu, Zn, Mn, Fe ( $H_{2;30} = 25,81$ ;  $p = 0,0000$ ) — между их количеством во все сезоны выявлены статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ). В меньшей степени наблюдали изменчивость для Pb ( $H_{2;30} = 21,38$ ;  $p = 0,0000$ ), Ni ( $H_{2;30} = 21,37$ ;  $p = 0,0000$ ) и Cd ( $H_{2;30} = 20,1$ ;  $p = 0,0000$ ). Для данных металлов статистически значимые различия уровня были выявлены не во все сезоны: осенние пробы ДО по содержанию Pb и Ni (соответственно  $8,46 \pm 0,10$  и  $12,7 \pm 0,27$  мкг/г) отличались от весенних ( $6,5 \pm 0,10$  и  $9,45 \pm 0,16$  мкг/г) и летних ( $6,74 \pm 0,05$  и  $10,3 \pm 0,25$  мкг/г) показателей ( $p < 0,05$ ), а по Cd — летние ( $1,26 \pm 0,01$  мкг/г) — от весенних ( $1,46 \pm 0,02$  мкг/г) и осенних ( $1,49 \pm 0,02$  мкг/г) ( $p < 0,05$ ) (см. рис.1).

Соотношения между содержанием ТМ в тканях МП были несколько иные, чем в ДО, и, кроме того, обладали сезонными особенностями — весной ТМ располагались в последовательности: Fe > Zn > Pb > Mn = Cu > Ni > Cd; а летом и осенью выглядели следующим образом: Fe > Zn > Pb > Ni = Cu > Mn > Cd.

Характер сезонной (от весны к осени) динамики эссенциальных металлов Zn, Fe, Mn в тканях МП был однотипным — наблюдалось линейное снижение их содержания (рис. 2). Максимальную потребность в этих микро-



1. Сезонная динамика содержания тяжелых металлов (ТМ, мкг/г) в донных отложениях реки Челбас: 1 — весна; 2 — лето; 3 — осень. \*,\*\* Содержание уменьшено соответственно в 10 и в 100 раз; \*\*\* содержание увеличено в 10 раз.

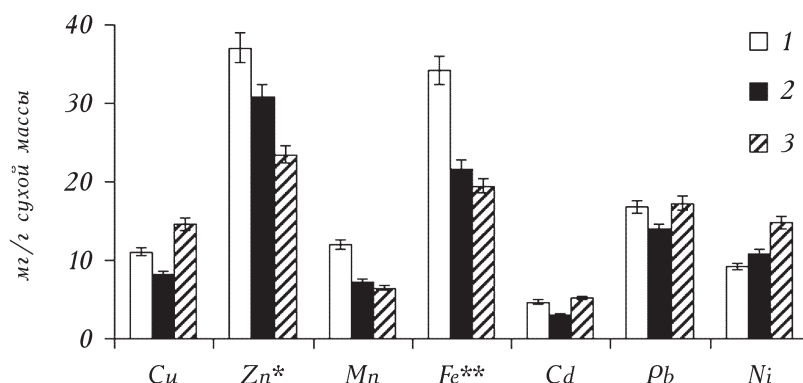
элементах пиявки испытывают весной, после выхода из зимнего анабиоза, что связано с ускорением метаболических процессов и активацией ферментных систем, в состав многих из которых в качестве кофермента входят эссенциальные металлы. Летом, в период активного роста и основных репродуктивных процессов, содержание Zn, Fe и Mn остается еще достаточно высоким. Осенью, со снижением уровня обменных процессов у малоактивных пиявок, уходящих в зимний анабиоз, отмечалось минимальное содержание Zn, Fe, Mn. Обратную картину наблюдали для сезонной динамики Ni — линейное накопление в тканях от весны к осени, что связано, скорее всего, с антагонизмом Fe и Zn [13].

У Cu, Cd и Pb сезонная изменчивость имеет минимальные значения летом. В период наращивания мышечной массы и откладки коконов у пиявок происходит частичная элиминация этих металлов из организма.

Наибольшие сезонные различия отмечены для содержания Cu ( $H_{2;30} = 23,01$ ;  $p = 0,0000$ ), Fe ( $H_{2;30} = 22,16$ ;  $p = 0,0000$ ) и Ni ( $H_{2;30} = 22,34$ ;  $p = 0,0000$ ), наименьшие — для Pb ( $H_{2;30} = 13,92$ ;  $p = 0,001$ ). Достаточно высокая изменчивость при смене времен года выявлена для содержания в тканях *H. verba-na* Zn ( $H_{2;30} = 21,83$ ;  $p = 0,0000$ ), Mn ( $H_{2;30} = 21,10$ ;  $p = 0,0000$ ), Cd ( $H_{2;30} = 21,1$ ;  $p = 0,0001$ ).

Статистически значимые различия между всеми тремя сезонами выявлены только для количества Cu и Zn ( $p < 0,05$ ). Для Mn и Fe обнаружено достоверно отличное содержание только у весенних пиявок (соответственно  $11,9 \pm 0,25$  и  $3418,2 \pm 14,4$  мкг/г), для Cd и Pb — у летних (соответственно  $3,06 \pm 0,05$  и  $13,9 \pm 0,48$  мкг/г), для Ni — у осенних ( $14,8 \pm 0,67$  мкг/г) ( $p < 0,05$ ).

Одной из важнейших характеристик микроэлементного обмена животных является их способность к накоплению в органах и тканях биологически активных металлов. Характер и степень биологической аккумуляции гидробионтов оценивается с помощью значений коэффициента биологиче-



2. Сезонная динамика содержания тяжелых металлов (ТМ, мкг/г) в тканях медицинских пиявок: 1 — весна; 2 — лето; 3 — осень. \*,\*\* Содержание уменьшено соответственно в 10 и в 100 раз.

ского накопления ( $K_{БН}$ ), рассчитанных по отношению тканевого содержания микроэлементов к количеству ТМ в ДО [20].

При изучении биоаккумуляционной активности было обнаружено, что МП, независимо от сезона, являются макроконцентраторами Zn, Cd, Pb ( $K_{БН} > 2$ ) и деконцентраторами Mn и Fe ( $K_{БН} < 1$ ) (таблица).

Полученные значения  $K_{БН}$  демонстрируют неоднозначный уровень накопления ТМ в тканях пиявок в разные сезоны. Показано, что осенью МП снижают биоаккумуляционную активность к эссенциальным Cu, Zn, Mn, Fe и ксенобиотику Pb, но повышают ее по отношению к токсичным Ni и Cd. Данное обстоятельство обусловлено, скорее всего, замедлением обменных процессов, в том числе механизмов детоксикации и элиминации экотоксикантов, в организме пиявок при уходе в зимний анабиоз.

Максимальные значения коэффициентов биологического накопления ( $K_{БН}$ ) Cu, Zn, Mn, Fe и Pb выявлены у весенних пиявок, активизирующих обменные процессы. В летний период отмечено снижение аккумуляции Cd.

Необходимо особо отметить потенциально высокую кумулятивную способность *H. verbana* к токсичным металлам Cd и Pb, для которых выявлены достаточно высокие показатели  $K_{БН}$ . Повышенная способность МП к накоплению этих токсикантов в условиях более сильного загрязнения водной среды может стать причиной дисбаланса в обменных процессах, происходящих в их организме. С учетом низкой способности Cd к выведению из организма и высокой степени его аккумуляции в тканях пиявок, его продолжительное поступление может вызвать метаболические нарушения. Известно, что даже после прекращения воздействия этого металла повреждения, произошедшие в тканях, остаются необратимыми [19].

Высокие значения  $K_{БН}$  свидетельствуют о биологической доступности и возможности ТМ включаться во все физиологические и биохимические процессы организма. Поскольку пиявки относятся к консументам второго и

**Сезонная динамика коэффициентов биологического накопления ( $K_{\text{БН}}$ ) тяжелых металлов у медицинской пиявки *H. verbana***

Сезоны	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Cd	Pb
Весна	2,16	16,1	0,07	0,72	0,97	3,22	2,59
Лето	2,01	15,9	0,05	0,61	1,06	2,43	2,07
Осень	1,96	7,57	0,03	0,40	1,17	3,51	2,04

третьего порядков, они находятся на вершине пищевой пирамиды водных экосистем, вследствие чего депонируют в своих тканях значительные количества ТМ, содержание которых, как известно, увеличивается по мере продвижения по трофической цепи [8, 17]. Отсюда столь высокие величины  $K_{\text{БН}}$  большинства исследуемых металлов. В то же время имеются работы, указывающие на отсутствие накопления токсичных металлов Cd и Pb в тканях животных при продвижении этих элементов по пищевой цепи [25], в отличие от биофильных элементов Zn и Cu, поступающих в организм беспозвоночных с пищей или через дыхательные поверхности [23]. Показано, например, что моллюски *Dreissena polymorpha* способны регулировать уровень Zn в теле независимо от его содержания в окружающей среде, а содержание в их тканях Pb, Cd и Cu зависит от концентрации последних в воде [1].

Результаты корреляционного анализа показали, что сезонная динамика содержания Zn и Mn в тканях *H. verbana* не зависит от сезонных колебаний уровня этих металлов в ДО (соответственно  $r_S = -0,39$ ;  $p = 0,13$  и  $r_S = -0,09$ ;  $p = 0,62$ ), а обусловлена физиологическими потребностями МП в данных эссенциальных металлах на разных этапах биологического цикла и наличием в организме пиявок механизмов их регуляции.

Вместе с тем выявлена статистически достоверная положительная связь высокой силы для Cu ( $r_S = 0,92$ ;  $p = 0,0000$ ), Cd ( $r_S = 0,89$ ;  $p = 0,0000$ ), Ni ( $r_S = 0,90$ ;  $p = 0,0000$ ), что свидетельствует о преимущественном влиянии абиотических факторов среды на сезонную динамику этих металлов в тканях пиявок. Корреляционная связь средней силы обнаружена для Fe ( $r_S = 0,64$ ;  $p = 0,0001$ ) и Pb ( $r_S = 0,45$ ;  $p = 0,01$ ), что связано, вероятно, со способностью пиявок частично регулировать содержание в организме данных металлов.

### **Заключение**

Установлено, что содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок *H. verbana*, а также в среде их обитания (донные отложения), подвержено сезонной динамике. Наибольшая сезонная изменчивость характерна для тканевого содержания Cu, Fe и Ni. Показано, что от весны к осени у пиявок снижается потребность в эссенциальных металлах Zn, Mn и Fe, и равномерно накапливается в тканях токсичный Ni. Летом, в период активного роста и откладки коконов в тканях пиявок наблюдается частичная элиминация Cu, Cd, Pb.

Обнаружено, что, независимо от сезона, пиявки являются макроконцентраторами Zn, Pb, Cd и деконцентраторами Fe и Mn. Максимальные значения коэф-

фициента биологического накопления Cu, Zn, Mn, Fe и Pb выявлены у весенних пиявок. Осенью, при уходе в зимний анабиоз, пиявки снижают биоаккумуляционную активность к эссенциальным Cu, Zn, Mn, Fe и токсичному Pb, но повышают ее по отношению к ксенобиотикам Cd и Ni.

Выявлена способность пиявок к сезонной регуляции уровня Zn и Mn. Содержание тяжелых металлов Cu, Fe, Ni, Cd, Pb в тканях *H. verbana* находится в прямой зависимости от их содержания в донных отложениях, что указывает на возможность использования медицинских пиявок в качестве биоиндикаторов при проведении мониторинга загрязнения водных экосистем.

\*\*

*Проведено дослідження сезонної динаміки вмісту важких металів у тканинах медичної п'явки Hirudo verbana Carena і у донних відкладах р. Челбас (Краснодарський край). Вивчено біоаккумуляційну активність п'явок до Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Cd, Pb. Відмічено високу накопичувальну здатність H. verbana до есенціального металу Zn і до екотоксикантів Cd і Pb. Виявлено статистично вірогідні кореляційні зв'язки між кількістю Cu, Fe, Ni, Cd, Pb у тканинах п'явок та їхнім вмістом у донних відкладах.*

\*\*

*Researches of seasonal dynamics of concentration of heavy metals are conducted in tissues of medical leeches Hirudo verbana Carena and in bottom sediments of the river Chelbas (Krasnodar region). Bioaccumulation of Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Cd, Pb in leeches were considered. High accumulation ability of the essential trace element Zn and Cd, Pb of non-essential elements, highly toxic metals were noted. There was a statistically significant dependent correlation between Cu, Fe, Ni, Cd, Pb in tissues of leeches and their total contents in bottom sediments of the river are revealed.*

\*\*

1. Данилин И.А., Павловская В.В. Удельное содержание металлотиионеинов в тканях моллюсков — биоиндикатор загрязнения водоема тяжелыми металлами // Вестн. РУДН. Серия «Экология и безопасность жизнедеятельности». — 2006. — № 2 (14). — С. 87—92.
2. Другов Ю.С., Рогин А.А. Пробоподготовка в экологическом анализе: практическое руководство: 3-е изд. доп. и перераб. — М.: БИНОМ, 2009. — 855 с.
3. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ets n 123) (Страсбург, 18 марта 1986 года). [Электронный ресурс]. — URL: <http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous>.
4. Каменев Ю., Каменев О. Вам поможет пиявка. Практическое руководство по гирудотерапии. — СПб: Весь, 2014. — 192 с.
5. Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Элементный и аминокислотный спектр секрета слюнных желез и тканей медицинских пиявок. Значение для гирудотерапии // Вестник восстановительной медицины. — 2013. — № 2. — С. 36—39.
6. Кустов С.Ю., Каменев О.Ю., Ярошенко В.А. Медицинская пиявка в Краснодарском крае: современное состояние популяции и проблемы ее ох-



- раны // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий. — Краснодар: Кубан. ун-т, 2005. — С. 118—121.
7. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты. — Ин-т водных проблем РАН. — М.: Наука, 2009. — 400 с.
  8. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. — М.: Мир, 1987. — 288 с.
  9. Никаноров А.М., Жулигов А.В., Покаржевский А.Д. Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах— Л.: Гидрометеиздат, 1993. — 291 с.
  10. Никонов Г.И. Гирудотерапия: наука и практика // Гирудотерапия и гирудотерапия. — 2007. — Т. 5. — С. 8—22.
  11. Нохрина Е.С., Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Динамика накопления тяжелых металлов в тканях медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. в модельном эксперименте // Вестн. Урал. мед. акад. науки. — 2009. — № 2 (23). — С. 145—146.
  12. Романова Е.М., Климина О.М. Биоресурсы класса Hirudinea в зоне Среднего Поволжья: экологическая значимость и перспективы использования // Изв. Самарск. науч. центра РАН. — 2010. — Т. 12. — № 1. — С. 208—211.
  13. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. — М.: Мир, 2004. — 215 с.
  14. Степанова Н.Ю., Яковлев В.А., Латыпова В.З., Анохина О.К. Экологическое нормирование содержания загрязняющих веществ в донных отложениях // Проблемы региональной экологии. — 2007. — № 4. — С. 40—47.
  15. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. — Л.: Наука, 1989. — 144 с.
  16. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ / Пер. с болг. Г. А. Шейниной; под ред. С.З. Яковлевой. — Л.: Химия, 1983. — 144 с.
  17. Черная Л.В., Ковальчук Л.А. Особенности распределения тяжелых металлов в водной трофической цепи на примере моллюсков и пиявок // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных: Материалы II Междунар. науч. конф. — Саранск, 2009. — С. 143—145.
  18. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., Нохрина Е.С. Сезонная изменчивость аминокислотного спектра в тканях медицинской пиявки *Hirudo verbana* Sarsen 1820 // Экология. — 2015. — № 4. — С. 317—320.
  19. Щербакова Е.Н. Возрастные изменения содержания тяжелых металлов в органах и тканях русского осетра: автореф. дис. ...канд. биол. наук — Астрахань, 2004. — 24 с.
  20. Яковлев В.А. Воздействие тяжелых металлов на пресноводный зообентос: 1 бионакопление // Экол. химия. — 2002. — Т. 11. — Вып.1. — С. 27—39.
  21. Chernaya L.V., Kovalchuk L.A., Nokhrina E.S. Peculiarities of microelement metabolism in the medical leech (*Hirudo medicinalis* L.) tissues from natural



- populations // Микроэлементы в медицине. — 2010. — Т. 11. — Вып. 2. — С. 6.
22. *Elliot J.M., Kutschera U.* Medicinal leeches: historal use, ecology, genetics and conservation // *Freshwater Reviews*. — 2011. — Vol. 4. — P. 21—41.
23. *Lithner G., Holm K., Borg H.* Bioconcentration factors for metals in humic waters at different pH in the Ronnskar area (N, Sweden) // *Water, Air and Soil Pollut.* — 1995. — Vol. 85. — P. 785—790.
24. *Satarug S., Baker J.R., Reilli P.* Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex and urin sample from Australia without occupational exposure to metal // *Arch. Environ. Health*. — 2002. — Vol. 57. — P. 69—77.
25. *Wright D.A.* Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* // *Freshwater Biol.* — 1980. — Vol. 10. — P. 123—133.

<sup>1</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, РФ

<sup>2</sup> Уральский государственный педагогический университет, Екатеринбург, РФ

Поступила 15.02.18