

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БИОТЫ В ЭСТУАРНЫХ ЗОНАХ

О. Н. Лукьянова, С. А. Ирейкина

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр),
г. Владивосток, Россия,
e-mail: onlukyanova@tinro.ru

Эстуарные экосистемы как природные границы между материками и океанами являются особенно изменчивыми и уязвимыми, и в значительной степени подвержены влиянию антропогенного загрязнения. Особенности эстуариев выражаются, прежде всего, в пониженной солености и ее значительном непостоянстве в пространстве и во времени. Вариабельность физико-химических факторов может изменять биодоступность и, соответственно, токсичность поллютантов. Присутствие большого количества органики в этих зонах обычно приводит к истощению кислорода, что негативно сказывается на метаболизме обитающих здесь организмов. Некоторые поллютанты могут прямо или косвенно изменять баланс между концентрацией прооксидантов во внешней среде и активностью антиоксидантов внутри клеток, вызывая развитие окислительного стресса. Загрязнение в эстуарных районах часто является критическим фактором, т.к. высокая вариабельность абиотических условий усиливает неблагоприятное воздействие на организмы, живущие в этих условиях.

Залив Петра Великого расположен в северо-западной части Японского моря, в умеренной зоне с муссонным климатом. На берегах залива расположены крупные города-порты Владивосток и Находка, находятся многочисленные промышленные и сельскохозяйственные предприятия. Наибольшее количество бытовых стоков от населенных пунктов поступает в акваторию практически неочищенными (Нигматулина, 2007). В донных отложениях и воде залива отмечены повышенные концентрации тяжелых металлов (Ковековдова, Симоконь, 2004) и хлорорганических пестицидов (Tkalin et al., 1997).

В залив впадает множество рек с различным объемом стока, крупнейшей из которых является река Раздольная, берущая начало на территории Китая и выносящая в море наибольшее

количество загрязняющих веществ. Водосборные бассейны рек отличаются по степени антропогенной трансформации. В наибольшей степени подвержены техногенному загрязнению реки Раздольная и Артемовка, к умеренно загрязненным можно отнести реки Тесная, Суходол и Шкотовка (рис. 1).

При изучении состояния биоты в эстуарных зонах очень важным является выбор организмов-индикаторов. Они должны быть не только широко распространены, доступны для сбора и чувствительны к внешним воздействиям, но и адаптированы к жизни в экстремальных условиях среды обитания. В каждой климатической зоне следует выбирать и использовать свой набор индикаторных видов и специфических реакций, которые адекватно отражают существование биоты в конкретной биогеографической зоне, со сложившимся комплексом природных и антропогенных факторов (Bartell, 2006). В наших исследованиях в качестве вида-индикатора впервые для залива Петра Великого был выбран японский мохнаторукий краб *Eriocheir japonica*, жизненный цикл которого связан с эстуариями. *E. japonica* – вид субтропический и его жизненный цикл в водах Приморья (у северного края ареала) имеет ряд особенностей (Семенькова, 2007). Самки вынашивают яйца в эстуариях и морском побережье летом, здесь же происходит развитие и осажение планктонных личинок, которые к осени мигрируют в верхнюю часть эстуария, где превращаются в ювенильных особей. Несколько лет краб живет в реке, затем у него происходит линька (летом), после чего половозрелые крабы мигрируют в морское побережье (весной). Японский мохнаторукий краб – вид моноциклический, после размножения и выпуска личинок взрослые особи в массе гибнут. Таким образом, оптимальный период для сбора животных – начало лета и осени.

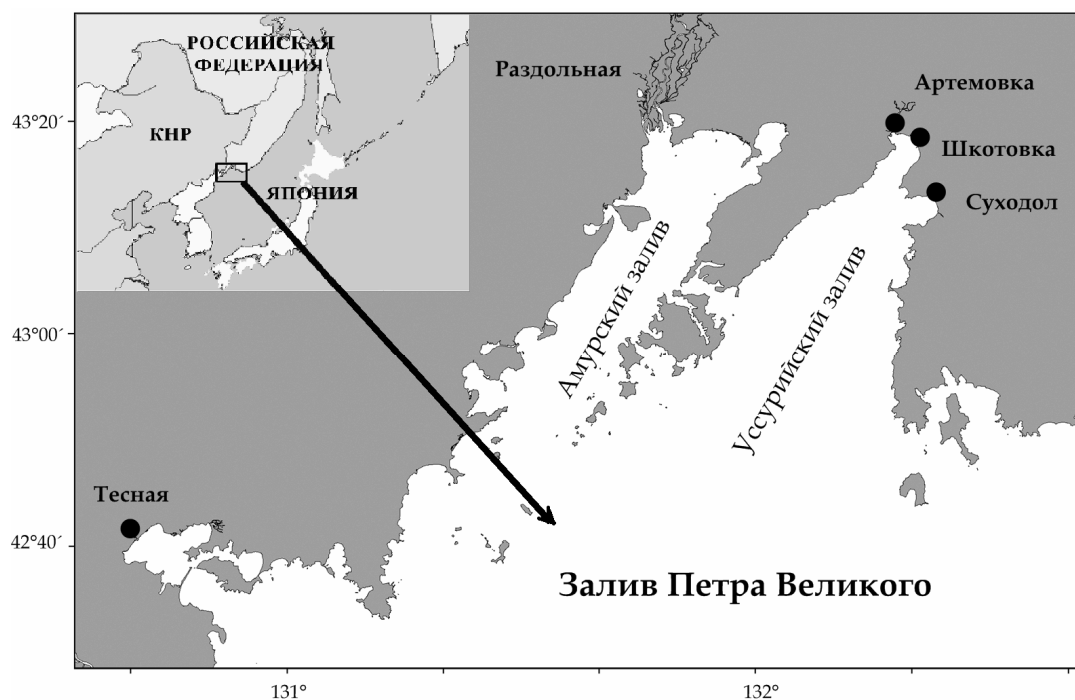


Рис. 1. Карта-схема района работ

Определение показателей окислительного стресса в водных организмах является примером неспецифических молекулярных биомаркеров, которые успешно применяются в полевых условиях с целью характеристики импактных районов, где обычно присутствует смесь поллютантов. Их также используют при изучении состояния биоты в эстуариях различных рек мира (Bacanskas et al., 2004; Paital, Chainy, 2010).

Крабы были собраны в эстуариях пяти рек бассейна залива Петра Великого весной и летом 2007–2010 гг. Крабов отлавливали в приустьевых зонах рек Раздольная, Артемовка, Суходол, Шкотовка и Тесная, в живом виде доставляли в лабораторию и препарировали на льду. В некоторых случаях животных замораживали при -20°C и анализировали в течение 2–3-днев после заморозки. Навески органов (жабры) массой около 1 г гомогенизировали в 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,5 в ледяной бане. Полученные гомогенаты центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. В супернатантах определяли концентрацию белка по методу Гринберга (Greenberg, Gaddock, 1982). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов анализировали в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой по количеству образовавшегося малонового диальдегида (Porter et al., 1976). Активность глутатион-S-трансферазы определяли с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (Habig et al., 1974),

каталазы – с перекисью водорода (Королук и др., 1988).

Степень перекисного окисления липидов характеризует состояние липидов мембран. Как правило, при неблагоприятных условиях, при действии повреждающих факторов, в том числе токсикантов различной природы, уровень малонового диальдегида (МДА), как показателя количества перекисных соединений в мембранах, увеличивается (Hugget et al., 1992). Следует ожидать, что высокое содержание МДА будет у животных в неблагоприятных условиях. Во всех исследованных пробах концентрация МДА в жабрах крабов была невысокой (рис. 2). Наибольшая концентрация МДА обнаружена у животных из эстуария р. Тесная – 1,7, наименьшая – у крабов из эстуария р. Шкотовка, 0,6 нмоль МДА/мг белка. Следовательно, по данному показателю можно заключить, что в наихудшем состоянии находятся крабы из эстуария р. Тесная.

Перекисное окисление липидов является интегрирующим показателем, по которому судят о степени развития окислительного стресса в клетках органов животных. Препятствуют свободнорадикальному окислению различные ферментативные и неферментативные компоненты (низкомолекулярные сквенджеры) антиоксидантной системы. Фермент каталаза расщепляет образующуюся перекись водорода, обладающую сильными токсическими свойствами

(Lemaire, Livingstone, 1993). Каталаза активируется при умеренном загрязнении и ингибируется высокими концентрациями токсикантов. Активность фермента была сходной у крабов из эстуариев Раздольной, Суходола и Артемовки во

все годы исследования, варьируя от 16 до 25 ед. акт./мг белка. Минимальная активность установлена у крабов из эстуария р. Тесная, 5 ед./мг белка, что отражает депрессивное состояние животных в данном районе (рис. 3).

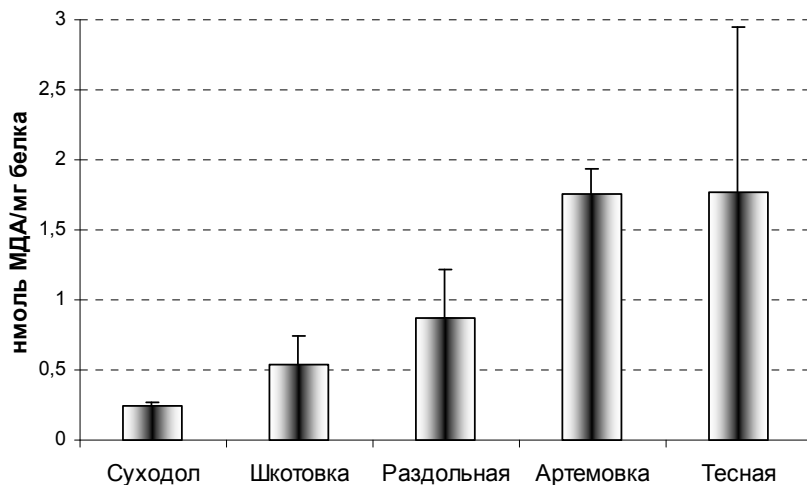


Рис. 2. Уровень перекисного окисления липидов в жабрах краба *E. japonica* из эстуариев рек залива Петра Великого ($M \pm m$, $N = 4$)

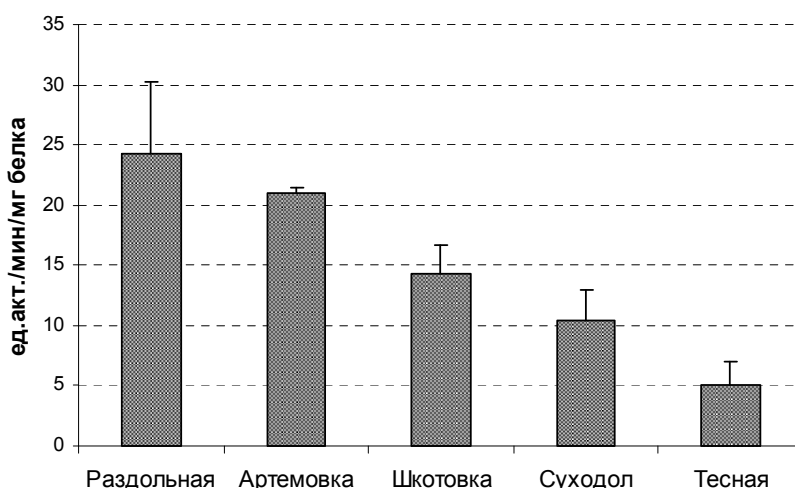


Рис. 3. Активность каталазы в жабрах краба *E. japonica* из эстуариев рек залива Петра Великого ($M \pm m$, $N = 4$)

Глутатион-S-трансфераза (GST) катализирует биотрансформацию гидрофобных субстратов за счет сульфгидрильных групп внутриклеточного глутатиона. Фермент обладает редуктазной и трансферазной активностями. При поступлении в организм повышенного количества экзогенных токсикантов активность фермента, как правило, повышается (Leaver, George, 1998).

Активность фермента была сходной у крабов из эстуариев рек Раздольная, Суходол, Артемовка и Шкотовка, составляя диапазон от 25 до 36 мкг/мин/мг белка (рис. 4). Несколько повышен-

ной можно считать активность GST у крабов из эстуария р. Тесной, среднее значение которой достигало 42 мкг/мин/мг белка.

Таким образом, на основании исследования физиологического состояния мохнаторукого краба их эстуариев некоторых рек залива Петра Великого в течение четырех лет можно заключить, что наибольший стресс испытывают крабы из эстуария р. Тесной, где отмечен максимальный уровень перекисного окисления липидов, ингибирование каталазы и повышенная активность GST. Состояние крабов из эстуариев

рек Раздольной, Суходол, Артемовка и Шкотовка можно считать сходным, о чем свидетельствуют близкие значения трех исследованных параметров. Река Тесная находится в юго-западной части залива и впадает в залив Посъета (залив второго порядка залива Петра Великого). Этот район подвержен влиянию стока реки Туманной (Туманган), протекающей по территории КНР и КНДР и являющейся границей между Россией и этими странами. Воды реки и устьевая зона загрязнены целым комплексом различных антропогенных соединений (Тарасов и др., 2004). Поллютанты с течениями

могут проникать в залив Посъета и оказывать влияние как на прибрежную, так и эстуарную фауну.

Для комплексной количественной характеристики физиологического состояния крабов из различных районов был рассчитан интегральный биохимический индекс (ИБХИ) (табл. 1). Индекс вычислен как сумма величины активностей ферментов и концентрации малонового диальдегида, выраженных в процентах от максимального значения, и составил: Артемовка – 93%, Суходол, Раздольная, Тесная – 74%, Шкотовка – 55%.

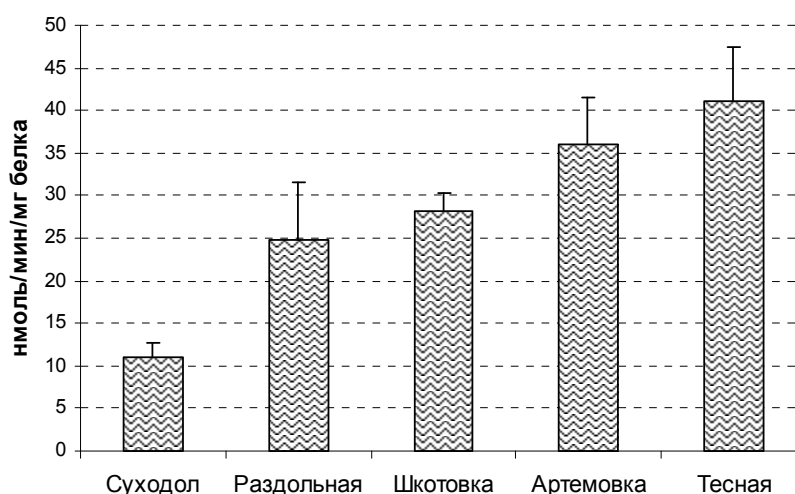


Рис. 4. Активность глутатион-S-трансферазы в жабрах краба *E. japonica* из эстуариев рек залива Петра Великого ($M \pm m$, $N = 4$)

Таблица 1. Значение интегрального биохимического индекса в жабрах мохнаторукого краба из различных эстуарных зон залива Петра Великого

Активность	Раздольная	% max	Суходол	% max	Артемовка	% max	Тесная	% max	Шкотовка	% max
ГСТ	$\frac{24-36^*}{30}$	73	$\frac{27-35}{31}$	75	35	85	41	100	28	68
Каталаза	$\frac{19-24}{22}$	100	18,5	82	21	95	5,0	23	14,2	67
ПОЛ	0,87	49	1,2	67	1,76	100	1,77	100	0,54	30
Сумма Σ		222		224		280		223		165
ИБХИ ($\Sigma/3$)		74		74		90		74		55

* – В числителе – диапазон значений, в знаменателе – средняя величина

Параллельно с определением молекулярных биомаркеров была проанализирована токсичность грунтов (методом биотестирования с использованием планктонных рачков мизид в качестве тест-объектов) и содержание нефтяных углеводородов (НУ) в грунтах и воде с тех же станций. На основании полученных данных был рассчитан индекс загрязнения, или интегральный абиотический индекс (ИАИ) как сумма степени токсичности (в % от максимальной) и со-

держания НУ в абиотических компонентах экосистемы (также в % от максимального) (табл. 2). Интегральный абиотический индекс (ИАИ) составил 92% для Раздольной, 74% для Артемовки, 52% для Тесной, 43% для Суходола и 37% для Шкотовки.

Суммарный индекс загрязнения, рассчитанный как сумма ИБХИ + ИАИ, позволил ранжировать эстуарные зоны в следующем порядке: Раздольная = Артемовка (суммарный индекс 167);

Тесная = 126; Суходол = 117, Шкотовка = 92. Таким образом, в отличие от данных по определению отдельных параметров окислительного стресса, ИБХИ указывает на наилучшее состоя-

ние животных и среды в эстуарии р. Шкотовка, а наихудшее – в эстуариях Раздольной и Артемовки, что соответствует известной степени антропогенного воздействия в бассейнах этих рек.

Таблица. 2. Интегральный абиотический индекс (ИАИ) для различных эстуарных зон залива Петра Великого

Показатель	Раздольная	% мах	Суходол	% мах	Артемовка	% мах	Тесная	% мах	Шкотовка	% мах
Токсичность		100		60		100		100		60
НУ, грунты	39	76	24	47	51	100	25–29	54	15	29
НУ, вода	190	100	42	22	45	23	5	3	45	23
Сумма Σ		276		129		223		157		112
ИАИ (Σ/3)		92		43		74		52		92

Коэффициент корреляции между ИБХИ и ИАИ составил 0,78. Следовательно, ИБХИ у эстуарных организмов с высокой степенью достоверности отражает антропогенное воздействие на

конкретную экосистему. Вычисление подобных интегральных индексов позволяет дать комплексную оценку состояния водных организмов в акваториях с различной степенью загрязнения.

Литература

Ковековдова Л. Т., Симоконов М. В. Тенденции изменения химико-экологической ситуации в прибрежных акваториях Приморья. Токсичные элементы в донных отложениях и гидробионтах // Изв. ТИНРО. 2004. Т. 137. С. 310–320.

Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. С. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.

Нигматулина Л. В. Оценка антропогенной нагрузки береговых источников на Амурский залив (Японское море) // Вестник ДВО РАН. 2007. № 1. С. 73–77.

Семенькова Е. Г. Биология и перспективы промысла японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonica* в водоемах Приморья: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владивосток: ТИНРО-Центр, 2007. 24 с.

Тарасов В. Г., Мощенко А. В., Питрук Д. Л. Трансграничное загрязнение российских вод // Дальневосточный морской биосферный заповедник. Исследования. Т. 1. Вл-к: Дальнаука, 2004. С. 305–313.

Bacanskas L.R., Whitaker J., Di Giulio R.T. Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus heteroclitus*) with differing contaminant exposure histories // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 597–601.

Greenberg C.G., Gaddock P.R. Rapid single-step membrane protein assay // Clin. Chem. 1982. Vol. 28. № 7. P. 1725–1726.

Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathion-S-transferase: the first step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 7130–7139.

Hugget R.J. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. 1992, Lewis Publishers: Chelsea, MI, USA. P. 235–335.

Lemaire P., Livingstone D.R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussels *Mytilus edulis* // Trends Comp. Biochem. Physiol. 1993. Vol. 1. P. 1119–1150.

Paital B., Chainy G.B.N. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity // Comp. Biochem. Physiol. 2010. Vol. 151 C, P. 142–151.

Porter N.A., Nolon Y., Ramdas L. Cyclic peroxides and thiobarbituric assay // Biochem. Biophys. Acta. 1976. Vol. 441. P. 506–512.

Tkalin A.V., Lishavskaya T.S., Hills J.W. Organochlorine pesticides in mussels and bottom sediments from Peter the Great Bay near Vladivostok // Ocean Res. 1997. Vol. 19. P. 115–119.

BIOCHEMICAL INDICES FOR BIOTA ASSESSMENT IN ESTUARIES ZONES

O.N. Lukyanova, S.A. Ireykina

Pacific Research Fisheries Centre (TINRO-Centre)

e-mail: onlukyanova@tinro.ru

Pollution in estuarine areas often is the critical factor, since high variability of environmental parameters influence on organisms. Many rivers with different anthropogenic transformation degree

run into Peter the Great Bay (Japan/East Sea). Molecular biomarkers of biotransformation and oxidative stress were determined in crab *Eriocheir japonica* collected in five estuaries of the Bay. The

integrated biochemical index (IBCI) was calculated as a sum of enzymatic activity and lipid peroxidation level, expressed in percentage of the maximal value. Acute toxicity of bottom sediments determined by biotesting with mysid shrimps, and petroleum hydrocarbons content in bottom sediments and seawater from the same stations were also analyzed,

and an integrated abiotic index (IAI) was computed. Total index of pollution, calculated as $IBCI + IAI$, allowed ranging the estuarine zones. The correlation coefficient between IBCI and IAI was 0,78. Thus, IBCI at estuarine organisms with a high degree of reliability reflects anthropogenic influence on a specific ecosystem.