

Департамент образования и науки города Севастополя
Государственное бюджетное образовательное учреждение
«Центр дополнительного образования
«Малая академия наук»

**СПОСОБ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПРИБРЕЖНЫХ АКВАТОРИЙ
ГОРОДА СЕВАСТОПОЛЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ
И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГИДРОБИОНТОВ**

Работу выполнила:

Ковыршина Екатерина Максимовна,
02.09.2007 г., учащаяся творческого
объединения «Экотоксикология» ГБОУ
ЦДО «Малая академия наук»,
ГБОУ СОШ № 41,7 класс

Научный руководитель:

Скуратовская Екатерина Николаевна,
педагог ДО, руководитель творческого
объединения «Экотоксикология» ГБОУ
ЦДО «Малая академия наук», к.б.н.,
вед.н.с. ФИЦ ИнБЮМ

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
РАЗДЕЛ 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	5
1.1 Характеристика показателей прооксидантно-антиоксидантной системы тканей гидробионтов	5
1.2 Применение морфофизиологических показателей гидробионтов для оценки качества водной среды	5
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	7
2.1 Характеристика объектов исследования	7
2.2 Характеристика районов исследования	7
2.3 Методы исследования	9
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	10
3.1 Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы в печени/ гепатопанкреасе гидробионтов из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения	10
3.2 Морфофизиологические показатели гидробионтов из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения	13
ВЫВОДЫ	14
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	15

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Антропогенная нагрузка на прибрежные районы Черноморского побережья Крыма создает неблагоприятные условия для жизни гидробионтов и вызывает необходимость разработки системы оценки качества морских прибрежных вод. Современные антропогенные воздействия на морские экосистемы, как правило, являются комплексными, и определить количественное содержание всех из них не представляется возможным. Большое разнообразие загрязняющих веществ, которые попадают в море, приводит к их взаимодействию и, в ряде случаев, возникновению новых соединений с неизвестными свойствами. Поэтому наряду с традиционными физико-химическими методами исследования, необходимо использование методов биоиндикации, отражающих реакцию живых организмов на весь комплекс неблагоприятных факторов среды в целом [1, 2].

Мировой опыт проведения биоиндикационных исследований основан на выборе биоиндикаторных видов – как правило, малоподвижных донных организмов, и комплекса показателей разного биологического уровня, способных реагировать на негативные воздействия среды любого происхождения. Для ранней биоиндикации морских акваторий рекомендовано использовать комплекс биохимических показателей, позволяющих на молекулярном уровне оценить изменения, происходящие в организме животных до появления видимых патологий. В то же время изменения, происходящие на молекулярном уровне, отражаются и на организменном, что проявляется в снижении размерно-массовых характеристик гидробионтов, изменении значений физиологических индексов у особей из акваторий с высоким уровнем загрязнения [2].

Цель и задачи исследования. Целью работы явилась сравнительная оценка комплекса биохимических и морфофизиологических показателей морского ерша *Scorpaena porcus* и черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* из бухт г. Севастополя (Черное море) с разным уровнем комплексного загрязнения.

В задачи исследования входило:

1. изучить показатели прооксидантно-антиоксидантной системы печени/гепатопанкреаса гидробионтов из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения;
2. изучить морфофизиологические показатели гидробионтов из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения;
3. определить наиболее информативные показатели и чувствительные виды гидробионтов к уровню загрязнения в бухтах.

Объекты исследования: морской ерш *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758, черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

Научная новизна. Впервые проведена сравнительная оценка экологического состояния прибрежных акваторий г. Севастополя с

применением биохимических и морфофизиологических показателей представителей разных таксономических групп гидробионтов. Установлена сходная реакция гидробионтов на действие комплексного загрязнения бухты Александровской, что выражалось в увеличении содержания ТБК-активных продуктов, а также активности КАТ в печени морского ерша и гепатопанкреасе мидий.

Теоретическое и практическое значение полученных результатов. Экспериментально установлена высокая чувствительность показателей прооксидантно-антиоксидантной системы печени морского ерша/гепатопанкреаса мидий к уровню комплексного загрязнения севастопольских акваторий, что позволяет рекомендовать их для ранней биоиндикации качества морских прибрежных вод.

Полученные результаты имеют важное теоретическое и практическое значение для понимания механизмов адаптации гидробионтов разных таксономических групп к действию загрязнителей, а также для ранней биодиагностики качества морских прибрежных акваторий, что позволяет своевременно оценить существующие риски, провести природоохранные мероприятия.

РАЗДЕЛ 1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 Характеристика показателей прооксидантно-антиоксидантной системы тканей гидробионтов

Организмы, активно использующие в своих обменных процессах кислород, в том числе гидробионты, имеют антиоксидантную (АО) защитную систему, обеспечивающую поддержание активных форм кислорода (АФК) в тканях на безопасном для организма уровне. Общая антиоксидантная система (АОС) живых организмов состоит из ферментов и низкомолекулярных соединений. АО ферменты характеризуются высокой специфичностью действия, направленного против определенных АФК [3].

Одним из важнейших ферментов АОС является каталаза. Каталаза – железосодержащий фермент, обезвреживающий перекись водорода [4]:
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2.$$

Действие негативных факторов приводит к усилению образования АФК. Нарушение процессов их обезвреживания АОС приводит к сдвигу тканевого баланса антиоксидантов и прооксидантов в сторону последнего. Следствием являются срыв работы защитных систем и развитие окислительного повреждения ткани [3].

Наиболее информативным показателем окислительного повреждения тканей является увеличение содержания ТБК-активных продуктов.

В настоящее время показатели прооксидантно-антиоксидантной системы тканей гидробионтов широко применяют для оценки качества водной среды, а также в лабораторных условиях, для оценки токсичности различных загрязнителей, или их смеси.

1.2 Применение морфофизиологических показателей гидробионтов для оценки качества водной среды

В настоящее время морфофизиологические индексы широко применяются для оценки благополучия гидробионтов на организменном уровне. Абсолютные и относительные размеры внутренних органов у разных видов рыб зависят от условий обитания, обеспеченности кормом, а также плавательной активности. Так, печень в организме выполняет важнейшие функций: вырабатывает желчь, которая активизирует ферменты, является кроветворным органом, нейтрализует вредные продукты распада, в ней также обезвреживаются ядовитые вещества и накапливаются углеводы. Величина этого органа зависит от интенсивности питания, обмена веществ и физиологического состояния особей. В связи с этим индекс печени рекомендован для оценки состояния популяций гидробионтов и качества среды их обитания [5].

В комплекс морфобиологических параметров входит также коэффициент упитанности гидробионтов, рекомендованный для экспресс-оценки их общего состояния [6].

РАЗДЕЛ 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Характеристика объекта исследований

В качестве объектов исследования нами были выбраны представители разных таксономических групп, характерные обитатели черноморского побережья Крыма – морской ерш *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 (рис. 2.1 А) и черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) ((рис. 2.1 Б)), отвечающие требованиям биоиндикаторных видов:

- повсеместное распространение;
- достаточно крупные размеры;
- хорошо изученная биология;
- доступность для исследования;
- принадлежность к донной экологической группе;
- оседлый образ жизни.



А



Б

Рис. 2.1 Морской ерш *Scorpaena porcus* (А) и черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* (Б)

2.2 Характеристика районов исследования

Гидробионтов отбирали в трех севастопольских бухтах (Александровская, Балаклавская, Казачья) с разным уровнем комплексного загрязнения весной 2019 г. (рис. 2.2).



Рис. 2.2 Карта районов отбора гидробионтов

Александровская бухта входит в состав Севастопольской бухты, перегруженной городскими застройками, промышленными предприятиями, причалами. Искусственное сужение входного пролива б. Севастопольской за счет сооружения защитных северного и южного молов в конце 1970-х гг. привело к снижению интенсивности водообмена с открытой частью моря на 40 – 70% в год, что способствовало ухудшению экологического состояния акватории. Содержание опасных веществ - хлорорганических пестицидов, нефти, тяжелых металлов в бухте значительно выше, чем в других исследованных акваториях [7, 8].

Балаклавская бухта занимает особое место по своему географическому положению и характеру природопользования [9]. Бухта длительное время использовалась исключительно в качестве военно-морской базы и подвергалась сильному техногенному воздействию. Кроме того, непосредственно в акваторию бухты или сопредельную часть моря практически без очистки сбрасываются сточные воды. Все эти факторы при ограниченности водообмена с прибрежной частью моря и отсутствии должных природоохранных мероприятий привело к повсеместному загрязнению морской среды [7, 9].

Казачья бухта расположена в 15 км от центра Севастополя и по гидрохимическим показателям воды и экологическим характеристикам относится к условно чистым акваториям [10]. Донные отложения Казачьей бухты представлены в основном заиленными ракушняками и песками. Такие крупнозернистые осадки характеризуются хорошей промываемостью и в меньшей степени накапливают загрязняющие вещества. Содержание опасных хлорорганических пестицидов, нефти, тяжелых металлов в бухте незначительно по сравнению с другими районами [7, 8].

Таким образом, на основании литературных данных исследуемые акватории можно расположить в порядке увеличения уровня загрязнения в следующей последовательности: б. Казачья < б. Балаклавская < б. Александровская.

2.3 Методы исследования

Материалом для *биохимических* исследований служила печень рыб и гепатопанкреас моллюсков. Орган несколько раз промывали холодным 0,85% физраствором, гомогенизировали и центрифугировали (10000 g) 15 минут на холоду. Для дальнейшего анализа использовали надосадочную жидкость.

Содержание ТБК-активных продуктов (нмоль ТБК/ мг белка) регистрировали по реакции с тиобарбитуровой кислотой [11], активность каталазы (КАТ) (мкат/мг белка) – по реакции взаимодействия перекиси водорода с молибдатом аммония [12].

В ходе биологического анализа определяли размер рыб (общую длину, стандартную длину), массу (Р) рыбы и массу рыбы без внутренностей (массу тушки), массу печени и гонад. Возраст рыб определяли по отолитам. Индекс печени (ИП) (%) и упитанность (Упит.) (%) определяли по следующим формулам [13]:

$$\text{ИП} = (P_{\text{печени}} * 100) / P_{\text{тушки}}$$
$$\text{Упит.} = (P_{\text{тушки}} * 100) / SL^3, \text{ где } SL - \text{стандартная длина}$$

У мидий определяли размер (длину, ширину, высоту) массу (Р) целого моллюска, а также сырой вес всех мягких тканей и гепатопанкреаса. Индекс гепатопанкреаса (ИГП) (%) и упитанность (Упит.) (%) рассчитывали следующим образом:

$$\text{ИГП} = (P_{\text{гепатопанкреаса}} / P_{\text{целой мидии}}) * 100$$
$$\text{Упит.} = (P_{\text{сырой массы всех мягких тканей}} / L^3) * 100, \text{ где } L - \text{длина мидии}$$

Статистическую обработку данных проводили по Лакину (1990) [14]. Вычисляли среднее арифметическое (М), стандартное отклонение (σ), ошибку среднего арифметического (m). Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми рядами считали достоверными и статистически значимыми при $p \geq 0,05$.

РАЗДЕЛ 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы в печени/гепатопанкреасе гидробионтов из севавтопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

В связи с тем, что действие токсикантов на организм гидробионтов приводит к изменениям, происходящим в первую очередь на молекулярном уровне, для ранней биоиндикации трех севавтопольских акваторий изучали показатели прооксидантно-антиоксидантной: активность КАТ – фермента АОС и содержание ТБК-активных продуктов – показателя тканевого повреждения при окислительном стрессе.

Согласно данным рисунка 3.1, активность КАТ была достоверно выше ($p \geq 0,01$) в печени морского ерша из наиболее загрязненной бухты Александровской по сравнению с таковой у рыб из бухт Казачьей и Балаклавской.

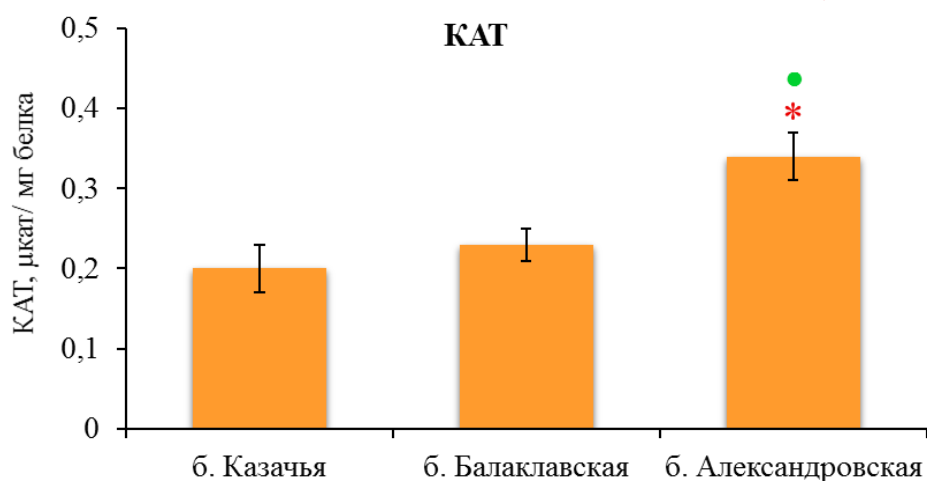


Рис. 3.1 Активность каталазы в печени морского ерша из севавтопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Примечания: * – достоверность различий между показателями печени морского ерша из б. Казачьей и других бухт; ● – из б. Балаклавской и б. Александровской.

Также как и активность КАТ, содержание ТБК-активных продуктов было достоверно выше ($p \geq 0,05$) в печени рыб из бухты Александровской по сравнению с аналогичным показателем рыб из бухт Казачьей и Балаклавской. Выявленная особенность свидетельствует об увеличении окислительного повреждения клеток печени у рыб из наиболее загрязненной бухты (Александровская) (рис. 3.2).

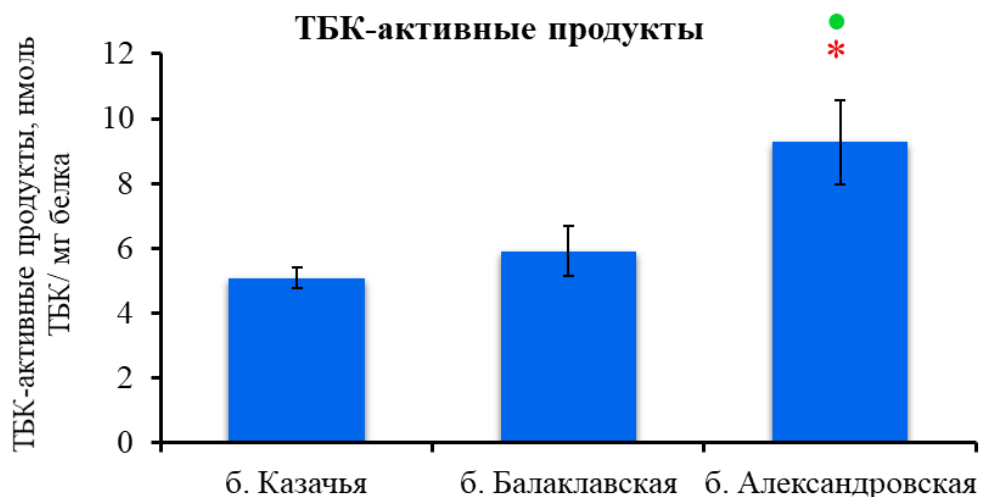


Рис. 3.2 Содержание ТБК-активных продуктов в печени морского ерша из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Примечания: * – достоверность различий между показателями печени морского ерша из б. Казачья и других бухт; ● – из б. Балаклавская и б. Александровская.

По аналогии с рыбами, исследовали показатели прооксидантно-антиоксидантной системы гепатопанкреаса мидий (рис. 3.3, 3.4).

Также, как и у рыб, активность КАТ была достоверно выше ($p \geq 0,05$) в гепатопанкреасе мидий из бухты Александровской по сравнению с таковой у моллюсков из менее загрязненных бухт Балаклавской и Казачьей (рис. 3.3).

Уровень ТБК-активных продуктов был достоверно выше ($p \geq 0,05$) в гепатопанкреасе мидий из бухты Александровская по сравнению с аналогичным показателем особей из бухты Казачья и увеличивался в ряду бухт: Казачья → Балаклавская → Александровская (рис. 3.4).

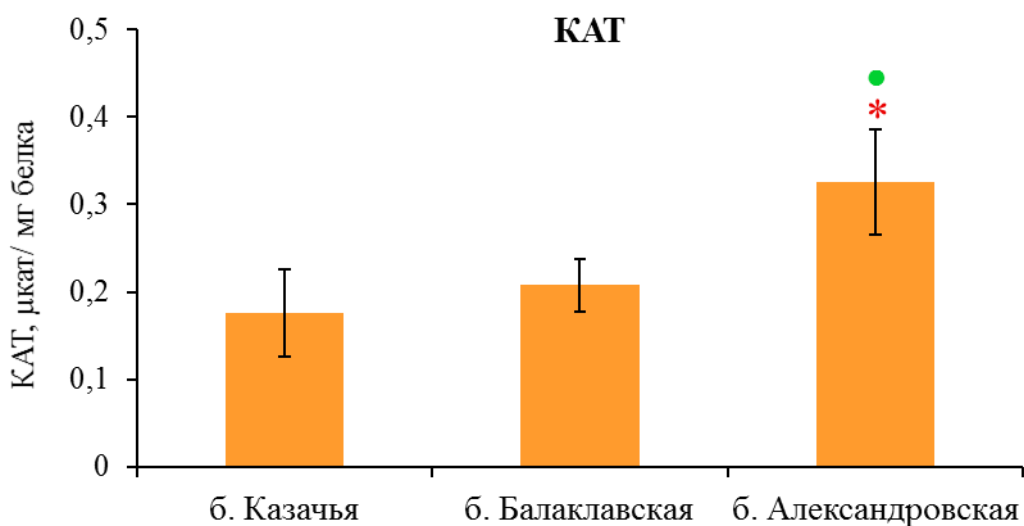


Рис. 3.3 Активность каталазы в гепатопанкреасе мидий из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Примечания: * – достоверность различий между показателями печени морского ерша из б. Казачьей и других бухт; ● – из б. Балаклавской и б. Александровской.

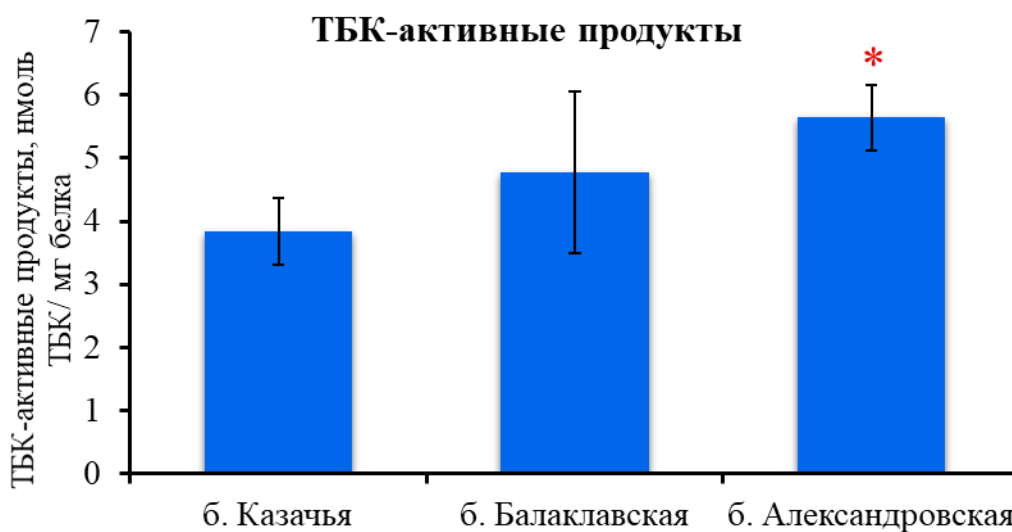


Рис. 3.4 Содержание TBK-активных продуктов в гепатопанкреасе мидий из севастопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Примечания: * – достоверность различий между показателями гепатопанкреаса мидий из б. Казачья и других бухт; ● – из б. Балаклавская и б. Александровская.

Таким образом, результаты исследований позволили установить высокую чувствительность показателей прооксидантно-антиоксидантной

системы печени/ гепатопанкреаса гидробионтов к уровню комплексного загрязнения в среде обитания.

3.2 Морфофизиологические показатели гидробионтов из сева­стопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Анализ морфофизиологических параметров ершей из трех сева­стопольских акваторий не показали достоверных отличий между значением индекса упитанности, тогда как ИП был достоверно выше ($p \geq 0,001$) у рыб из бухт Александровская и Балаклавская по сравнению с этим показателем рыб из бухты Казачья (табл. 3.1).

Таблица 3.1 Морфофизиологические параметры морского ерша из сева­стопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Показатель	Бухта		
	Казачья (n=42)	Балаклавская (n=39)	Александровская (n=52)
ИП, %	2,75±0,21	4,67±0,24*	4,43±0,22*
Упит, %	3,57±0,06	3,53±0,07	3,36±0,1

Примечания: * – достоверность различий между соответствующими показателями морского ерша из б. Казачьей и других бухт.

Согласно данным таблицы 3.2, ИГП моллюсков из бухты Александровской был достоверно ниже ($p \geq 0,01$) по сравнению с таковым у особей из бухт Казачьей и Балаклавской.

Таблица 3.2 Морфофизиологические параметры мидий из сева­стопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Показатель	Бухта		
	Казачья (n=17)	Балаклавская (n=27)	Александровская (n=17)
ИГП, ‰	4,43±0,28	4,72±0,13	3,48±0,21*•
Упит, %	1,81±0,08•	2,5±0,14	1,76±0,07•

Примечания: * – достоверность различий между соответствующими показателями мидий из б. Казачьей и других бухт; • – из б. Балаклавской и других бухт.

Упитанность у моллюсков из б. Балаклавской была достоверно выше, чем в других акваториях.

Таким образом, результаты исследования морфофизиологических показателей гидробионтов позволили установить, что наиболее информативным для биоиндикационной оценки акваторий является ИП и ИГП, тогда как показатель упитанности был мало информативным.

ВЫВОДЫ

1. Установлено увеличение уровня ТБК-активных продуктов в печени морского ерша и гепатопанкреасе моллюсков из бухты Александровской по сравнению с аналогичными показателями гидробионтов из бухт Казачьей и Балаклавской, что может характеризовать бухту Александровскую как менее экологически благополучную.
2. Отмечена сходная реакция гидробионтов на действие комплексного загрязнения бухты Александровской: увеличение активности КАТ в печени морского ерша и гепатопанкреасе мидий свидетельствует об адаптивной ответной реакции гидробионтов на загрязнение.
3. Значения ИП и ИГП гидробионтов из районов исследования изменялись неоднозначно и зависели как от уровня комплексного загрязнения акватории, так и от обеспеченности пищей гидробионтов.
4. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы являются наиболее чувствительными к уровню комплексного загрязнения акваторий, что позволяет рекомендовать их для ранней биоиндикации качества морских прибрежных вод.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Руднева И.И. Использование биомаркеров рыб для оценки экологического состояния морских акваторий // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. 2013. № 2 (55). С. 68–73.
2. Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя / под ред. И. И. Рудневой. М.: ГЕОС, 2016. 360 с.
3. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113, вып. 3. С. 442–445.
4. Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Каталаза и супероксиддисмутаза: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 9. С. 1170–1186.
5. Микодина Е.В., Шатуновский М.И. Физиолого-биохимические исследования функционального гомеостаза рыб // Вопросы ихтиологии. 2013. Т. 53, № 1. С. 113–118
6. Курицын А.Е., Ефремов С.А., Макарова Т.А. Морфофизиологические характеристики радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) и муксуна (*Coregonus muksun* (Pallas)) при садковом выращивании // Известия ТСХА. 2017. Вып. 3. С. 84–94.
7. Малахова Л.В., Скуратовская Е.Н., Малахова Т.В., Болтачев А.Р., Лобко В.В. Хлорорганические соединения в ерше *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в акватории Севастополя (Чёрное море): пространственное распределение и биологический отклик на уровень накопления загрязнителей // Морской биологический журнал. 2018. Т. 3. № 4. С. 51–63.
8. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века / под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова; Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН. – Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 276 с.
9. Овсяный Е.И., Котельянец Е.А., Орехова Н.А. Мышьяк и тяжелые металлы в донных отложениях Балаклавской бухты (Черное море) // Морской гидрофизический журнал. 2009. № 4. С. 67–80.
10. Терещенко Н.Н., Лазоренко Г.Е., Мирзоева Н.Ю., Егоров В.Н., Плотницyna О.В. Радиохэмоэкологическое состояние бухты Казачья (Чёрное море) в отношении токсичных металлов Hg, ⁹⁰Sr, ^{238,239,240}Pu и ²¹⁰Po // Морской экологический журнал. 2014. Т. 13, № 3. С. 59–74.
11. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
12. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.

13. *Правдин И.Ф.* Руководство по изучению рыб. М. : Пищ. пром., 1966. 376 с.
14. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк. 1990. 352 с.