

свидетельствуют, что источником цезия-137 в Азово-Донском бассейне остается Чернобыльский инцидент. Увеличения накопления Cs-137 в компонентах экосистем Азово-Донского бассейна в связи с работой Волгоградской АЭС в 2002-2007 гг. не зарегистрировано. Многолетний мониторинг акватории Азово-Донского бассейна, проводимый АзНИИРХ, позволяет эффективно контролировать радиологическую обстановку в Азово-Донском бассейне и успешно отслеживать возможные изменения радиологического фона.

Влияние антропогенного загрязнения донных отложений на ранний онтогенез бычка-кругляка *Neogobius Melanostomus*

И.Е. Цыбульский., А.Ю. Виноградов, М.А. Цыбульская, О.П. Купрюшкина

Антропогенное загрязнение оказывает негативное воздействие на биологические ресурсы водоемов и является одним из основных факторов нанесения ущерба рыбному хозяйству.

Наиболее распространенным видом антропогенного воздействия на биоресурсы Азовского и Черного морей и на их экосистемы в целом является нефтяное загрязнение. Как показали исследования аналитического центра ФГУП «АзНИИРХ», в районе Южной Озереевки в Черном море, в зоне работы морского терминала «Каспийского трубопроводного консорциума» (КТК), а также в отдельных районах Азовского моря (Темрюкский залив, центральная часть) содержание нефтяных углеводородов в донных отложениях приближается и нередко превышает величину 1г/кг грунта. В районах хронического загрязнения на территориях портов концентрация углеводородов в донных отложениях может достигать еще больших величин (более 10 г/кг грунта). Существенный ущерб водным биоресурсам нанесла авария танкера в Керченском проливе, произошедшая в ноябре 2007 г., в результате которой акватория пролива и береговая полоса оказались загрязненными нефтепродуктами. Последствия аварии для биоты в полной мере еще не определены, однако донные отложения, загрязненные нефтепродуктами, на этих акваториях еще долгое время будут являться источником вторичного загрязнения водной среды.

Как временные (аварийные), так и постоянные загрязнения среды морских водоемов оказывают неизбежное влияние на донные биоценозы. Как показали наши экспериментальные исследования прошлых лет, углеводороды на уровне 1,0 г/кг грунта и выше в разной степени влияют на функциональное состояние макрофитов, бентосоядных рыб (барабуля),

моллюсков (мидии и рапана), червей (полихеты).

Целью данного исследования явилось изучение влияния загрязненных донных отложений на эмбриональное и раннее постэмбриональное развитие бентосоядных рыб.

Материалы и методы исследования

Для постановки экспериментальных исследований использовали донные отложения, загрязненные частично трансформированными нефтепродуктами в концентрации 5,67 г/кг, отобранные на акватории одного из портов Азовского моря, и условно чистый морской грунт аналогичного гранулометрического состава (далее «грунт 1»). Указанный загрязненный грунт был «разбавлен» приблизительно в 5 раз условно чистым морским «грунтом 1». Полученный таким образом экспериментальный «грунт 2» имел конечное содержание нефтепродуктов около 1,0 г/кг.

Эксперименты выполняли на базе НЭМБЦ «Б. Утриш» в 100-л аквариумах, куда вносили по 5 кг «грунта 1» (контроль), или по 5 кг «грунта 2» (опыт). Соотношение вода: грунт составило 1:20.

Тест-объектом послужили кладки икры эвригалинной морской рыбы бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) на стадии гастрюляции (Калинина, 1976), прикрепленные к естественному субстрату (мелким булыжникам, обломкам ракушечника). Кладки отбирали в районах нереста бычка в Ейском лимане Азовского моря и Витязевском лимане Черного моря. Поскольку кладки отбирались в районах с различной соленостью воды, были выполнены две постановки эксперимента – на воде из Ейского лимана (эксперимент А, соленость 4 ‰) и воде из Витязевского лимана (эксперимент Б, соленость 15 ‰). В качестве условного контроля использовали кладки икры бычка-кругляка, развивавшиеся в воде соответствующей солености (4 и 15 ‰) из районов отбора, но без внесения донных осадков. В эксперименте отработывались варианты экспозиции икры как непосредственно прикрепленной к нерестовому субстрату, так и помещенной в специальные садки. Общая плотность посадки составила 30 икринок на 1 л воды.

О влиянии загрязненных донных отложений на эмбриональное и постэмбриональное развитие мальков бычка-кругляка судили по показателям выклева мальков и по биохимическим показателям: содержанию общего белка по Лоури (Lowri et al., 1951), активности глутатион-S-трансферазы – фермента, участвующего в детоксикации различных ксенобиотиков и являющегося важным звеном антиоксидантной системы (Карпищенко, 1999), а также по активности лизосомальных ферментов – кислой фосфатазы (КФ) и катепсина Д. Активность КФ определяли

стандартным методом с п-нитрофенилфосфатом (Меньшиков, 1999), активность катепсина Д – по Динглу (Дингл, 1980).

Результаты исследований и обсуждение

Выклев мальков бычка из икры, отобранной в Ейском и Витязевском лиманах и развивавшихся в вариантах эксперимента **А** и **Б** с добавлением чистого и загрязненных грунтов составил, соответственно, 100.0, 59.1 и 63.3 % (с поправкой по Эбботу). Следовательно, загрязнение донных отложений существенно снизило процент выклева мальков относительно варианта с незагрязненным грунтом: - в 1,7 раз в эксперименте при солености 4 ‰ и в 1,6 раза – при солености 15 ‰.

Из литературных данных следует, что отклонения в эмбриональном развитии рыб, вызываемые сырой нефтью и нефтепродуктами, сопровождаются сдвигами в белковом, липидном и нуклеотидном обменах (Миронов и др., 1993; Чесалина, Руднева, 1998; Carls et al., 1999; Heintz et al., 1999; Обухов, Крючков, 2000). Наибольшей чувствительностью к воздействию внешней среды кругляк обладает в процессе эмбриогенеза (Полуян и др., 2005).

Содержание общего белка в тканях взрослых рыб в норме, как правило, является «консервативным», которое, вместе с тем, может существенно колебаться в связи с нерестовыми и сезонными изменениями, зависеть от трофического фактора. При токсической нагрузке работа внутренних механизмов детоксикации в первую очередь выражается в увеличении использования белковых соединений в качестве окислительных субстратов (Коваленко, 2004). Наблюдаемые при этом изменения содержания общего белка и белкового спектра в различных тканях свидетельствуют о перестройках белкового обмена как адаптивной реакции рыб на неблагоприятные условия окружающей среды (Каниева, 2004).

По нашим данным, в разных вариантах эксперимента **А** (соленость 4 ‰) уровень белка в процессе эмбриогенеза бычка-кругляка и последующие первые 10 суток постэмбрионального развития повышался на 110-135 % или в 2,2-2,7 раза (рис. 1 А). Существенные различия в содержании белка между вариантами «условно чистый» и «загрязненный» грунт выявлены только в икре на 3-и сутки наблюдения, когда в варианте с загрязненным грунтом показатель был на 46% выше, чем в варианте с условно чистым грунтом. У бычка-кругляка в эксперименте **Б** (соленость 15 ‰) четко выраженного прироста содержания общего белка в процессе наблюдений за эмбриональным и постэмбриональным развитием не обнаружено (рис. 1 Б). У мальков, развивавшихся на загрязненном грунте, начиная с 5-х суток, отмечено заметное увеличение уровня белка по сравнению

с мальками с незагрязненного грунта. На 10-е сутки наблюдения этот прирост достиг 63 % и был статистически достоверным.

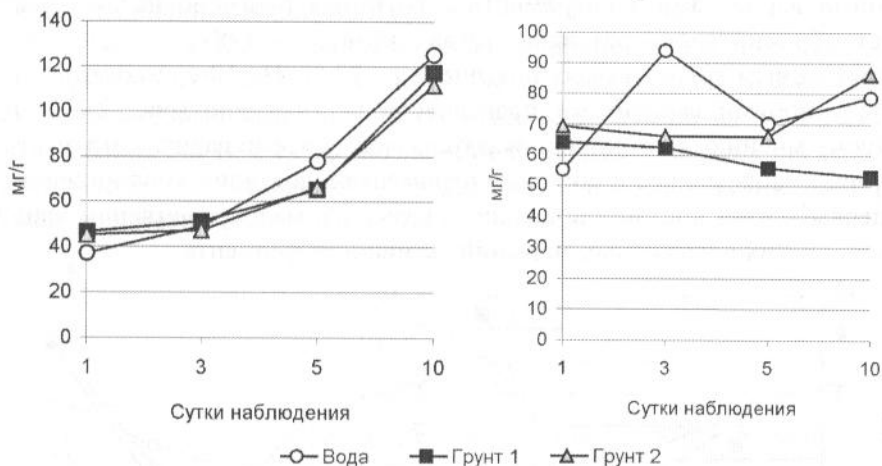


Рис. 1. Содержание общего белка (мг/г ткани) в тканях развивающихся мальков бычка-кругляка при солёности 4 ‰ (А) и 15 ‰ (Б)

Глютамин-S-трансфераза (Г-S-T) катализирует конъюгирование глутатиона с рядом эндогенных и экзогенных соединений, включая углеводороды нефти. Уровень экспрессии Г-S-T у многих видов рыб значительно возрастает при воздействии ксенобиотиков, что указывает на формирование ответа на химический стресс и может быть использовано в качестве эффективного биомаркера загрязнения воды (Дудкин и др., 1997; Сен, Кирикбакан, 2004).

Активность Г-S-T возростала в процессе эмбрионального и постэмбрионального развития бычка при различной солёности и достигла максимально высоких значений в тканях мальков к 10-м суткам наблюдения, превышая исходные значения ферментативной активности в икре в 100-120 раз. При солёности 4 ‰ в икре бычка в варианте с загрязненным грунтом показатель был снижен на 7-9-е сутки наблюдения как по сравнению с условным контролем (водой), так и по сравнению с незагрязненным грунтом на 38 и 37 % соответственно. У мальков активность Г-S-T в варианте с загрязненным грунтом также была в основном снижена как относительно воды, так и относительно незагрязненного грунта. В последнем случае отличие составило 18-52 % и на 10-е сутки наблюдения было статистически достоверно (рис. 2 А). В икре при солёности 15 ‰ к этапу завершения эмбрионального развития в варианте с загрязненным грунтом показатель на 9-е сутки наблюдения

был значительно (на 44 %) ниже, чем в варианте с незагрязненным грунтом. У мальков самое значительное отличие показателя между обоими вариантами эксперимента с грунтами отмечено на 3-и сутки постэмбрионального развития, когда активность Г-S-T в варианте с загрязненным грунтом была повышена на 92 %. На 10-е сутки отличий между обоими вариантами практически не отмечено (рис. 2 Б). По нашему мнению, те отличия показателя между всеми вариантами опыта, которые наблюдались в обоих экспериментах на стадии эмбриогенеза и в первые сутки постэмбрионального развития, малозначительны ввиду очень низких абсолютных значений активности фермента.

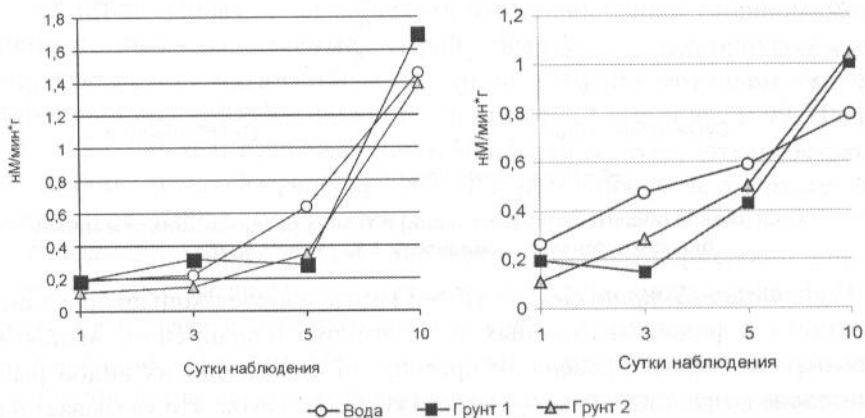


Рис. 2. Активность глутатион-S-трансферазы (нМ глутатиона/мин/г ткани) в тканях развивающихся мальков бычка-кругляка при солености 4 ‰ (А) и 15 ‰ (Б)

Определение активности лизосомальных ферментов – кислой фосфатазы и катепсина Д было предпринято нами с целью установить отклонения в функционировании лизосомального аппарата у мальков бычка, эмбриональное развитие которых проходило в среде с загрязненным в различной степени грунтом. Лизосомы – внутриклеточные органеллы, играющие важную роль в процессах раннего онтогенеза, в процессах биохимической адаптации организма рыб к неблагоприятным экологическим факторам, а также в защите организма рыб от ксенобиотиков (Немова и др., 1987; Высоцкая, Руоколайнен, 1993). Показатели функциональной активности лизосом у эмбрионов и личинок рыб согласуются с данными по выживаемости, росту и развитию (Высоцкая и др., 1993а).

Кислая фосфатаза (КФ) катализирует неспецифический гидролиз фосфорных эфиров органических соединений с образованием остатка

фосфорной кислоты. Фермент содержится в лизосомах клеток многих органов и тканей, но особенно велика его активность в печени, являющейся детоксикационным барьером в организме (Дингл, 1980).

Активность КФ у бычка-кругляка в процессе эмбриогенеза и в эксперименте А, и в эксперименте Б быстро увеличивалась, и особенно этот прирост был заметен у выклюнувшихся мальков на 3-10-е сутки наблюдений. На 10-е сутки активность фермента у мальков превышала исходные значения в икре в 12-16 раз при солености 4 ‰ и в 38-50 раз - при солености 15‰ (рис. 3, А, Б).

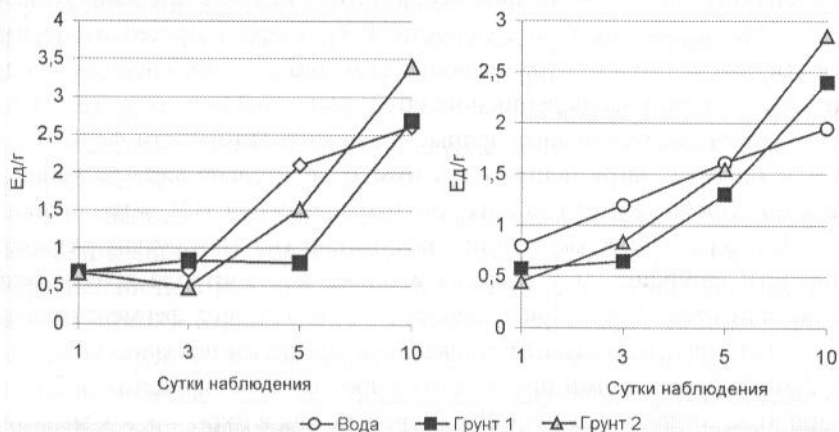


Рис. 3. Активность кислой фосфатазы (Ед/г) в тканях развивающихся мальков бычка-кругляка при солености 4 ‰ (А) и 15 ‰ (Б)

Различия в активности КФ в икре между опытом и контролем в ранние сроки эмбриогенеза были мало информативны из-за низких абсолютных значений активности. На 5-9-е сутки наблюдения, когда активность КФ существенно возросла, в икре, развивавшейся на загрязненном грунте, отклонения показателя в обоих экспериментах были незначительны. У выклюнувшихся мальков на загрязненном грунте при солености 4 ‰ отмечены кратковременные разнонаправленные изменения активности кислой фосфатазы: снижение на 3-и сутки на 42 %, затем прирост на 5-е сутки на 87 %. На 10-е сутки статистически достоверных отличий по сравнению с незагрязненным грунтом не отмечено (см. рис. 3 А). При солености 15 ‰ у мальков на 3-и сутки наблюдения отмечен кратковременный прирост активности КФ на 29 % в опыте на загрязненном грунте по сравнению с незагрязненным. В дальнейшем, на 5-10-е сутки наблюдения, показатели в вариантах эксперимента с грунтами различной загрязненности существенно не отличались (см. рис. 3 Б).

Катепсин Д - один из хорошо изученных лизосомальных ферментов, относящийся к классу карбоксильных протеиназ, гидролизующих большинство белковых субстратов. Изменение активности катепсина Д в ответ на воздействие токсикантов на организм как взрослых рыб, так и их эмбрионов и ранних личинок может быть одним из свидетельств изменения внутриклеточного белкового метаболизма и служить показателем состояния рыб в антропогенно нарушенных биоценозах (Немова и др., 1987).

По нашим данным, непрерывное возрастание ферментативной активности, отмеченное нами для Г-S-T и КФ в период перехода бычка от эмбрионального к постэмбриональному развитию, в случае катепсина Д было гораздо менее выражено. При солёности 4 ‰ прирост протеолитической активности отмечен только у развивающихся мальков: у них в период между 1-ми и 10-ми сутками наблюдения показатель вырос в 3,0-3,5 раза (рис. 4 А). При этом отмечены разнонаправленные изменения активности фермента у мальков в опыте с загрязненным грунтом относительно незагрязненного грунта: снижение показателя на 3-и сутки наблюдения на 31%, затем прирост на 5-е сутки на 37 %. К окончанию экспозиции (на 10-е сутки) различия в активности катепсина Д у мальков в опыте и в контроле практически отсутствовали (рис. 4 А). При солёности 15 ‰ прирост ферментативной активности отмечен, напротив, в развивающейся икре, где показатель в период между 2-ми и 7-ми сутками наблюдения вырос во всех вариантах в 2,1-2,4 раза. При этом отличия в активности фермента, как в икре, так и у мальков, постэмбриональное развитие которых проходило на загрязненном грунте, относительно варианта с незагрязненным грунтом были незначительны в течение всего периода наблюдений (рис. 4 Б).

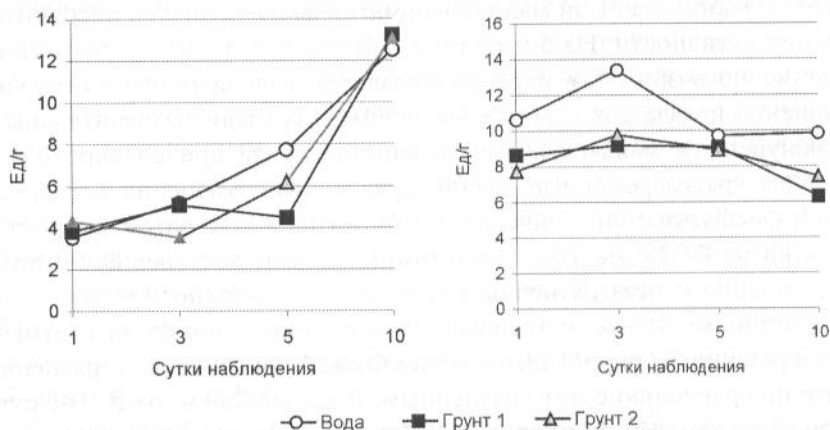


Рис. 4. Активность катепсина Д (Ед/г) в тканях развивающихся мальков бычка-кругляка при солёности 4 ‰ (А) и 15 ‰ (Б)

Заключение

Результаты биохимических исследований показали увеличение содержания общего белка и возрастание активности ферментов в процессе эмбриогенеза и постэмбрионального развития бычка-кругляка, что связано с дифференцировкой тканей и перестройкой метаболических процессов, протекающих под контролем соответствующих ферментов.

Возрастание активности глутатион-S-трансферазы и кислой фосфатазы у мальков после выклева было особенно заметным (на один – два порядка) и носило неравномерный характер. Изменения ферментативной активности катепсина Д в раннем онтогенезе были менее выражены. Следует отметить, что изменения протеолитической активности в большинстве случаев происходили синхронно с изменениями уровня общего белка в икре и у мальков: так, увеличение активности катепсина Д во всех вариантах эксперимента при солёности 4 сопровождалось ростом содержания белка.

В целом, исследование развития икры бычка-кругляка, экспонированной с грунтами (нерестовыми субстратами) различной загрязнённости, не выявило глубоких изменений биохимических характеристик, отражающих состояние белкового обмена, функцию лизосом, уровни детоксикационной и антиоксидантной активности. Кратковременные и, в некоторых случаях, разнонаправленные изменения исследованных показателей в экспериментальных вариантах с загрязнённым грунтом (на 25-50 от контрольного уровня), как правило, стабилизируются у мальков к 10-м суткам после выклева.

Вместе с тем у мальков, экспонированных в аквариумах с загрязнённым грунтом, наблюдались отдельные кратковременные отклонения биохимических показателей, превосходящие допустимый уровень ($\pm 50\%$), а также достаточно продолжительные отклонения, имеющие характер тенденции. Так, при солёности 4% отмечались подавление активности глутатион-S-трансферазы в икре к концу периода эмбриогенеза и у мальков в течение почти всего периода наблюдений, а также скачок активности кислой фосфатазы у мальков на 5-е сутки после выклева. При солёности 15% наблюдался скачок активности глутатион-S-трансферазы у мальков на 3-и сутки после выклева и устойчивый прирост содержания общего белка, начиная с 5-х суток после выклева.

Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о снижении процентного количества выклюнувшихся мальков в вариантах с донными отложениями, и, особенно, при загрязнении нерестового субстрата. Материалы экспериментальных исследований позволяют предположить,

что при загрязнении нефтепродуктами донных отложений (нерестового субстрата) в местах нереста бентосоядных рыб (в частности, бычков) могут произойти нарушения эмбрионального и постэмбрионального развития и, как следствие, - снижение количества выклюнувшихся мальков и ухудшение выживаемости молоди.

Выделение из воды Азовского и Черного морей перспективных для биотестирования штаммов биолюминесцентных бактерий

М.А. Сазыкина, И.Е. Цыбульский

Среди разрабатываемых в настоящее время методов биотестирования особое место занимают методы оценки токсичности по изменению люминесценции светящихся бактерий, а также отдельных ферментативных систем этих бактерий. Простота измерения люминесценции, экспрессность и высокая чувствительность метода, возможность автоматизации измерений и статистической обработки данных обеспечивают светящимся бактериям несомненное преимущество по сравнению с другими биологическими тестами. Так, фирмой Microbics Operations of Beckman Instruments, Inc. (США) разработан современный тест-реагент на основе лиофилизированных морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Этот биосенсор, получивший торговую марку Микротокс (Microtox 5TM), нашел широкое применение в «быстрой токсикологии» во многих странах. Морская биолюминесцентная бактерия *Vibrio fisheri* оказалась более чувствительной при детекции токсичности морской воды по сравнению с *Artemia franciscana* (Kungolos et al., 2003).

Основные задачи наших исследований заключались в выделении, идентификации, разработке методов хранения, определении чувствительности светящихся аборигенных бактерий и разработке на их основе метода оценки токсичности компонентов среды морских рыбохозяйственных водоемов.

Материалы и методы исследования

Выделение биолюминесцентных бактерий из проб воды, отобранных в районе мыса Б. Утриш (Черное море) и в Темрюкском заливе Азовского моря проводили методом мембранных фильтров.

В ходе фильтрации бактерии концентрировали на мембранном фильтре и затем выращивали на специально подобранных селективных средах. При этом использовали оригинальные среды с