

УДК 574.24

## ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГИДРОБИОНТОВ *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

© 2015 В.В. Слободскова<sup>1</sup>, С.Е. Лескова<sup>3</sup>, В. П. Челомин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

<sup>3</sup>Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет

Поступила в редакцию 19.05.2015

В работе представлены результаты исследования физиологического состояния *Mizuhopecten yessoensis*, культивируемого в бух. Северная. Для этой цели были использованы биохимические маркеры: индекс генетического повреждения, степень окислительной деградациии липидов и концентрацию тяжелых металлов в тканях гребешка приморского. Показано, что при культивировании моллюски испытывают окислительный стресс, который сопровождается повреждением молекулы ДНК клеток жабр и пищеварительной железы гидробионтов.

Ключевые слова: *окислительный стресс, малоновый диальдегид, аквакультура, Mizuhopecten yessoensis*

Марикультура – сравнительно молодая отрасль рыбного хозяйства, ее история исчисляется несколькими десятилетиями. При этом по данным ФАО, марикультура в мире является одной из самых быстро развивающихся отраслей в мировой экономике [1]. В России первое хозяйство по разведению моллюсков было создано в Приморском крае в 1972 г., который впоследствии стал лидером в нашей стране по количеству подобных предприятий. Приморский край весьма перспективен для развития марикультуры. Побережье залива Петра Великого характеризуется наличием закрытых бухт и высокой продуктивностью прибрежных вод, что значительно выделяет его на фоне других акваторий по числу потенциальных объектов культивирования [2]. На сегодняшний день в Приморском крае действует около 50 аквакультурных хозяйств по разведению различных видов гидробионтов, которые занимают площадь более 20000 га [3].

Массовое выращивание гидробионтов в морских водах (марикультура) помимо экономической выгоды также создает некоторые проблемы [4], основной из которых является сложное и неоднозначное воздействие аквакультуры на окружающую среду. По данным различных исследователей влияние промышленной

марикультуры на естественные прибрежные экосистемы колеблется от слабых, практически неощутимых [5-7], до катастрофических по своим последствиям.

Некоторые исследователи отмечают, что основным модифицирующим фактором выступают взвешенные органические вещества, являющиеся производным от жизнедеятельности культивируемых объектов [7-10]. При этом большая часть растворенного кислорода тратится на окисление метаболитов культивируемых организмов, что приводит к возникновению бескислородных зон (зон гипоксии). Известно, что зоны гипоксии, образующиеся в различных акваториях шельфа Мирового океана, приводят к гибели, как отдельных видов гидробионтов, так и к трансформации водных экосистем [11]. Для дальнейшего устойчивого развития хозяйств марикультуры требуется тщательное изучение влияния промышленного культивирования гидробионтов на окружающую среду, а также необходима постоянная оценка физиологического состояния культивируемых организмов.

Возможным решением проблемы изучения и прогнозирования устойчивости хозяйств марикультуры служит эффективное определение так называемых «сигналов бедствия» на молекулярном и клеточном уровнях, а также в сопоставлении их с возможными последствиями на более высоких уровнях организации (популяции, сообщества, экосистемы). Следовательно, «сигналы бедствия», обнаруженные на молекулярном, клеточном и физиологическом уровнях организации являются ранними

*Слободскова Валентина Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории морской экотоксикологии. E-mail: slobodskova@list.ru*

*Лескова Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, заведующая кафедрой «Водные биоресурсы и аквакультура». E-mail: svetaleskova@mail.ru*

*Челомин Виктор Павлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией морской экотоксикологии. E-mail: chelomin@poi.dvo.ru*

предостерегающими биомаркерами сниженных функций культивируемых организмов, вызванных различными нарушениями, в том числе патологиями.

**Цель работы:** оценить физиологическое состояние *Mizuhopecten yessoensis*, культивируемого в бух. Северная (Славянский залив) с помощью биохимических маркеров.

**Материал и методы исследования.** Гребешок приморский *Mizuhopecten yessoensis* является одним из традиционных объектов культивирования в зал. Петра Великого, моллюск обитает у берегов Приморья, о-ва Сахалин, Курильских островов, у северных берегов Кореи и Японии и является ценным промысловым объектом. Для гребешка благоприятными считаются районы, в которых зимой температура воды не опускается ниже  $-1,5^{\circ}\text{C}$ , а летом не поднимается выше  $18-20^{\circ}\text{C}$ . *M. yessoensis*, особенно его молодь, очень чувствителен к дефициту кислорода, поэтому предпочитает хорошо аэрируемые районы с постоянными сильными течениями, периодическими приливами и отливами. Благоприятное для жизни гребешка количество растворенного в воде кислорода находится в пределах  $5-9 \text{ мл}\cdot\text{л}^{-1}$ , хотя для моллюска потребление может меняться в зависимости от его физиологического состояния, сезона года, условий среды обитания. Продолжительность жизни – до 22 лет. Раздельнопольный. Нерест в мае-июне. В случае опасности способен активно перемещаться. К донному образу жизни моллюск переходит, достигнув размера раковины в длину 20 мм.

Исследование проводили на гребешках 2-х летнего возраста, отобранных из садков марикультурного хозяйства, расположенного в бух. Северная (Славянский залив) (рис. 1). Моллюски были получены в 2008 г. и 2014 г. в посленерестовый период (октябрь). Для биохимических анализов использованы жабры и гепатопанкреас *M. yessoensis*. Степень развития окислительного стресса оценивали по изменению концентрации малонового диальдегида (МДА) как конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12]. Концентрацию МДА определяли на следующий день после препарирования. Хранили материал при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Приготовление гомогената проводилось на льду. Отбирали по 15 экз. моллюсков, при этом определение уровня содержания ПОЛ проводилось отдельно для каждого животного. Для количественного анализа содержания тяжелых металлов в тканях был применен атомно-абсорбционный метод как наиболее широко используемый в аналитической практике [13, 14].

При определении количества повреждений в молекуле ДНК использовали щелочной вариант кометного анализа [15], адаптированного к

морским организмам [16]. Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений была использована компьютерная программа CometScore Freeware v1.5, которая позволяет вычислять различные параметры комет, указывающие на степень повреждения клеточной ДНК. Для каждой кометы рассчитывали долю ДНК в хвосте кометы (DNAt), исходя из значений которого был рассчитан индекс генетического повреждения (ИГП) для каждой группы моллюсков. Для этого выборку ДНК-комет полученных с одного геле-слайда, разделили на пять классов в зависимости от степени фрагментации клеточной ДНК (C0 – <5% фрагментированной ДНК, C1 – 5-20% фрагментированной ДНК, C2 – 20-40% фрагментированной ДНК, C3 – 40-75% фрагментированной ДНК, C4 – >75% фрагментированной ДНК) [18]. ИГП рассчитывали по формуле  $(C1+2*C2+3*C3+4*C4) / (C0+C1+C2+C3+C4)$  [17]. В исследованных группах гребешков анализировали по 15 геле-слайдов (1 слайд = 1 особь), содержащих не менее 50 комет в каждом.

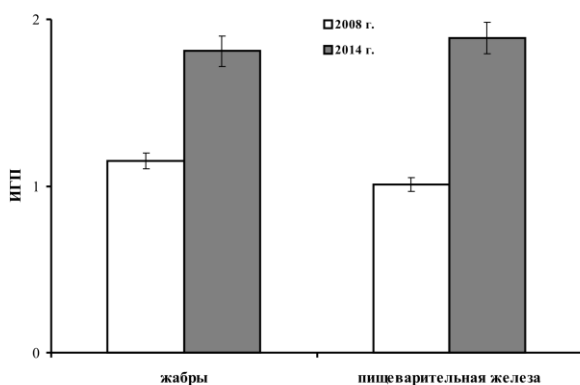


Рис. 1. Карта-схема района отбора *M. yessoensis*.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2003. Оценку результатов проводили по каждому эксперименту путем сравнения среднегрупповых показателей ( $P < 0,05$  с использованием непараметрического критерия Даннета).

**Результаты и обсуждение.** Результаты проведенного исследования показали, что у гребешков, отобранных в 2014 г., степень деградации молекулы ДНК клеток жабр и пищеварительной железы значительно выше, чем в 2008 г. Индекс генетического повреждения в жабрах в 2014 г. увеличился более, чем в 1,5 раза и составил  $1,81 \pm 0,6$ , тогда как в 2008 г. этот показатель был равен  $1,15 \pm 0,3$  (рис. 2). Из литературы известно, что в норме значение ИГП находится в пределах единицы [18], при этом незначительное увеличение данного показателя наблюдалось в жабрах гребешка и в 2008 г. В пищеварительной железе моллюсков наблюдается подобная картина, при этом ИГП вырос почти в 1,9 раза в 2014г, по сравнению с 2008г (с  $1,01 \pm 0,4$  до  $1,89 \pm 0,61$  соответственно) (рис. 2).

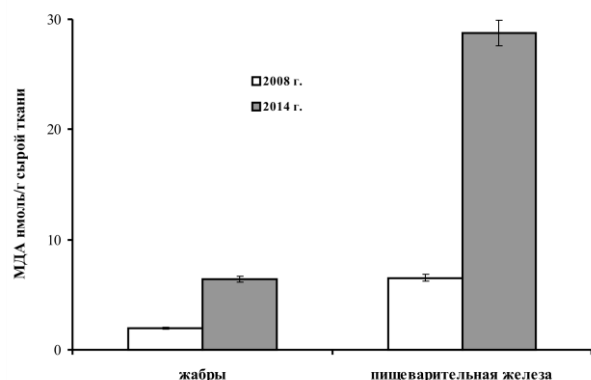
Можно предположить, что культивируемые моллюски находятся в состоянии окислительного стресса, так как исходя из наших результатов видно, что в тканях *M. yessoensis* наблюдается интенсивное накопление продуктов ПОЛ (МДА). Уровень МДА в жабрах гребешков в 2014 г. увеличился практически в 3,5 раза, в пищеварительной железе – более, чем в 4,5 раза по сравнению с моллюсками отобранными в 2008 г. (рис. 3). Как известно окислительный стресс сопровождается деструктивным повреждением основных биоструктур, в том числе и ДНК. МДА легко взаимодействует с нуклеиновыми кислотами, что неизбежно приводит к нарушению функционирования клеток. Окислительное повреждение нуклеиновых кислот выражается во множественных разрывах цепей, фрагментации рибозы (или дезоксирибозы) и модификации нуклеиновых оснований [18].



**Рис. 2.** Индекс генетического повреждения (ИГП) ДНК клеток жабр и гепатопанкреаса *M. yessoensis* в 2008 и 2014 гг. (среднее  $\pm$  стандартное отклонение, n = 15)

Возможно, рост количества деструктивных изменений в геноме и накопление продуктов ПОЛ связаны с угнетением системы репарации ДНК и ослаблением антиоксидантной защиты клетки. При этом возникшие повреждения в структуре ДНК могут спровоцировать мутации и злокачественную трансформацию клеток гидробионтов. Положительная зависимость между этими двумя маркерами (повреждение ДНК и количество продуктов ПОЛ (МДА)) подтверждает тот факт, что, скорее всего, окислительный стресс является одной из причин деградации генома культивируемых гребешков.

Исследования последних лет убедительно показали, что тяжелые металлы (ТМ) могут активно вмешиваться в окислительно-восстановительный баланс клетки, создавая условия для усиления генерации активных форм кислорода (АФК) или снижая способность клетки к их нейтрализации [19-24], в связи с чем был проведен анализ содержания микроэлементов в жабрах и пищеварительной железе гребешков (табл. 1). Выявлено, что концентрации ТМ Fe, Mn, Zn, Cu и Cd в 2008 г. значительно выше, чем в 2014 г. В настоящее время достаточно хорошо изучены особенности аккумуляции ТМ в тканях гребешка приморского, обитающего в разных акваториях, а также известен диапазон максимальной и минимальной концентрации для районов с разной степенью антропогенной нагрузки. Следует отметить, что уровни Fe, Mn, Zn, Cu и Cd в жабрах и пищеварительной железе гребешка из бух. Северная сходны по значениям с таковыми у *M. yessoensis* из залива Восток, который считается акваторией с незначительным антропогенным прессом [25].



**Рис. 3.** Уровень МДА в жабрах и пищеварительной железе *M. yessoensis* в 2008 и 2014 гг. (среднее  $\pm$  стандартное отклонение, n = 15)

**Таблица 1.** Содержание ТМ в тканях *M. yessoensis*, мкг/г сухой массы (среднее ± стандартное отклонение, n = 15)

Год	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd
жабры					
2008	72±2.2	10,5±0.9	436±25.3	4,7±1.6	4,07±0.9
2014	43±1.4	3,43±0.3	335±18.6	0,43±0.1	0,87±0.2
пищеварительная железа					
2008	338±31.4	7±2.6	132±15.6	11±2.1	56±5.9
2014	171±20.6	3,53±1.7	71±4.9	2,59±1.6	36,7±2.5

Полученные нами результаты дают основание полагать, что в данном случае аккумуляция ТМ не является основной причиной окислительного стресса *M. yessoensis* культивируемого в бух. Северная. Отмечается обратная взаимосвязь между этими показателями, так при снижении уровней ТМ в тканях гребешков в 2014г., наблюдается увеличение продуктов ПОЛ и резко возрастает количество повреждений молекулы ДНК.

Данное исследование является начальным этапом в серии работ по оценке физиологического состояния культивируемых гидробионтов (*M. yessoensis*) в бух. Северная. Учитывая важную роль генома в функционировании биологических систем, деструктивные изменения в структуре молекулы ДНК, являются наиболее значимыми проявлениями неблагоприятного воздействия среды.

**Выводы:** полученные результаты с помощью предлагаемого нами подхода могут быть использованы для решения проблем, связанных с изучением и прогнозированием устойчивости хозяйств марикультуры.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 15-04-06526 А.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры. 2014. <http://www.fao.org/3/f3c6a307-540d-4335-8edf-613df95251fd/i3720r.pdf>
2. Гайко, Л.А. Марикультура: прогноз урожайности с учетом воздействия абиотических факторов. – Владивосток: Дальнаука, 2006. 204 с.
3. Коваль, И.В. Состояние и тенденции развития аквакультуры в Приморском крае / И.В. Коваль, И.А. Овчинникова // Вестник ТГУ. 2013. №1. С. 36-47.
4. Read, P.A. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe / P.A. Read, T.F. Fernandes // Aquaculture. 2003. Vol. 226. P. 139-163.
5. Ansari, Z.A. Effect of high organic enrichment of benthic polychaete population in an estuary / Z.A. Ansari, B.S. Ingole, A.H. Parulekar // Mar. Pollut. Bull. 1986. Vol. 17. P. 361-365.
6. Veer, H.W. Eutrophication and mussel culture in the western Dutch Wadden Sea: impact on the benthic ecosystem; hypothesis // Helgol. Meeresuntersuch., 1989. Vol. 43. N 3-4. P. 517-527.
7. Yokoyama, H. Environmental quality criteria for fish farms in Japan // Aquaculture. 2003. Vol. 226. P. 45-56.
8. Stenton-dozey J.M.E. Impact of mussel culture on macrobenthic community structure in Saldanha bay, South Africa / J.M.E. Stenton-dozey, L.F. Jackson, A.J. Busby // Marine Pollution Bulletin, 1999. Vol. 39. N 1-12. P. 357-366.
9. Hansen, L.P. The incidence of escaped farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in the Faroese fishery and estimates of catches of wild salmon / L.P. Hansen, J.A. Jacobsen, R.A. Lund // ICES J. Mar. 1999. Vol. 56. P. 200-206.
10. Holmer, M. ICES Symposium on Environmental Effects of Mariculture: Introduction / M. Holmer, P. Lassus, J.E. Stewart, D.J. Wildish // ICES Journal of Marine Science. 2001. Vol. 58. P. 363-368.
11. Wu, R.S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses // Mar. Pollut. Bul. 2002. Vol. 45. P 35-45.
12. Buege, J.A. Microsomal lipid peroxidation / J.A. Buege, S.D. Aust // Methods in Enzymology. Academic Press. N.Y. 1978. Vol. 52. P. 302-310.
13. Julshamn, K. Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed molluscs in western Norway-I. The distribution and binding of cadmium, zinc and copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis* / K. Julshamn, K.-J. Andersen // Comp. Biochem. Physiol. 1983. Vol. 75A. P. 9-12.
14. Никаноров, А.М. Биомониторинг тяжелых металлов в пресных экосистемах / А.М. Никаноров, А.В. Жулидов, А.Д. Покаржевский. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. 144 с.
15. Singh, N.P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells / N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider // Exp. Cell Res. 1978. Vol. 175. P. 184-191.
16. Mitchelmore, C.L. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the "Comet" assay / C.L. Mitchelmore, C. Birmelin, D.V. Livingstone, J.K. Chipman // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 41. P. 51-58.
17. Cavas, T. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay / T. Cavas, S. Konen // Aquat. toxicol. 2008. Vol. 90. P. 154-159.
18. Rodriguez, H. Mapping of copper/hydrogen peroxide-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction / H. Rodriguez, R. Drouin, G.P. Holmquist et al. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 17633-17640.
19. Chelomin, V.P. The effect of heavy metals on processes of lipid peroxidation in microsomal membranes from

- the hepatopancreas of bivalve mollusks *Mizuhopecten yessoensis* / V.P. Chelomin, N.N. Belcheva // Comp. Biochem. Physiol. 1992. Vol. 103 C. P. 419-422.
20. Regoli, F. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers / F. Regoli, G. Principato // Aquat. Toxicol. 1995. Vol. 31. P. 143-164.
  21. Stohs, S.J. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions / S.J. Stohs, D. Bagchi // Free Rad. Biol. Med. 1995. Vol. 18, № 2. P. 312-336.
  22. Livingstone, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // Mar. Pollut. Bull. 2001. Vol. 42, Issue 8. P. 656-666.
  23. Chandran, R. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod *Achatina filica* / R. Chandran, A. Sivakumar, S. Mohandass, M. Aruchami // Compar. Biochem. Physiol. 2005. Vol. 140 C. P. 422-426.
  24. Довженко, Н.В. Окислительный стресс, индуцируемый кадмием в тканях двусторчатого моллюска *Modiolus modiolus* / Н.В. Довженко, А.В. Куриленко, Н.Н. Бельчева, В.П. Челомин // Биол. моря. 2005. Т. 31, № 5. С. 358-362.
  25. Лукьянова, О.Н. Молекулярные биомаркеры. – Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 2001. 196 с.

## ASSESSMENT THE PHYSIOLOGICAL STATE OF CULTIVATED HYDROBIONTS *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

© 2015 V.V. Slobodskova<sup>1</sup>, S.E. Leskova<sup>3</sup>, V.P. Chelomin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Pacific Oceanological Institute named after V.I. Ilyichev

<sup>2</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok

<sup>3</sup> Far Eastern State Technical Fisheries University

The paper presents the results of study the physiological state of *Mizuhopecten yessoensis*, cultivated in Severnaya bay. For this purpose were used biochemical markers of genetic damage index, the degree of oxidative degradation of lipids and concentration of heavy metals in the scallops tissues. It is shown that when cultured clams are experiencing oxidative stress, which is accompanied by damage to the DNA molecules of the gill cells and digestive gland of aquatic organisms.

Key words: *oxidative stress, malondialdehyde, aquaculture, Mizuhopecten yessoensis*

---

Valentina Slobodskova, Candidate of Biology, Research Fellow at the Marine Ecotoxicology Laboratory. E-mail: slobodskova@list.ru

Svetlana Leskova, Candidate of Biology, Head of the Department "Water Bioresources and Aquaculture".

E-mail: svetaleskova@mail.ru

Viktor Chelomin, Doctor of Biology, Chief of the Marine Ecotoxicology Laboratory. E-mail: chelomin@poi.dvo.ru