

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ АН УССР

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ "РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
РЕСУРСОВ МОРЯ _- ВАЖНЫЙ ВКЛАД В РЕАЛИЗАЦИЮ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ ПРОГРАММЫ"

№2556-85 Длн.

УДК 594:577.1+551.46.09:628.5(262.5)

С.А.Горомосова, В.А.Таможняя, А.З.Шапиро

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ
УСТОЙЧИВОСТИ МОЛЛЮСКОВ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ

Одним из основных тест-организмов биомониторинга являются моллюски, что связано с их распространенностью в донных биоценозах, способностью аккумулировать ряд тяжелых металлов и сравнительно высокой устойчивостью отдельных видов к загрязнению. В настоящее время оценку состояния морской среды предполагается проводить не только по биологическим показателям вида - выживаемость, рост, репродукционная способность, но и по изменению ряда биохимических показателей - содержанию АТФ, аминокислот, активности ферментов пластического и энергетического обмена. Особенно показательна при этом активность ферментов, участвующих в адаптивных перестройках обмена, в частности, при переходе с аэробного пути на анаэробный.

В данной работе сделана попытка применить биохимические характеристики для обоснования разной степени выносливости некоторых массовых видов черноморских моллюсков к хроническому загрязнению в природных условиях, что ранее, как нам известно, не проводилось.

В качестве показателей были выбраны ферменты аминокислотного обмена: аспартат- и аланинаминотрансфераза (ААТ и АЛАТ) и ферменты, ответственные за альтернативные пути превращения продуктов расщепления углеводов: малат- и лактатдегидрогеназа (МДГ и ЛДГ). Как известно, углеводный и аминокислотный обмен наиболее активны в энергетическом балансе моллюсков.

Материал и методы.

Моллюсков собирали в июне 1982 г. в трех бухтах разной степени загрязненности, показателем которой служило содержание хлороформэкстрагируемых веществ, отражающее нефтяное и органическое загрязнение [1]. Материал доставляли в контейнерах с морской водой, держали в течение суток в протоке и затем использовали для анализов. Были исследованы два вида брюхоногих моллюсков - *Tritia reticulata*, *Cerithium vulgatum* и четыре вида двустворчатых - *Cerastoderma lamarki*, *Polititapes* sp., *Chamelea galina*, *Pitar rudis*.

В самой загрязненной бухте были собраны только трития и церастодерма, так как остальные виды там не встречаются. Для анализа брали две ткани: мышцы (мускул-замыкатель, нога) и печень. Ткани выделяли на холоду, измельчали ножницами и затем гомогенизировали. Соотношение навески ткани и 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4 составляло 1:9. Гомогенат центрифугировали в ЦРЛ-1 со скоростью 12 тыс.об/мин. Полученный супернатант являлся источником ферментного белка. Методы определения активности ферментов описаны нами ранее [2,3].

Опыты с гипоксией проводили в непроточной морской воде. В два кристаллизатора объемом 9 л помещали разные виды моллюсков по 10 экземпляров. В одном сосуде вода была проточной, в другом нет.

Экспозиция моллюсков в опыте 24 часа. Температура морской воды - 22° С. Содержание кислорода в непроточном варианте составляло через сутки 1,5 - 2,1 мг/л. Все приведенные результаты являются средними из трех определений.

Результаты и обсуждение.

При рассмотрении полученных данных оказалось, что в чистых бухтах уровень активности ферментов переаминирования в тканях всех видов моллюсков (рис.1) колеблется в незначительных пределах. В загрязненных бухтах по сравнению с чистыми в мышцах разных видов либо повышается, либо понижается. Особенно хорошо это заметно у тритии, питара и церастодермы. ААТ у первых двух повышается, у церастодермы - понижается. Активность АЛАТ у всех видов, кроме церитиума, несколько снижается в загрязненных бухтах (рис.1,б). Таким образом, абсолютные величины ферментативных активностей меняются разнонаправленно.

Более показательное отношение активности ААТ/АЛАТ, которое в норме у данного вида в один и тот же сезон является постоянной величиной. Повышение этого отношения в 1,5 раза в загрязненных районах наблюдается у трех видов моллюсков - тритии, питара и хамелеи, и во столько же раз оно понижается у полититапеса, церитиума и церастодермы (рис.2).

Активность ЛДГ у исследованных моллюсков донных биоценозов низка (10-50 нмоли/мг белка/мин), что свойственно для ферментов конечной части гликолиза у гидробионтов с малоподвижным или прикрепленным образом жизни [4]. В чистой бухте самая высокая активность отмечается у церастодермы и тритии, самая низкая - у хамелеи и питара (рис.3). В загрязненных районах активность ЛДГ значительно понижается, наиболее вы-

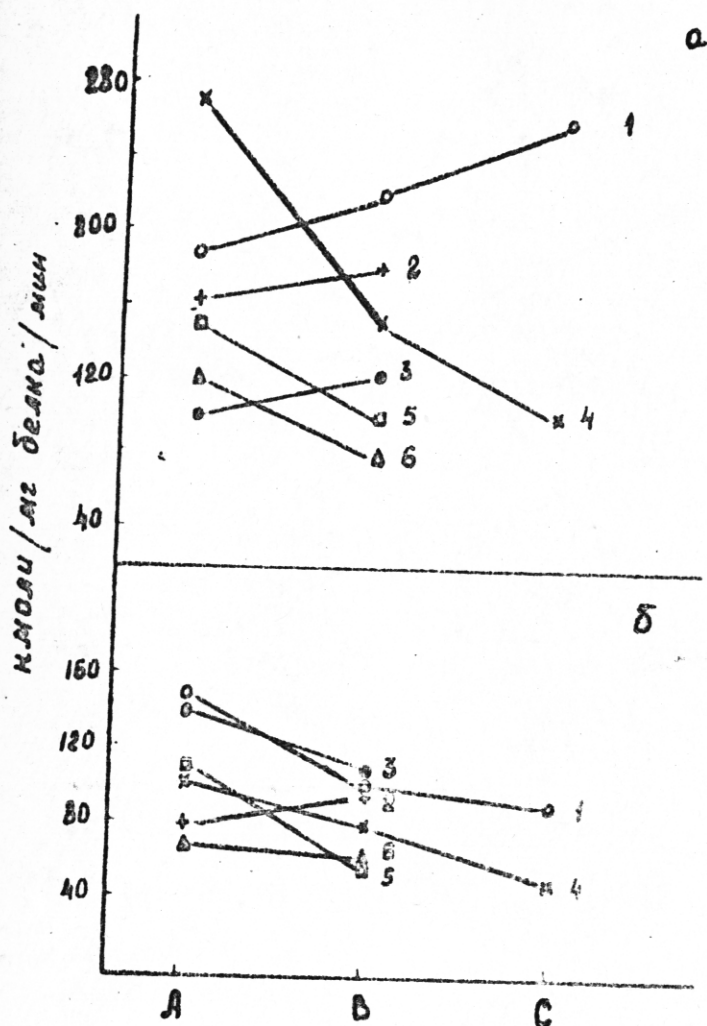


Рис. I. Активность аспартат- (а) и аланинаминотрансферазы (б) в мышцах моллюсков из условно чистой (А), средней степени загрязненности (В) и сильно загрязнённой (С) бухты. 1-трития, 2-церитиум, 3 - питар, 4 - церастодерма, 5 - хамелея и 6 - полититапес.

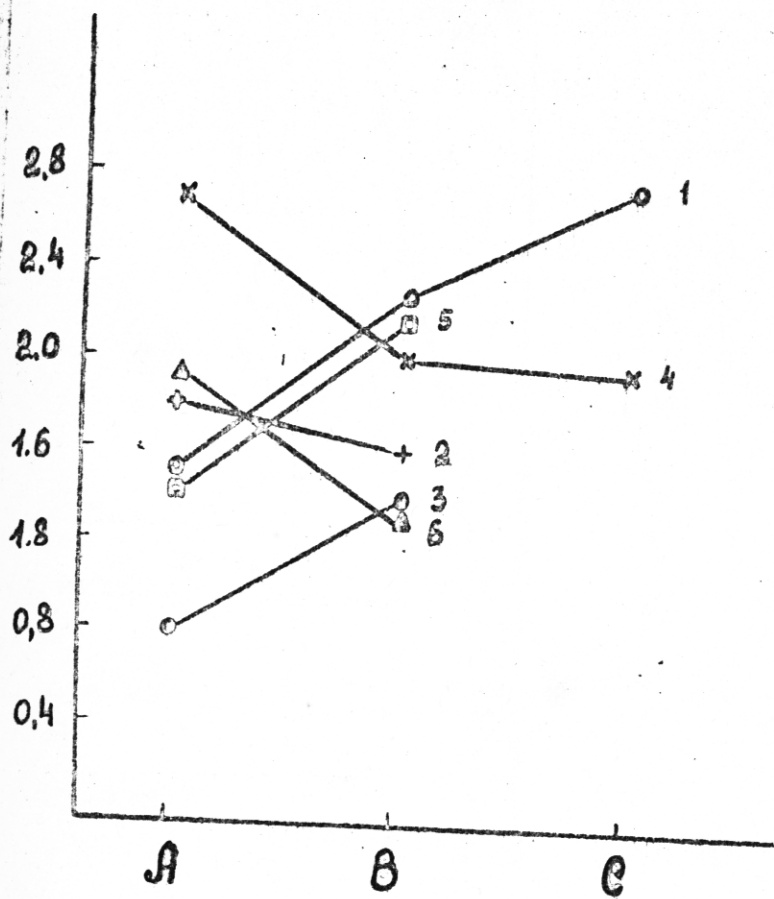


Рис.2. Отношение активности ААТ/АЛАТ в мышцах моллюсков из бухт разной степени загрязненности. Обозначения те же, что и на рис.1.

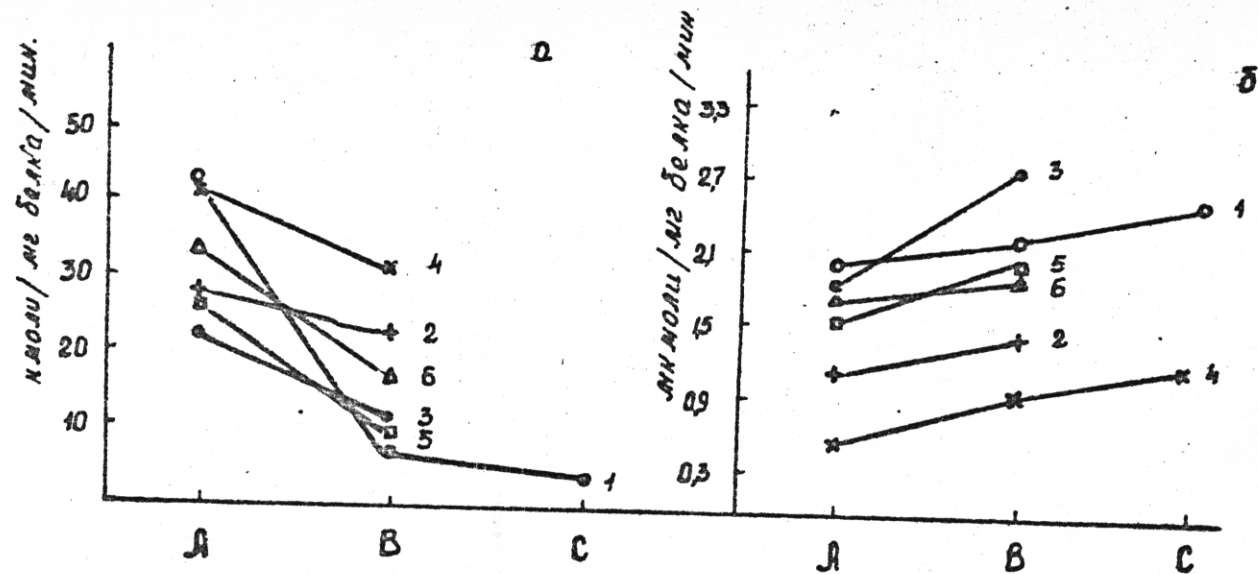


Рис.3. Активность лактат- (а) и малатдегидрогеназы (б) в мышцах моллюсков из бухт разной степени загрязненности. Обозначения те же, что и на рис.1.

сокий уровень активности остается у церастодермы, полититапеса и церитиума.

Уровень активности МДГ, наоборот, повышается с возрастанием фона загрязнения. В обоих случаях наиболее высокая активность наблюдается у питара и тритии, наиболее низкая - у церастодермы и церитиума. Отношение активности МДГ/ЛДГ в чистой бухте у всех видов выражается близкими величинами. В загрязнённых бухтах наблюдается повышение величины МДГ/ЛДГ у всех видов моллюсков, однако степень его различна (рис.4). Наиболее значительно оно возрастает у тритии - в 8 раз, затем следует питар и хамелея - в 3 раза; у полититапеса и церитиума отношение возрастает в 1,5-2 раза, церастодермы - 2,5 раза.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что у исследованных видов моллюсков, обитающих в условиях хронического загрязнения, по сравнению с относительно чистыми районами, происходит перестройка обменных процессов, направленных на повышение устойчивости организма. Степень этих изменений не одинакова и зависит от индивидуальной выносливости моллюска.

Следует отметить, что сходство в изменении величины отношения двух пар исследованных ферментов не случайно. МДГ и ААТ катализируют превращения субстратов цикла Кребса, тогда как ЛДГ и АЛАТ непосредственно связаны с трансформацией пирувата - конечного продукта гликолиза. Сопряженное действие этих двух ферментных систем можно рассматривать как механизм в регуляции адаптивных функций у гидробионтов, которые обитают в условиях непостоянного режима, свойственного верхней зоне литорали.

Сравнительный анализ данных показал, что изученные виды

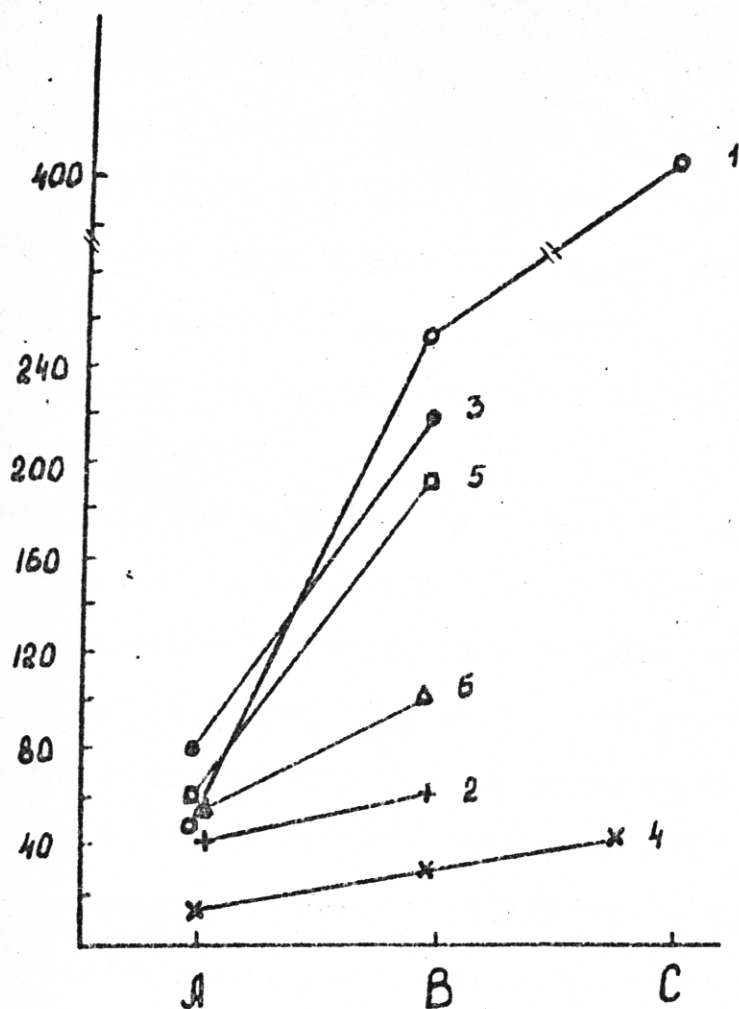


Рис.4. Отношение активности МПГ/ЛПГ в мышцах моллюсков из бухт разной степени загрязненности. Обозначения те же, что и на рис.1.

моллюсков можно подразделить на 2 группы. Первая группа объединяет виды более устойчивые к загрязнению - это трития, питар, и хамелея, у которых в условиях загрязнения возрастает отношение ААТ/АЛАТ и МДГ/ЛДГ. Вторая группа - полититапес перитиум и церастодерма, менее устойчивые, имеют более низкий уровень отношения названных ферментов. Величина ААТ/АЛАТ у них с ростом загрязнения уменьшается, МДГ/ЛДГ возрастает в меньшей степени.

Для уточнения сравнительной устойчивости моллюсков к стрессовым факторам, были проведены опыты по содержанию разных видов в условиях гипоксии, которая является, как известно, экологическим фактором. В этих условиях активность 2-х пар ферментов существенно меняется. Активность ААТ снижается в мышцах и печени всех видов моллюсков, но наиболее значительно - у питара, хамелеи и церастодермы. Активность АЛАТ напротив, увеличивается в обеих тканях, за исключением мышц у церастодермы, где АЛАТ снижается. В отличие от всех моллюсков, у тритии обе аминотрансферазы активируются.

Отношение ААТ/АЛАТ снижается как в мышцах, так и в печени моллюсков при экспозиции в условиях гипоксии. При этом в печени оно слабо меняется у тритии, хамелеи и питара (на 10-20%), тогда как у остальных трех видов значительно больше - на 36-50%. В мышечной ткани моллюсков отношение аминотрансферазных активностей снижается на 22-38% (рис.5).

Сходная во многом картина наблюдается в изменениях активности МДГ и ЛДГ. В условиях гипоксии активируется МДГ у тритии и хамелеи, остается на уровне контроля у церастодермы, и угнетается на 40-80% у остальных видов. Активность ЛДГ снижается у всех моллюсков, особенно значительно в мышцах

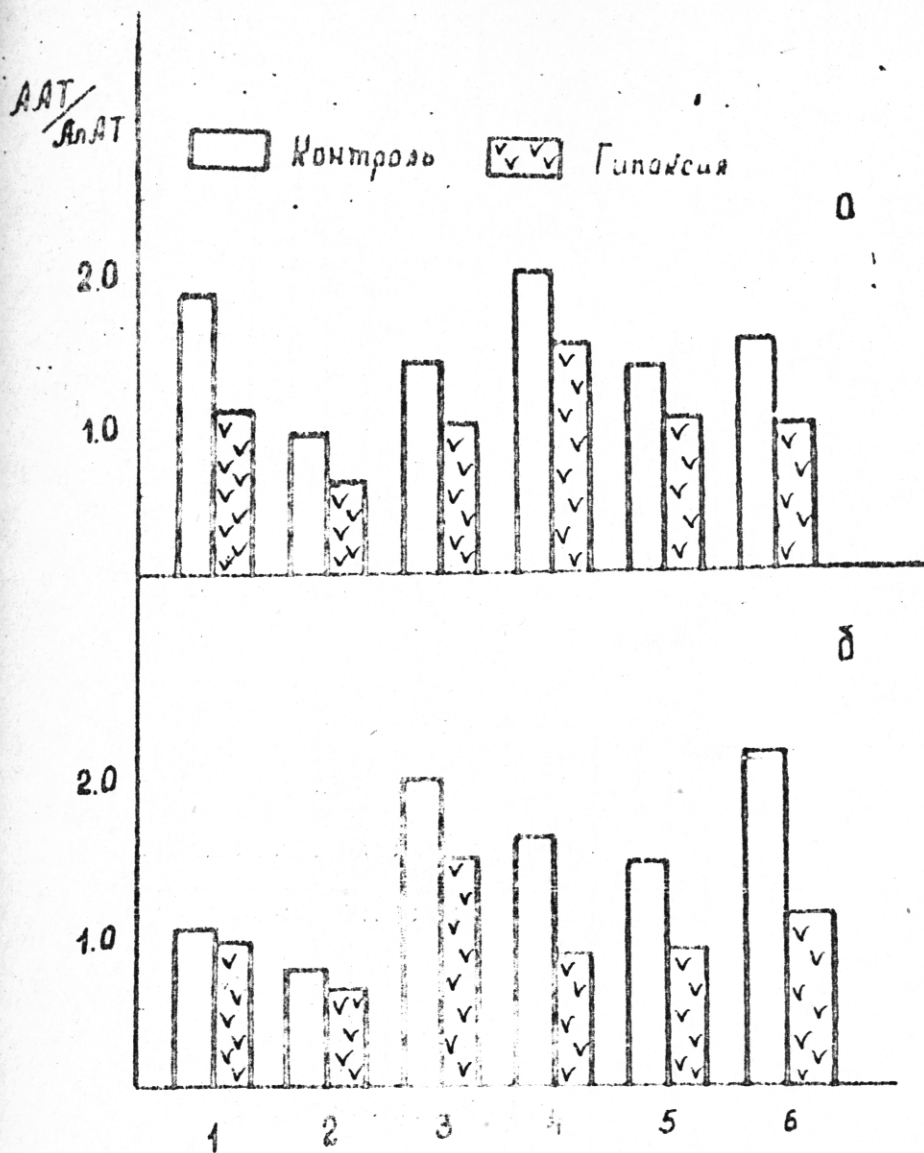


Рис.5. Отношение ААТ/АЛАТ в тканях мидий в условиях экспериментальной гипоксии; а - мышцы, б - печень. 1 - трития, 2 - питар, 3 - хамелея, 4 - церастодерма, 5 - полититанес, 6 - церитиум.

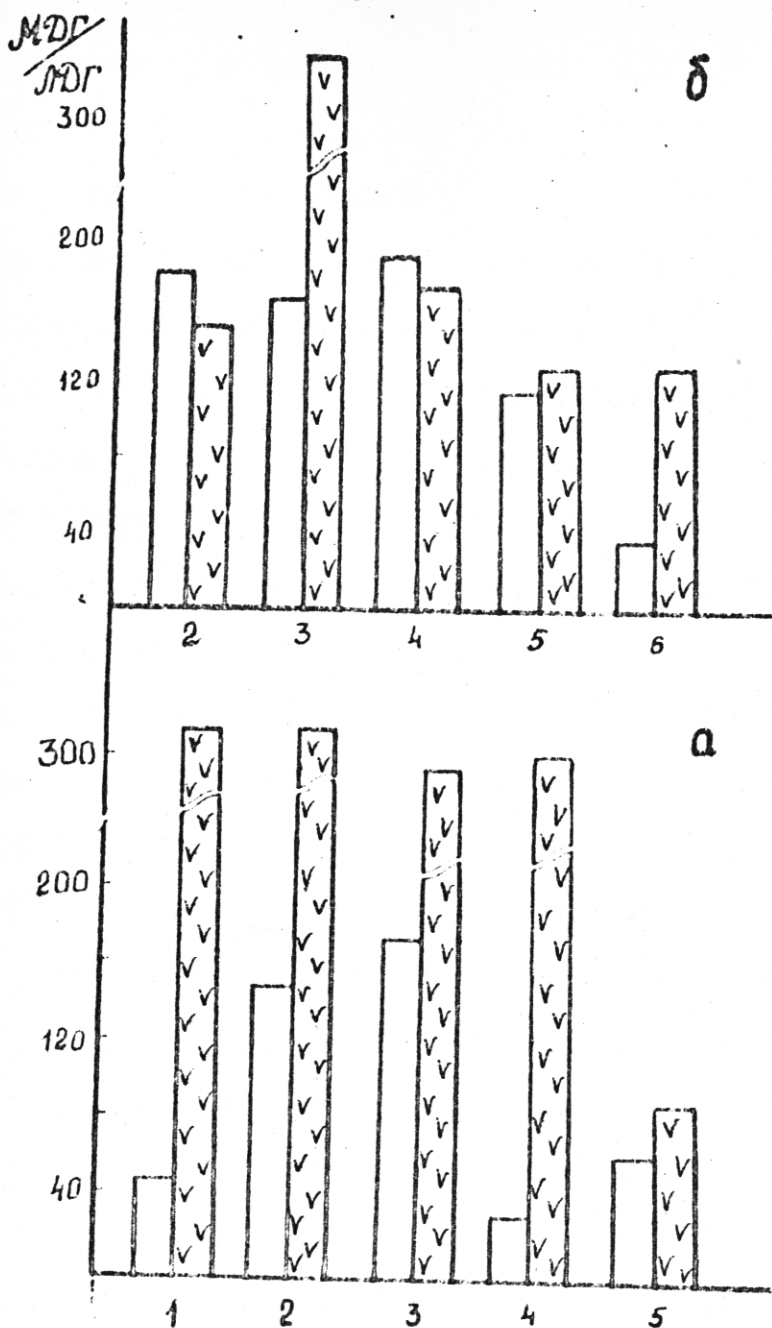


Рис.6. Отношение МДГ/ЛДГ в тканях мидий в условиях экспериментальной гипоксии; а - мышцы, б - печень. Обозначения те же, что и на рис.5.

церастодермы, питара и тритии. Отношение МДГ/ЛДГ у этих 3-х видов и хамелеи повышается в 5-10 раз, тогда как у полити-тапеса и церитиума оно возрастает лишь в 1,5-3 раза.

Из приведенных данных видно, что изменения уровня активности исследованных ферментов у разных видов моллюсков в естественных условиях загрязнения и в условиях экспериментальной гипоксии в некоторой степени отличаются. Если в условиях недостаточного содержания кислорода в среде активность АЛАТ чаще всего повышается в тканях моллюсков, то при загрязнении АЛАТ угнетается (рис. I). Также не однозначны изменения величины отношения ферментативных активностей. В условиях загрязнения ААТ/АЛАТ у моллюсков первой группы возрастает, при гипоксии - падает. У менее выносливых видов 2 группы в обоих случаях наблюдается значительное снижение его. В изменениях уровня отношения МДГ/ЛДГ мышц моллюсков из загрязнённых районов и при гипоксии наблюдается значительное сходство. Интересно, что по этому показателю в условиях гипоксии относится церастодерма, у которой оно повышается также сильно, как и у хамелеи и питара.

Наиболее четкие изменения отношения МДГ к ЛДГ в экстремальных условиях происходят в мышцах, ААТ/АЛАТ - в печени (рис. 5, 6), и это закономерно. Мышечная ткань имеет высоко развитую систему гликолиза, что обусловило высокую реактивность ЛДГ. В то же время, аминотрансферазная система более активна в печени и значительно сильнее угнетается в этой ткани по сравнению с мышцами при недостатке кислорода [5].

Таким образом, материалы, полученные в гипоксии, подтверждают правильность подразделения исследуемых видов на две группы по характеру ответной реакции на загрязнение.

Церастодерма по биохимическим показателям иногда занимает промежуточное положение: по ферментным характеристикам в естественных условиях она ближе к чувствительным видам, в то время как гипоксия не вызывает у нее существенных сдвигов в метаболизме.

Обращаясь к многолетним наблюдениям Н.Ю.Миловицовой [6, 7] за распространением и динамикой численности данных видов моллюсков в бухтах Крымского и Кавказского побережья, мы находим в них подтверждение сделанным выводам. Так, трития является доминирующим видом в самых загрязнённых бухтах; исключительную устойчивость ее можно объяснить способом питания - она относится к плотоядным хищникам. Питар и хамелея встречаются также в сравнительно грязных бухтах-гаванях. Полититапес и церитиум в основном обитатели чистых районов. Церастодерма отличается от других видов тем, что встречается в вершинах бухт, опресненных стоком рек, как чистых, так и грязных. Обитание этого моллюска в распресненных районах хорошо согласуется с высокой устойчивостью его ферментных систем к гипоксии в экспериментальных условиях.

Таким образом, проведенные биохимические исследования в сочетании с экологическими данными показали, что соотношение активностей ферментов ААТ/АЛАТ и МДГ/ЛДГ могут служить показателями степени выносливости отдельных видов моллюсков на загрязнение и, возможно, могут быть использованы для сравнительной характеристики загрязнённости района обитания.

Литература

1. Миловидова Н.Ю., Кирюхина Л.Н. Физико-химические свойства донных осадков и макрозообентос у юго-западного побережья Крыма. -Экология моря, 1982, вып.9, с.36-42.
2. Горомосова С.А., Таможняя В.А. Уровень трансаминазной активности в тканях мидий в норме и в условиях гипоксии. -Биология моря, 1979, вып.48, с.70-75.
3. Шапиро А.З., Бобкова А.Н. Роль малатдегидрогеназы беспозвоночных в адаптации к дефициту кислорода. -Ж.эволюц. биохим. и физиол., 1975, II, № 5, с.546-548.
4. Горомосова С.А., Шапиро А.З., Бобкова А.Н. Биохимические адаптации организмов обрастания - причина их устойчивости к действию ядов. -Биология моря, 1975, вып.35, с.42-52.
5. Горомосова С.А., Шапиро А.З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. М.: Легкая и пищ.пром-ть, 1984, - 120 с.
6. Миловидова Н.Ю., Материалы по экологии брюхоногого моллюска *Tritia reticulata* (Gastropoda) -Биология моря, 1979, вып.50, с.89-94.
7. Миловидова Н.Ю., Кирюхина Л.Н. Макрозообентос донных осадков фитали юго-западного Крыма. Там же, с.83-89.

Институт биологии
южных морей АН УССР
г.Севастополь