

И. И. Р У Д Н Е В А, В. Г. Ш А Й Д А

МЕТОД МИКРОКАЛОРИМЕТРИИ В ГИДРОБИОЛОГИИ: ОБЗОР

Выполнен обзор применения метода микрокалориметрии в гидробиологических исследованиях. Показаны примеры использования метода в водной экотоксикологии, микробиологии, биохимии, марикультуре, биологии развития, химии моря и т.д., перспективы и возможности применения метода для оценки состояния водных экосистем и их компонентов.

В настоящее время решение многих экологических проблем возможно с применением комплексного подхода, позволяющего всесторонне и на всех уровнях организации живого оценить состояние экосистемы в целом. При этом совершенно отчетливо проявляется тенденция внедрения более тонких методов анализа, в частности методов биохимии, иммунологии и молекулярной биологии, которые ранее традиционно использовались в изучении токсических эффектов загрязнения у гидробионтов, а сейчас являются неотъемлемой методической составляющей в мониторинговых исследованиях водных экосистем [1]. В этом отношении наиболее важны работы, направленные на поиск и применение экспресс-методов, позволяющих адекватно оценить изменения в организме гидробионтов, обусловленные действием неблагоприятных факторов, и выявить биомаркеры, отражающие ответные реакции систем разного уровня на эти воздействия [19-21]. При этом ответные реакции отдельного организма более адекватны и ограничены во времени, в связи с чем такой ответ может быть отнесен к экспресс-методам анализа состояния организмов, в дальнейшем его можно экстраполировать для оценки состояния популяции и экосистемы в целом [3,4].

Известно, что параметры метаболической активности являются величинами относительно постоянными, характеризующими гомеостаз в данных условиях среды. Изменение условий обитания влечет соответственно изменение этих показателей и отражается в первую очередь на энергетических процессах, протекающих в организме [5]. Это может быть использовано для решения многих экологических проблем. В связи с этим метод микрокалориметрии, позволяющий наиболее адекватно оценить прижизненные характеристики энергетического состояния организма, находит все более широкое применение в экологических исследованиях.

Метод основан на прямом измерении теплопродукции живых систем различного уровня организации, включая молекулярный, клеточный, тканевой и организменный. Микрокалориметрия нашла широкое применение в биологических исследованиях [15]:

- в микробиологии: для изучения процессов роста, размножения бактерий и их взаимодействия с антибиотиками, вирусами, фагами, а также процессов ферментации и микробиологического синтеза;
- в физиологии растений: для изучения метаболизма, и прежде всего фотосинтеза, высших растений и одноклеточных водорослей;
- в зоологии: для исследования энергетики клеток тканей и органов (включая гаметы);
- в клеточной биологии: для исследования клеточных систем и различных метаболических процессов, происходящих в них;
- в клинической химии, гематологии, вирусологии и иммунологии: для определения энергетических особенностей метаболических процессов у здоровых и больных, а также изучения канцерогенеза.

Этот метод, благодаря возможности измерять теплопродукцию в живых объектах без какого-либо нарушения жизнедеятельности, находит все большее применение.

© И.И. Руднева, В.Г. Шайда, 1998

Традиционно наиболее многочисленные исследования с использованием микрокалориметрического анализа проводятся в микробиологии. Накоплены данные о теплопродукции различных штаммов морских и пресноводных микроорганизмов, в том числе бактериопланктона и фитопланктона, их особенностей, а также влиянии различных условий культивирования (численность клеток, среда, температура, видовой состав) на рост и теплопродукцию микроорганизмов [2, 11, 17]. С этих позиций метод нашел применение в экологических исследованиях для оценки состояния грунтов. Известно, что метаболическая активность донных осадков зависит от деятельности разных микроорганизмов, их населяющих, и изменение теплопродукции этой сложной системы в каждом случае может являться ответом микрофлоры на загрязнения экосистемы как химическими веществами, так и физическими факторами (тепловое, ультрафиолетовое, акустическое и т.д.). На основании проведенных исследований был предложен тест, использующий культуру клеток человека и позволяющий по степени ингибирования их теплопродукции определять токсичность различных водных загрязнителей [14]. На клетках человека штамма *Hela* с помощью метода калориметрии были проанализированы свойства некоторых биологически активных веществ, выделенных из морских водорослей, показана их способность ингибировать теплопродукцию данной клеточной культуры и, следовательно, тормозить ее рост. Это направление является чрезвычайно важным для поиска и выделения веществ, обладающих антиканцерогенными свойствами [13]. Аналогичные исследования позволили обнаружить токсические вещества, содержащиеся в морских организмах, и оценить их влияние на клеточные культуры человека [18]. Микрокалориметрический метод находит широкое применение для анализа морепродуктов, их сохранности и уровня бактериального загрязнения [9].

Исследование биохимических процессов с помощью метода микрокалориметрии позволяет получать существенную информацию о протекании метаболических реакций и влиянии неблагоприятных факторов, в том числе избыточных концентраций токсикантов и других биологически активных веществ как на биомолекулы и их функции, так и на клетки и организм в целом. Было показано, что активность гидролиза экзогенной АТФ клетками в значительной степени изменяется под действием таких ингибиторов как мерсалил, олигомицин, карбоксипиридиндисульфид, убаин, что параллельно было подтверждено классическими спектрофотометрическими методами [12].

Метод используется для изучения особенностей физиологических процессов гидробионтов. Анализ энергетического вклада липидов четырех видов двустворчатых моллюсков с помощью разных методов, в том числе микрокалориметрического, позволил получить совершенно идентичные результаты [8]. Исследования теплопродукции морских губок, обитающих на глубине 2000м, показали, что около 22% кислорода, потребляемого бентическим сообществом, приходится именно на губок, которые играют ведущую роль в обмене органического углерода в глубоководных районах [6].

Большой интерес представляет использование метода микрокалориметрии для изучения развития гидробионтов и исследования энергетических процессов, протекающих на разных стадиях раннего онтогенеза. Сопоставление этих характеристик с морфологическими изменениями растущего и развивающегося организма имеет большое значение как для решения теоретических проблем биологии развития, так и для практики аквакультуры, так как позволяет определить особенности метаболизма в процессе метаморфоза гидробионтов и выявить критические этапы [6].

Однако в наибольшей степени метод микрокалориметрии продолжает использоваться для оценки эффектов загрязнения у водных организмов в экотоксикологических исследованиях. Известно, что хлорорганические соединения являются одними из существенных загрязнителей водоемов. Среди них ведущую роль занимают гербициды, попадающие туда со стоками с полей. Помимо непосредственной опасности этих соединений, заключающейся в передаче их по пищевым цепям и аккумуляции в гидробионтах, что приводит к нарушению их метаболизма и других

физиологических функций, эти соединения по своей структуре имеют сходство со структурой строгенов, увеличение концентрации которых в живых организмах приводит к необратимым отклонениям в обмене веществ [3, 4]. С помощью метода микрокалориметрии в клеточных экстрактах жабр двустворчатого пресноводного моллюска *Elliptio complanata* было установлено, что действие гербицидов и эстрогенов на величины теплопродукции экстрактов зависит от времени инкубации и концентрации гормонов и гербицидов. Ответная реакция во всех случаях была весьма специфичной. Однако были выявлены и общие тенденции: обработка тканей эстрогенами стимулировала теплопродукцию, такой же эффект наблюдали при кратковременном воздействии малых концентраций гербицидов. При увеличении концентрации гербицидов и длительности экспозиции происходило ингибирование или снижение метаболической активности тканевых экстрактов жабр моллюска [7]. Таким образом, с помощью микрокалориметрического метода можно отслеживать эффекты гербицидов и других биоцидов, анализировать дозовые нагрузки, время воздействия и последствия для водных экосистем.

Исследования, проведенные на трех видах пресноводных бентических беспозвоночных (личинки хирономид *Chironomus riparius*, олигохет *Lumbriculus variegatus* и сферических моллюсков *Sphaerium corneum*), экспонированных в грунтовых осадках, содержащих 23-85 мкг 2,4,5-хлорфенола на грамм сухого грунта, показали существенное влияние токсиканта на теплопродукцию организмов. Этот параметр зависел от концентрации хлорфенола как в грунтах, так и в теле животных. Наибольшее содержание хлорфенола в теле *C. riparius* (0.1-0.6 мкг/г массы) сопровождалось повышением теплопродукции более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Это, вероятно, обусловлено разобщением процессов окислительного фосфорилирования и является первичным ответом на токсическое воздействие хлорфенолов [16]. В этом случае микрокалориметрический метод позволяет не только фиксировать ответные реакции организмов на токсические воздействия, но и объяснять их механизмы.

Применение микрокалориметрического анализа в экологических исследованиях не исчерпывается изучением ответной реакции живых систем на действие неблагоприятных факторов. Известно, что помимо прямого действия ксенобиотиков на живые организмы, они могут оказывать и опосредованные эффекты вследствие взаимодействия с абиотическими компонентами экосистемы и изменения их физико-химических свойств [3,4]. В этом плане применение метода может дать существенную информацию о физико-химических процессах, происходящих в водной среде и в грунтах, связанных с взаимодействием биоцидов с растворенными в воде веществами, позволит проанализировать основные тенденции этих изменений и, в конечном итоге, их влияния на водные экосистемы [10].

Все вышеперечисленные факты свидетельствуют о перспективах использования метода микрокалориметрии в гидробиологии для получения более полной и адекватной информации о состоянии водных экосистем и их компонентов.

1. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга. - М.: Из-во МГУ. - 1985. - 158с.
2. Степанова О.А., Пахорукова О.Н., Шайда В.Г., Жильцова Н.Н. Экспериментальное изучение влияния морских фагов на бактериопланктон. // Сб. научных трудов специалистов санитарно-эпидемиологической службы г. Севастополя. - 1997. - Вып. 5. - С. 47-49
3. Adams S.M., Brown A.M., Gaed R.W. A quantitative health assessment of index for fish condition in the field // Transactions of American Fisheries Societies. 1991. - **122**. - P. 61-73
4. Adams S.M. Early signs of environmental damage and recovery // Oak Ridge National Laboratory Review. - 1994. - N 3. - P. 44-56.
5. Atkinson D.E. Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism. // Biochem. Soc. Symp. - 1968. - **27**. - P. 21-24.
6. Baker S.M., Mann R. Metabolic rates of metamorphosing oysters (*Crassostrea virginica*) determined by microcalorimetry. // Am. Zool. 1991. - **31**, N5. - P. 134.

7. Cheney M.A., Fiorillo R., Cridde R.C. Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Elliptio complanata* measured by calorespirometry. // Comp. Biochem. Physiol. - 1997. - **118C**, N2. - P. 159-164
8. Deslous-Pauli J.M., Heral M., Jousset M., Boromthanarat S., Goulletquer P., Sauriau P.G. Total lipid content and lipid energetic of bivalve molluscs. // Comp. Biochem. Physiol. -1988.- **89**, N1. - P. 51-53
9. Fung D.Y.C., Hart R.A. Chain V. Rapid methods and automated procedures for microbiological evaluation of seafood. Seafood. Quality Determination. // Proc. Int. Symp. Anchorage, AK(USA), 10 Nov.- 1987.- **15**.- P. 247-253.
10. Kramer D.E., Liston J. Haes M.H.B., Pick M.E., Toms B.A. Application of microcalorimetry to the study of interactions between organic chemicals and soil constituents. // Science Tools.- 1972.- **19**, N 1.- P. 9-12.
11. Johansson A., Nord C.-E., Wadstrom T. Computer evaluation of bacterial growth patterns based on microcalorimetric data. //Science Tools. - 1975.- **22**, N 2. - P. 19-21.
12. Kemp R.B. Surface-located reactions in tissue cells: a microcalorimetric study. // Science Tools.-1972. - **19**, N1.-P. 3-5.9.
13. Liu Zhaoqian, Cui Changhai, Zhang Youmin. Studies of the effect on tumor and normal cells in vitro with bioactive materials isolated from algae by microcalorimetric method //J. Biochem. Biophys. Methods.-1991.-**23**, 2. - P. 163-167.
14. McGuiness S.M., Barisas B.G. Acute toxicity measurements on aquatic pollutants using microcalorimetry on tissue-cultured cells // Environ. Sci. Technol. - 1991. - **25**, N 6. - P. 1092-1098.
15. Microcalorimetry in biochemistry and biology //Science Tools. - 1972. - **19**, N1. - P. 1-2.
16. Penttinen O.P., Kukkonen J., Pellinen J. Preliminary study to compare body residues and sublethal energetic responses in benthic invertebrates exposed to sediment-bound 2,4,5- trichlorophenol // Environ.Toxicol. Chem. - 1996. - **15**, N2. - P. 160-166.
17. Schaarschmidt B., Lamprecht I. Calorimetric characterization of microorganisms. // Experientia. - 1976. - **30**. - P. - 1230-1234.
18. Shnyrov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P. Calorimetric study of interactions of toxin from *Radianthus macrodactylus* with erythrocyte membrane // Bioc-hem. Int. - 1992. - **26**, N 2. - P. 219-229
19. Stegeman J.J., Klopper-Sams P.J., Farrington J.W. Monooxygenase induction and chlorobiphenyls in the deep-sea fish *Coryphaenoides armatus* // Science. - 1986.- **231**. - P.1287-1289.
20. Stegeman J.J., Klopper-Sams P.J. Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals // Environ. Health Perspectives. - 1987. -**71**. - P. 87-89.
21. Stegeman J.J., Teng F.Y., Showberger E.A. Induced Citochrome P-450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusets evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes // Can. J. Fish Aquat. Sci. - 1987. - **44**. - P. 1270- 1277.
22. Witte U., Graf G. Metabolism of deep-sea spongers in the Greenland-Norwegian Sea. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. - 1996.- **198**, N2.- P. 223-23

Получено 20.08.98

I.I. RUDNEVA., V. G. SHAIDA

MICROCALORIMETRY IN HYDROBIOLOGY: A REVIEW

Summary

Review of microcalorimetry method application in hydrobiological reserches is given. Results of microcalorimetry investigations in ecotoxicology, microbiology, biochemistry, mariculture, developmental biology, marine chemistry are presented. Perspectives and abilities of this method and its application for aquatic ecosystems and their components evaluation are shown.