

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЕЯ

1871



ИНБЮМ

28
—
1988

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ И САМООЧИЩЕНИЯ МОРЯ

УДК 591.041:577.1

И. А. ДИВАВИН, Ю. П. КОПЫТОВ

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ОТДЕЛЬНЫХ ОРГАНОВ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ СОЛЯРОМ

Мидии играют значительную роль в самоочищении морских акваторий от различных поллютантов, в том числе и от нефтепродуктов. В настоящее время предполагается использовать мидии на конечных этапах биологической очистки нефтесодержащих сточных вод [7]. Кроме того, эти моллюски перспективны как объект марикультуры. Изучение содержания углеводов, белков, каротиноидов, углеводородов автотонного и аллохтонного происхождения в теле и различных органах черноморских мидий проводится достаточно интенсивно [2]. Однако биохимический состав моллюсков в связи с их пищевой ценностью в условиях углеводородной интоксикации практически не исследован. Цель нашей работы — определение изменений биохимического состава отдельных тканей мидий в условиях острой интоксикации соляровым маслом.

Материалы и методы. Опыты проводились в июле—августе в районе бухты Ласпи (южная оконечность Крыма). В водах этого района углеводородов антропогенного происхождения практически нет, поэтому мидии не адаптированы к нефтяному загрязнению. Животных отбирали в 50 м от берега на глубине 0,8—1 м. В эксперименте использовались экземпляры размером 70—80 мм. В полиэтиленовые ванны помещали по 45 мидий, контролем служила чистая морская вода (20 л), в опытном варианте была использована эмульсия соляра в морской воде концентрацией 45 ± 5 мг·л⁻¹. Подобные концентрации возникают при аварийных разливах дизельного топлива и удерживаются несколько дней. Общая продолжительность эксперимента 7 сут. Ежедневно проводилась смена воды в контроле и эмульсии в опыте. Вода в ваннах периодически аэрировалась. В течение всего опыта мидий не кормили. Через 3, 5, 7 сут из каждого варианта отбирали по три мидии, которые препарировались по отдельным органам: гепатопанкреас (ГП), жабры (Ж), гонады (Г). Для биохимического анализа использовали объединенные навески тканей отдельных органов всех трех мидий. Схема анализа и некоторые методы определения биохимических показателей разработаны Ю. П. Копытовым.

Анализ проводили по следующей схеме: во взвешенную пробирку (а) помещали ткань мидий, заливали 5—6 мл ацетона и растирали стеклянной палочкой. После 15—20 мин отстоя ацетоновый экстракт декантировали во взвешенный бюкс (б). Операцию повторяли 3—4 раза. Осадок ткани в пробирке заливали 3—5 мл спиртобензольной (1 : 1 по объему) смеси и растирали аналогичным способом. После 15 мин отстоя экстракт также декантировали в бюкс (б) и повторяли операцию до получения бесцветного экстракта. Объединенные экстракты в бюксе (б) упаривали досуха, бюкс взвешивали и определяли сухой остаток (в). Остаток ткани в пробирке (а) высушивали при 105 °С до постоянной массы. Общую навеску ткани (г) определяли, суммируя массу в пробирке (а) и сухой остаток (в). Последний обрабатывали небольшим (4—6 мл) количеством хлороформа, сливали его, замеряли объем и

определяли сначала каротиноиды, а затем фракционный состав липидов. Высушенный бюкс (б) снова взвешивали (д) и по разнице масс (в) и (д) вычисляли содержание липидов. Затем остаток в бюксе (б) растворяли в 1 мл 1 N NaOH, переносили в пробирку (а), добавляли в зависимости от навески 2—4 мл 1 N NaOH и растворяли содержимое на водяной бане. После охлаждения из полученного раствора (Е) отбирали 1 мл аликвоты для определения белка. Оставшийся раствор (е) гидролизovali на водяной бане 1 ч, предварительно добавив равный объем 60%-ного NaOH. Из гидролизата отбирали несколько проб по 0,1 мл, добавляли 3—5 мл H_2SO_4 , перемешивали. Из полученного раствора (ж) отбирали по 0,2 мл для выявления суммы углеводов. Остальной раствор (ж) использовали для определения гликогена. Все анализы, за исключением фракционного состава липидов, проводили трижды. Разработанная схема анализа позволяет избежать потерь, связанных с многократными переносами.

Общее содержание липидов установили весовым методом, фракционный состав липидов — на пластинках «Силуфол» методом ТСХ в нашей модификации [6]. Денситограммы снимали на приборе ERJ-65 (ГДР). Каротиноиды находили спектрофотометрически по методу [4]. Измерение концентрации белка проводили общепринятым биуретовым методом. Сумму углеводов узнавали по методу [1] с триптофановым реактивом.

В основу определения гликогена была положена известная качественная реакция на крахмал и гликоген с раствором Люголя [8]. К 4,9 мл раствора (ж) добавляли 0,1 мл раствора Люголя, перемешивали и измеряли интенсивность окраски при длине волны $23\,000\text{ см}^{-1}$. Концентрацию гликогена находили по калибровочной кривой, построенной по раствору гликогена, выделенного из тканей мидий осаждением 96%-ным этанолом. Олигосахариды получили по разнице содержаний суммы углеводов и гликогена.

Результаты. Изменения биохимических показателей в тканях мидий в контроле и опыте при интоксикации соляром приведены в табл. 1. Условия в контроле отличались от природных отсутствием постоянного протока воды, вследствие чего периодически могли возникать экстремальные ситуации вроде повышенной температуры, дефицита кислорода или недостатка пищи. Поэтому изменения в контроле следует рассматривать как результат адаптации гидробионтов к экспериментальным условиям. На этом фоне протекал процесс интоксикации соляром в опыте. Для удобства сопоставления экспериментальных данных начальный уровень всех биохимических показателей принят за 100%.

Обмен белков. В гепатопанкреасе (ГП) и жабрах (Ж) мидий на протяжении 5 сут от начала эксперимента наблюдалось небольшое ($\pm 5\%$ начального) изменение в содержании белка в опыте и контроле. На 7-е сут количество белка в тканях обоих органов снизилось до 70—80% при небольшой разнице между контролем и опытом.

В гонадах (Г) в течение первых 5 сут отмечалось отчетливо выраженное изменение белкового обмена в результате действия соляра. Уже на 3-и сут содержание протеина в (Г) мидий в опыте снизилось в два раза. На 5-е сут количество белка возросло до 65,8%, но к концу опыта уменьшилось до 37,9%. В контроле содержание протеина резко снизилось почти до уровня опыта лишь за период между 5-ми и 7-ми сут.

Обмен углеводов. Изменение углеводного обмена в (ГП) мидий под действием соляра в основном связано с утилизацией гликогена как основного энергетического материала двустворчатых моллюсков. Через 5 сут его содержание в опыте снизилось до 75,7, а через 7 сут — до 38% (в контроле соответственно на 96,4 и 44,8%). В обоих вариантах за счет гликолиза количество олигосахаридов постоянно увеличивалось, в результате чего общее содержание углеводов в течение эксперимента существенно не изменялось.

Таблица 1. Содержание биохимических компонентов в тканях мидий

Орган	Липиды	Каротиноиды	Белок	Углеводы (сумма)	Гликоген	Олигосахариды
0 сут						
ГП	15,00±0,63	0,18±0,01	42,16±1,55	40,11±0,66	18,71±0,74	21,40±0,61
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Г	10,51±0,48	0,07±0,01	36,94±0,91	36,88±1,12	30,25±1,22	6,63±0,35
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Ж	6,48±0,39	0,08±0,01	30,54±0,77	16,28±0,48	5,01±0,34	11,27±0,42
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3 сут						
ГП-К	14,78±0,40	0,17±0,01	40,37±0,83	40,66±0,36	19,67±0,48	20,99±0,15
	98,4	94,4	95,7	101,3	105,1	98,0
ГП-О	4,44—0,21	0,07—0,01	42,50—0,58	39,60—0,55	18,20—0,22	21,40—0,37
	19,6	38,8	100,8	98,7	97,2	100,0
Г-К	9,76±0,23	0,07±0,01	37,73±1,10	35,01±0,34	28,61±0,15	6,40±0,33
	92,8	100,0	102,1	94,9	94,5	96,5
Г-О	5,05±0,11	0,12±0,01	19,09±0,66	16,56±0,40	14,32±0,83	2,24±0,08
	48,0	171,4	51,6	44,9	47,3	33,7
Ж-К	6,90±0,14	0,07±0,01	31,66±0,96	15,80±0,56	5,79±0,11	10,01±0,09
	106,4	87,5	103,6	97,0	115,5	88,8
Ж-О	8,28±0,20	0,08±0,01	31,84±1,12	17,46±0,43	3,46±0,12	14,00±0,13
	127,7	100,0	104,2	107,2	69,0	124,2
ГП-К	15,02±0,55	0,22±0,02	36,78±1,10	47,20±0,66	18,04±0,22	29,16±0,26
	100,0	122,2	99,5	117,6	96,4	136,2
ГП-О	6,66±0,23	0,14±0,01	40,24±0,81	43,61±0,34	14,17±0,48	29,44±0,33
	44,4	77,7	95,4	108,7	75,7	124,2
Г-К	10,19±0,36	0,08±0,01	38,56±0,57	38,12±0,70	29,45±0,53	8,67±0,22
	96,9	114,2	104,3	103,3	97,3	130,7
Г-О	7,85±0,17	0,21±0,02	24,31±0,55	20,77±0,45	18,28±0,48	2,49±0,13
	74,6	300,0	65,8	56,3	60,4	37,5
Ж-К	7,81±0,45	0,09±0,01	29,48±0,88	13,19±0,25	5,04±0,10	8,15±0,30
	120,5	112,5	96,5	81,0	100,6	72,3
Ж-О	14,12±0,42	0,13±0,01	30,64±0,44	13,92±0,36	2,48±0,11	11,44±0,23
	217,9	162,5	100,3	85,5	49,5	101,5
ГП-К	16,75±0,25	0,74±0,03	32,99±1,26	41,01±0,83	8,39±0,34	32,62±0,74
	111,7	411,1	78,2	102,2	44,8	152,2
ГП-О	13,75±0,18	1,01±0,03	29,56±0,78	38,19±0,34	7,12±0,09	31,02±0,43
	91,6	561,1	70,1	95,2	38,0	147,7
Г-К	11,63±0,34	0,42±0,02	14,91±0,51	52,89±0,77	15,65±0,10	37,25±0,38
	110,6	600,0	40,3	143,4	51,7	561,8
Г-О	12,51±0,31	0,46±0,03	14,03±0,26	37,56±0,58	7,07±0,06	30,49±0,33
	119,0	657,1	37,9	101,8	23,3	459,8
Ж-К	20,66±0,40	0,95±0,03	22,99±0,34	21,26±0,34	6,80±0,22	14,45±0,36
	318,8	1187,5	75,2	130,6	135,7	128,2
Ж-О	14,81±0,16	0,54±0,03	21,91±0,47	16,29±0,20	3,24±0,18	12,97±0,31
	228,5	675,0	71,7	100,0	64,6	115,0

Примечание. Над чертой — мг/100 мг сухой ткани; под чертой — % исходного количества.

Расчет корреляционных взаимосвязей для отдельных составляющих углеводного обмена показал, что содержание гликогена в (ГП) тесно связано с белковым обменом — коэффициент корреляции ($r=0,97$) в опыте и ($r=0,95$) в контроле (здесь и далее $P<0,05$).

В (Ж) мидий интенсивность гликолиза в результате углеводородной интоксикации выражена сильнее, чем в (ГП). В опыте наблюдалось линейное снижение содержания гликогена в течение первых 5 сут эксперимента (средняя скорость 10,1%/сут), однако к 7-м сут его количество достигло 64,6%. В контроле, наоборот, — ниже 100% не опускалось, а к концу опыта возросло до 135,7%.

Противоположная картина наблюдалась в обмене олигосахаридов. В (Ж) опытных мидий их концентрация изменялась в пределах 100—124,2%. В контроле до 5-х сут количество олигосахаридов постепенно снижалось до 72,3%, но за период с 5-х по 7-е сут резко возросло до 128,2%. По этой причине после небольшого снижения общего количества углеводов в обоих вариантах через 5 сут к концу опыта этот показатель у подопытных мидий вернулся к норме, а у контрольных стал на 30% выше.

В результате действия соляра наибольшие изменения в углеводном обмене наблюдались у (Г) мидий. В то время как у контрольных мидий общее количество углеводов за первые трое суток экспозиции снизилось всего на 5,1%, у опытных животных этот показатель упал до 44,9%. В дальнейшем количество углеводов стало возрастать в обоих вариантах, и к концу эксперимента в опыте оно вернулось к начальному уровню, а в контроле превысило его на 43,4%. Углеводный обмен положительно коррелировал с липидным: для обоих вариантов $r=0,95$.

Под действием соляра заметно возросла интенсивность гликолиза в (Г) мидий. Если в контроле на 3-и и 5-е сут опыта содержание гликогена было соответственно 94,5 и 97,3%, то в опыте — 47,3 и 60,4%. Через 7 сут произошло резкое снижение содержания гликогена до 51,7% в контроле и до 23,3% в опыте. В (Г) и (ГП) мидий процесс гликолиза в обоих вариантах положительно взаимосвязан с обменом белка ($r=0,99$).

Наличие соляра также оказало существенное влияние на содержание олигосахаридов в (Г) мидий. Необходимо отметить, что из исследованных органов мидий наибольшие изменения в содержании этого вида углеводов произошли именно в (Г). Так, в контроле на 5-е сут концентрация олигосахаридов превышала начальную в 1,3 раза, а еще через двое суток — в 5,6 раза. В опыте после первоначального снижения олигосахаридов до 33,7—37,5% (3—5-е сут соответственно), к 7-м суткам их содержание резко увеличилось до 459,8%.

Влияние углеводородной интоксикации на углеводный обмен мидий выражается в снижении по сравнению с контролем количества углеводов (гликогена и олигосахаридов). Это, вероятно, обусловлено повышением интенсивности гликолиза в результате усиливающейся тканевой гипоксии.

Обмен липидов. В (ГП) мидий интоксикация соляром привела к значительному снижению содержания жиров, особенно в начале эксперимента. Если в контроле на протяжении первых 5 сут количество липидов оставалось практически неизменным, то в опыте оно на 3-и сут снизилось до 29,6%. В дальнейшем в опытном варианте к концу эксперимента содержание липидов увеличилось до 91,6%. В контроле за этот период количество жиров достигло 111,7%.

Аналогичные изменения содержания липидов отмечены в (Г) мидий. О большом сходстве обмена жиров в (ГП) и (Г) мидий свидетельствуют высокие коэффициенты корреляции между опытными ($r=0,92$) и контрольными ($r=0,95$) вариантами соответственно для каждого из этих органов. Однако в (Г) подопытных мидий количество липидов в конце эксперимента было несколько выше, чем в контроле (119 и 110,6% соответственно).

Таблица 2. Изменение фракционного состава липидов в различных органах мидий в результате углеводородной интоксикации

Орган	Сутки	Триглицериды		Жирные кислоты		Диглицериды		Стерины		Эфиры стеринов	
		О	К	О	К	О	К	О	К	О	К
ГП	5	2,39	4,96	0,66	1,95	0,33	1,04	0,93	2,10	0,09	0,30
		35,9	33,0	9,9	13,0	5,9	7,0	13,9	14,0	1,4	2,0
	7	5,91	5,18	1,37	1,16	0,55	0,16	2,05	1,84	0,13	0,31
		43,0	31,0	10,0	6,9	4,0	1,0	15,0	11,0	0,9	1,9
Ж	5	3,53	1,48	3,10	1,48	0,13	0,07	2,54	1,01	0,24	0,12
		25,0	18,9	22,0	18,9	0,9	1,0	18,0	13,0	1,7	1,5
	7	2,37	3,93	2,81	3,71	0,15	0,61	3,26	4,33	0,15	0,20
		16,0	19,0	18,9	18,0	1,0	3,0	22,0	20,9	1,0	1,0
Г	5	4,00	4,18	0,38	0,71	0,15	0,30	1,25	1,32	0,15	0,46
		51,0	41,0	4,9	7,0	2,0	3,0	15,9	13,0	2,0	4,5
	7	6,12	5,69	0,49	0,23	0,24	0,23	1,87	1,63	0,31	0,28
		49,0	49,0	3,9	2,0	1,9	2,0	15,0	14,0	2,5	2,5

Примечание. О — опыт, К — контроль. Над чертой — содержание липидов, мг/100 мг сухой ткани; под чертой — % суммы липидов.

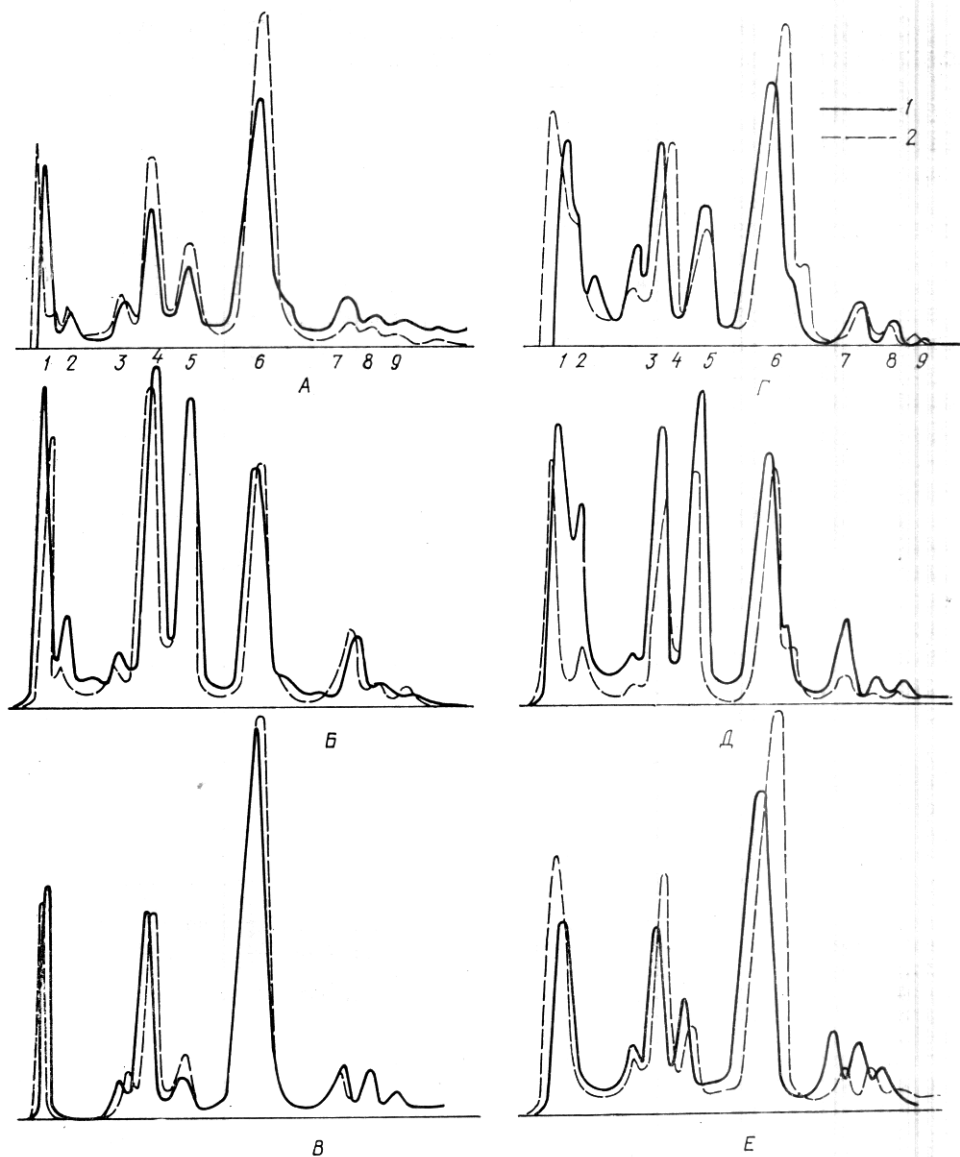
В (Ж) мидий под воздействием соляра содержание жиров возросло и в первые 5 сут в опыте было значительно выше, чем в контроле. В последнем количестве липидов резко увеличилось между 5-ми и 7-ми сут, в результате чего оно превысило показатели опыта.

Изменения во фракционном составе липидов за 5 и 7 сут представлены в табл. 2 и на рисунке (А—Е). Из полученных данных видно, что, во-первых, каждый из исследованных органов мидий имел свой, характерный для него состав липидов, отличающийся от других качественно и количественно, а во-вторых, в процессе проведения эксперимента фракционный состав липидов претерпевал существенные изменения.

Каротиноиды. Роль каротиноидов в тканях животных окончательно не выяснена [3]. В нашем эксперименте содержание каротиноидных пигментов в тканях исследованных органов контрольных животных изменялось таким образом. К 3-м сут оно либо не изменялось (Г), либо снижалось на 5,6—12,5% (соответственно ГП и Ж мидий). Через 5 сут содержание каротиноидов возрастало до 112,5—122,2%. Но наиболее резко количество этих компонентов изменилось за последующие 2 сут. Так, в (ГП) контрольных мидий оно увеличилось в 4,1 раза, в (Г) — в 6 раз, в (Ж) — почти в 12 раз по сравнению с начальным.

В результате действия соляра в (ГП) опытных мидий концентрация каротиноидов за 3 сут снизилась до 38,8%. Затем их количество начало быстро возрастать и через 7 сут превысило контроль. В (Ж) в конце эксперимента содержание пигментов в контроле было в 1,8 раза больше, чем в опыте, хотя первые 5 сут ситуация была обратная. В (Г) мидий количество каротиноидов на протяжении всего эксперимента в опыте было выше, чем в контроле.

Во всех случаях между 5-ми и 7-ми сут наблюдалось резкое увеличение концентрации каротиноидных пигментов в тканях. В свете возможной функции каротиноидов в тканях животных, и особенно моллюсков, в качестве депо кислорода [3] это возрастание их количества можно трактовать как адаптивную реакцию мидий на гипоксические условия среды.



Изменения фракционного состава липидов в гепатопанкреасе (А — через 5, Г — через 7 сут), жабрах (Б — 5 сут, Д — 7 сут), гонадах (В — 5 сут, Е — 7 сут): 1 — контроль, 2 — опыт; 1-9 — номера фракций (3 — диглицериды, 4 — стерины, 5 — жирные кислоты, 6 — триглицериды, 8 — эфиры стерinov)

Обсуждение результатов. Проведенный эксперимент еще раз подтвердил, что углеводороды нефти являются токсикантом общего действия. В результате углеводородной (соляровой) интоксикации у подопытных животных наблюдаются существенные по сравнению с контролем изменения в обмене всех основных биохимических компонентов в исследованных тканях моллюсков. Происходящие изменения взаимосвязаны и взаимообусловлены, о чем свидетельствуют коэффициенты корреляции между отдельными видами обмена. Но действие соляра по-разному отражается на различных составляющих обмена в разных органах мидий. Так, под влиянием соляра почти не изменяется содержание белка в (ГП) и (Ж) мидий, в то время как в (Г) концентрация этого биохимического компонента значительно снижается. Аналогичная картина наблюдается и в общем углеводном обмене.

С другой стороны, под воздействием соляра в (ГП) и (Ж) происходят более значительные изменения в липидном обмене по сравнению с (Г) мидий. Из исследованных органов наибольшей резистентностью в биохимическом отношении к углеводородной интоксикации обладал (ГП), в то время как остальные органы мидий оказались более чувствительными.

Исследования в условиях хронического отравления, действия нефти на содержание гликогена в органах и тканях мидий, показали, что за время эксперимента (28 сут) наименьшее изменение в количестве этого полисахарида произошло в гонадах животных, а наибольшее — в жабрах [5]. Это объясняется проявлением общебиологической закономерности защиты организмом репродуктивных органов. Вероятно, в условиях нашего относительно короткого опыта, в котором использовался более токсичный для гидробионтов соляр в концентрации, на порядок превышающей концентрацию нефти, применявшуюся в [5], защитные механизмы детоксикации и адаптации мидий были подавлены в результате сильной перегрузки.

Действие соляра на подопытных животных наиболее сильно проявлялось в течение первых 3 сут эксперимента, в то время как в контрольной группе за это время существенных изменений биохимических показателей в тканях исследуемых органов мидий не происходило. По истечении этого срока изменения биохимических параметров в опыте и в контроле носили одинаковый характер. Очевидно, что активизация и запуск детоксикационных защитных систем происходят в первые 3 сут, после чего наступает стадия адаптации к действию токсиканта.

1. Агатова А. И., Полуяков В. Ф. Определение суммы углеводов в морской воде, взвеси и осадках с *L*-триптофаном // Методы исследования органического вещества в океане. — М.: Наука, 1980. — С. 115—121.
2. Биохимическая характеристика беспозвоночных северо-западного шельфа Черного моря / Под ред. Ю. П. Зайцева. — Киев: Наук. думка, 1979. — 177 с.
3. Карнаухов В. Н. Функции каротиноидов в клетках животных. — М.: Наука, 1973. — 93 с.
4. Карнаухов В. Н., Миловидова Н. Ю., Каргополова И. Н. Каротиноиды и устойчивость морских моллюсков к загрязнению среды // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1977. — 13, № 2. — С. 134—138.
5. Копытов Ю. П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов и углеводов // Экология моря. — 1983. — Вып. 13. — С. 76—80.
6. Мазманиди Н. Д., Диасамидзе Н. М., Замбахидзе Н. П. К вопросу о действии нефти на некоторые виды моллюсков и ракообразных Черного моря // Материалы Всесоюз. симпозиума по изуч. Черного и Средиземного морей, использ. и охране их ресурсов. — Киев: Наук. думка, 1973. — Ч. 4. — С. 78—82.
7. Миронов О. Г., Шекатурина Т. Л. Очистка мидиями нефтесодержащих вод // Нефть. хоз.-во. — 1981. — № 6. — С. 63—66.
8. Филиппович Ю. Б., Егорова Г. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. — М.: Просвещение, 1975. — 318 с.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР,
Севастополь

Получено 05.04.84

I. A. DIVAVIN, Yu. P. KOPYTOV

DYNAMICS OF FLUCTUATIONS IN BIOCHEMICAL COMPOSITION OF CERTAIN ORGANS OF MYTILUS GALLOPROVINCIALIS UNDER SOLAR INTOXICATION

Summary

Dynamics of fluctuations in the content of carbohydrates, proteins, carotenoids, lipids and their fractions in the hepatopancreas, gills and gonads of *Mytilus galloprovincialis* is studied under experimental solar intoxication. Essential changes are found in the exchange of practically all biochemical components in studied mollusc tissues. Hepatopancreas is the most resistant to the hydrocarbon intoxication. The rest organs are more sensitive to the solar effect.