

ОБЩИЙ БЕЛОК В ГЕМОЛИМФЕ РАКА PONTASTACUS LEPTODACTYLUS КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОМАРКЕР КАЧЕСТВА СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

© С. В. Сладкова, С. В. Холодкевич

Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: sladkova_svl@mail.ru

Резюме

Анализ общего белка гемолимфы проводился методом Лоури на половозрелых раках *Pontastacus leptodactylus*. В работе изучено содержание общего белка в гемолимфе раков в течение года. Концентрация белка варьировала в широких пределах и составляла от 12 до 95 мг/мл и зависела от сезона и стадии личиночного цикла. Приведены гистограммы распределения животных по уровню белка для разных сезонов и проанализирован их характер. Летом количество белка максимально перед линькой и уменьшается на 40 % сразу после нее. Исследован диапазон концентраций общего белка в гемолимфе, при котором выживаемость раков при неблагоприятных изменениях в среде обитания максимальна. Показано, что адаптационные возможности раков с низким содержанием белка снижены. Раки, концентрация белка в гемолимфе которых выше «критической», были подвергнуты разной длительности воздействию гидрохинона в концентрации 1 г/л, используемого в качестве модельного токсиканта. Кратковременное действие не приводило к изменению содержания белка в гемолимфе. При длительном токсическом воздействии уровень белка в гемолимфе падал в среднем на 40 %, что предшествовало гибели животных. Обсуждаются возможные механизмы положительной корреляции концентрации белка в гемолимфе раков и их выживаемости при ухудшении качества водной среды.

Ключевые слова: раки, гемолимфа, общий белок, сезон, личинный цикл.

Введение

Для получения однородных и достоверных результатов в экотоксикологических экспериментах на животных, отловленных в дикой природе, необходимо предварительно формировать из них референтные группы тест-организмов, однородных не только по морфометрическим и весовым характеристикам, но и по функциональному состоянию и адаптивным способностям к различным изменениям среды обитания [1, 2].

В ряде работ [3—5] для оценки функционального состояния беспозвоночных животных класса Crustacea, в том числе и пресноводных раков, предлагается использовать биохимический показатель — уровень белка в гемолимфе. Показано, что высокий уровень белка в межличинный период соответствует высокому уровню жизнестойкости организмов и хорошему состоянию среды обитания, особенно в эвтрофных водоемах [6—8]. Однако содержание белка в гемолимфе у этих животных в процессе всего личиночного цикла не является постоянным [9, 10] и зависит от стадии этого процесса [7], а также от сезона, что, несомненно,

осложняет использование этого биомаркера для оценки качества среды обитания и требует более глубокого изучения этого вопроса.

Задачей настоящего исследования было изучение динамики содержания общего белка в гемолимфе пресноводных раков в течение года, а также до и после воздействия неблагоприятных экологических факторов и токсических веществ с целью выяснения возможности использования этого показателя в качестве одного из основных при отборе референтных групп животных, пригодных по своему функциональному состоянию для использования в качестве тест-организмов в биоэлектронных системах мониторинга контроля качества воды в масштабе реального времени [11, 12].

Материал и методы

Исследования проводили на половозрелых раках *Pontastacus leptodactylus*. Животных в течение двух недель акклиматизировали в лаборатории в открытых лотках, в которых осуществлялась аэрация и циркуляция воды через фильтр биологической очистки. Содержание растворенного кисло-

рода в воде было близким к предельному и колебалось приблизительно от 8 до 10 мг/л в зависимости от температуры. Температура поддерживалась на уровне 16 °С. Концентрация водородных ионов в течение всего времени наблюдения находилась в области оптимальных значений. Раков кормили 1 раз в три дня личинками хирономид (в пересчете на суточный рацион 2 % веса тела), а в летний и осенний период добавляли растительную пищу — водоросли.

Перед началом экспериментов у всех животных анализировали гемолимфу на содержание общего белка. Забор 0.1 мл гемолимфы осуществляли через суставную мембрану пятой грудной ножки в предварительно обработанные гепарином шприцы. Концентрацию общего белка в гемолимфе *P. leptodactylus* определяли методом Лоури [13]. В качестве калибровочного белка использовали бычий сывороточный альбумин. Анализировали цельную гемолимфу без центрифугирования, поскольку предварительный анализ показал, что вклад клеточных элементов незначителен. После проведения первоначального анализа раков оставляли в лотках, для дальнейших исследований, повторные анализы белка осуществляли не чаще чем через 2 недели.

6 раков были помещены в отдельные аквариумы с проточной водой из питаемого подземными ключами Никольского пруда в Петродворцовом районе Санкт-Петербурга, где за ними постоянно длительно наблюдали, в том числе и за их линьками. В распределительном баке подогревали воду, поэтому температура поддерживалась на уровне 16 °С, как и в лабораторных условиях, за исключением летнего сезона. Летом температура была 22 ± 2 °С. Величина рН в течение всего времени наблюдения находилась в области 7.9—8.7. Содержание растворенного кислорода в воде было близким к предельному и колебалось приблизительно от 8 до 10 мг/л в зависимости от температуры. Средняя жесткость — 6.1 ммоль/дм³, которая полностью удовлетворяет требованиям раков к ионам Ca²⁺. Режим кормления такой, как и при лабораторном содержании.

Всего было исследовано 240 раков, самцов с длиной 122 ± 5 мм и весом (61.1 ± 4.2) г из различных партий раков, отлавливаемых ежемесячно в течение 2006—2007 гг.

Результаты

На рис. 1 представлены количественные результаты определения содержания белка в гемолимфе свежесловленных раков в зависимости от времени года. Количество общего белка в гемолимфе всех исследованных особей варьировало в широких пределах: от 12 до 95 мг/мл в зависимости от времени года и стадии личиночного цикла. Из графика, представленного на рис. 1, видно, что у раков исследованной выборки содержание белка в гемолимфе явно повышается в конце весны и достигает максимальных значений уже в июне, оставаясь на этом уровне все лето, именно в этот период происходит интенсивный рост раков, сопровождающийся периодическими линьками. С наступлением осени концентрация белка в гемолимфе падает примерно до исходного уровня, соответствующего с учетом разбросов интервалу значений в 20—30 мг/л. Гистограммы распределения свежесловленных в разные сезоны и акклиматизированных к лабораторным условиям в течение 2 недель раков по содержанию белка в гемолимфе представлены на рис. 2.

Видно, что только зимой распределение имеет вид, близкий к гауссовскому распределению (рис. 2, а).

Выделяется максимум при 20—30 мг/мл, при разбросе значений от 10 до 40 мг/мл, что свидетельствует об относительной однородности выборки. Весной разброс значений содержания общего белка к гемолимфе максимален (от 10 до 80 мг/мл), и распределение имеет тот же максимум, что зимой, и длинный «хвост» в сторону высоких значений (рис. 2, б). Это связано с тем, что в мае появляется большое количество раков с концентрацией белка в 2 и более раз выше по сравнению с зимой. Такое распределение указывает на то, что раки находятся в разных физиологических состояниях в начале и в конце весны, что связано с различием в климатических условиях и начинающимися в конце мая линьками. Летом раки с концентрацией белка ниже 50 мг/мл отсутствовали, а максимальное ее значение у исследованных особей достигало 90—100 мг/мл. Летнее распределение (рис. 2, в) имеет два различных по величине максимума в районе 50—60 мг/мл и 80—90 мг/мл, что, вероятно, связано с линьками. Характер осеннего распределения (рис. 2, г) похож на весенний, однако просматриваются два максимума: в районе 20—30 и 40—50 мг/мл. Наличие этих максимумов свидетельствует о неоднородности выборки, т. е. о различном физиологическом состоянии входящих в нее особей.

Более 50 % раков, отловленных летом, линяли во время акклиматизации в лабораторных условиях. Значения концентрации белка до и через 2 дня после линьки представлены на рис. 3. Видно, что значение концентрации белка максимально перед линькой и составляет 84 ± 5 мг/мл. Сразу после линьки концентрация белка падает и через 2—3 дня после линьки она равняется 49 ± 3 мг/мл, что составляет приблизительно 60 % первоначальной величины.

Из анализа данных, представленных на рис. 1—3, следует, что высокие концентрации белка в гемолимфе (более 80 мг/мл), которые наблюдаются в летний период, соответствуют предлиночной стадии. Известно [5], что в природных условиях за теплый сезон (с мая по сентябрь) половозрелые самцы линяют дважды. Из полученных данных видно (рис. 2, в), что в отлавливаемых летом партиях около 50 % раков находятся в предлиночном состоянии.

Для того чтобы ответить на вопрос о том, что происходит с концентрацией белка у раков, отловленных в осенне-зимний период при содержании их в лаборатории при температуре 16 ± 1 °С, у 10 раков, содержащихся в лотках, периодически брали пробы гемолимфы. Было показано, что уровень белка в гемолимфе этих животных не изменяется в течение наблюдаемого периода с октября по март (6 мес) и составляет 26 ± 4 мг/мл. Кроме того, измерение количества белка у трех раков, содержащихся в лаборатории в течение тех же 6 мес в условиях искусственной зимы (при температуре воды 10 °С) обнаружило у них примерно одинаковую концентрацию белка, равную 23 ± 2 мг/мл.

Проведенный анализ значений концентраций белка в гемолимфе раков, отловленных поздней осенью и содержащихся в лабораторных условиях длительное время, погибших при ухудшении качества среды обитания, а именно резкого повышения концентрации ор-

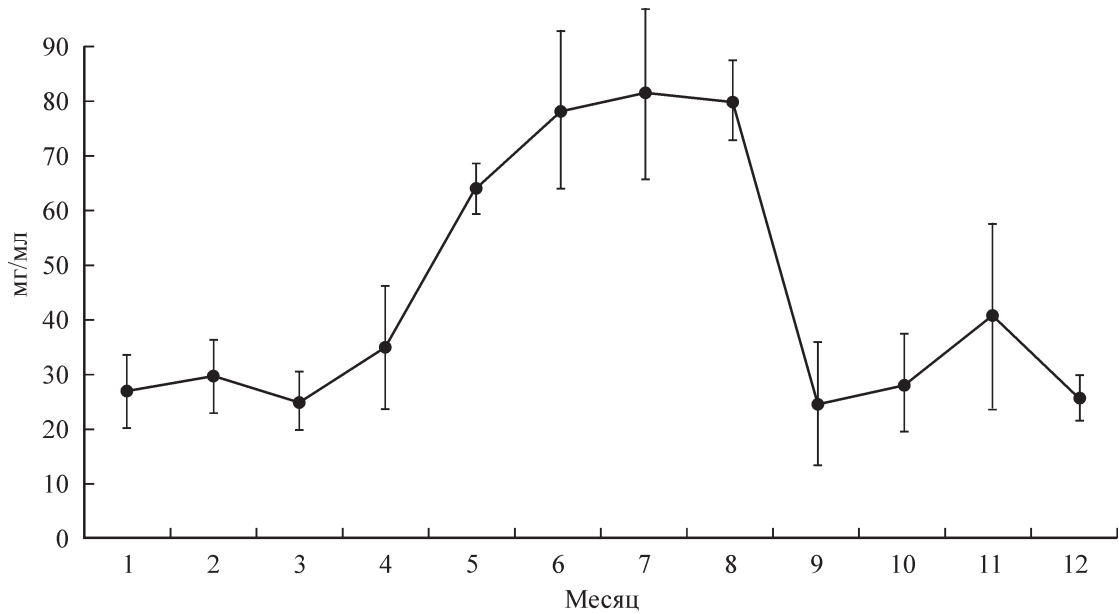


Рис. 1. Концентрация общего белка (мг/мл) в гемолимфе раков в течение года.

ганики в воде, получающейся из-за процессов гниения пищи и продуктов метаболизма животных при отключении фильтра биологической очистки, показал, что средняя концентрация белка у таких раков составляла (19 ± 3) мг/мл. Общее количество погибших раков — 12 особей, тогда как у раков, переживших эти неблагоприятные изменения качества среды обитания, содержание общего белка в гемолимфе в среднем было (27 ± 3) мг/мл ($n = 18$). Эти результаты показывают, что раки, у которых концентрация белка в гемолимфе была ниже 20 мг/мл, находились в неудовлетворитель-

ном физиологическом состоянии, их адаптационные способности были ослаблены, поэтому вероятность их гибели при неблагоприятных изменениях среды обитания оказалась велика. Раков, концентрация белка в гемолимфе которых была выше этой «критической» величины, по-видимому, можно отнести к животным с условно высоким уровнем адаптации. Причем чем выше был уровень содержания общего белка в гемолимфе раков, отловленных в различные сезоны года, исключая летний, тем более высокий уровень выживаемости они демонстрировали в неблагоприятных усло-

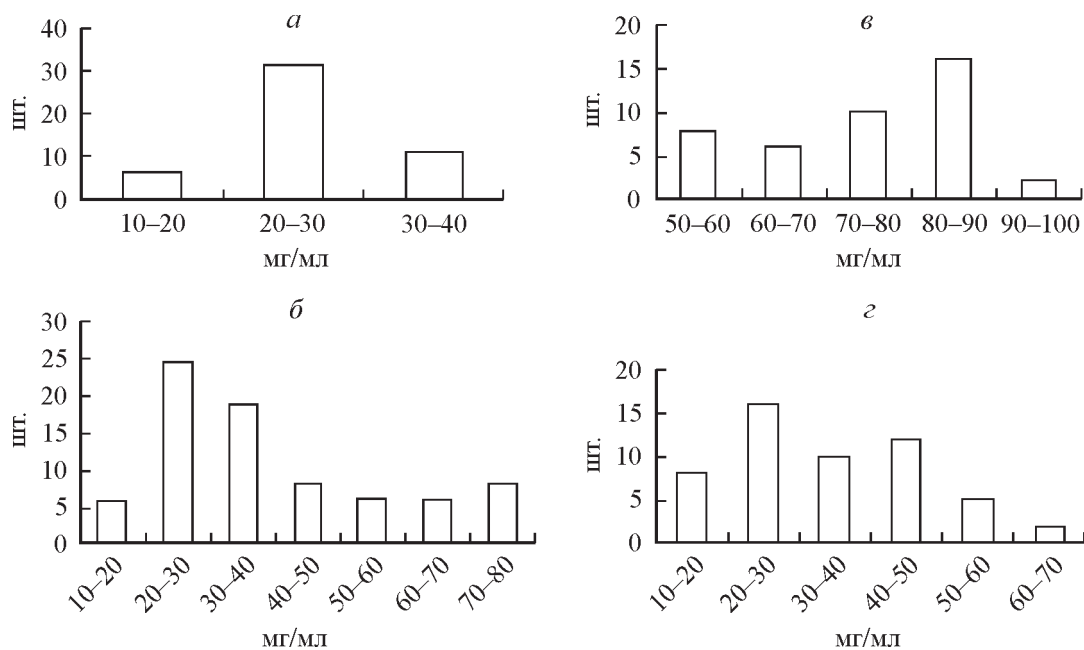


Рис. 2. Гистограммы распределения раков по содержанию общего белка в гемолимфе в зависимости от сезона.

На рисунках а—г по вертикали — количество раков (шт.), по горизонтали — концентрация белка (мг/мл); а — зимнее распределение по выборке — 45 штук, б — весеннее распределение по выборке — 70, в — летнее распределение по выборке — 45 штук, г — осеннее распределение по выборке — 50.

виях. В летний период раки, имеющие концентрацию белка выше 80 мг/л, находятся в предлиночной стадии D классификации линьки по Драгу [14], так как максимальное содержание белка у представителей Crustacea соответствует именно этой стадии [5, 7]. Как показали наши наблюдения, гибель раков с максимальной концентрацией белка в период акклимации к лабораторным условиям содержания или после стрессорных воздействий, вызванных различными причинами, в том числе и при транспортировке, составила 40 %. Эти данные подтверждают то обстоятельство, что функциональное состояние раков в предлиночной стадии цикла кардинально отличается от состояния в межлиночный период. В этот период их адаптационные возможности значительно снижены, потому что линька у раков — доминирующий процесс в течение всей их жизни, прямо или косвенно влияющий на обмен, поведение, размножение и даже сенсорное восприятие [15].

Раки (6 штук) с концентрацией белка выше 20 мг/мл (средняя концентрация составила 23 ± 3 мг/мл), которая, по нашим исследованиям зависимости белка от времени года является нормальной для зимы, в конце февраля были помещены в отдельные аквариумы с проточной водой из Никольского пруда, где за ними осуществлялось постоянное длительное (в течение года) наблюдение. Годичное содержание раков в таких условиях привело к снижению белка в 2 раза (средняя концентрация белка 11 ± 5 мг/мл). Такое количество белка в гемолимфе раков в естественных условиях является ниже критического даже для зимы [5] и у отловленных жизнеспособных раков практически не встречается. В наших экспериментах раки, содержащиеся в отдельных аквариумах с проточной водой, в течение года нормально развивались (три успешные линьки за наблюдаемый период) и прибавили в весе в среднем 45 %.

Для оценки токсического влияния на уровень белка в гемолимфе раков были проведены эксперименты по действию гидрохинона в концентрации 1 мг/л в течение 1 ч, 24 ч и более. Для экспериментов были отобраны животные (12 штук) с уровнем белка выше 30 мг/мл, но менее 75 мг/мл (отловленные в мае). Было показано, что воздействие гидрохинона в течение 1 ч не вызывает достоверного изменения уровня белка сразу же после воздействия. Длительное воздействие (более суток) гидрохинона, используемого нами в качестве модельного токсиканта, в концентрации 1 г/л приводило к значительному снижению белка в среднем на 40 % и последующей гибели животных (см. таблицу). Причем чем меньше была начальная концентрация белка, тем более выраженное токсическое действие оказывал гидрохинон — гибель организмов наступала раньше.

Обсуждение

Проведенные нами исследования показывают, что концентрация белка в гемолимфе раков *Pontastacus leptodactylus* варьирует в широких пределах, как и у

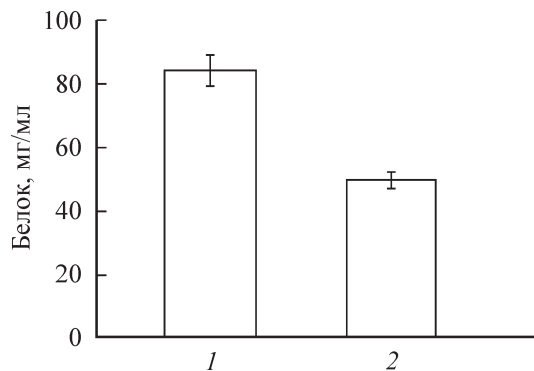


Рис. 3. Содержание белка в гемолимфе раков до (1) и сразу после (2) линьки в летний сезон.

других представителей Crustacea [10]. Полученный диапазон вариаций концентраций белка у этих раков близок к диапазону вариаций белка у других представителей Decapoda. Так, у крабов *Carcinus maenas* [4], как и у креветок *Stangon vulgaris* [9], диапазон вариации белка в гемолимфе лежит в пределах от 20—30 до 75—85 мг/мл. Минимальная концентрация белка в гемолимфе близкого вида *Pontastacus cubanicus* составляет 20 мг/мл, а максимальная 80 мг/мл [5, 8]. Линьки и сезон являются главными факторами, оказывающими влияние на содержание общего белка в гемолимфе самцов раков в естественных условиях. В летний сезон концентрация белка значительно выше, чем зимой. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными об увеличении содержания белка в гемолимфе раков в весеннее и летнее время года, что связано с увеличением светового периода и повышением температуры воды в водоеме, где обитают раки, следствием чего является увеличение количества доступной пищи, а также годовой программой роста и развития, сопровождающейся периодическими линьками [5, 6, 8]. Анализ сезонных изменений гистограмм распределения раков по содержанию общего белка в гемолимфе показывает, что только в зимний период, совпадающий в естественных условиях с диапаузой, раки находятся приблизительно в одинаковом физиологическом состоянии. Такой характер вариаций белка в гемолимфе свидетельствует об изменении адаптивных состояний функциональных систем животных в теплое время года, их этологических, эволюционных приспособлениях к сезонным изменениям. Поскольку линьки не синхронизированы, то в конце весны и летом раки находятся на разных стадиях линьки процесса, о чем свидетельствует большой диапазон значений содержания белка в гемолимфе. Максимальный уровень белка

Концентрация общего белка в гемолимфе раков до и после воздействия гидрохинона

Концентрация белка до воздействия (мг/мл)	Время воздействия (ч)	Концентрация белка после воздействия (мг/мл)
55 ± 19	1	59 ± 17
65 ± 9	24	43 ± 6

соответствует предлиночной стадии цикла и, как показали наши исследования, адаптационные способности раков в этот момент ослаблены, поскольку сложный процесс линьки является естественным физиологическим стрессом и протекает с большими затратами энергии, которая нужна для разрушения старого карапакса и построения нового, большего по размерам.

Значительное уменьшение концентрации белка сразу после линьки происходит в большей степени за счет изменения объема гемолимфы, а не за счет процессов его распада [16, 17]. Непосредственно перед сбрасыванием карапакса для облегчения его разрушения и сразу после сбрасывания для «раздувания» нового мягкого карапакса до необходимых размеров раки резко увеличивают потребление воды, что приводит к разбавлению гемолимфы. Существующие в литературе данные зависимости концентрации белка гемолимфы у ракообразных от стадии линьки цикла [18] свидетельствуют о том, что концентрация белка на стадиях затвердевания панциря минимальна. Например, показано, что у ювенильных особей *Penaeus vannamei* содержание белка в гемолимфе сразу после линьки составляет 20 мг/мл, а затем постепенно повышается и в конце линьки цикла опять достигает максимальной величины 70—80 мг/мл.

Проведенные в настоящей работе длительные наблюдения и исследования раков в лабораторных условиях позволяют сделать вывод о том, что концентрация общего белка в гемолимфе раков с октября по май не претерпевает значительных изменений. Необходимо отметить, что чем выше уровень белка в это время, тем больше адаптационные возможности они демонстрируют при неблагоприятных изменениях водной среды и вредных химических воздействиях. Аналогичная положительная корреляция концентрации общего белка и выживаемости наблюдалась также и на других ракообразных. Так, длительное воздействие меди на береговых крабов *Scapinus maenas* приводило к уменьшению белка в гемолимфе, выживаемость животных была прямо пропорциональна начальной концентрации белка, что позволило авторам разделить популяцию на фенотипы по этому биомаркеру [4]. Причины этой взаимосвязи ясны не до конца. Возможно, такая корреляция связана с тем, что для адаптации к негативным изменениям среды обитания, а также для резистентности к токсическим воздействиям органам и тканям раков требуются дополнительные затраты энергии, потому что при воздействии стрессовых факторов происходит изменение в скорости окислительно-восстановительных процессов, протекающих в клетках организма. У раков, как у большинства *Decapoda*, гемоцианин — переносчик кислорода — растворен в плазме, а не содержится в специализированных клетках. Поскольку более 60 %, а у некоторых видов *Crustacea* до 93 % [16, 19] общего белка гемолимфы составляет гемоцианин, раки с низким уровнем белка находятся в энергетически менее выгодном состоянии, и у них тканевая гипоксия жизненно важных органов наступает быстрее, что приводит к ухудшению функционального состояния организма и в конечном итоге — к гибели животного [20]. В работе [21] сообщалось, что

омамы, концентрация белка в гемолимфе которых при транспортировке в течение нескольких часов падала примерно до 9 мг/мл, погибали. Наши наблюдения за животными в лабораторных условиях в течение года без паузы показали, что раки нормально росли и развивались, однако содержание общего белка в их гемолимфе упало до минимального уровня, которое в естественных условиях практически не встречается. Вероятно, к этому могла привести дополнительная третья линька. Также возможно, что длительное существование раков в искусственно созданных условиях гиподинамии (достаточность и доступность корма, отсутствие угрозы для жизни, ограниченный объем для жизнедеятельности, комфортный температурный режим) в сочетании с предельно высоким насыщением воды кислородом приводит к тому, что адекватное снабжение кислородом органов и тканей рака достигается гораздо меньшим количеством гемоцианина (50 % исходного). Возможно также, что при таком значительном увеличении раков в размерах и биомассе часть белков гемолимфы, особенно медьсодержащих, участвует в предлиночный период в интенсивных процессах синтеза [17, 22]. Однако, скорее всего, такое низкое содержание белка в гемолимфе способно обеспечивать энергетические затраты раков только в этих искусственных условиях, и любые стрессорные воздействия, требующие дополнительных затрат энергии, приведут к гибели животных.

Таким образом, наши исследования показывают, что уровень белка в гемолимфе раков является надежным индикатором физиологического состояния организма. Раки, концентрация белка в гемолимфе которых лежит в диапазоне от 20 до 75 мг/л, могут быть выбраны в качестве тест-организмов для формирования референтных групп. Этот показатель целесообразно применять на первом этапе отбора животных для использования их в автоматических биоэлектронных системах мониторинга токсикологической опасности поверхностных вод в режиме реального времени [12]. Такой отбор дает возможность создавать референтные, однородные по функциональному состоянию группы здоровых животных-биоиндикаторов, что, в частности, позволяет исключать использование в качестве тест-организмов тех раков, адаптационные возможности которых значительно снижены.

Список литературы

- [1] Кузнецова Т. В., Сладкова С. В., Холодкевич С. В. Оценка функционального состояния раков в нормальной и токсической среде по характеристикам их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 42. С. 203—210.
- [2] Kholodkevitch S. V., Kyznetsova T. V., Sladkova S. V. Criteria for selection of crayfish's referent groups in exotoxicological investigations // Future in Native Crayfish in Europe: Abstr. book. Pisek, Czech Republic, 2009. P. 46.
- [3] Алякринская И. О., Коржуев П. А. Биохимическая характеристика гемолимфы черноморских ракообразных // Докл. АН СССР. 1981. Т. 60. С. 502—505.
- [4] Depledge M. H., Aagaard A., Gyorkis P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and beha-

- vioural biomarkers // Mar. Pollut. Bull. 1995 V. 31. N 1—3. P. 9—27.
- [5] Черкашина Н. Я. Динамика популяций раков родов *Pontastacus* и *Caspiastacus* (Crustacea, Decapoda, Astacidae) и пути их увеличения. М., 2002.
- [6] Chaisemartin C. Effects du taux des proteines alimentaires sur differens «indices» physiologiques cher l'ecrevisse *Austropotamobius pallipes pallipes* (Lereboullet) // Freshwater Crayfish, Thonon, les-Bains; Brance, 1978. P. 43—51.
- [7] Busselen P. Effects of moulting cycle and nutritional conditions on haemolymph proteins in *Carcinus maenas* // Com. Biochem. Physiol. 1970. V. 37. P. 73—83.
- [8] Черкашина Н. Я., Коломейцева Н. Е., Карпенко В. Н. К качеству самок и самцов длиннопалого кубанского рака *Astacus leptodactylus cubanicus* // Сб. научн. тр. ГосНИОХР. 1989. Вып. 300. С. 49—55.
- [9] Diangman J. S. Effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* // Com. Biochem. Physiol. 1970. V. 32. P. 709—731.
- [10] Florkin P. I. Blood chemistry // The Physiology of Crustacea. N.-Y., 1960. V. 10. P. 141—159.
- [11] Федотов В. П., Холодкевич С. В., Строчило А. Г. Изучение сократительной активности сердца раков с помощью нового неинвазивного метода // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2000. Т. 36. С. 219—222.
- [12] Холодкевич С. В. Биоэлектронный мониторинг уровня токсичности природных и сточных вод в реальном времени // Экологическая химия. 2007. Т. 16. № 4. С. 223—232.
- [13] Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randle R. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 93. P. 265—275.
- [14] Drach P. Mue et cycle d'intermue chez les Crustaces Decapodes // Annales De L Institut Oceanographique. 1939. V. 19. P. 103—391.
- [15] Passano L. M. Molting and its control // The Physiology of Crustacea. N.-Y., 1960. N 1. P. 473—536.
- [16] Depledge M. H., Bjerregaard P. Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans // Helgoland Marine Research. 1989. V. 43. P. 207—223.
- [17] Terwilliger Nora B. Hemolymph proteins and molting in crustaceans and insects // American Zoologist. 1999. N 39. P. 589—599.
- [18] Chan S., Rankin S., Keeley L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose // Biol. Bull. 1988. N 175. P. 185—192.
- [19] Magnum C. P. Oxygen transport in the blood // Biology of Crustacea. N.-Y., 1983. V. 5. P. 382—428.
- [20] Сладкова С. В., Федотов В. П., Холодкевич С. В. Компенсаторные возможности сердечно-сосудистой системы раков в условиях прогрессирующей гипоксии // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2006. Т. 42. С. 49—56.
- [21] Danford A. R., Uglov R. F., Carland J. Effect of long-haul international transport on lobster hemolymph constituents and nitrogen metabolism // Marketing and shipping live aquatic products. Proceeding of the Second International Conference and Exhibition, Seattle, Washington, 1999. P. 9—17.
- [22] Kuballa A., Elizur A. Novel molecular approach to study moulting in crustaceans // Bull. Fish. Res. Agen. 2007. N 20. P. 53—57.

Поступила 11 2010

TOTAL PROTEIN IN CRAWFISH HEMOLYMPH AS A PARAMETER OF FUNCTIONAL STATE OF ANIMALS AND BIOMARKER OF QUALITY OF HABITAT

© S. V. Sladkova and S. V. Kholodkevish

St. Petersburg Research Center of Safety, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

ABSTRACT

Analysis of total protein in hemolymph was performed by Lowry method on sexually mature crawfish *Pontastacus leptodactylus*. The total protein content in the crawfish hemolymph was studied for one year. The protein concentration varied widely, amounted to from 12 to 95 mg/ml, and depended on season and the moulting cycle phase. There are presented histograms for distribution of animals for the protein level for different seasons and their character is analyzed. In summer the amount of protein is maximal prior to moult and decreases by 40 % at once after it. There is studied the diapason of total protein concentrations in hemolymph, in which survival of crawfish at unfavorable changes in habitat is maximal. The adaptive possibilities of crawfish with the low protein content are reduced. The crawfish with the protein concentration in hemolymph lower than the «critical» one were submitted for different time by action of hydroquinone (1 g/l) used as a model toxicant. A brief action did not affect the protein content in hemolymph. At a long toxic action the protein level in hemolymph fell, on average, by 40 %, which preceded the death of the animals. Possible mechanisms of positive correlation of the protein concentration in the crawfish hemolymph and of their survival at deterioration of quality of the water medium are discussed.

Key words: crawfish, hemolymph, total protein, season, moulting cycle.