

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ОКЕАНОЛОГИИ имени П.П. Ширшова РАН

На правах рукописи

УДК 574.64: 574.24

Г. Колочкина

КОЛЮЧКИНА
Галина Антоновна

**БИОМАРКЕРЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ
НА ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ
СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ЧЕРНОГО МОРЯ**

03.00.18 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва
2009

Работа выполнена в Лаборатории экологии прибрежных донных сообществ
Института океанологии им. П.П. Ширшова
Российской академии наук

- Научный руководитель:** кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
Кучерук Никита Валентович;
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук
Михеев Виктор Николаевич;
кандидат геолого-минералогических наук
Демина Людмила Львовна
- Ведущая организация:** Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 17 февраля 2009 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 002.239.01 в Учреждении Российской академии наук Институте океанологии им. П.П. Ширшова РАН по адресу:
117997, Москва, Нахимовский проспект, 36.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН по адресу: 117997, Москва, Нахимовский проспект, 36.

Автореферат диссертации разослан 16 января 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Г.Г. Николаева

*Посвящается моему Учителю
Марии Александровне Ланге,
безвременно ушедшей из жизни
15 июня 2005 года.*

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Интенсивное антропогенное загрязнение прибрежных морских акваторий остается одной из важных проблем современности. В результате человеческой деятельности в океаны и моря поступает огромное число загрязняющих веществ, включая ксенобиотики. По времени воздействия и концентрации веществ загрязнение можно разделить на хроническое и импульсное. Хроническое загрязнение характеризуется наличием постоянного источника загрязнения (канализационные стоки городов, загрязнение нефтепродуктами вблизи крупных портов и пр.). Импульсное или залповое загрязнение – это одномоментный выброс высоких концентраций загрязняющих веществ, при этом облако загрязнителя может сравнительно быстро рассеиваться в толще вод.

Традиционно используемые при оценке качества водной среды величины предельно допустимых концентраций (ПДК) не позволяют ни предсказать эффекты всех возможных комбинаций поллютантов на биоту, ни выявить последствия импульсных воздействий. Методики биотестирования с использованием культур ракообразных и микроводорослей, которые используют при анализе токсичности водной среды, не применимы для морских экосистем с высокой гидродинамической активностью, когда изменения концентрации поллютантов вблизи источника загрязнения могут происходить за часы (Отчет по Федеральной Целевой Программе «Мировой океан», тема 7 – «Комплексные исследования Черного и Азовского морей»; 2004). Кроме того, эти методы дают оценку токсичности среды, но не позволяют предсказать возможные эффекты антропогенного загрязнения на экологические характеристики водных экосистем. Множество комбинаций синергических, антагонистических и маскирующих эффектов антропогенных факторов, а также необходимость соотнесения этих эффектов с изменениями в реальных сообществах, выдвигают на первый план проблему методов интегральной оценки их влияния на водные организмы (Руднева и др., 2004).

Традиционным методом оценки состояния морских экосистем является биоиндикация - метод определения качества среды обитания по видовому составу и

структуре сообществ, а также по показателям количественного развития видов-биоиндикаторов. Наиболее консервативными и пригодными для биомониторинга являются бентосные организмы. Однако для водоемов с нестабильной экологической обстановкой использование этого метода оказывается затруднительным. Так, в последние годы на Северо-Кавказском побережье Черного моря наблюдаются значительные изменения в структуре прибрежных экосистем. В результате инвазии аллохтонных видов и бенто-планктонных взаимодействий наблюдаются значительные колебания численности и биомассы донных организмов (Кучерук и др., 2002; Чикина и др., 2003). На этом фоне значительно сложнее выявить появление и динамику видов-биоиндикаторов, а также однозначно связать изменения в структуре сообществ с загрязнением. Кроме того, виды-биоиндикаторы развиваются в экосистемах в основном при хроническом загрязнении. Однако возможность залпового загрязнения прибрежных акваторий с интенсивными морским транспортом и слабо контролируемые бытовыми стоками остается важной проблемой и сравнительно слабо изученной областью. Поэтому рациональным и целесообразным представляется использование подходов, основанных на принципе биомаркирования, позволяющих получить интегральную оценку физиологического состояния животных на основе измерения нескольких ключевых параметров (Куценко, 2002). Главное преимущество этого метода заключается в возможности использования неспецифических биомаркеров, отражающих общее изменение физиологического состояния организма в ответ на воздействия разной природы.

Наиболее доступными и удобными объектами биомаркерных исследований в прибрежных донных экосистемах Северо-Кавказского побережья Черного моря являются двустворчатые моллюски-фильтраторы – доминанты местных донных сообществ. Они характеризуются крупными размерами и высокой численностью, легко доступны для отбора, что позволяет использовать их как для химического анализа загрязнений, так и для изучения биологических реакций на поллютанты.

Целью настоящей работы является выявление неспецифических физиологических и гистологических биомаркеров в организме двустворчатых моллюсков, отражающих уровень антропогенной нагрузки на прибрежные экосистемы Северо-Кавказского побережья Черного моря и позволяющих разделять хроническое и импульсное воздействие загрязняющих веществ.

Для достижения цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Найти неспецифические биомаркеры при экспериментальном импульсном и хроническом воздействиях сублетальных концентраций тяжелых металлов и нефтепродуктов на черноморских двустворчатых моллюсков (*Chamelea gallina*, *Anadara cf. inaequalvis* и *Mytilus galloprovincialis*).
2. Оценить возможности использования физиологических и гистологических параметров для разделения эффектов импульсного и хронического воздействий.
3. Оценить фоновые значения биомаркерных параметров: содержание АТФ, концентрацию гемцитов в гемолимфе, уровень гистопатологий двустворчатых моллюсков из разных районов Северо-Кавказского побережья Черного моря.

Научная новизна. В экспериментальных условиях получены новые данные по: 1) содержанию АТФ в гемцитах трех видов черноморских двустворчатых моллюсков (*Anadara cf. inaequalvis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*), 2) соотношению клеточных типов в гемолимфе, 3) концентрации гемцитов и 4) гистопатологиям в условиях импульсного и хронического загрязнения среды обитания.

Впервые был выполнен анализ содержания АТФ в гемцитах, концентрации гемцитов и гистопатологий трех видов двустворчатых моллюсков (*Anadara cf. inaequalvis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*) Северо-Кавказского побережья Черного моря.

Разработан метод идентификации импульсных и хронических стрессовых воздействий на двустворчатого моллюска *Anadara cf. inaequalvis*, играющего важную роль в структуре прибрежных донных сообществ Северо-Кавказского побережья Черного моря.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты подтверждают применимость метода гистологического анализа для разделения эффектов импульсного и хронического воздействий загрязняющих веществ на двустворчатых моллюсков. Единообразная реакция животных на действие загрязняющих веществ указывает на неспецифичность и универсальность регистрируемых реакций. Полученные результаты по исследованию параметров гемолимфы *Anadara cf. inaequalvis* указывают на неспецифичность ответа

организма на различные типы загрязнителей и **специфичность** реакции на разное время воздействия и концентрацию загрязнителей.

Эти методы могут быть использованы в рутинном мониторинге для оценки физиологического состояния двустворчатых моллюсков – доминирующих видов большинства прибрежных донных сообществ Северо-Кавказского побережья Черного моря. Комплексная оценка концентрации гемоглобина в гемолимфе и содержания в них АТФ может применяться в качестве экспресс-метода для выявления и разделения импульсных и хронических воздействий.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на I Международной научной конференции по изучению Черного моря (2006, Стамбул, Турция); на 99-й Международной конференции по аквакультуре (2007, Сан-Антонио, Техас, США); на XXII Международной береговой конференции «Проблемы управления и устойчивого развития прибрежной зоны моря» (2007, Геленджик); на 50-м Ежегодном симпозиуме Научного комитета по изучению океана (2008, Вудсхолл, Массачусетс, США) и на коллоквиумах Лаборатории экологии прибрежных донных сообществ Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН (2003-2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ (3 статьи и 7 тезисов), 1 статья находится в печати.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 116 страницах и включает в себя разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Основную часть, состоящую из 5-ти глав, Заключение, а также Выводы, Список литературы и Приложение. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 4 таблицами. Список литературы включает 238 источник, в том числе 210 – на иностранных языках.

Сокращения в тексте. ТМ – тяжелые металлы, НУ – нефтяные углеводороды, ДТ – дизельное топливо, ГЛПП – гранулы липофусциноподобного пигмента. АТФ - аденозинтрифосфат.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор содержит два раздела. Первый посвящен краткому описанию неспецифических биомаркеров, используемых для оценки физиологического состояния двустворчатых моллюсков. Освещен вопрос принципиального различия

импульсных и хронических воздействий загрязняющих веществ на двустворчатых моллюсков. Рассмотрены различные подходы для выявления последствий таких воздействий с помощью биомаркеров.

Во втором разделе кратко описано современное состояние макрозообентосных сообществ Северо-Кавказского побережья Черного моря. Приводится анализ работ, посвященных инвазии и массовому размножению видов-вселенцев (гребневик *Mnemiopsis leidyi*, моллюски *Anadara cf. inaequalvis* и *Rapana venosa*). Отмечено, что значительные ежегодные колебания численности и биомассы донных организмов связывают в настоящее время исключительно с биотическими межвидовыми взаимодействиями, вызванными вселением аллохтонных видов (Кучерук и др., 2002; Чикина и др., 2003; Chikina, Kucheruk, 2005). Рассмотрена антропогенная нагрузка на прибрежные экосистемы в последние годы (2003-2008). Обоснована необходимость поиска дополнительных подходов к анализу вклада импульсных выбросов загрязняющих веществ в дестабилизацию донных экосистем. Показано, что биомаркерный анализ физиологического состояния двустворчатых моллюсков может позволить определить, какой вклад в эту дестабилизацию вносит загрязнение.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на Северо-Кавказском побережье Черного моря в 2003-2008 годах. В качестве объектов исследования использовали массовые виды двустворчатых моллюсков:

- *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) - (Bivalvia, Veneridae)
- *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) – (Bivalvia, Mytilidae)
- Моллюск из семейства Arcidae (Bivalvia) – тихоокеанский вселенец. В настоящее время его систематическое положение пересматривается. В данной работе мы будем использовать принятое название *Anadara cf. inaequalvis* (Лутаенко, 2006).

Отбор животных производили вручную с использованием легководолазного снаряжения. Для дальнейших лабораторных исследований моллюсков помещали в 5-литровые контейнеры с морской водой (по 5-100 особей на контейнер, в зависимости от размера животных). Воду заменяли ежедневно, ее фильтрацию и

обеззараживание не производили. Для аэрации использовали воздушный насос. В контейнерах моллюсков содержали до начала исследований в течение 5-15 дней.

Выбор биомаркерных параметров. По литературным данным и результатам предварительных исследований были выбраны биомаркерные параметры, которые наиболее полно отражают физиологическое состояние моллюсков, универсальны по реакциям на разные загрязнители, удобны в полевых условиях и применимы к исследуемым видам моллюсков. Для анализа были использованы следующие методы:

- исследование концентрации гемоцитов в гемолимфе;
- исследование содержание АТФ в гемоцитах;
- гистологический анализ.

Для сравнения эффектов импульсного и хронического загрязнений на двустворчатых моллюсков были поставлены лабораторные эксперименты. Хроническое загрязнение моделировали с использованием разных концентраций ТМ и НУ (в эксперименте с *A. cf. inaequalis* – сублетальных, в экспериментах с *Chamelea gallina* – как сублетальных, так и летальных), при этом воду с загрязняющим веществом заменяли ежедневно. Импульсное загрязнение моделировали единовременным однократным помещением животных в емкости с морской водой и загрязняющими веществами в сублетальных концентрациях (значения этих концентраций были определены в предварительном эксперименте) с последующим перенесением животных в чистые емкости с морской водой (далее воду меняли ежедневно).

В качестве **загрязняющих веществ** были выбраны сульфат меди, хлорид кадмия и дизельное топливо. Эти загрязняющие вещества являются ключевыми на Северо-Кавказском побережье Черного моря. Так, фунгицид Бордоская жидкость ($\text{CuSO}_4/\text{Ca}(\text{OH})_2$) широко используется для обработки виноградников. В период дождей концентрация меди в устьях рек может значительно возрасти. В донных осадках прибрежной части Кавказского побережья Черного моря наблюдается повышенное содержание кадмия (Отчет ГОИН, 2005). При интенсивных осадках его концентрация в воде может возрасти на порядки (Отчет по Федеральной Целевой Программе «Мировой океан», тема 7 – «Комплексные исследования Черного и Азовского морей»; 2004). Высокая транспортная нагрузка на

исследуемые акватории приводит к значительному загрязнению прибрежных биотопов нефтепродуктами, в том числе дизельным топливом.

Рабочие концентрации загрязняющих веществ были определены из литературных данных и в ходе предварительных экспериментов (исходя из сублетальных концентраций этих веществ для двустворчатых моллюсков). Время импульсного воздействия (36 часов) было выбрано исходя из гидродинамических особенностей циркуляции черноморских вод, которая приводит к быстрому распределению загрязняющих веществ в водной толще (в течение 1 - 2 дней пятно загрязняющего вещества перераспределяется в толще вод и его концентрация значительно снижается) (Отчет по Федеральной Целевой Программе «Мировой океан», тема 7 – «Комплексные исследования Черного и Азовского морей»; 2004).

Экспериментальное исследование эффектов хронического загрязнения на *Anadara cf. inaequalis* и *Chamelea gallina*. Отбор *C. gallina* (N=40) для экспериментальных исследований производили в Геленджикской бухте, в районе, удаленном от основных транспортных путей. Отбор *A. cf. inaequalis* (N=264) для экспериментальных исследований производили на базе ВНИРО близ пос. Шепси на коллекторах для выращивания двустворчатых моллюсков. В качестве загрязняющих веществ использовали или сульфат меди (конечная концентрация ионов меди 0, 50, 500 мкг/л; 5, 50, 500 мг/л и 5 г/л – для *C. gallina*; 25 и 250 мкг/л – для *A. cf. inaequalis*), или хлорид кадмия (конечная концентрация ионов кадмия - 2 и 10 мг/л – для *A. cf. inaequalis*), или дизельное топливо (100 мкл/л, 1, 10 и 100 мл/л – для *C. gallina*). Моллюсков из аквариумов отбирали через 0, 3, 12 часов, 2, 3 и 5 дней после начала экспериментов – для *C. gallina* и через 0, 3, 8, 18 часов, 1, 5, 3 и 7 дней – для *A. cf. inaequalis*. Для *C. gallina* проводили только гистологическое исследование, у *A. cf. inaequalis* исследовали все выбранные биомаркерные параметры, а также накопление меди и кадмия в мягких тканях.

Предварительный эксперимент. Определение сублетальных концентраций загрязняющих веществ для черноморских двустворчатых моллюсков *Anadara cf. inaequalis*, *Mytilus galloprovincialis* и *Chamelea gallina*. Для определения рабочих концентраций при проведении эксперимента по импульсному воздействию загрязняющих веществ на черноморских двустворчатых моллюсков был поставлен предварительный эксперимент. Для этого моллюсков каждого вида помещали по 40 особей в 5-20 литровые сосуды с морской водой, в которой содержались или

дизельное топливо (0,1; 1; 10 и 100 мл/л), или хлорид кадмия (100 нг/л, 1, 10, 100 мкг/л, 1, 10 мг/л). Воду для содержания моллюсков заменяли ежедневно и отбирали с пирса на расстоянии 150 метров от берега. Каждый раз раствор сульфата меди готовили заново. Для аэрации использовали воздушный насос. На сроках 0, 3, 10 часов, 2,3 и 7 суток после начала эксперимента производили подсчет погибших животных и оценивали жизнеспособность оставшихся. Для оценки жизнеспособности моллюсков использовался рефлекс закрывания раковины при прикосновении к мантии, а также визуальные наблюдения фильтрационной активности.

Экспериментальное исследование эффектов импульсного загрязнения на *Anadara cf. inaequalvis*, *Mytilus galloprovincialis* и *Chamelea gallina*. Во время 79-го рейса НИС "Акванавт" (2005) были собраны моллюски для экспериментальных работ: 40 экз. *C. gallina* в районе пос. Джемете (около Анапы) с глубины 10 м и 264 экз. *A. cf. inaequalvis* на глубине 9 м в районе пос. Шепси. Отбор *M. galloprovincialis* с глубины 1-2 м производили со свай пирса Голубой (Рыбачьей) бухты на акватории, прилегающей к ЮО ИО РАН. В качестве загрязняющих веществ использовали или сульфат меди, или хлорид кадмия (конечная концентрация ионов кадмия - 1 мг/л), или дизельное топливо (1 мл/л). Для прекращения воздействия поллютантов моллюсков пересаживали в чистые сосуды с морской водой и содержали на протяжении трех недель при ежедневной замене воды. Отбор моллюсков для исследования биомаркерных параметров и содержания кадмия в мягких тканях производили спустя 0, 1,5, 7, 14 и 21 день после начала эксперимента.

Оценка фоновых значений биомаркерных параметров двустворчатых моллюсков из разных районов Северо-Кавказского побережья Черного моря. В рамках экспедиций «Черное море 2003-2007» и комплексных исследований последствий катастрофического разлива мазута (Керченский пролив, февраль-март 2008 года) были собраны пробы трех видов двустворчатых моллюсков (*Anadara cf. inaequalvis*, *Mytilus galloprovincialis* и *Chamelea gallina*) для анализа их физиологического состояния и содержания в них основных типов загрязнителей: тяжелых металлов (ТМ) и нефтяных углеводородов (НУ). Всего было проанализировано около 1000 моллюсков с 38 станций. Для анализа концентрации гемоцитов в гемолимфе и АТФ в гемоцитах отбирали по 10 моллюсков со станции,

для гистологического анализа - 30 моллюсков со станции, для анализа на содержание ТМ и НУ – 3-10 моллюсков со станции. Для интерпретации полученных данных в районе станции Шепси было проведено исследование динамики популяции *Anadara cf. inaequalis* и его естественного хищника *Rapana venosa*. В ходе работы была изучена численность и размерный состав двух видов моллюсков.

МЕТОДИКИ АНАЛИЗОВ БИОМАРКЕРНЫХ ПАРАМЕТРОВ.

Исследование клеточного состава гемолимфы и концентрации в ней гемоцитов. Гемолимфу отбирали при помощи стерильных шприцов из паллиального пространства или из синуса мускула-замыкателя, осторожно приоткрыв створки раковины. Подсчет концентрации гемоцитов производили под микроскопом «Olympus» с увеличением 400х в камере Горяева. Соотношение клеточных типов определяли на мазках гемолимфы, окрашенных красителями Май-Грюнвальда и Гимзы.

Для анализа содержания АТФ в гемолимфе отбирали 50 мкл гемолимфы у каждого моллюска и смешивали отдельно каждую пробу с ДМСО (диметилсульфоксид) в соотношении 1:1, и хранили при температуре -18°C до начала анализа. БиOLUMИнесцентный анализ концентрации АТФ с использованием светлячковой люциферазы на люцинометре RFT20046 (Германия) с пороговой чувствительностью 10^{-9} моль АТФ/л проводили на Биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Для гистологического исследования органы моллюсков (для крупных моллюсков с длиной раковины более 3 см) или отделенные от раковины мягкие ткани (для мелких экземпляров – менее 3 см) фиксировали одним из перечисленных ниже фиксаторов (использование различных фиксаторов не сказывалось на получаемой гистологической картине): **смесь ФСУ** (формальдегид 40%: спирт 96°: ледяная уксусная кислота в соотношении 9:3:1) - 1,5 - 2 часа с последующей отмывкой в течение 3-х часов в этиловом спирте 96°; **формальдегид**, разведенный морской водой до 4% - 2 суток – несколько месяцев, с последующей промывкой проточной водой в течение 2-х суток; **смесь Дэвидсона** (глицерин дистиллированный: 40% формальдегид: спирт 96°: морская вода в соотношении 1:2:3:3) – 2 суток при температуре 4°C с последующей отмывкой спиртом 48° на морской воде в течение 2-х часов.

При невозможности немедленного продолжения обработки материал помещали в 70° спирт. Дальнейшую проводку проводили для всех образцов по стандартной гистологической методике (образцы выдерживали последовательно в емкостях, содержащих 96° спирт – 1 час, 100° спирт – 3 часа, хлороформ – 40 минут, смесь хлороформ: гистомикс 1:1 – 16 часов, гистомикс – 3 часа, и заливали в гистомикс в формах). Срезы (5-7 мкм толщиной) получали с использованием салазочного микротомы, окрашивали гематоксилином Караччи и эозином и изучали под световым микроскопом «Olympus» при увеличении 400х-900х.

Измерения содержания тяжелых металлов и углеводов в донных осадках и моллюсках. Исследование содержания тяжелых металлов проводилось сотрудниками Государственного океанографического института Росгидромета и сотрудниками Лаборатории физико-геологических исследований Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН с использованием метода атомно-адсорбционной спектрометрии.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 8.0 из пакета SPSS и Statistica 7.0. Для оценки степени схождения/отличия экспериментальных данных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для анализа корреляций использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

4-1. ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ *Anadara cf. inaequalis* и *Chamelea gallina*.

При гистологическом анализе последствий хронического воздействия на *A. cf. inaequalis* и *C. gallina* разных концентраций дизельного топлива, ионов меди и кадмия были получены сходные результаты для различных загрязняющих веществ и видов моллюсков.

Наибольшему повреждению подверглись граничащие с окружающей средой эпителиальные пласты жабр и пищеварительного тракта. С увеличением концентрации и времени воздействия возрастал процент пораженных органов и тканей моллюсков. В первые часы наблюдалась **вакуолизация пищеварительной железы**, а при более длительном экспонировании проявились следующие патологические изменения:

- увеличение содержания гранул липофусциноподобного пигмента (ГЛПП) в клетках пищеварительной железы (пигмента, образующегося в результате нарушения липидного обмена; он нерастворим и хорошо заметен на гистологических срезах),

- увеличение содержания **коричневых клеток в соединительной ткани** (это клетки соединительной ткани – своеобразные «почки накопления», содержащие повышенную концентрацию липофусцина и других продуктов обмена). В нормальном состоянии они присутствуют в небольших количествах там, где происходит лизис, например, при деструкции тканей гонад после нереста, и выводятся через пограничные эпителиальные пласты (эпителий кишечника) наружу. Однако в патологических состояниях этих клеток становится на порядок больше (Ушева и др., 2006).

При воздействии на *A. cf. inaequalvis* ионов меди и кадмия в различных концентрациях наблюдалось накопление ТМ в тканях моллюсков. При этом со временем содержание меди линейно возрастало, а содержание кадмия увеличивалось в первые три часа до максимального значения, а затем незначительно снижалось, но не достигало контрольных значений.

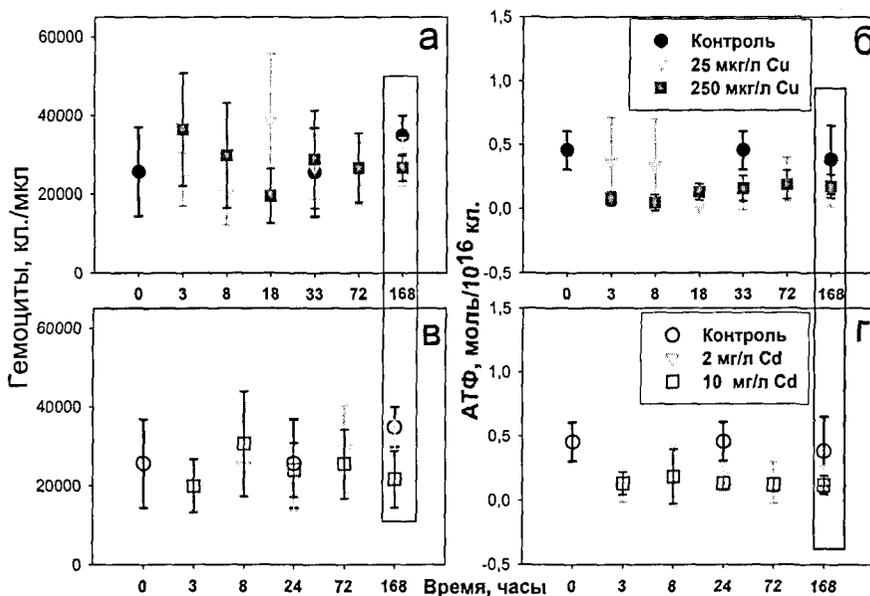


Рисунок 1. Изменения параметров гемолимфы *A. cf. inaequalvis* при хроническом воздействии ионов меди (а, б) и кадмия (в, г). Рамками обозначены хронические эффекты.

Наблюдалась единообразная реакция параметров гемолимфы *A. cf. inaequalvis* при воздействии обоих загрязнителей (рис. 1):

- в первые сутки эксперимента не наблюдалось достоверных отличий от контрольных значений, а затем происходило **снижение концентрации гемцитов в гемолимфе** до 60% от контрольных значений, до конца эксперимента этот параметр не восстанавливался.
- При всех концентрациях загрязнителей наблюдалось **снижение содержания АТФ в 5-7 раз, которое сохранялось до конца эксперимента.**

Интересно отметить, что при воздействии меди (25 мкг/л) или кадмия (10 мг/л) в первые сутки после начала эксперимента происходило увеличение средней концентрации гемцитов, возможно, это было связано с мобилизацией защитных свойств гемолимфы в ответ на острое загрязнение (рис.1).

4.2. ЭФФЕКТЫ ИМПУЛЬСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА *Anadara cf. inaequalvis*, *Mytilus galloprovincialis* и *Chamelea gallina*.

В экспериментах по импульсному воздействию загрязняющих веществ на моллюсков мы анализировали только содержание кадмия в тканях.

- У *C. gallina* содержание кадмия изменялось классическим образом - достигало максимума к концу экспонирования в среде с хлоридом кадмия, а затем постепенно снижалось.

- В тканях *M. galloprovincialis* и *A. cf. inaequalvis* содержание кадмия линейно росло в течение эксперимента.

При гистологическом исследовании наблюдался схожий гистопатологический ответ у трех видов моллюсков. При воздействии загрязнителей на моллюсков было отмечено увеличение процента животных с гистопатологическими нарушениями: **отеком жабр, гемоцитозом, вакуолизацией пищеварительной железы, дегенерацией ооцитов.** Основные изменения были отмечены в пограничных эпителиальных пластах (эпителиях жабр и пищеварительного тракта). Через три недели эксперимента у моллюсков наблюдали **крупные прозрачные вакуоли в клетках пищеварительной железы, гемоцитоз и гранулемы в соединительной ткани.**

При анализе параметров гемолимфы достоверные изменения удалось проследить только по одному виду – *A. cf. inaequalvis*. В гемолимфе этих

моллюсков содержатся два основных типа клеток, принципиально различающихся между собой: эритроциты, содержащие гемоглобин и выполняющие функцию переноса кислорода, и амебоциты, не содержащие гемоглобина и выполняющие самые разнообразные функции (от иммунной до функции пищеварения).

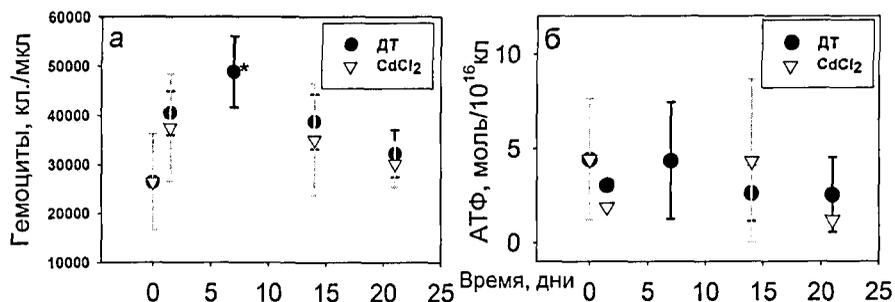


Рисунок 2. Динамика концентрации гемоцитов в гемолимфе *A. cf. inaequalvis* (а) и содержания в них АТФ (б) при импульсном воздействии ДТ или хлорида кадмия.

У *A. cf. inaequalvis* наблюдалась тенденция к увеличению количества гемоцитов в гемолимфе к 7-му дню эксперимента до максимальных значений, а затем – тенденция к снижению до контрольных значений к 21-му дню эксперимента (рис. 2). Достоверное повышение концентрации гемоцитов наблюдалось в эксперименте с ДТ на 7-е сутки (рис. 2).

Увеличение содержания гемоцитов в гемолимфе *A. cf. inaequalvis* происходило за счет повышения содержания эритроцитов, содержание амебоцитов не изменялось. Изменения содержания АТФ у всех трех видов моллюсков были недостоверными. Однако у *A. cf. inaequalvis* наблюдалась тенденция к понижению содержания АТФ в гемоцитах, сохраняющаяся на протяжении всего эксперимента. Увеличение содержания гемоцитов в гемолимфе при снятии острого воздействия, возможно, связано с мобилизацией эритроцитов для обеспечения органов и тканей кислородом в стрессовых условиях и в период восстановления.

Эффект воздействия загрязнения как на концентрацию гемоцитов в гемолимфе, так и на гистологические параметры сохранялся на протяжении 3-х недель.

4.3. БИОМАРКЕРЫ ИМПУЛЬСНОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

На основании полученных нами результатов можно заключить, что импульсное и хроническое воздействия различаются по возникающим гистопатологическим изменениям:

Гистопатологическими биомаркерами импульсного загрязнения являются:

- **вакуолизация пищеварительной железы;**
- **гемоцитоз**

При **хроническом** загрязнении мы наблюдали следующие признаки, которые не встречаются ни в контроле, ни при импульсном загрязнении:

- **увеличение процента животных с повышенным содержанием коричневых клеток** в соединительной ткани;
- **увеличение содержания ГЛПП** в эпителиальных клетках пищеварительной железы.

Полученные результаты согласуются с данными, опубликованными ранее по другим видам двустворчатых моллюсков (Ушева и др., 2006; Довженко и др., 2005). Нарушения, возникающие при импульсном загрязнении, носят обратимый характер. Следует отметить, однако, что при импульсном воздействии ионов меди на балтийских мидий последствия этого загрязнения проявлялись спустя год и выражались в нарушениях формирования раковины и макроархитектоники жабр (Sunila, 1987).

При исследовании параметров гемолимфы достоверный отклик удалось проследить только по одному виду – *A. cf. inaequalvis*. Полученные результаты согласуются с литературными данными по хроническому загрязнению, однако экспериментов по импульсному воздействию на вид *Anadara cf. inaequalvis* ранее в литературе не встречались.

По результатам наших экспериментов маркерным параметром является комплекс характеристик – сочетание снижения концентрации эритроцитов в гемолимфе и снижение содержания в них АТФ, которое наблюдается при **хроническом загрязнении**, продолжающемся как минимум неделю (Колучкина, Исмаилов, 2007). Такое изменение параметров гемолимфы может указывать на угнетение метаболизма, вызванное либо истощением защитных иммунных механизмов, либо включением механизмов, приводящих к переходу моллюска на замедленный метаболизм, как, например, при аноксии.

Наблюдаемое в эксперименте по хроническому воздействию ТМ на *A. cf. inaequalvis* повышение концентрации гемоцитов и вакуолизация пищеварительной железы в первые часы после начала воздействия напоминает последствия импульсного загрязнения. Увеличение концентрации гемоцитов происходило за счет эритроцитов, что может объясняться повышенными затратами кислорода на обеспечение нормального прохождения метаболических процессов в организме при сильном стрессе или в период восстановления.

По нашим данным, последствия импульсного воздействия можно проследить по биомаркерным параметрам моллюсков в течение 3-х недель, однако по литературным данным гистологических исследований этот срок - около года (Sunila, 1987).

Для *M. galloprovincialis* и *C. gallina* реакция параметров гемолимфы неоднозначна (изменения недостоверны). Использование характеристик гемолимфы для этих моллюсков в качестве биомаркеров антропогенного воздействия требует определения нормы реакции по концентрации гемоцитов и содержанию в них АТФ.

4-4. ФОНОВЫЕ ЗНАЧЕНИЯ БИОМАРКЕРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ИЗ РАЗНЫХ РАЙОНОВ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ЧЕРНОГО МОРЯ.

В 2003-2007 годах были проведены исследования биомаркерных параметров трех видов двустворчатых моллюсков Северо-Кавказского побережья Черного моря. Были получены данные по среднему содержанию гемоцитов в гемолимфе и содержанию в них АТФ (Табл. 1). Среднее содержание АТФ было сходным у трех видов моллюсков.

Таблица 1. Средние значения концентрации гемоцитов в гемолимфе и содержания в них АТФ ± стандартное отклонение. N – выборка.

Вид	Концентрация	Содержание АТФ,	N,
<i>Chamelea gallina</i>	1403 ± 786	2,40 ± 2,01	45
<i>Anadara cf. inaequalvis</i>	28246 ± 11700	4,38 ± 3,44	50
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1135 ± 730	6,18 ± 6,10	30

Наблюдалась нелинейная зависимость среднего содержания АТФ в моллюсках и нормированного содержания в них ТМ (рис. 3-а). Содержание АТФ было

наиболее высоким у моллюсков, содержащих наименьшие концентрации ТМ. При анализе корреляций между количеством ТМ в тканях моллюсков и количеством гистопатологий была обнаружена положительная зависимость (рис. 3-б). На некоторых станциях при гистологическом исследовании наблюдалось повышенное содержание ГЛПП в эпителиальных клетках пищеварительной железы у 65-100 % моллюсков (*C. gallina* и *A. cf. inaequalvis*). У *A. cf. inaequalvis*, отобранных около Шепси в 2006 году, и у *C. gallina*, отобранных в районе Железного рога в 2005 году, наблюдали снижение концентрации гемцитов в гемолимфе и содержания АТФ в гемоцитах (рис. 4).

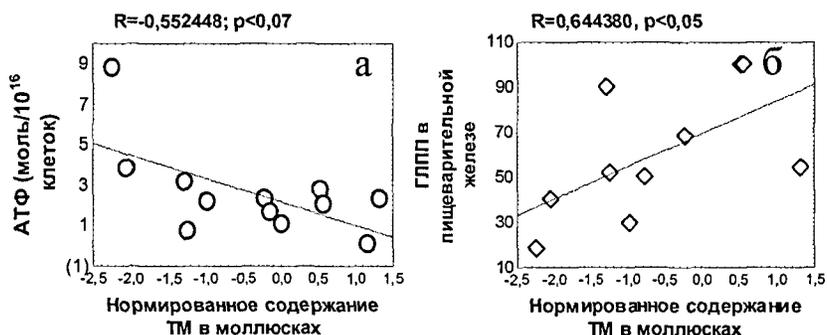


Рисунок 3. Зависимость содержания АТФ в гемоцитах (а) и количества гистопатологий (б) у двусторчатых моллюсков Северо-Кавказского побережья Черного моря.

Повышенная частота гистопатологий и изменения параметров гемолимфы указывают на хроническое загрязнение следующих районов Северо-Кавказского побережья Черного моря: Железный рог (2005 год), Джемете (2005 год), Шепси (2006 год).

У *A. cf. inaequalvis*, отобранных около пос. Шепси (2007), наблюдалась вакуолизация пищеварительной железы в 50% случаев (рис. 4) и снижение концентрации АТФ в гемоцитах. Полученные результаты позволяют предположить, что в этом районе моллюски подвергались импульсным воздействиям загрязняющих веществ. У *A. cf. inaequalvis*, отобранных близ строящегося аммиачного терминала у мыса Железный рог (2005), с той же станции, где было обнаружены хронические реакции у *C. gallina*, наблюдалась вакуолизация пищеварительной железы в 50% случаев (рис. 4) и снижение концентрации

гемоцитов в гемолимфе при незначительном понижении содержания АТФ в гемоцитах.

У *A. cf. inaequalvis* было обнаружено превышение содержания меди в 2 раза по сравнению с фоновыми значениями. Таким образом, в районе Железного рога, по всей видимости, наблюдалось хроническое загрязнение. Более слабый ответ *A. cf. inaequalvis* на загрязнение может объясняться большей устойчивостью этого моллюска к изменениям среды благодаря наличию гемоглобина и большей эффективности энергетических процессов (de Zwaan et al., 1995).

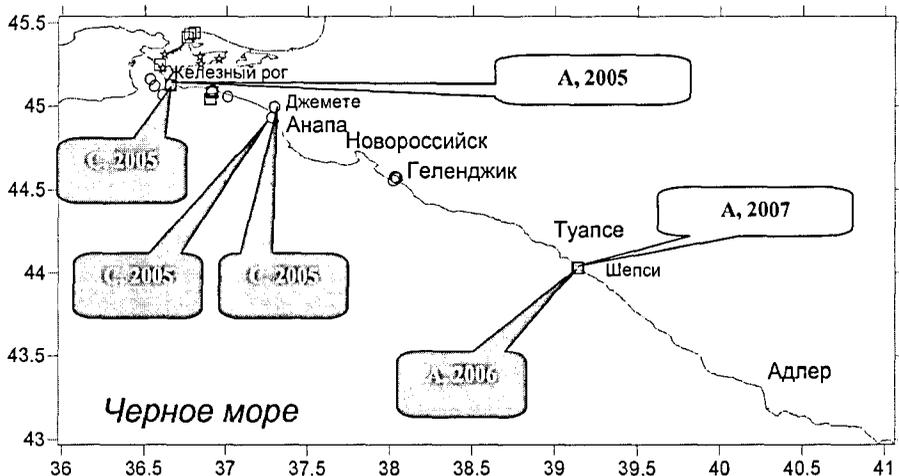


Рисунок 4. Гистопатологии у двустворчатых моллюсков Северо-Кавказского побережья Черного моря. Серыми выносками обозначены станции, на которых было обнаружено повышенное содержание ГЛПП в пищеварительной железе моллюсков. Белыми выносками обозначены станции, на которых была обнаружена вакуолизация пищеварительной железы у моллюсков. Сокращения – А – *A. cf. inaequalvis*, С – *Chamelea gallina*.

Для района пос. Шепси была прослежена динамика биомаркерных параметров *A. cf. inaequalvis*, а также популяционная динамика *A. cf. inaequalvis* и *Rapana venosa*. Известно, что *R. venosa* – мигрирующий хищник, который питается двустворчатыми моллюсками, в частности, и видом *A. cf. inaequalvis*. В конце 1990-х годов на глубинах 5-30 м на участке шельфа от Геленджика до Адлера произошло практически полное исчезновение популяций двустворчатых моллюсков, связанное с массовым размножением *R. venosa*, а также выеданием личинок двустворчатых моллюсков гребневиком *Mnemiopsis leidyi*. Ранее в этом диапазоне глубин находилось сообщество с доминированием *Chamelea gallina*

(Кучерук и др., 2002). Появление в 1999 году нового вселенца гребневика *Beroe ovata*, питающегося *M. leidy* привело к значительному оседанию двустворчатых моллюсков (Кучерук и др., 2002). Однако на глубинах 20-30 м, где было отмечено заиление и повышенное содержание органического углерода, преимущество получил вселенец *A. cf. inaequalvis* (Чикина и др., 2003; Chikina, Kucheruk, 2005). *A. cf. inaequalvis* способна дольше переживать неблагоприятные условия по сравнению с другими двустворчатыми моллюсками (*C. gallina* и *M. galloprovincialis*), благодаря присутствию гемоглобина в ее эритроцитах (de Zwaan et al., 2001). Таким образом, значительные колебания численности и биомассы донных организмов на Северо-Кавказском побережье в настоящее время связывают с биотическими взаимодействиями между аллохтонными и автохтонными видами (Chikina, Kucheruk, 2005). При этом масштабы перестройки прибрежных донных сообществ, происходящие в южной части Северо-Кавказского побережья (на участке шельфа от Геленджика до Адлера) таковы, что выявить на их фоне локальные антропогенные воздействия стандартными экологическими методами практически невозможно. Использование биомаркерного подхода позволяет выявить последствия таких воздействий.

Так, в течение 2005-2006 гг. было отмечено постепенное снижение численности *A. cf. inaequalvis* в районе поселка Шепси, которое резко усилилось в мае 2007 года (рис. 5 в, г). Параллельно в ноябре 2006 года произошло резкое увеличение численности хищного моллюска *Rapana venosa* (Отчет ВНИРО, Милютин, 2005, 2006). При детальном анализе биомаркерных данных оказалось, что в мае 2006 года наблюдалась повышенная концентрация гемоцитов в гемолимфе двустворчатого моллюска *A. cf. inaequalvis* при нормальном содержании в них АТФ (рис. 5 а), что, по нашим данным, свидетельствует о последствиях острого воздействия загрязняющих веществ. Наблюдавшаяся в ноябре 2006 года чрезвычайно низкая концентрация гемоцитов в гемолимфе *A. cf. inaequalvis* при низком содержании АТФ и повышенное содержание коричневых клеток в соединительной ткани и ГЛПП в эпителии пищеварительной железы на гистологических срезах свидетельствуют об истощении защитных иммунных механизмов моллюсков (рис. 5 а, б).

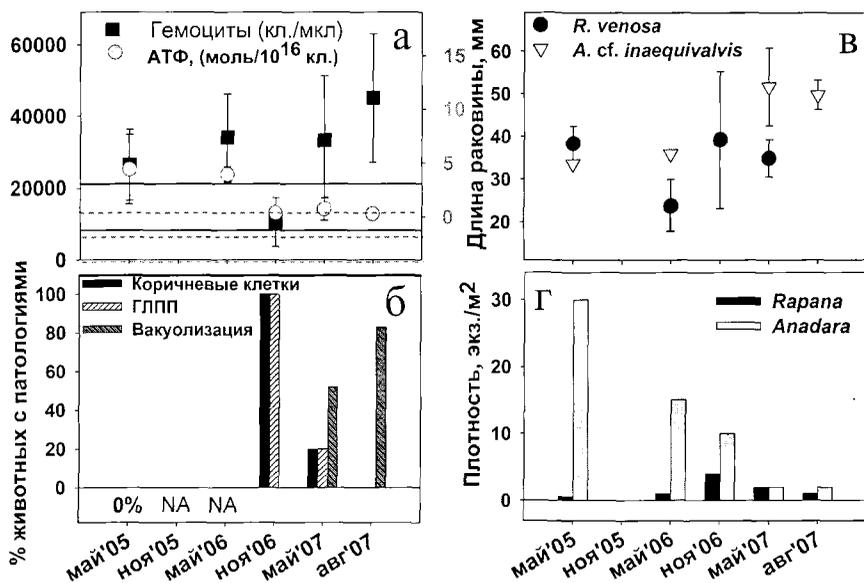


Рисунок 5. Динамика биомаркерных параметров *A. cf. inaequalvis* (а, б) и параметров популяционных показателей (в, г). На рисунке (а) линиями обозначены средние фоновые значения концентрации гемоцитов (черные сплошные линии) и АТФ (серые пунктирные линии) \pm стандартное отклонение. NA – данные отсутствуют, 0% - изменений нет. (Данные по численности и размерам моллюсков мая 2005 и мая 2006 гг. – по материалам отчета ВНИРО: Милютин, 2005, 2006)

Физиологические нарушения подтверждаются натурными наблюдениями: створки раковин моллюсков были открытыми, и животные демонстрировали очень вялый рефлекс закрытия створок в ответ на прикосновение к ноге и мантии. При поднятии на поверхность в течение нескольких минут они смыкали створки, однако при содержании в течение недели в лабораторных условиях наблюдалась 100% гибель моллюсков.

По всей вероятности, весной-летом 2006 года в исследуемом районе произошло резкое изменение условий обитания *A. cf. inaequalvis*, которое привело к истощению защитных иммунных механизмов моллюсков и, возможно, сделало их более доступным пищевым объектом для хищного моллюска *Rapana venosa*.

Сильное течение в исследуемом районе и штормовая погода осенью 2006 года, обеспечивающие перемешивание воды на глубинах 4-9 м, исключают возможность замора от недостатка кислорода в придонном слое. А значения биомаркерных параметров совпадают с экспериментальными значениями, полученными в

эксперименте по хроническому воздействию загрязняющих веществ на двусторчатых моллюсков. Кроме того, в мягких тканях *A. cf. inaequalvis*, отобранных в мае 2007 года, наблюдалось значительное превышение содержания в тканях кадмия и никеля по сравнению с 2005 годом (табл. 2). Известно, что период полувыведения кадмия из организма моллюсков составляет в среднем от 6 до 12 месяцев. Таким образом, мы предполагаем, что в период между отборами проб (маем и ноябрем 2006 года), в исследуемом районе происходило интенсивное загрязнение тяжелыми металлами, что спровоцировало значительные изменения в донной экосистеме.

Таблица 2. Содержание тяжелых металлов в тканях моллюска *A. cf. inaequalvis*, отобранных в районе поселка Шепси.

Дата	Cd, мкг/г сыр. веса	Ni, мкг/г сыр. веса
30.05.2005	0,98	0,57
27.05.2007	3,40	2,26

4-5. ПОСЛЕДСТВИЯ РАЗЛИВА МАЗУТА В КЕРЧЕНСКОМ ПРОЛИВЕ

11 ноября 2007 года в Керченском проливе произошла авария танкера «Волгонепфть-139», в результате которой в акваторию Керченского пролива и прилегающих районов попало около 2,5 тысяч тонн мазута (рис. 6).



Рисунок 6. Области акватории Керченского пролива, находившиеся 11-15 ноября 2007 г. под воздействием разлива мазута после аварии танкера «Волгонепфть-139» (Овсиенко и др., 2008).

Большая часть мазута, выброшенная волнами на берег была собрана для утилизации, но в районе косы Тузла, находящейся в непосредственной близости от неликвидированного на тот момент источника мазута, наблюдалось постоянное поступление новых порций загрязнителя в воду вплоть до сентября 2008 года (по спутниковым данным: Лаврова, Фашук и др., 2008). Химический анализ образцов придонной воды, донных осадков и двустворчатых моллюсков, собранных в ходе экспедиции в феврале-марте 2008 года, показал высокое содержание нефтяных углеводородов (рис. 7) (Спиридонов и др., 2008; Колочкина и др., 2009 [в печати]).

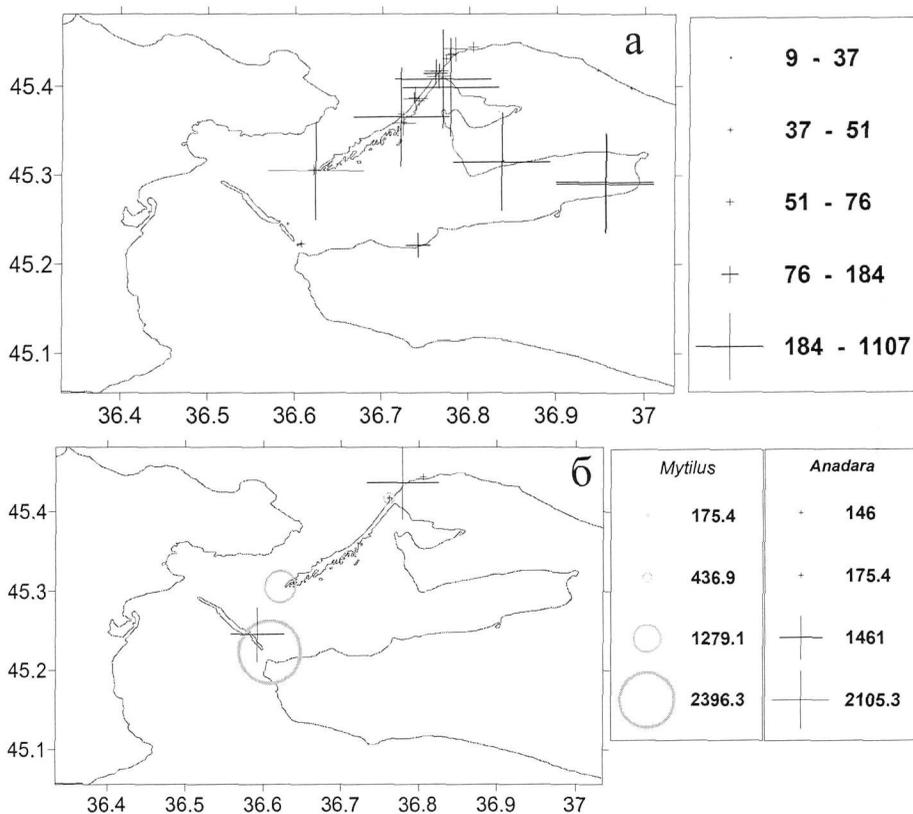


Рисунок 7. Содержание нефтяных углеводородов в донных осадках, мг/кг (а) и в двустворчатых моллюсках, мг/кг (б). Условные обозначения: *Mytilus* – *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara* – *Anadara cf. inaequalvis*.

У двустворчатых моллюсков (*Anadara cf. inaequalvis* и *Mytilus galloprovincialis*), отобранных как на северных станциях, так и на косе Тузла,

наблюдалось повышенное содержание коричневых клеток и ГЛПП в пищеварительной железе и значительное снижение содержания АТФ в гемоцитах. Это свидетельствует, по нашим данным, о хроническом загрязнении и согласуется с данными, полученными сотрудниками Лаборатории химии океана (ИО РАН) по содержанию углеводов в этих животных (Спиридонов и др., 2008). Однако концентрация гемоцитов в гемолимфе *A. cf. inaequalis*, отобранных на северных станциях, в два раза выше нормы, наблюдаемой для черноморских моллюсков, живущих при солености 17-18‰. Это может быть связано как с пониженной в этом районе соленостью (до 10‰), так и с менее интенсивным загрязнением этого района по сравнению с южными областями пролива.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование биомаркерных характеристик трех видов двустворчатых моллюсков из разных районов Северо-Кавказского побережья Черного моря показало, что в некоторых районах физиологическое состояние моллюсков значительно отличалось от фоновых значений. Частота встречаемости моллюсков с патологическим содержанием ГЛПП в пищеварительной железе положительно коррелировала с содержанием тяжелых металлов и нефтепродуктов в моллюсках, а содержание АТФ – отрицательно (достоверно только для тяжелых металлов), что согласуется с результатами лабораторных экспериментов по хроническому воздействию.

Последствия импульсных воздействий, по всей видимости, схожи с этапами восстановления физиологического состояния моллюсков после длительных хронических воздействий. Такие изменения в организме моллюсков менее долговременны, поэтому, по всей видимости, частота встречаемости таких событий ниже. Выявить импульсные загрязнения возможно только при регулярном мониторинге исследуемых точек, причем при анализе параметров гемолимфы не реже 1 раза в месяц. Комплексное исследование параметров гемолимфы и гистопатологий позволяет более точно определить физиологическое состояние животных при меньшей частоте исследований.

Динамика биомаркерных характеристик и содержания в мягких тканях ТМ, прослеженная для *A. cf. inaequalis* в районе поселка Шепси на протяжении 3-х лет, указывает на интенсивное загрязнение тяжелыми металлами в период,

предположительно, с мая по ноябрь 2006 года. Вероятнее всего, именно это загрязнение могло спровоцировать резкие изменения в донной экосистеме.

Таким образом, комплексный анализ предлагаемых параметров может стать основой для выявления вклада импульсных воздействий загрязняющих веществ в общую дестабилизацию донных экосистем.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что гистопатологические изменения тканей пищеварительной железы (сходные у всех трех видов моллюсков), концентрация эритроцитов в гемолимфе и содержание в них АТФ (у *Anadara cf. inaequalvis*) являются биомаркерами стресса и могут быть использованы для выявления хронических и импульсных загрязнений.
2. Предложенные биомаркеры позволяют выявить воздействие поллютантов на двустворчатых моллюсков до того, как это воздействие проявляется по популяционным показателям (смертность и др.).
3. Хронические и импульсные загрязнения среды различаются по вызываемым ими реакциям в организмах двустворчатых моллюсков, эти изменения могут быть дифференцированы только с использованием комплексного анализа гистологических и физиологических биомаркеров.
4. Значительное снижение численности *Anadara cf. inaequalvis* в районе поселка Шепси является последствием ее истощения из-за длительного воздействия загрязняющих веществ, что сделало этот вид более доступным пищевым объектом для хищного моллюска *Rapana venosa*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Чикина М.В., Колючкина Г.А., Кучерук Н.В. 2003. Аспекты биологии размножения *Scapharca inaequalvis* (Bruguière) (Bivalvia; Arcidae) в Черном море // *Экология моря*, вып. 64. С. 72-77.
2. Федоров А.В., Колючкина Г.А., Ланге М.А. 2004. Гистологическое исследование тканей моллюска *Dreissena polymorpha* как тестовых систем для оценки загрязненности водоемов нефтепродуктами // *Сборник Трудов Международного Биотехнологического Центра Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Труды конференции «Биотехнология – охране окружающей среды»*. М. Часть II. С. 181-185.
3. Колючкина Г.А., Исмаилов А.Д. 2007. Параметры экстрапаллиальной жидкости двустворчатых моллюсков – неспецифические биомаркеры

кратковременного загрязнения водной среды // *Океанология*. Т. 47, № 2. С. 233-240.

4. **Колочкина Г.А.,** В.А. Спиридонов, У.В. Симакова, В.И. Пересыпкин, Н.А. Беляев, П.В. Хлебопашев, А.В. Макаров, Ф.В. Сапожников, В.В. Козловский, Е.С. Шаповалова Изучение долговременных последствий катастрофического разлива мазута в Керченском проливе // *Океанология*, 2009 (в печати).

Тезисы докладов на конференциях:

5. Чикина М.В., **Колочкина Г.А.,** Кучерук Н.В. 2003. Аспекты биологии размножения *Scapharca inaequivalvis* (Bruguière) (Bivalvia; Arcidae) в Черном море // *Конференция молодых ученых «Понт Эвксинский III»*, 27-30 мая 2003 года, Севастополь. Тезисы докладов. С. 20-21.
6. Ланге М.А., Федоров А.В., **Колочкина Г.А.** 2003. Гистологическое исследование тканей моллюска *Dreissena polymorpha* как тестовых систем для оценки загрязненности водоемов нефтепродуктами // *Всероссийская Научная Конференция «Гистологическая наука России в начале XXI века: итоги, задачи, перспективы»*, 22-24 октября 2003 года, М. Тезисы докладов. С. 237.
7. **Колочкина Г.А.,** Федоров А.В. 2004. Исследование интенсивности амебоцитопоза у *Venus gallina* при загрязнении окружающей среды // *XI Международная Научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004»*, 14 мая 2004 года, МГУ им. М.В. Ломоносова, М. Тезисы докладов. С. 66-67.
8. **Kolyuchkina G.A.,** Ismailov A.D., Kucheruk N.V. 2006. *Anadara inaequivalvis* hemolymph parameters as indicator of benthic communities pollution by example of Black Sea North Caucasian Coast // *1st Biannual Scientific Conference "Black Sea Ecosystem 2005 and Beyond"*, 8-10 May 2006, Istanbul, Turkey. Abstracts. P. 38.
9. **Kolyuchkina G.A.** 2007. Effects of acute and chronic cadmium or diesel fuel pollution on hemolymph parameters of black sea bivalve *Anadara inaequivalvis* // *"Aquaculture 2007"*, 26 February – 2 March 2007, San Antonio, Texas, USA. CD-Abstracts.
10. **Колочкина Г.А.,** Исмаилов А.Д. 2007. Применение различных методических подходов в биоиндикации загрязнения Северо-Кавказского побережья Черного моря с использованием двустворчатых моллюсков // *XXII Международная береговая конференция «Проблемы управления и устойчивого развития прибрежной зоны моря»*, 16-20 мая 2007 г., Геленджик. Тезисы докладов. С. 243.
11. **Kolyuchkina G.A.,** Belyaev N.A., Simakova U.V. Effects of November 2007 oil spill on the bottom ecosystems of Kerch Strait // *50th Anniversary Symposium of the Scientific Committee on Oceanic Research "The changing ocean: from past to future"*, 19-21 October 2008, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA. Abstracts. 1 P.

Автор искренне благодарен своему научному руководителю к.б.н. Н.В. Кучеруку за постоянную помощь и поддержку при проведении данной работы. Глубокую признательность за постоянную идейную поддержку и благодарность приношу своему учителю - Марии Александровне Ланге, безвременно ушедшей из жизни в июне 2005 года. Автор признателен д.б.н. в.н.с. кафедры Микробиологии Биологического факультета МГУ А.Д. Исмаилову за помощь в освоении методов измерения концентрации АТФ и поддержку при выполнении исследований. Выполнение данной работы стало возможным благодаря активной поддержке и помощи д.б.н. М.В.Флинта и к.б.н. В.А. Спиридонова (Институт океанологии РАН). Автор благодарен д.б.н. А.И. Азовскому, к.б.н. Д.А. Астахову, О.В., Максимовой (ИО РАН) за помощь в обсуждении результатов работы, а также всем сотрудникам и аспирантам Лаборатории экологии прибрежных донных сообществ ИО РАН за поддержку, и особенно М.В. Чикиной и У.В. Симаковой. Автор искренне признателен доктору Инке Сунилы (*Inke Sunila, Dept. of Agriculture, Bureau of Aquaculture, Connecticut, USA*) - за бескорыстную помощь в освоении методов гистопатологического анализа двустворчатых моллюсков; И. Яхонтовой (ВНИРО) и сотрудникам базы ВНИРО на Черном море - за помощь при сборе материала; сотрудникам ИОО ИО РАН и особенно В.В. Козлову - за бесшестенную помощь в передвижениях по Северо-Кавказскому побережью при сборе материала; к.б.н. М.А. Милютинной и к.б.н. Д.А. Милютину (*Forschungsinstitut Senckenberg DZMB, Germany*), а также сотрудникам Лаборатории экологии и распределения планктонных организмов, Лаборатории биохимии и гидрохимии, и Лаборатории экспериментальной физики океана (ИО РАН), и особенно П.В. Хлебопашеву, К.А. Соловьеву и к.ф.-м.н В.В. Кременецкому за помощь при организации и проведении полевых исследований; а также всем сотрудникам Лаборатории гистологии МГУ, где автор начинал гистологические исследования. Автор признателен к.ф.-м.н. зав. Лабораторией аэрокосмической радиолокации ИКИ РАН О.Ю. Лавровой за предоставленные спутниковые изображения, сотрудникам Лаборатории химии океана под руководством д.х.н. В.И. Пересыпкина, сотрудникам лаборатории Физико-геологических исследований (ИО РАН) под руководством академика А.П. Лисицына (ИО РАН) и сотрудникам Лаборатория прикладной гидрохимии и аналитической химии (ГОИН) под руководством д.х.н. А.В. Сыроешкина за определение содержания тяжелых металлов и углеводов. Автор благодарен своей семье и друзьям за поддержку и понимание.

Работа была поддержана грантами РФФИ 02-05-64012-а, 05-05-64329-а (рук. к.б.н. Н.В. Кучерук), 06-05-65284-а (рук. к.б.н. В.А. Спиридонов).

14

Заказ № 20-а/01/2009 Подписано в печать 14.01.2009 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,5



ООО "Цифровичок", тел. (495) 649-83-30; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; [e-mail:info@cfr.ru](mailto:info@cfr.ru)