



УДК 594.124:551.464.621(262.5)

В. В. Трусевич¹, канд. биол. наук, ст. н. с., **А. Я. Столбов¹**, канд. биол. наук, ст. н. с.,
О. Ю. Вялова¹, канд. биол. наук, н. с., **Т. П. Кондратьева²**, м. н. с.,
А. Л. Морозова², канд. биол. наук, директор, **Г. Е. Шульман¹**, член-корр. НАНУ, зав. отделом

¹Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины,
Севастополь, Украина

²Карадагский природный заповедник им. Т. И. Вяземского Национальной академии наук Украины,
Карадаг, Украина

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ
(*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* Lam.) ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ
КАРАДАГСКОГО ЗАПОВЕДНИКА**

Исследованы особенности потребления кислорода и экскреции азота, а также их соотношение у мидий естественных поселений из районов чистой воды и хронического воздействия бытовых стоков. У моллюсков из биотопа загрязненной воды наблюдается пониженный уровень метаболизма. В условиях кратковременной аутогенной гипоксии критические уровни насыщения воды кислородом, лимитирующие обмен у моллюсков, проявляются при более низких величинах, по сравнению с мидиями из биотопов чистой воды. Ведущая роль в энергообеспечении метаболизма мидий из биотопа загрязненной воды принадлежит белково-азотистым субстратам, что свидетельствует об их меньшей устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов. Скорость потребления кислорода и экскреции азота и их соотношение O/N могут быть достаточно чувствительными показателями состояния естественных популяций мидий.

Ключевые слова: экофизиология, мидии, загрязнение, дыхание, аммоний, соотношение O/N

Возрастающее антропогенное воздействие на морские экосистемы в наибольшей степени проявляется в прибрежной и шельфовой зонах, вызывая глубокие структурно-функциональные изменения популяций гидробионтов. В то же время именно в этой зоне имеется ряд видов, характеризующихся высокой устойчивостью к воздействию повреждающих факторов среды. К ним относятся факультативные анаэробы, в основном бентосные формы и, в первую очередь, двустворчатые моллюски, характерным представителем кото-

рых являются мидии. Эти виды, в силу прикрепленного образа жизни в сублиторали, выработали ряд адаптаций, позволяющих им существовать в широком диапазоне экстремальных условий среды (гипоксия, аноксия, большой диапазон колебаний температуры, солености и высоких концентраций загрязняющих веществ). Указанные свойства метаболизма мидий послужили причиной детального изучения особенностей процессов их жизнедеятельности [2, 6, 12, 15, 17].

Устойчивость моллюсков к неблагоприятным условиям объясняется спецификой протекания конечных реакций углеводного обмена. Показано, что в основе краткосрочных адаптаций лежат механизмы анаэробного использования гликогена тканями мидий, сопровождающиеся резким снижением интенсивности обменных процессов. При более длительном воздействии неблагоприятных факторов включаются альтернативные классическому гликолізу пути анаэробного ресинтеза АТФ с совместным использованием углеводных и белковых субстратов [2, 16, 17].

Имеется достаточное количество данных, свидетельствующих об использовании моллюсками в качестве энергетических субстратов белков и свободных аминокислот как в аэробных, так и анаэробных условиях [6, 16]. Известно, что у двустворчатых моллюсков преобладающим конечным продуктом белкового и азотистого катаболизма является аммоний, а уровень потребления кислорода, экскреции аммонийного азота и их соотношение (O/N) являются важнейшими показателями физиологического состояния моллюсков [7, 10]. Большинство материалов, характеризующих метаболические особенности адаптивных реакций моллюсков к условиям среды, получены в экспериментальных условиях с искусственно заданными параметрами среды. В то же время остаются мало исследованными проявления адаптивных особенностей моллюсков, обитающих в широком спектре естественных биотопов.

Целью настоящей работы было изучение особенностей метаболизма мидий (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) из различных биотопов Карадагского природного заповедника в связи с адаптацией моллюсков к условиям обитания в зонах относительно чистой воды и на участках с повышенным антропогенным влиянием. В задачи исследования входило: 1) определить скорость потребления кислорода у мидий из различных биотопов в условиях развития ауто-

генной краткосрочной гипоксии и выявить критические уровни насыщения воды кислородом как показателя чувствительности к дефициту кислорода; 2) оценить направленность и характер метаболизма через атомное соотношение потребленного кислорода к выделенному аммонийному азоту (O:N) и динамику гликогена в норме и в условиях гипоксии.

Материал и методы. Работа проведена на базе Карадагского природного заповедника. Исследованы мидии из трех биотопов: 1 – со скал на глубине 1 – 1.5 м в наиболее чистой части заповедника (район Золотых ворот); 2 – на этих же скалах с глубины 7 м; 3 – на прилегающем к заповеднику участке акватории, загрязненном бытовыми стоками (со свай пирса пансионата «Крымское Приморье») (рис. 1).



Рис.1. Схема расположения точек отбора проб на акватории Карадагского заповедника
Fig.1. Sampling stations in the region of the Karadag's natural reserve

Пробы отбирали в сентябре 2001 г. при температуре воды 19 – 22⁰ С. Для опытов использовали взрослых одноразмерных особей (55 – 60 мм), собранных одновременно

(в течение светового дня). Отобранных моллюсков очищали от эпибионтов и выдерживали перед экспериментами в течение суток в фильтрованной через газовое сито (20 μm) воде. Температура воды в опытах соответствовала температуре среды обитания.

Для определения скорости потребления кислорода ($\text{мг} \cdot \text{экз}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$) группу мидий (по 10 экз.) помещали в термостатированные респирометры замкнутого типа объемом 1.4 и 1.1 л. Продолжительность экспозиции 2.5 – 3.0 ч до конечного насыщения воды кислородом 8 – 10 % исходного уровня (опыт 1). Изменение содержания кислорода в ходе эксперимента определяли с помощью кислородных электродов типа Кларка в ячейках, подключенных к замкнутой системе циркуляции воды, с регистрацией на ленте самописца КСП-4. Критические уровни насыщения воды кислородом, характеризующие предел компенсаторных реакций физиологических систем исследуемых организмов, устанавливали по точке перегиба кривой потребления кислорода, достоверно отличающейся от последующей величины, и выражали в процентах кислородного насыщения воды в момент отсчета.

Степень влияния дефицита кислорода на азотистый метаболизм у мидий исследовали в параллельных экспериментах (опыт 2). Интенсивность экскреции аммонийного азота рас-

считывали по приросту концентрации его в воде респирометров в конце эксперимента и выражали в микрограммах на экземпляр в час. Опыты, в пяти повторностях, проводили в респирометрах замкнутого типа объемом 1 л, содержащих по 7 экз. мидий, при температуре 19 - 20 $^{\circ}\text{C}$. Продолжительность опыта 6,5 ч.

Содержание аммонийного азота в контроле и опыте устанавливали по методу Грасхофф-Йохансена [11] и выражали в $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$. Концентрация аммонийного азота в контроле и его накопление в опытах не превышали токсикологических норм для беспозвоночных [9]. Содержание кислорода определяли по методу Винклера. Для определения долевого участия катаболизируемого белка и азотистых продуктов относительно углеводного и липидного метаболизма использовали аммонийный коэффициент O/N.

Содержание гликогена в жабрах и гепатопанкреасе мидий определяли антроновым методом [3] в контроле и после окончания опытов по дыханию.

Материалы обработаны статистически с привлечением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Зависимость скорости дыхания от содержания кислорода в среде у мидий из различных биотопов показана на рис. 2.

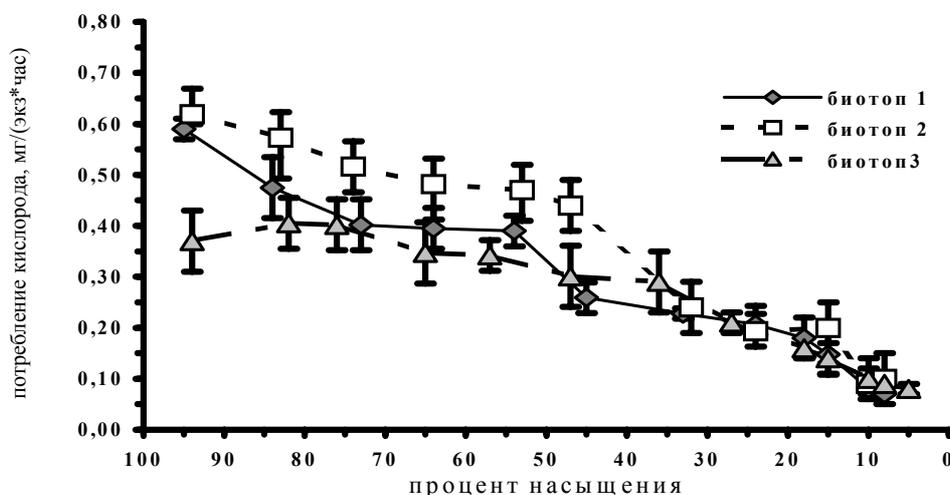


Рис. 2. Скорость потребления кислорода мидиями из различных биотопов в условиях экспериментальной гипоксии (каждая точка – $M \pm SD$, число опытов: 1-й биотоп – 8; 2-й биотоп – 7; 3-й биотоп – 9)
Fig. 2. Rate of oxygen consumption in mussels from the different biotopes at the experimental hypoxia

Из представленных материалов видно, что скорость потребления кислорода в состоянии нормоксии (95 % насыщения) у мидий из района чистой воды (биотопы 1 и 2) существенно выше ($P < 0,01$), по сравнению с мидиями из загрязненного района (биотоп 3). Как известно, на скорость дыхания существенное влияние оказывает множество факторов и, в первую очередь, температура, характер и интенсивность питания, стадия развития половых продуктов, а также наличие загрязняющих агентов [2, 14, 16]. Очевидно, что при прочих равных факторах именно хроническое наличие загрязняющих агентов в воде биотопа 3 существенно ограничивает дыхание мидий. Показано, что загрязнения различной природы оказывают ингибирующее влияние на отдельные группы ферментов и, главным образом, кислородтранспортной и кислородакцептирующих систем, приводящее к глубокой перестройке метаболизма в целом [1, 2, 14, 15]. Следует отметить также, что бытовые стоки оказывают сочетанное воздействие на организм, когда влияние отдельных агентов может взаимно усиливаться. В нашем случае эти изменения метаболизма у мидий из биотопа 3, вызванные хроническим воздействием бытовых стоков, не

возвращаются к норме даже после суточного пребывания моллюсков в чистой воде.

По мере уменьшения содержания кислорода в респирометрах скорость дыхания постепенно снижается до момента наступления критического уровня насыщения, когда скорость потребления кислорода падает более резко. Критический уровень насыщения воды кислородом является показателем чувствительности организма к дефициту кислорода, отражает адаптационные возможности организма и свидетельствует об изменении характера метаболизма. Изменение метаболического статуса клеток, обусловленное снижением концентрации субстратов и накоплением промежуточных продуктов обмена, а также изменение рН в клетках тканей при снижении содержания кислорода приводят к изменению активности ферментных систем и последующему переключению метаболизма на анаэробные пути энергопродукции [2, 16, 17].

Момент наступления критического уровня у мидий из разных биотопов в наших экспериментах наблюдается при различной величине насыщения воды кислородом и примерно через одинаковый промежуток времени (табл. 1).

Таблица 1. Скорость дыхания мидий и критические уровни насыщения воды кислородом ($M \pm m$)
Table 1. Rates of respiration of mussels and critical levels of oxygen saturation in seawater ($M \pm m$)

Биотопы	Скорость потребления кислорода (нормоксия), $\text{мгO}_2 \cdot \text{экз}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$	Критический уровень насыщения, %	Потребление кислорода, $\text{мгO}_2 \cdot \text{экз}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$		Концентрация кислорода в конце эксперимента, %	Продолжительность периода, в мин	
			в начале посткритического периода	в конце эксперимента		докритический	посткритический
1	0.590 ± 0.02	54	0.259 ± 0.04	0.07 ± 0.02	8	60 ± 3.4	175 ± 29
2	0.619 ± 0.04	47	0.242 ± 0.05	0.07 ± 0.03	8	62 ± 1.8	133 ± 21
3	0.370 ± 0.06	36	0.210 ± 0.04	0.08 ± 0.02	5	77 ± 1.5	175 ± 35

Так, у мидий из биотопа 3 критический уровень наблюдается при наименьшем насыщении воды (36 %). Очевидно, что хроническое воздействие бытовых стоков на мидий биотопа 3, ингибирующих, как было показано

выше, окислительные процессы в тканях, формирует у них особый тип метаболизма с низким уровнем обмена. В связи с этим, при воздействии гипоксии критический уровень менее

выражен и наступает при более низком насыщении воды кислородом.

Скорость дыхания мидий из всех биотопов от момента критического уровня заметно понижается и достигает минимальных значений к концу эксперимента (табл.1). По [17], наиболее важным приспособительным механизмом в стратегии адаптации к воздействию неблагоприятных факторов среды у беспозвоночных, в том числе моллюсков, является резкое снижение интенсивности обмена, что позволяет им выживать продолжительное время в условиях гипоксии и аноксии. Величина этого снижения может варьировать с условиями эксперимента и физиологическим состоянием моллюсков и составлять, по [2, 17], 10 – 20 и более раз. В наших экспериментах получены величины того же порядка.

Обращает на себя внимание тот факт, что в посткритическом периоде исчезают различия в скорости дыхания мидий из рассматриваемых биотопов ($P > 0,1$). Ранее было отмечено, что в условиях низкого содержания кислорода также отсутствуют различия в интенсивности дыхания разноразмерных и разновозрастных мидий [5]. Это является, по нашему мнению, результатом переключения метаболизма на гликолиз, активность ферментных систем которого мало зависит от сдвигов внутриклеточного гомеостаза [2, 14]. В экспериментах [12] установлено, что доля анаэробных процессов в посткритический период для четырех видов двустворчатых моллюсков по величине теплопродукции близка и составляет

около 28 % от аэробной. Следует также отметить, что момент переключения на анаэробный метаболизм в отдельных тканях обнаруживается при различном уровне гипоксии, поэтому в начальный период гипоксии наблюдают частичный анаэробноз, при котором возможно одновременное протекание аэробных и анаэробных метаболических процессов [10, 16].

В основе адаптаций моллюсков к гипоксии лежат механизмы анаэробного использования энергетических субстратов и, в первую очередь, гликогена, свободных аминокислот, пул которых в интрацеллюлярной жидкости может достигать 36 %, и белка. Для моллюсков в процессе анаэробноза характерно совместное использование этих субстратов с возможным восстановлением уровня гликогена в процессах глюконеогенеза за счет увеличения доли использования белка. Важная роль в реакциях сопряжения углеводного и белкового катаболизма в анаэробнозе принадлежит ферментам переаминирования [2, 16]. По мере развития гипоксии у моллюсков резко увеличивается доля белковых и азотистых субстратов в энергообеспечении процессов жизнедеятельности [2, 16, 17].

Данные по исследованию экскреции азота и аммонийному коэффициенту у мидий представлены в табл. 2. Как видно, минимальный индекс O/N отмечен для мидий биотопа 3, в то время как для мидий из остальных биотопов величина индекса примерно одинакова и колеблется около 30. Известно, что при величине коэффициента более 25 преобладает

Таблица 2. Потребление кислорода и экскреция аммонийного азота мидиями из различных биотопов при кратковременной гипоксии ($M \pm m$)

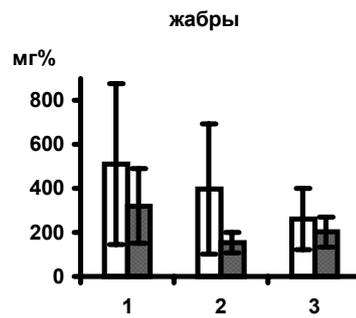
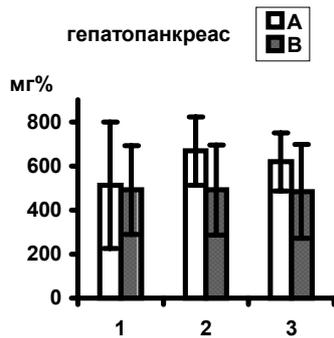
Table 2. Oxygen consumption and ammonia excretion in mussels from the different biotopes in short-term hypoxia ($M \pm m$)

Биотопы	Потребление кислорода, $\text{мгO}_2 \cdot \text{экз}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$	Экскреция азота, $\text{мкгNH}_4^+ \cdot \text{экз}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$	Индекс O/N
1	0.182±0.005	7.29±0.97	27.5±1.8
2	0.151±0.001	6.03±0.41	28.6±1.9
3	0.136±0.001	9.82±0.90	16.1±1.3

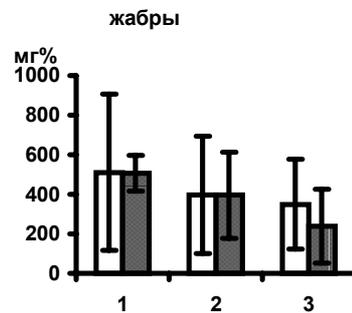
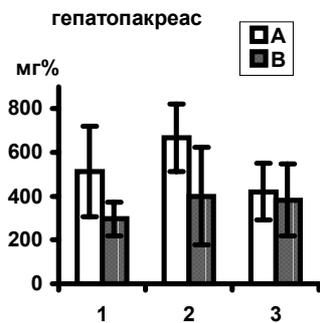
углеводно-липидный метаболизм, при 20 - углеводно – белковый, а коэффициент 15 и менее свидетельствует о переходе метаболизма на использование исключительно белков и свободных аминокислот как энергетических субстратов в условиях анаэробноза [7, 8, 14]. По [6, 16, 17], в начальный период гипоксии у ми-

дий основным энергетическим субстратом является гликоген. Судя по величине коэффициента O/N, у мидий из биотопов 1 и 2 (район чистой воды) преобладает безбелковый катаболизм. Вместе с тем, достоверных изменений в содержании гликогена в гепатопанкреасе и жабрах мидий не обнаружено ($P>0,1$) (рис.3).

ОПЫТ 1



ОПЫТ 2



1, 2 и 3 – номера биотопов

Рис. 3. Содержание гликогена в тканях мидий в условиях гипоксии (А – контроль, В – опыт)
 Fig. 3. Glycogen content in tissues of mussels at hypoxia conditions (A – control; B – experiment)

Это противоречие можно объяснить тем, что на фоне резкого снижения интенсивности метаболизма высокая вариабельность содержания гликогена в тканях мидий, а также восстановление этого содержания в процессах глюконеогенеза делают невозможным обнаружение изменений его уровня в процессе краткосрочных адаптаций [14, 16]. По [2], заметные изменения в содержании гликогена проявля-

ются только на третьи сутки гипоксии, причем изменения его уровня носят колебательный характер.

У мидий из загрязненного района (биотоп 3) в энергообмене преобладает преимущественное использование белково-азотистых субстратов, что свидетельствует о меньшей устойчивости моллюсков из биотопа 3 к недостатку кислорода (табл. 2). На преобладание

белкового катаболизма в тканях моллюсков в условиях глубокой гипоксии и воздействия загрязняющих факторов указывает ряд исследований [4, 7, 10, 14, 17]. Наличие в воде загрязняющих веществ различной природы угнетает активность ферментов не только аэробного, но и анаэробного метаболизма, резко снижая эффективность энергопродуцирующих процессов в организме гидробионтов [2, 15]. Это влияние проявляется в снижении интенсивности роста и продукции морских организ-

мов, что и наблюдается в последние десятилетия в районах интенсивной рекреации, прилегающих к заповеднику.

Таким образом, полученные материалы показали возможность использования данных по дыханию, экскреции азота и их соотношению в качестве индикаторов состояния мидий, обитающих в различных условиях среды, для характеристики состояния их естественных популяций.

1. Горомосова С. А., Миловидова И. Ю., Таможняя В. А., Шапиро А. З. Некоторые эколого-биохимические показатели устойчивости моллюсков к загрязнению // Гидробиол. журнал. - 1987. - **23**, №1. - С. 61 - 69.
2. Горомосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. - М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1984. - 120 с.
3. Мешикова Н. П., Северин С. Е. Практикум по биохимии. - М.:Изд-во МГУ, 1977. - 429 с.
4. Столбов А. Я., Вялова О. Ю. Респираторный метаболизм черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* в условиях дефицита кислорода (экспериментальные исследования) // Экология моря. - 2001. - Вып. 56. - С. 59 - 62.
5. Таможняя В. А. Обмен метаболитами с окружающей средой в популяции *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Биология моря. - 1991. - Вып. 3. - С. 85 - 93.
6. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. - М.: Мир, 1977. - 388 с.
7. Шульман Г. Е. Физиолого-биохимическая индикация и мониторинг состояния гидробионтов Черного моря // Гидробиол. журн. - 1999. - **35**, № 1. - С. 42 - 52.
8. Шульман Г. Е., Аболмасова Г. И., Столбов А. Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биол. - 1993. - **113**, № 5. - С. 576 - 586.
9. Babarro J. M. F., Zwaan A. de Influence of abiotic factors on bacterial proliferation and anoxic survival of the sea mussel *Mytilus edulis* L. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. - 2002. - **273**. - P. 33 - 49.
10. Bayne B. L., Livingstone D. R. Responses of *Mytilus edulis* L to Low Oxygen Tension. Acclimation of the Rate of Oxygen consumption // J. Comp. Physiol. - 1977. - **114**. - P. 29 - 142.
11. Grasshoff A., Johansen S. A new sensitive and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water // J. Cons. Explor. Mer. - 1972. - **34**. - P. 516 - 521.
12. Hammen C. S., Ellington W. R. Anaerobic energy metabolism of invertebrate // Fed. Proc. - 1984. - **43**, № 2. - P. 220 - 225.
13. Widdows J. Physiological responses to pollution // Marine Pollut. Bull. - 1985. - **16**, №4. - P. 129 - 134.
14. Widdows J. Physiological measurement and physiological procedures. The effect of stress and pollution on marine animals. - Praeger, N-Y, 1985. - P. 3 - 45.
15. Wu R. S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses // Mar. Pollution. - 2002. - **45**. - P. 35 - 45.
16. Zwaan A. de, Wijsman A. Anaerobic metabolism in Bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism // Comp. Biochem. Physiol. - 1976. - **54B**. - P. 313 - 324.
17. Zwaan A. de, Mathien A. Cellular energy metabolism in the Mytilidae: an overview. The mussel *Mytilus* ecology, physiology, genetics and culture. - Elsevier, Amsterdam, 1992. - P. 143 - 155.

Поступила 09 июня 2003 г.

Особливості метаболізму чорноморських мідій (*Mytilus galloprovincialis* Lam) з різних біотопів Карадагського заповідника. В. В. Трусевич, А. Я. Столбов, О. Ю. Вялова, Т. П. Кондратьєва, А. Л. Морозова, Г. Є. Шульман. Досліджувані особливості споживання кисню та екскрецію азоту, а також їхнє співвідношення у мідій природних поселень з районів чистої води та з хронічним впливом побутових стоків. У моллюсків з біотопу забрудненої води спостерігалось зниження рівня метаболізму. В умовах короткотермінової гіпоксії критичні рівні насичення води киснем, що лімітували обмін у моллюсків, виявлялися при більш низьких величинах порівняно з мідіями з біотопів чистої води. Ведуча роль у забезпеченні метаболізму мідій з біотопу забрудненої води належала білково-азотістим субстратам, що свідчить про меншу стійкість їх до впливу несприятливих умов. Швидкість споживання кисню та екскреція азоту та їхнє співвідношення (O/N) можуть бути достатньо чутливим показником стану природних популяцій мідій.

Ключові слова: екофізіологія, *Mytilus*, забруднення, дихання, амоній, співвідношення O/N

Features of metabolism of the Black Sea mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam) from the different biotopes of the Karadag reserve. V. V. Trusevich, A. Y. Stolbov, O. Yu. Vyalova, T. P. Kondrat'eva, A. L. Morozova, G. E. Shulman. Respiration and nitrogen excretion rates along with its ratios have been studied in *Mytilus galloprovincialis* from the regions of both clean and chronic impact of sewage waters. It was shown that sewage effect cause a decrease of oxygen consumption rate in mussels. Under short-term autogen hypoxia in the mussels from sewage water, critical levels of water oxygen saturation limiting the respiration rate are lower in mussels from sewage impact water as compared to the mussels from pure water biotopes. Protein-nitrogen substrates are the most important in metabolism suggesting that the mussels from the sewage impact biotope is less stable to the effect of unfavourable factors. Oxygen consumption and nitrogen excretion rates as well as O/N ratios may be fine indicators of condition of natural mussel populations.

Key words: ecophysiology, *Mytilus*, sewage, respiration, ammonium, O/N ratio