

УДК 57.083.3:594.124(262.5)

**С.В. Холодкевич<sup>1,2</sup>, Т.В. Кузнецова<sup>1</sup>, А.С. Куракин<sup>1</sup>, А.А. Солдатов<sup>3,4</sup>,  
О.Л. Гостюхина<sup>3</sup>, И.В. Головина<sup>3</sup>, Т.И. Андреевко<sup>4</sup>, М.П. Кирин<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр  
экологической безопасности РАН,  
197110, г. Санкт-Петербург, ул. Корпусная, 18;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9;

<sup>3</sup> Институт морских биологических исследований  
им. А.О. Ковалевского РАН,  
299011, г. Севастополь, просп. Нахимова, 2;

<sup>4</sup> Севастопольский государственный университет,  
299053, г. Севастополь, ул. Университетская, 33

## **НОВЫЙ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОПЕРАТИВНОЙ ОЦЕНКЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПРИБРЕЖНЫХ МОРСКИХ АКВАТОРИЙ**

Для оперативной оценки экологического состояния прибрежных морских акваторий Севастополя использован новый методологический подход, основанный на сравнительной оценке функционального состояния мидии *Mytilus galloprovincialis*, которую относят к ключевым видам экосистем прибрежных акваторий Черного моря. Оценка функционального состояния мидий проводили путем неинвазивного измерения характеристик их кардиоритма в процессе тестирования по разработанному авторами методу функциональной нагрузки. В качестве контрольного применяли широко известный биохимический метод оценки состояния окислительного стресса по активности ферментов антиоксидантной системы, измеряемой в органах мидий. При тестировании мидий по методу функциональ-

---

\* Холодкевич Сергей Викторович, доктор технических наук, заведующий лабораторией, профессор, e-mail: kholodkevich@mail.ru; Кузнецова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: kuznetsova\_tv@bk.ru; Куракин Антон Сергеевич, старший научный сотрудник, e-mail: balboy2004@mail.ru; Солдатов Александр Александрович, доктор биологических наук, заведующий отделом, профессор, e-mail: aleks-soldatov@yandex.ru; Гостюхина Ольга Леонидовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: gostolga@yandex.ru; Головина Ирина Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: ivgolovina@mail.ru; Андреевко Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, доцент, e-mail: tatyana-andreenk@mail.ru; Кири́н Максим Петрович, ведущий инженер, e-mail: kirinmaxim@mail.ru.

Kholodkevich Sergey V., D.Sc., head of laboratory, professor, e-mail: kholodkevich@mail.ru; Kuznetsova Tatiana V., Ph.D., senior researcher, e-mail: kuznetsova\_tv@bk.ru; Kurakin Anton S., senior researcher, e-mail: balboy2004@mail.ru; Soldatov Aleksander A., D.Sc., head of department, professor, e-mail: alekssoldatov@yandex.ru; Gostyukhina Olga L., Ph.D., senior researcher, e-mail: gostolga@yandex.ru; Golovina Irina V., Ph.D., senior researcher, e-mail: ivgolovina@mail.ru; Andreenko Tatiana I., Ph.D., assistant professor, e-mail: tatyana-andreenk@mail.ru; Kirin Maxim P., leading engineer, e-mail: kirinmaxim@mail.ru.

ной нагрузки измерялись два показателя работы кардиосистемы — время восстановления частоты сердечных сокращений после снятия нагрузки и коэффициент вариации частоты сердечных сокращений в восстановительный период. Установлено, что эти показатели значительно различаются для мидий, обитающих в разных по антропогенной нагрузке акваториях. В относительно чистых бухтах с хорошим водообменом (Казачья и Карантинная бухты) они были значительно ниже этих биомаркеров для загрязненных акваторий (две локации в Южной бухте с низким уровнем водообмена). Исследования, проведенные на основе биомаркеров окислительного стресса, дали сходную сравнительную оценку.

**Ключевые слова:** биоиндикация, оценка состояния морских экосистем, Черное море, бухты Севастополя, *Mytilus galloprovincialis*, биомаркеры кардиоактивности, биомаркеры окислительного стресса.

DOI: 10.26428/1606-9919-2018-194-215-238.

**Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Kurakin A.S., Soldatov A.A., Gostukhina O.L., Golovina I.V., Andreenko T.I., Kirin M.P.** New methodological approach to express assessment of ecological state for the coastal sea waters // *Izv. TINRO*. — 2018. — Vol. 194. — P. 215–238.

New methodological approach to express assessment of ecological state in the coastal areas of the Black Sea is proposed on the base of functional state evaluation for mussel *Mytilus galloprovincialis*. Non-invasive cardiac activity of mussels under a short-term functional loading (salinity change) was monitored in four differently polluted sites at Sevastopol city to detect early signs of their physiological state deterioration. As the control, the biochemical method of antioxidative stress (AOS) assessment was applied that is widely implicated in bioindication of marine environments. The sites in the Yuzhnaya/South Bay were defined as the most contaminated ones where the mussels demonstrated a prolonged recovery of the heart rate (76.8 min) and high variation of the heart rate after loading (24 %), while the mussels from the Kazachya Bay had rapid recovery (35.3 min) and lower variation of the heart rate (9 %) after removal of the stress load. The biochemical assessment showed the same results. The poor ecological state of the South Bay is obviously caused by heightened concentrations of heavy metals, as Pb, Sn, and Cu, detected in the hepatopancreas of tested mussels. The levels of antioxidative system parameters (e.g. glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase activity) correlated significantly with Pb content in the hepatopancreas ( $R^2 = 0.89–0.92$ ) and were heightened, as well. Prospects of the proposed biomarkers application in biomonitoring and their relevance for the risk assessment in aquatic ecosystems are discussed.

**Key words:** bioindication, Sevastopol bays, ecological state assessment, bivalve, *Mytilus galloprovincialis*, heart rate recovery, oxidative stress biomarker.

## Введение

В современных условиях все возрастающего антропогенного воздействия на окружающую среду, и особенно на водные экосистемы, возникла необходимость объединения усилий ряда европейских государств для определения четкой генеральной политики в области стратегии оценки состояния морей и океанов и стратегии морских исследований (Directive 2008/56/EC (<http://eea.europa.eu>)) Европейского Парламента и Комитета от 17 июня 2008 г. в рамках Директивы морской рамочной стратегии (Marine Strategy Framework Directive). В ряде документов (Directive 2008/56/EC; Davies and Vethaak, 2012) отмечается необходимость развития новых методологических приемов и инструментальных подходов для выработки критериев оценки состояния здоровья экосистем, основанных на применении биологических методов. Так, для объединения усилий стран Средиземноморского бассейна по организации мониторинга биологических эффектов загрязнения (MEDPOL Phase IV (2006-2013)) Барселонской конвенцией была принята Стратегия развития индикаторов состояния морских акваторий Средиземного моря — Mediterranean Marine Pollution Indicators (MPIs). Эта стратегия подразумевает развитие новых методов и методологии оценки здоровья (в отечественной литературе — состояния) морских экосистем (marine ecosystem health assessment), которая может быть использована в области защиты и охраны Средиземноморского бассейна и прибрежных морских акваторий других морей.

В последние 20 лет рядом исследований показана эффективность применения биомаркеров в индикации биологических эффектов загрязняющих веществ или их

смесей на состояние экосистем (Lehtonen et al., 2014; Turja et al., 2014). В связи с этим исследования последних лет отечественных и зарубежных ученых были направлены на выработку интегральных критериев и методов, основанных на биомаркерных показателях мидий и рыб, а также определении концентраций загрязняющих веществ или их смесей в поверхностных седиментах и органах морских животных. Под биомаркером понимается ответная реакция организма на биологически значимое для него воздействие различной природы (Depledge, Andersen, 1990; Depledge et al., 1995; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015). Такого же рода рекомендации по применению биомаркерных показателей были приведены в документах ICES Working Group on Biological Effects of Contaminants\* и в Директиве ЕС (Directive 2008/56/EC). Естественно, что рекомендованные показатели прошли сначала апробацию в сертифицированных лабораториях мира.

Исходя из выдвинутой британскими учеными парадигмы: «Здоровые животные — здоровая экосистема» (Depledge, Galloway, 2005), такого рода биомаркерные исследования, проводимые на отдельных организмах (случайным образом взятых из природной популяции), позволяют распространить выводы на состояние популяции и, таким образом, опосредованно судить об экологическом состоянии (здоровье) акватории, в которой обитают изучаемые животные — биологические «мишени» интегрального токсического действия загрязняющих веществ (Depledge, Fossi, 1994; Depledge et al., 1995; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015).

Важное достоинство данного подхода — то, что регистрируемые эффекты проявляются на организменном уровне при воздействии еще сублетальных концентраций загрязнений водной среды (Biomarkers..., 1992; Копецка et al., 2006; Чуйко, 2014; Lehtonen et al., 2014; Климова и др., 2017). Это позволяет обнаруживать изменения состояния «здоровья» (определяемые по интегральным показателям (Beliaeff, Burgeot, 2002): condition factor, condition index, integrated biomarker response — IBR) отдельных видов животных задолго до наступления серьезных изменений или даже деградаций популяций, сообществ и нарушений экосистем, в которых они обитают (Depledge, Andersen, 1990; Handy et al., 2003; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015).

Определен целый ряд живых организмов, используемых для диагностики состояния окружающей водной среды. International Council for the Exploration of the Sea (ICES) приводит мидию *Mytilus* sp. в Перечне видов-«мишеней», рекомендованных при проведении биомониторинговых исследований с целью оценки экологического состояния водных экосистем\*. При этом изучение биомаркерного «отклика» этих моллюсков (например, мидий) может быть проведено как на геном, так и на организменном и тканевом уровнях (Handy et al., 2003; Depledge, Galloway, 2005; Солдатов и др., 2008, 2014; Kholodkevich et al., 2011).

Снижение адаптационных возможностей организма (в том числе способности быстро восстанавливаться после нагрузочных воздействий) служит прогностическим признаком, подтверждающим возникновение и развитие заболевания, и может быть выявлено методом функциональной нагрузки (функциональной пробы) еще задолго до явного проявления признаков серьезного заболевания не только у человека, но и у беспозвоночных животных (Кузнецова и др., 2010; Холодкевич и др., 2012; Кузнецова, 2013). В частности, для индикации адаптационных возможностей организма в настоящее время считается обоснованным использование показателей функционирования сердечно-сосудистой системы (Баевский, Берсенева, 1997; Федотов и др., 2000; Холодкевич и др., 2009; Кузнецова и др., 2010; Кузнецова, 2013). Фактически быстрота восстановления кардиоритма после стандартизованных воздействий характеризует возможности организма к компенсации изменений, вызванных воздействием внешних факторов, что является важным признаком здоровья животного (Kholodkevich et al., 2011; Turja et al., 2014; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015).

---

\* ICES. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC). Alessandria, Italy, 2007. CM 2007/MHC:03. 129 p.

Адаптивность кардиосистемы живых организмов может рассматриваться как интегральный компенсаторный ответ организма на изменение целого ряда биологически значимых для вида факторов внутренней и внешней среды. Адаптивные возможности кардиореспираторной системы отражают интенсивность физиологических процессов, а также во многих случаях позволяют судить о функциональном состоянии организма в целом (Баевский, Берсенева, 1997; Vamber, Depledge, 1997; Федотов и др., 2000; Кузнецова и др., 2010). Высокая чувствительность характеристик кардиоритма мидий при воздействии тяжелых металлов была показана ранее (Curtis et al., 2000; Brown et al., 2004; Fokina et al., 2013), так же как аммиака (Bloxham et al., 1999), детергента (Kuznetsova, Kholodkevich, 2015) и нефти (Bakhmet et al., 2009). То же относится к биомаркерам двигательной активности створок двустворчатых моллюсков (Kramer, Foekema, 2000; Трусевич и др., 2004, 2015; Borcherdig, 2006).

Один из эффективных методов диагностики здоровья животных — метод функционального тестирования, применяемый в медицине и физиологии, в котором измеряется скорость адаптации животного к той или иной кратковременной стрессовой нагрузке (Баевский, Берсенева, 1997; Кузнецова, 2013; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015). Метод достаточно широко используется в экофизиологических исследованиях на позвоночных и беспозвоночных (Фролов, 1972; Vamber, Depledge, 1997; Curtis et al., 2000; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015). Показатель быстроты восстановления ритма сердца свидетельствует о функциональных резервах организма и, в случае медленного восстановления ритма или отсутствия такого восстановления, является показателем ранних признаков ухудшения здоровья.

В данной работе в качестве биомаркеров загрязнения акваторий г. Севастополь применяли предложенное ранее (Kholodkevich et al., 2011; Холодкевич и др., 2012; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015) время восстановления частоты сердечных сокращений (ЧСС) до фонового уровня после снятия кратковременной функциональной нагрузки (изменения солености воды на 50 % от нативной). Вторым показателем нами был выбран коэффициент вариации ЧСС ( $KV_{\text{ЧСС}}$ ) выборки тестируемых моллюсков. Данный подход прошел успешную апробацию в полевых исследованиях (Kholodkevich et al., 2011; Холодкевич и др., 2015), в которых была выявлена связь антропогенного загрязнения водной среды с предложенными физиологическими биомаркерами.

В настоящее время при оценках биологических эффектов загрязнения водных экосистем широко применяют биохимические показатели окислительного стресса, обусловленного реакцией организмов на загрязнение среды обитания (Depledge, Fossi, 1994; Sheehan et al., 1995). Считается, что контроль состояния антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков позволяет судить об уровне стрессированности организма, обусловленной неблагоприятным качеством среды обитания и, таким образом, может использоваться при биоиндикации качества пресноводных и морских акваторий (Biomarkers..., 1992; Rodriguez-Ortega et al., 2002; Roméo et al., 2005; Солдатов и др., 2007, 2008; Чуйко, 2014; Lloret et al., 2014; Лукьянова, Корчагин, 2017).

Целью настоящей работы являлись апробация и дальнейшее развитие нового методологического подхода к оперативной оценке состояния морских прибрежных акваторий (на примере 4 различающихся уровнями антропогенной нагрузки акваторий Севастополя) на основе оценок функционального состояния обитающих в них мидий путем измерения физиологических биомаркеров (характеристик кардиоритма животных). В качестве независимого контроля физиологического состояния животных в работе использовали общепринятые (Directive 2000/60/EC ([http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm))) биохимические показатели окислительного стресса (COMMISSION DECISION of 1 September 2010 on criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters (notified under document C(2010) 5956) ([mcc.jrc.ec.europa.eu/documents/201409161330.pdf](http://mcc.jrc.ec.europa.eu/documents/201409161330.pdf))).

## Материалы и методы

Объектами исследования в настоящей работе были 4 морские акватории Севастополя (Черное море): бухты Казачья, Карантинная и Южная (вблизи ее выхода (у Графской пристани) и в ее кутовой, оконечной, части). Оценка состояния акваторий делалась на основе диагностики функционального состояния обитающих в них видов гидробионтов, занимающих важное место в нормальном функционировании их биоценоза. Предметом исследования являлось функциональное состояние мидии *Mytilus galloprovincialis*, обитающей в этих акваториях, оцениваемое с помощью различных физиологических и биохимических биомаркеров.

**Характеристика исследуемых акваторий.** Из 15 бухт Севастополя для исследования были выбраны 4 локации, в которых проводили сбор моллюсков. Это Казачья бухта, Карантинная бухта, 2 локации в Южной бухте. Все выбранные локации значительно различаются по водообмену, стратификации, перемешиванию воды и особенно по степени антропогенного воздействия на них (рис. 1).

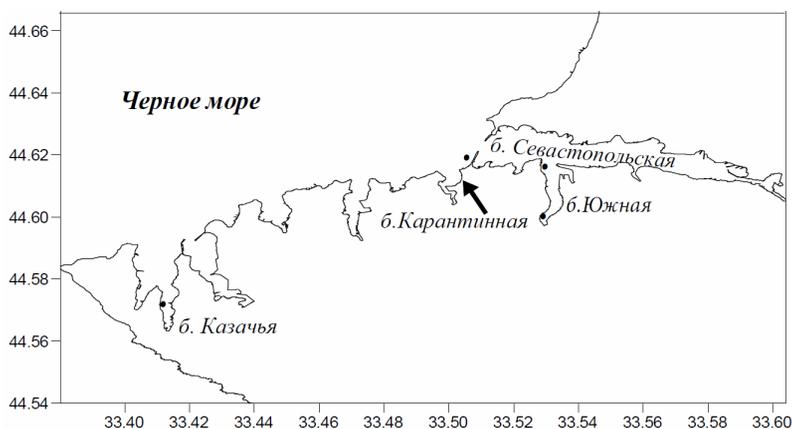


Рис. 1. Схема расположения изучаемых бухт г. Севастополь. Точками указаны места сбора моллюсков

Fig. 1. Scheme of the studied bays of Sevastopol. Sites of mussels sampling are shown by black points

Казачья бухта расположена ближе к открытой части моря, имеет активный водообмен. Уровень антропогенной нагрузки невысок (Миронов и др., 2002). Содержание нефтяных углеводородов в воде крайне низкое (следовые количества), а в грунте не превышает  $28 \text{ мг } 100 \text{ г}^{-1}$  сухого остатка, что характерно для относительно чистых морских акваторий. Остальные характеристики донных осадков (натуральная влажность, рН, Eh, содержание тяжелых металлов, свободных и связанных битумоидов) близки к таковым для грунтов открытой части моря (Миронов и др., 2002; Игнатьева и др., 2005; Губанов и др., 2010). По санитарно-гигиеническим нормам концентрации исследованных тяжелых металлов бухта является перспективной акваторией для создания марихозийств по культивированию моллюсков (Козинцев, 2006).

Карантинная бухта расположена на входе в Севастопольскую бухту, поэтому водообмен несколько ограничен, но каких-либо причалов и предприятий нет. Экологическое состояние бухты близко к внешней стороне расположенной рядом Карантинной бухты (Миронов и др., 2002). Большая часть дна покрыта алевритовым и алевро-пелитовым илом. Уровень свободных битумоидов в грунтах находится в пределах  $0,5\text{--}1,5 \text{ г } 100 \text{ г}^{-1}$  сухой массы. Количество органических соединений варьирует от 1 до 5 % (массовая доля). Содержание тяжелых металлов (Cu, Zn) в грунте не превышает  $1 \text{ мг } \text{кг}^{-1}$  сухой массы (Игнатьева и др., 2005; Губанов и др., 2010). Исключение составили соли Mn, их уровень превысил  $13 \text{ мг } \text{кг}^{-1}$  сухой массы, но исследователи (Губанов и др., 2010) считают, что это не результат антропогенной нагрузки, а следствие естественных гидрохимических процессов — смен окислительной обстановки на восстановительную.

Это означает, что данная акватория также не испытывает существенной антропогенной нагрузки.

Графская пристань расположена в выходе из Южной бухты. Имеет значительно лучший водообмен и, как следствие, испытывает меньшую антропогенную нагрузку (Миронов и др., 2002; Игнатъева и др., 2005; Губанов и др., 2010). Здесь швартуются рейсовые катера, осуществляющие перевозку населения в различные районы Севастополя.

Кутовая часть Южной бухты наиболее удалена от открытой части моря. Водообмен крайне низкий. В этой акватории находится большое количество причалов, а на выходе из бухты — судоремонтный завод (Миронов и др., 2002). Дно акватории заполнено черным пелитовым илом. Уровень нефтяных углеводородов в донных осадках достигал 960–1330 мг 100 г<sup>-1</sup> сухого остатка, что составляет почти 80 % липидно-углеводородного комплекса. Сравнительно высокое содержание в грунтах было отмечено и для солей тяжелых металлов (Cu, Zn, Mn). Оно в 2–7 раз превышало значения, зарегистрированные для других бухт, причем исследователи (Овсяный и др., 2003; Игнатъева и др., 2005; Губанов и др., 2010) особо отмечают высокий уровень Cu — 11,19 мг кг<sup>-1</sup> сухой массы. Содержание других тяжелых металлов не определялось. Все вышеперечисленное отражает достаточно высокую степень антропогенной загрязненности бухты.

**Отбор мидий и их содержание в лабораторных условиях.** Мидий отбирали в летний сезон с глубины около 1 м из каждой исследуемой локации, с твердого субстрата (камень, бетон) при помощи металлического скребка, чтобы не повредить биссусный аппарат. Старались отбирать мидий близкого размерного состава — 48–59 мм. Всего было отобрано по 20 животных с каждой изучаемой локации. Мидии были доставлены в лабораторию Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН (г. Севастополь) в термостатируемых полиэтиленовых емкостях с морской водой. Далее их пересаживали в отдельные стеклянные экспериментальные аквариумы емкостью 10 л с аэрируемой морской водой, привезенной из мест сбора моллюсков. Температура воды в проточном аквариуме соответствовала температуре воды в море и в течение суток изменялась в пределах 20–22 °С. Кормления мидий во время экспериментов не проводили, но они могли получать некоторое питание из непрерывно поступающей в проточные аквариумы природной морской воды.

**Волоконно-оптический метод неинвазивной регистрации кардиоритма мидий и анализ его характеристик в реальном времени.** Для регистрации кардиоритма тестируемых мидий на их раковину (без ее повреждения) в точке регистрации четкой и устойчиво воспроизводимой пульсации сердца приклеивали специальный миниатюрный пластмассовый держатель, в котором затем фиксировали волоконно-оптический датчик (общая масса не превышает 2 г), не препятствующий двигательной и фильтрационной активности моллюсков. Регистрацию кардиоритма мидий проводили с помощью лазерного волоконно-оптического фотоплетизмографа (Федотов и др., 2000; Пат. РФ № 2308720), а также оригинального программного обеспечения VarPulse (Kholodkevich et al., 2008, 2013), позволяющего в реальном времени оценивать уровень стрессированности одновременно у 8 бентосных беспозвоночных с жестким наружным покровом (раков, крабов и раковинных моллюсков) (Kholodkevich et al., 2008, 2011). Так же, как и ранее (Холодкевич и др., 2015), в экспериментах использовали одновременно по две 8-канальные установки, что позволяло регистрировать сигналы одновременно у 16 мидий, тем самым обеспечивая условия для необходимого объема выборочной совокупности для статистической обработки данных по мидиям из каждой исследуемой акватории.

**Процедура тестирования функционального состояния моллюсков.** Для тестирования моллюсков из разных бухт г. Севастополь в течение 1–2 ч после сбора доставляли в лабораторию, наклеивали миниатюрные волоконно-оптические датчики. Через несколько часов, после стабилизации ЧСС у большинства моллюсков, проводилось тестирование их функционального состояния по методу функциональной нагрузки.

В качестве стандартизированной функциональной нагрузки применяли быстрое (в течение 2–3 мин) понижение солёности воды с 18 до 9–10 ‰ (т.е. в пределах толерантности вида) на 1 ч путем добавления в аквариум необходимого количества дистиллированной воды. Такое воздействие носило гипоосмотический по модальности характер. Для диагностики функционального состояния мидий анализировали адаптивную перестройку сердечного ритма после восстановления солёности воды в аквариумах до природного уровня (Kholodkevich et al., 2011; Холодкевич и др., 2012; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015). При этом из 20 животных (собранных в каждой акватории) для диагностики отбирались только те 15–16 особей, которые к началу тестирования стабильно демонстрировали ЧСС, соответствующие состоянию активной фильтрации для данной температуры воды (20–22 °С).

Оценки функционального состояния моллюсков в соответствии с рекомендациями (Холодкевич и др., 2012; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015) проводились на основе измерения времени восстановления ЧСС ( $T_{\text{восст}}$ ), т.е. промежутка времени между моментом восстановления исходной солёности воды и до отсутствия достоверных отличий ЧСС от фоновых значений, наблюдавшихся до изменения (понижения) солёности воды. Базовыми (фоновыми) характеристиками кардиоритма мидий служили средние величины ЧСС и среднеквадратичного отклонения в выборке из 50 ударов сердца мидии за 2 ч фоновых наблюдений.

Схематически процедуры тестирования и вычисления времени восстановления паттерна ЧСС представлены на рис. 2.

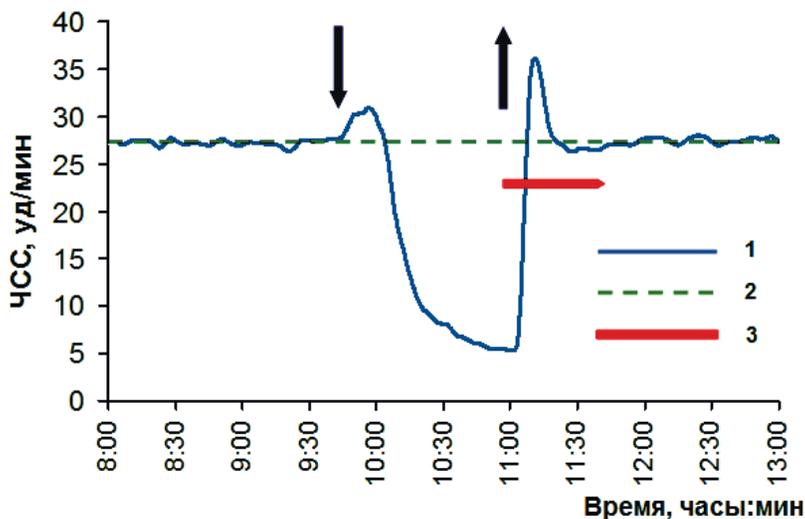


Рис. 2. Изменение частоты сердечных сокращений (ЧСС) у мидии в процессе тестирования на основе гипоосмотического стресс-воздействия (1 — тренд средней ЧСС до, во время воздействия и после восстановления первоначальной солёности воды; 2 — среднее значение ЧСС по группе мидий в спокойном, фоновом, состоянии; 3 — время восстановления фоновой ЧСС после возвращения к исходной солёности воды). Стрелки показывают время начала изменения солёности (стрелка вниз) и начала восстановления первоначальной солёности воды (стрелка вверх)

Fig. 2. Heart rate changes for mussels under hypo-osmotic stress-load (1 — trend of mean heart rate before salinity change, under lowered salinity, and after return to initial salinity; 2 — heart rate in background conditions; 3 — heart rate recovery time (min) after return to initial salinity. Arrows indicate the beginning of salinity change (arrow down) and beginning of its restoration) (arrow up)

Коэффициент вариации, характеризующий вариабельность средних значений ЧСС в тестируемой группе моллюсков, определялся в момент времени достоверного восстановления фоновых значений ЧСС по формуле  $KV_{\text{ЧСС}} = \text{СКО} / \text{ЧСС}_{\text{ср}}$ , где СКО — среднеквадратичное отклонение;  $\text{ЧСС}_{\text{ср}}$  — среднее значение ЧСС.

Более детальное, попарное сравнение средних значений ЧСС и их дисперсий у мидий, собранных с разных локаций, проводили с помощью критерия Фишера, ис-

пользуя PAST 3.15. Целью дисперсионного анализа являлась проверка значимости различий между средними в разных группах с помощью сравнения дисперсий этих групп. Разделение общей дисперсии на несколько источников (связанных с различными эффектами) позволяет сравнивать дисперсию, вызванную различием между сравниваемыми группами, с дисперсией, вызванной внутригрупповой изменчивостью (statsoft.ru/products/STATISTICA\_Base/analysis-of-variance.php). Применяли также поправку Бонферрони — один из методов контроля групповой вероятности ошибки (первого рода). Она вводилась нами для выявления в случае множественного сравнения уровня значимости различий между локациями обследования. Предварительно анализируемые данные по средним ЧСС проверяли на нормальность по критерию Шапиро-Уилка (ГОСТ Р ИСО 5479-2002). Проверку нормальности распределения биомаркера  $T_{\text{восст}}$  также выполняли по критерию Шапиро-Уилка.

**Определение показателей окислительного стресса.** Показатели окислительного стресса определяли в гепатопанкреасе мидий. Гепатопанкреас двустворчатых моллюсков способен нейтрализовать достаточно широкий спектр ксенобиотиков. Активное участие в этом принимает антиоксидантный ферментный комплекс данного органа, поэтому хронические биологические эффекты аккумулированных тканями моллюска химических соединений оценивали с использованием этого подхода. Препарирование проводили с использованием ледяной бани (0–4 °С). Образцы гепатопанкреаса упаковывали в пищевую фольгу и хранили при температуре минус 30 °С в морозильной камере Liebherr (Германия). Навеску замороженной ткани (150–400 мг) на холоде измельчали при помощи гомогенизатора Поттера. Трансформирующей средой являлся 1,15 %-ный раствор КСl. Фрагменты тканей осаждали центрифугированием: 6000 об/мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин. Для этих целей применяли рефрижераторную центрифугу К-23D (Германия).

Количество активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) в тканях оценивали по реакции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (малонового диальдегида — МДА) с 2-тиобарбитуровой кислотой (Ohkawa et al., 1979). Активность каталазы (КАТ) определяли по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония и образованию желтоокрашенного комплекса (Гири́н, 1999). Активность супероксид-дисмутазы (СОД) оценивали по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии восстановленного НАДН<sub>2</sub> и феназинметасульфата (Переслегина, 1989), а активность глутатионпероксидазы (ГП) — по накоплению окисленного глутатиона (GSSG) (Переслегина, 1989). Контроль содержания белка в гомогенатах осуществляли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Все измерения проводили на однолучевом спектрофотометре СФ-26.

Сравнение выборочных совокупностей проводили при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по критерию Пирсона. Результаты представлены как  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ . Статистическая обработка и графическое оформление выполнено с применением стандартного пакета Grafer (версия 7).

**Определение тяжелых металлов в тканях мидий.** Случайным образом отобранные мидии из группы прошедших тестирование с изменением солёности (10–16 особей для каждого места) были отобраны для анализа содержания тяжелых металлов в их тканях. Мидий помещали в полиэтиленовые пакеты, замораживали и хранили в холоде до проведения лабораторного химического анализа с помощью спектрофотометра с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS (Алемасова и др., 2003). Непосредственно перед анализом мягкие ткани отделяли от раковин пластмассовым ножом на холоде. Далее применяли кислотный метод вываривания при комнатной температуре в концентрированной HNO<sub>3</sub> в течение по крайней мере 10 ч, затем добавляли 2 мл 33 %-ной концентрированной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Полученная смесь нагревалась до 90 °С до испарения и формирования влажных солей. В полученную солевую смесь добавляли 2 мл концентрированной HNO<sub>3</sub>, затем образец охлаждался до комнатной температуры, после чего в него добавляли очищенную с помощью системы Mili-Q воду до объема 100 мл. Образцы анализировались с помощью спектрофотометра ICP-MS

(Алемасова и др., 2003) с индуктивно связанной плазмой. В работе использовался спектрометр марки ICPE-9000 (Shimadzu), который обеспечивает определение большинства элементов на уровне 1–10 ppb и ниже при диапазоне линейности 5–6 порядков. Все измерения содержания каждого из определяемых тяжелых металлов в тканях гепатопанкреаса и жабрах для каждой из групп мидий из определенной локации проводили в трехкратной повторности. Результаты пересчитывались в микрограммах на грамм влажной массы. Стандартные образцы анализируемых элементов для калибровочных растворов приготавливались из мультикомпонентного стандарта MERCK в 0,1N HNO<sub>3</sub>. Диапазон калибровочных растворов составлял 0,001–100,0 мг/л.

### Результаты и их обсуждение

**Оценка функционального состояния моллюсков.** На резкое понижение солености воды мидии реагировали быстрым закрытием створок, демонстрируя защитно-оборонительную реакцию, характерную для поведения двустворчатых моллюсков при стрессовых воздействиях различной модальности. При закрытых створках мидии постепенно (через 10–12 мин) переходят на анаэробный обмен, что отражается и в снижении ЧСС (Холодкевич и др., 2012).

Качественно тренд ЧСС всех протестированных мидий из 4 акваторий Севастополя был аналогичен представленному ранее на рис. 2. Изменения индивидуальных ЧСС мидий из Казачьей бухты показаны на рис. 3.

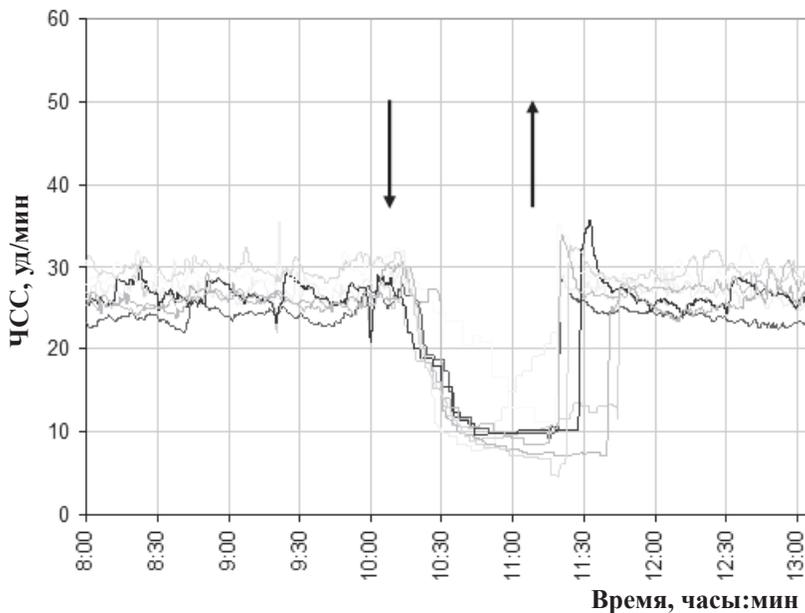


Рис. 3. Динамика индивидуальных частот сердечных сокращений (ЧСС) (уд./мин) для группы мидий ( $n = 9$ ) из Казачьей бухты в фоне (2 ч до воздействия), при изменении солености воды на 50 % (в пределах стрелок) и при восстановлении исходной солености (стрелка вверх)

Fig. 3. Dynamics of individual heart rate (beats per minute) for mussels ( $n = 9$ ) from the Kazachya Bay in the rest (2 hours before load), under 50 % salinity change (between arrows), and during return to initial salinity (arrow up)

Приведены экспериментальные кривые динамики ЧСС в процессе тестирования по использованному методу функциональной нагрузки. Средняя ЧСС фона (рассчитанная за 2 ч фонового кардиоритма) для группы мидий из Казачьей бухты составила  $24,8 \pm 3,5$  уд./мин (рис. 3). Для группы мидий из Карантинной бухты средняя ЧСС фона составила  $29,2 \pm 7,3$  уд./мин. Средняя ЧСС фона для группы мидий Графской пристани Южной бухты составляла  $33,3 \pm 7,5$  уд./мин. Средняя ЧСС фона для группы мидий кутовой части Южной бухты составила  $24,4 \pm 12,3$  уд./мин.

В табл. 1 приведены данные по сравнению дисперсий фоновых ЧСС мидий из разных локаций (поправка Бонферрони была введена для определения уровня значимости различий станций в случае множественного сравнения).

Таблица 1

Сравнение дисперсий (F) для частот сердечных сокращений (ЧСС) мидий, собранных в разных по антропогенной нагрузке бухтах г. Севастополь

Table 1

Comparison of dispersion (Fisher F-test) for heart rate of mussels collected from differently contaminated bays of Sevastopol

Сравниваемые бухты		F	Уровень значимости	Уровень значимости с поправкой Бонферрони
Казачья	Карантинная	4,3502	0,007162	0,0429702
Казачья	Графская	4,5918	0,005428	0,0325704
Казачья	Южная	12,3500	0,000015	0,0000926
Карантинная	Графская	1,0555	0,918010	1,0
Карантинная	Южная	2,8390	0,051718	0,3103080
Графская	Южная	2,6896	0,064533	0,3871980

Уровни значимости различий при использовании поправки Бонферрони дали те же результаты сравнения станций наблюдения.

Таким образом, только мидии из Казачьей бухты отличаются от прочих по дисперсии средней ЧСС фона (критерий Фишера,  $p < 0,01$ ). По средним значениям ЧСС фона различия между мидиями, собранными из разных бухт, оказались недостоверны, различия отмечены для Казачьей бухты и Южной бухты ( $F = 12$ ,  $p < 0,0001$ ), а между другими локациями нет значимых различий и по дисперсиям тоже.

В то же время эксперименты с функциональной нагрузкой дали более детальные результаты, позволяющие оценить функциональное состояние мидий из 4 исследуемых локаций, поскольку дают возможность в ходе анализа восстановительного процесса выявить ранние нарушения в работе регуляторных систем организма, направленных на компенсацию затрат организма в ответ на внешние воздействия.

Для сравнения биомаркера  $T_{\text{восст}}$  первоначально была проведена проверка нормальности распределения его значений для исследованных станций, она осуществлялась по критерию Шапиро-Уилка, применяемому для выборок экспериментальных данных объемом от 8 до 50 в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5479-200. Статистика критерия была вычислена с использованием программы анализа данных AtteStat (версия 12.0.5) в среде MS Excel 2003. Результаты проверки показывают, что для всех станций отбора мидий значения биомаркера  $T_{\text{восст}}$  были распределены по нормальному закону.

Значения показателей  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$  протестированных мидий из всех 4 акваторий приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты тестирования мидий *M. galloprovincialis* из различных акваторий с помощью гипосоленостной функциональной нагрузки

Table 2

Results of the mussels *M. galloprovincialis* from different sites testing with hypo-osmotic loading

Место отбора мидий	N	$T_{\text{восст}}$ , мин	$KB_{\text{ЧСС}}$ , %
Казачья бухта	12	$37,1 \pm 4,0^*$	12
Карантинная бухта	8	$50,6 \pm 4,4$	14
Графская пристань	8	$51,4 \pm 9,1$	17
Южная бухта	10	$76,8 \pm 9,1^*$	24

\* Отмечены статистически значимые различия (при  $p < 0,01$ ).

Привлекает внимание то, что показатели функционального состояния ( $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$ ) мидий из Карантинной бухты и у Графской пристани, расположенной в районе выхода из Южной бухты, близки друг к другу, но достоверно отличаются от показа-

телей мидий как из Казачьей бухты (заметно превышают их), так и из кутовой части Южной бухты (значительно ниже).

**Результаты измерения показателей окислительного стресса.** Состояние антиоксидантного ферментного комплекса гепатопанкреаса моллюсков, собранных из различных акваторий Севастопольской бухты, показано на рис. 4.

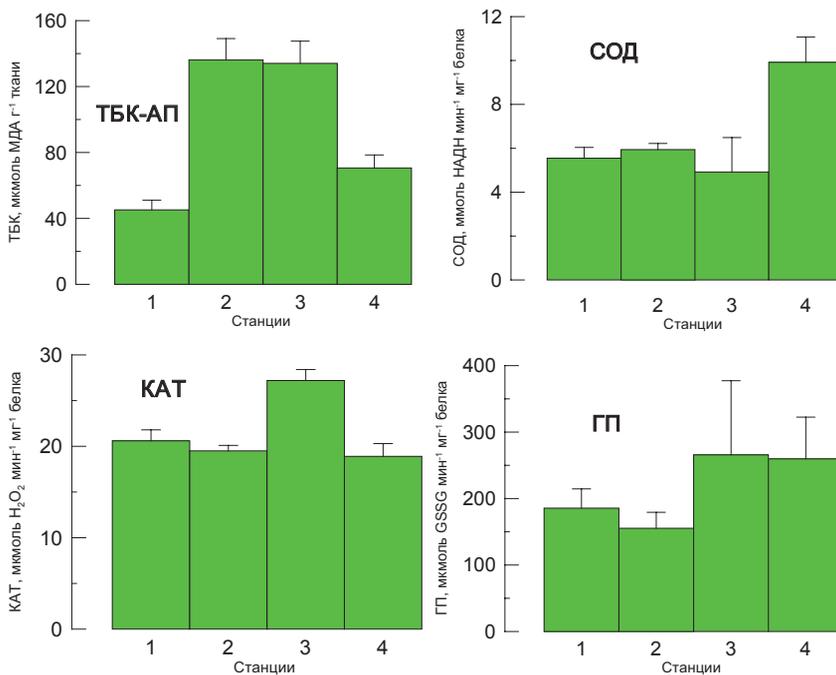


Рис. 4. Состояние антиоксидантного комплекса гепатопанкреаса моллюсков из различных акваторий Севастополя (1 — Карантинная бухта; 2 — Графская пристань; 3 — кутовая часть Южной бухты; 4 — Казачья бухта)

Fig. 4. Parameters of AOS in hepatopancreas of mussels from different sites at Sevastopol (1 — Karantinnaya Bay; 2 — Grafskaya pier; 3 — recess of the Yuzhnaya/South Bay; 4 — Kazachya Bay)

Наибольшее напряжение испытывал антиоксидантный комплекс гепатопанкреаса мидий, находящихся на станции № 3 (Южная бухта). Здесь отмечена самая высокая активность КАТ и ГП — соответственно  $27,2 \pm 1,2$  мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка и  $265,7 \pm 76,7$  мкмоль GSSG мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка. Относительно минимальных значений (станция № 2) различия по КАТ достигали 47–48 % ( $p < 0,01$ ). Для ГП они не были статистически выражены. Уровень ТБК-АП в данном органе был близок к максимальному —  $134,1 \pm 13,5$  мкмоль МДА г<sup>-1</sup>.

Уровень окислительного стресса в тканях мидий, собранных в Карантинной бухте (станция № 1), был минимален. Об этом свидетельствует самый низкий уровень ТБК-АП в гепатопанкреасе —  $45,2 \pm 5,9$  мкмоль МДА г<sup>-1</sup>, а также сопоставимо низкие активности всех контролируемых антиоксидантных ферментов (рис. 4).

Сходные результаты получены для станции № 4 (Казачья бухта). Единственным отличием являлась высокая активность СОД. Различия достигали 80 % ( $p < 0,05$ ). Однако это не было сопряжено с ростом активности КАТ, ГП и увеличением уровня ТБК-АП, что не позволяет констатировать усиление окислительной нагрузки на ткани мидий. Относительно низкие активности СОД, КАТ и ГП отмечены и для станции № 2 (Графская пристань), несмотря на сравнительно высокий уровень ТБК-АП. Это отражает усиление процессов перекисного окисления липидов в ткани. Однако отсутствие реакции со стороны ферментативного комплекса не позволяет рассматривать ситуацию как критическую.

Оценка корреляционных отношений между активностями АО ферментов и содержанием тяжелых металлов в морской воде позволила установить однозначную связь

между уровнем Pb и КАТ ( $R^2$  0,920) (рис. 5). Очевидно, что данный металл оказывает наибольший токсический эффект на организм моллюска.

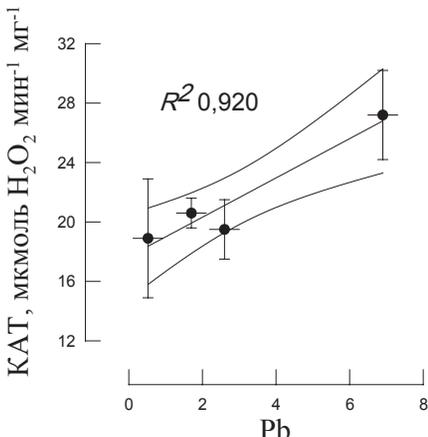


Рис. 5. График аппроксимаций для корреляции между содержанием Pb в гепатопанкреасе моллюсков и активностью каталазы (КАТ), число измерений — 4 (по числу акваторий)

Fig. 5. Correlation between Pb content in hepatopancreas and catalase activity for mussels from 4 sites at Sevastopol (n = 4)

**Содержание тяжелых металлов в тканях мидий.** Полученные данные химического анализа содержания тяжелых металлов в различных тканях мидий из исследованных бухт Севастополя и различных референтных акваторий некоторых других морей представлены в табл. 3.

Таблица 3  
Содержание тяжелых металлов в тканях мидий из разных локаций, мкг г<sup>-1</sup> влажной массы  
Table 3  
Heavy metals content in tissues of mussels from different locations, μg/g WW

Локация и вид ткани мидий	Al/27	Ni/60	Cu/65	Zn/66	Cd/111	Sn/118	Pb/208
Казачья бухта (геп)	15,0	1,800	3,30	66,0	2,700	0,049	0,52
Карантинная бухта (геп)	63,0	2,200	5,40	59,0	1,300	0,170	1,70
Графская пристань (геп)	28,0	1,500	4,70	58,0	0,660	0,150	2,60
Южная бухта (геп)	26,0	1,800	5,50	102,0	1,100	0,220	6,90
Охотское море (геп)***	—	1,700	9,70	65,0	4,0–5,0	—	2,30
Казачья бухта (ж)	5,2	0,130	0,82	21,0	0,180	0,015	0,41
Карантинная бухта (ж)	9,1	0,150	1,10	35,0	0,120	0,029	0,89
Графская пристань (ж)	6,5	0,120	1,30	27,0	0,120	0,042	1,60
Южная бухта (ж)	4,0	0,092	5,80	23	0,088	0,050	3,0
Адриатическое море*	—	—	1,02–2,40	32,40–34,60	0,290–0,350	—	0,66–1,70
Черное море (Румыния)*	—	—	1,10–1,40	18,0–31,7	0,160–0,290	—	—
Белое море**	—	—	5,0	33,0	0,330	—	1,70

*Примечание.* Через косую — атомная масса обозначенных металлов (а.е.м., г/моль); геп — гепатопанкреас; ж — жабры. Звездочки — данные, пересчитанные на общую влажную массу мягких тканей мидий: \* по Stankovic с соавторами (2011); \*\* по Д.Ф. Будько с соавторами (2015); \*\*\* по О.В. Подгурской с соавторами (2004).

На рис. 6 представлены графики аппроксимаций для всех случаев положительных ( $p > 0,4$ ) корреляций между содержанием Zn и Pb в тканях (гепатопанкреас, жабры) и  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{чсс}}$ . Число измерений — 4 (по числу акваторий).

Ранее в опытах, как с морскими, так и с пресноводными двустворчатыми моллюсками было обнаружено, что время восстановления ЧСС моллюсков из условно чистых, референтных мест составляет 30–50 мин, а из загрязненных может достигать нескольких часов (Kholodkevich et al., 2011; Turja et al., 2014; Холодкевич и др., 2015; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015). Это объяснялось разной адаптационной способностью к стрессовому тест-воздействию здоровых животных по сравнению с ослабленными животными, обитающими в загрязненной, неблагоприятной среде. Было установлено также (Kholodkevich et al., 2011; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015), что величины  $KB_{\text{чсс}}$  для загрязненных акваторий, как и  $T_{\text{восст}}$ , также значительно, в

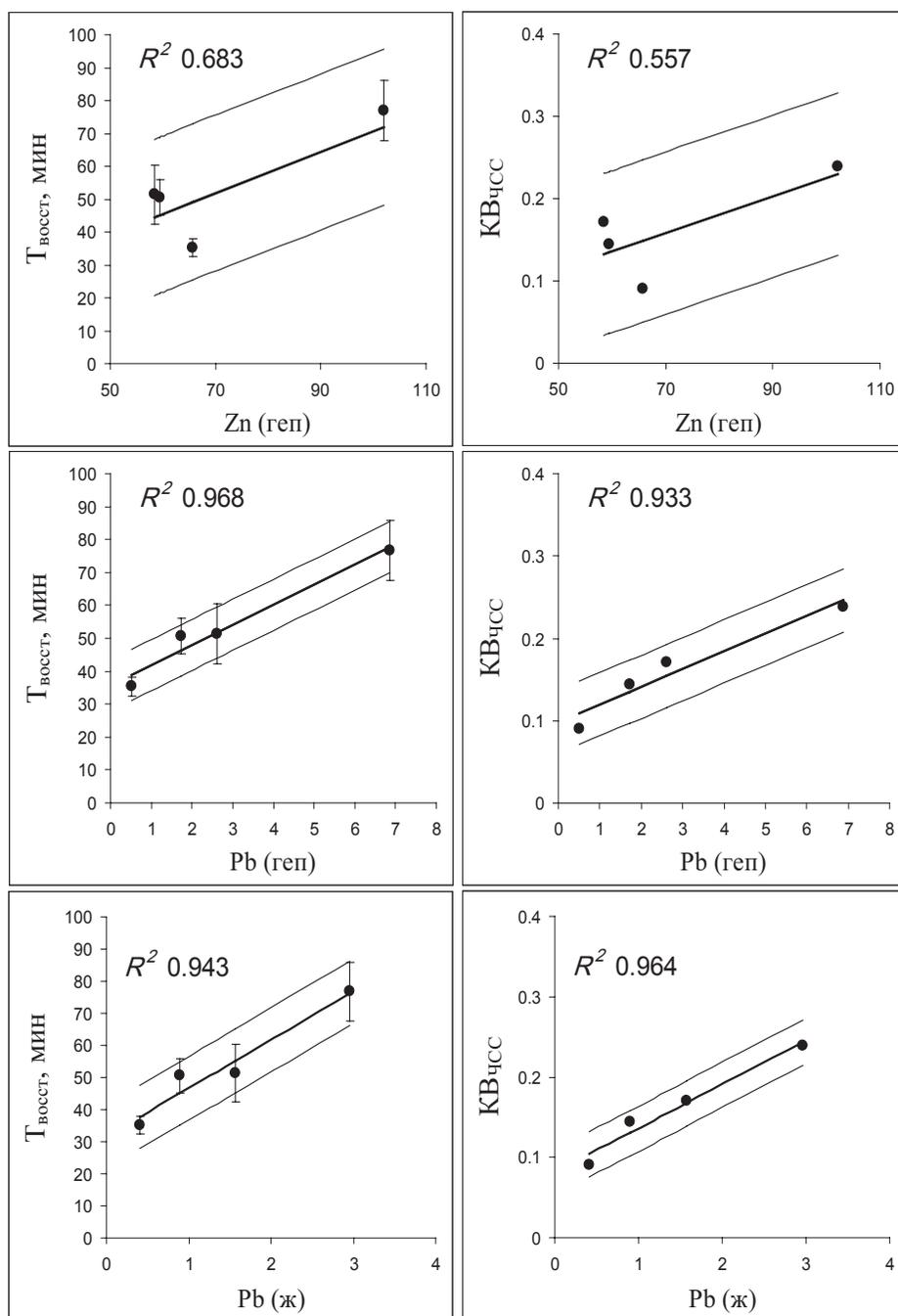


Рис. 6. Графики аппроксимаций для всех случаев положительных ( $> 0,4$ ) корреляций между содержанием ( $\text{мкг г}^{-1}$  влажной массы) Zn и Pb в тканях (гепатопанкреас, жабры), временем восстановления частоты сердечных сокращений ( $T_{\text{восст}}$ ) и коэффициентом вариации частоты сердечных сокращений ( $KB_{\text{чсс}}$ ). Данные для  $T_{\text{восст}}$  представлены как средние и их среднеквадратичные отклонения (СКО) — вертикальные линии — для каждой локации обследования

Fig. 6. Cases of significant positive dependence ( $R > 0.4$ ) of the recovery time of heart rate ( $T_{\text{восст}}$ ) and the heart rate variation ( $KB_{\text{чсс}}$ ) for mussels from 4 sites at Sevastopol on contents of Zn and Pb ( $\mu\text{g/g WW}$ ) in their hepatopancreas and gills ( $n = 4$ ). Means and standard deviations are presented for the recovery time of heart rate for each location

разы, могут превышать эти величины для референтных акваторий со слабой антропогенной нагрузкой. Последнее согласуется с общей закономерностью для биологических систем, что большинству природных популяций свойственен стандартный

уровень коэффициента вариации по любому признаку в пределах 4–7 % (Черепанов, 1986). Однако экстремальные факторы и неблагоприятные для биоты изменения состояния окружающей среды могут приводить к повышению изменчивости организмов внутри популяции, которые в количественном отношении можно оценивать с помощью коэффициента вариации. Например, ранее (Curtis et al., 2000; Кузнецова, 2013) указывалось, что вариабельность сердечного ритма — надежный показатель ранних стадий ухудшения функционального состояния организма под влиянием факторов различного происхождения, модальности и интенсивности. При величине коэффициента вариации до 10 % изменчивость оценивается как слабая, при 11–25 % — как средняя, при достижении значения более 25–30 % — трактуется как сильная. В частности, экспериментально наблюдалось (Viarengo et al., 2000; Kholodkevich et al., 2011; Kuznetsova, Kholodkevich, 2015), что для различных видов бентосных животных из условно чистых мест обитания коэффициент вариации различных биомаркеров находится в пределах 5–10 %, а из загрязненных районов — до 30–40 % (Kholodkevich et al., 2017).

Из полученных в настоящей работе данных (см. табл. 2) видно, что мидии из Казачьей бухты способны быстро, в среднем всего за 35 мин, восстанавливать «фоновый» уровень ЧСС, что указывает на их хорошее функциональное состояние. Этот вывод согласуется с аналогичным выводом из более ранних работ (Куфтаркова и др., 2008; Терещенко и др., 2014; Лазоренко, Пиркова, 2017), что экологическое состояние среды в бухте Казачьей наиболее благоприятно для жизнедеятельности черноморских мидий, а также с выводом А.Ф. Козинцева (2006), который Казачью бухту г. Севастополь по санитарно-гигиеническим нормам концентрации исследованных в мидиях тяжелых металлов отнес к перспективной акватории для создания марихозайств по культивированию моллюсков. Исходя из того положения, что условия обитания определяют состояние биоты, возможно использование этой бухты в качестве референтной при сравнительных оценках состояния экосистем прибрежных акваторий Севастополя.

Следует отметить, что наличие референтной акватории является важным базовым фактором, принципиально необходимым для развития и использования биологических методов оценки состояния экосистем акваторий данного региона. В частности, это открывает возможность использовать рекомендованный Европейской Водной Рамочной Директивой (ЕВРД) подход (Directive 2000/60/EC ([http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm))) к оценке экологического состояния всех водных объектов как отклонения от эталонных условий, измеряющегося с помощью показателя (коэффициента) экологического качества (Ecological Quality Ratio — EQR): отношения эталонного (фоновое) значения к наблюдаемому для разных групп биомаркеров загрязнения. Основной целью применения коэффициента EQR для классификации экологического статуса пресноводных или морских акваторий является обеспечение сопоставимости разных методов оценки, главным образом биологических. В этом подходе экологический статус — это безразмерная количественная оценка отклонения контролируемой водной экосистемы от ее естественного (фоновое, «нечтвенного») состояния. При этом значения EQR, близкие к единице, означают высокую степень сходства между наблюдаемыми и эталонными (фоновыми) условиями и, как следствие, хорошее экологическое состояние, а значения, близкие к нулю, — плохое. Согласно ЕВРД весь диапазон экологического состояния водного объекта, определенным образом зависящий от учета характера взаимосвязи между нагрузкой и воздействием на биоту, рекомендуется разделять на пять категорий качества: высокий, хороший, посредственный, плохой и очень плохой (Directive 2000/60/EC). На основании предварительного проведения ряда экспертных процедур, дифференцированно для разных типов водных экосистем, устанавливаются значения EQR, соответствующие определенному классу качества вод. В качестве примера в табл. 4 приведены используемые в ряде европейских стран, а также предлагаемые нами категории качества морских экосистем в соответствии с численными величинами EQR для биомаркеров  $T_{\text{востт.}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$ .

Таблица 4

Ранжирование экологического статуса экосистем акваторий в соответствии с принятыми в ряде стран ЕС (Directive 2000/60/EC) и предложенными нами градациями EQR для биомаркеров  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$  мидий Черного моря

Table 4

Classification for ecological status of aquatic ecosystems used in European Community (Directive 2000/60/EC) and determined for the coastal areas of the Black Sea with the proposed biomarkers (expressed as EQR)

Экологический статус	Дания	Норвегия	Испания	Великобритания	Наши предложения
Высокий	$\geq 0,80$	$\geq 0,83$	$\geq 0,83$	$\geq 0,80$	$\geq 0,80$
Хороший	0,60–0,80	0,72–0,83	0,62–0,83	0,64–0,80	0,60–0,80
Посредственный	0,40–0,60	0,60–0,72	0,41–0,62	0,43–0,65	0,40–0,60
Плохой	0,20–0,40	0,48–0,60	0,20–0,41	0,20–0,43	0,20–0,40
Очень плохой	$\leq 0,20$	$\leq 0,47$	$\leq 0,20$	$\leq 0,20$	$\leq 0,20$

Таким образом, если принять показатели референтной (чистой) акватории — Казачья бухта ( $T_{\text{восст}} = 37,1$  мин;  $KB_{\text{ЧСС}} = 12\%$ ) — и разделить это значение на значения  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$ , измеренные для всех других станций, то получим коэффициенты EQR, представленные в табл. 5 (в скобках приведены коэффициенты EQR для величин  $KB_{\text{ЧСС}}$ ). Эта процедура позволяет перейти к безразмерным относительным единицам в интегральной оценке биологических эффектов загрязнения исследованных акваторий, расставленных в табл. 5 в соответствии с предложенными нами в табл. 4 численными величинами EQR для мидий *M. galloprovincialis* из акваторий Черного моря.

Таблица 5

Ранжирование экологического статуса акваторий Севастополя на основе результатов тестирования мидий по показателям  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$ , представленным в виде EQR

Table 5

Ranking for ecological status of the bays of Sevastopol on results of testing with the mussel biomarkers, as the recovery time of heart rate ( $T_{\text{восст}}$ ) and the heart rate variation ( $KB_{\text{ЧСС}}$ )

Экологический статус	Показатели EQR	Казачья бухта	Карантинная бухта	Графская пристань	Кутовая часть Южной бухты
Высокий	$\geq 0,8$	1(1)			
Хороший	0,60–0,80		0,70 (0,64)	0,69 (0,53)	
Посредственный	0,40–0,60				0,46 (0,38)
Плохой	0,20–0,40				
Очень плохой	$\leq 0,20$				

*Примечание.* В скобках указаны значения  $KB_{\text{ЧСС}}$ , нормированные к 1 (к показателям в Казачьей бухте).

$T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$  мидий из Карантинной бухты и от причала Графской пристани близки (см. табл. 2), но достоверно отличаются от этих показателей и для Казачьей бухты (заметно больше), и для акватории оконечной, кутовой, части Южной бухты (заметно меньше). Величины  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$  для мидий из этих бухт характерны для слабо загрязненных акваторий (табл. 5), в то время как экологический статус акватории кутовой части Южной бухты следует отнести к посредственному, близкому к плохому.

Из данных по тяжелым металлам (см. табл. 3) видно, что в гепатопанкреасе мидий их содержание больше, чем в жабрах. Кроме того, у мидий из Графской пристани и из Кутовой части Южной бухты наблюдается также сравнительно высокое содержание Pb в жабрах, что, по-видимому, указывает на постоянное наличие этих загрязнений в воде данной акватории.

Оценка корреляционных отношений между физиологическими биомаркерами  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$  и содержанием тяжелых металлов в тканях мидий позволила установить однозначную связь только между уровнем содержания Pb во всех видах тканей и  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{ЧСС}}$  ( $R^2 > 0,9$ ). Все остальные металлы в тканях мидий не имели четких корреляционных отношений ( $R^2 < 0,4$ ) с  $T_{\text{восст}}$  или  $KB_{\text{ЧСС}}$ .

Контроль биомаркеров окислительного стресса в тканях моллюсков дал сходные результаты: установлена достоверная связь между содержанием Pb и антиоксидантным комплексом гепатопанкреаса мидий ( $R^2$  превышал 0,9); кутовая часть Южной бухты оказалась самой неблагоприятной из исследованных 4 акваторий Севастопольской бухты, так как тканевой уровень ТБК-АП и активность всех контролируемых ферментов антиоксидантного комплекса гепатопанкреаса моллюсков, собранных в данной акватории, оказались самыми высокими.

Токсический эффект свинца, увеличивающий уровень оксидативного стресса в тканях животных, хорошо известен (Roméo, Gnassia-Barelli, 1997; Viarengo et al., 2000; Трахтенберг и др., 2001). Он сопровождается ростом содержания продуктов перекисного окисления липидов в тканях. При этом действие на составляющие антиоксидантного ферментного комплекса дифференцировано, что в целом близко к результатам, полученным в настоящей работе.

Известно, что СОД и КАТ обычно функционируют во взаимосвязи (Меньщикова, Зенков, 1993; Солдатов и др., 2014). Для мидий наших акваторий такая связь не была обнаружена: рост активности КАТ не сопровождался увеличением активности СОД. Значения коэффициента детерминации ( $R^2$ ), рассчитанные для этих ферментов, не превышали 0,2. Аналогичные результаты получены нами ранее для данного вида моллюска при различных видах окислительных нагрузок (Солдатов и др., 2007, 2008, 2014). Такое соотношение активности ферментов свидетельствует об утилизации высоких концентраций гидроперекисей при участии КАТ, образование которых не было связано с реакцией дисмутации  $\text{O}_2^-$ , а определялось, скорее всего, величиной внешней токсической нагрузки. Доказательством этого явилась относительно высокая коррелятивная связь между КАТ и ГП. Значения  $R^2$  находились в пределах 0,5–0,6. ГП — фермент, обладающий высоким сродством к гидроперекисям, поэтому нейтрализует их лишь при низких концентрациях. При значительном повышении данного вида ПОЛ в ткани эта функция передается КАТ. Сопряжение этих процессов, по-видимому, и реализовалось в тканях (гепатопанкреасе) моллюска в условиях естественной среды с различным уровнем токсической нагрузки.

Известно, что изменение биомаркеров окислительного стресса достоверно коррелирует с повышением концентрации некоторых тяжелых металлов в органах моллюсков (Климова и др., 2017). Анализ корреляционных отношений позволяет прийти к заключению о том, что наибольший токсический эффект на моллюсков в исследованных акваториях оказывал именно свинец ( $R^2$  0,920). Определенные зависимости были также установлены между содержанием Cu и активностью КАТ ( $R^2$  0,467), уровнем Cd и активностью ГП ( $R^2$  0,419), содержанием Pb и ТБК-АП в гепатопанкреасе ( $R^2$  0,497), однако они были существенно ниже. В отношении же содержания солей Al, Ni, Zn и Sn в гепатопанкреасе моллюсков и состояния антиоксидантного ферментного комплекса связь вообще не выявлялась ( $R^2$  был менее 0,2).

### Заключение

Предложена новая методология сравнительной оценки экологического состояния прибрежных морских акваторий на основе показателей адаптивности кардиосистемы аборигенной мидии *M. galloprovincialis* к стандартизованной функциональной нагрузке — кратковременному изменению солености морской воды. Установлено, что время восстановления паттерна кардиоритма после нагрузочного теста отражает степень воздействия загрязнения 4 прибрежных акваторий Севастополя: бухт Казачьей, Карантинной и Южной вблизи ее выхода (у Графской пристани) и в ее кутовой оконечности — на функциональное состояние мидий и хорошо коррелирует с наличием некоторых тяжелых металлов в их тканях, а именно Pb. Проведенные параллельно на этих же животных биохимические исследования показателей окислительного стресса их гепатопанкреаса и жабр независимым способом подтвердили то, что наибольший токсический эффект на организм мидий исследованных акваторий Севастополя оказывает загрязнение тканей свинцом, а также то, что наиболее неблагоприятной акваторией является кутовая часть Южной бухты.

Полученные данные по оценке функционального состояния особей *M. galloprovincialis*, собранных в разных по антропогенной нагрузке акваториях г. Севастополь, дают возможность сравнительной оценки качества их поверхностных вод как среды обитания гидробионтов. Для оценки экологического статуса прибрежных морских акваторий можно использовать рекомендованный ЕВРД ЕС показатель относительно-экологического качества EQR для биомаркеров кардиоактивности —  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{чсс}}$ , численные значения которых впервые предложены в настоящей работе (см. табл. 4).

Использованные в работе физиологические показатели — время восстановления сердечного ритма и оценка вариабельности ритма мидий — могут количественно вычисляться из данных достаточно несложного для практической реализации физиологического метода тестирования животных в течение всего нескольких часов. Напротив, анализ тканей мидий, как биохимическими, так и химическими методами, требует участия высококвалифицированного персонала и наличия сложного и дорогостоящего аналитического оборудования. К настоящему времени использованный в работе подход прошел успешную апробацию на пресноводных (восточная часть Финского залива), солоноватых (Финский и Ботнический заливы, Датские проливы Балтийского моря) (Kuznetsova et al., 2018) и в 4 морских прибрежных акваториях г. Севастополь. По-видимому, можно ожидать, что данный подход окажется полезным для оценок экологического состояния прибрежных акваторий и других морей. Предложенные нами численные значения EQR для  $T_{\text{восст}}$  и  $KB_{\text{чсс}}$  основаны преимущественно на данных наших исследований, проведенных на мидии *M. galloprovincialis* из акваторий Черного и Адриатического морей.

Следует отметить, что численные значения EQR, являясь относительной величиной, могут различаться для разных видов загрязнений, а также разных биотопов, поэтому для других морей и других видов животных их можно рассматривать лишь в качестве ориентиров.

Таким образом, предлагаемый авторами новый методологический подход оценки состояния прибрежных акваторий является экспрессным и экономически эффективным, что указывает, на наш взгляд, на целесообразность разработки на его основе методического руководства, которое создаст правовую основу использования соответствующей методики при проведении восстановительных (ремедиационных) действий со стороны природоохранных ведомств и муниципалитетов для поддержания устойчивого функционирования экосистем прибрежных морских акваторий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 18-44-920010 p\_a «Оценка рекреационного потенциала акваторий Севастопольского региона методами биоиндикации».*

### Список литературы

- Алемасова А.С., Рокун А.Н., Шевчук И.А. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия : учеб. пособие. — Донецк, 2003. — 327 с.
- Баевский Р.М., Берсенева А.П. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний : моногр. — М. : Медицина, 1997. — 234 с.
- Будько Д.Ф., Демина Л.Л., Мартынова Д.М., Горшкова О.М. Микроэлементы в различных трофических группах беломорских организмов // Океанол. — 2015. — Т. 55, № 5. — С. 808–820. DOI: 10.7868/S0030157415050032.
- Гириин С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лаб. диагностика. — 1999. — № 4. — С. 45–46.
- Губанов В.И., Копытов Ю.П., Бобко Н.И. Оценка состояния загрязнения донных осадков тяжелыми металлами в прибрежных районах Крыма (Черное море) // Мор. экол. журн. — 2010. — Т. 9, № 4. — С. 38–47.
- Игнатъева О.Г., Овсяный Е.И., Романов А.С. Загрязнение седиментов Севастопольской бухты тяжелыми металлами // Геополитика и экогеодинамика регионов. — Симферополь : ТНУ, 2005. — Т. 1, вып. 1. — С. 92–95.
- Климова Я.С., Чуйко Г.М., Гапеева М.В., Песня Д.С. Использование показателей окислительного стресса двустворчатых пресноводных моллюсков *Dreissena polymorpha* (Pallas,

1771) как биомаркеров для оценки воздействия хронического антропогенного загрязнения различных участков Рыбинского водохранилища // Сибир. экол. журн. — 2017. — Т. 24, № 2. — С. 210–217. DOI: 10.15372/SEJ20170210.

**Козинцев А.Ф.** Сезонная динамика содержания тяжелых металлов в мидии (*Mytilus galloprovincialis*) из бухты Казачья Черного моря // Мор. экол. журн. — 2006. — Т. 5, № 4. — С. 41–47.

**Кузнецова Т.В.** Изменение солености среды как функциональная нагрузка при оценке физиологического состояния рака *Astacus leptodactylus* // Журн. эвол. биохим. и физиол. — 2013. — Т. 49, № 5. — С. 348–351.

**Кузнецова Т.В., Сладкова Г.В., Холодкевич С.В.** Оценка функционального состояния раков *Pontastacus leptodactylus* в нормальной и токсической среде по характеристикам их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Журн. эвол. биохим. и физиол. — 2010. — Т. 46, № 3. — Р. 203–210.

**Куфтаркова Е.А., Родионова Н.Ю., Губанов В.И., Бобко Н.И.** Гидрохимическая характеристика отдельных бухт Севастопольского взморья // Тр. ЮгНИРО. — 2008. — Т. 46. — С. 110–117.

**Лазоренко Г.Е., Пиркова А.В.** Индикация экологического состояния черноморских мидий и среды их обитания с использованием природного радионуклида полония-210 // Журн. Сибир. федер. ун-та. Биология. — 2017. — Т. 10, № 1. — С. 59–73. DOI: 10.17516/1997-1389-0008.

**Лукьянова О.Н., Корчагин В.П.** Интегральный биохимический индекс состояния водных организмов в условиях загрязнения // Изв. РАН. Сер. биол. — 2017. — № 2. — С. 174–180. DOI: 10.7868/S0002332917020114.

**Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.** Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Усп. совр. биол. — 1993. — Т. 113, вып. 4. — С. 442–455.

**Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алемов С.В.** Экологическая характеристика бухты Казачьей (Черное море) // Экол. моря. — 2002. — Вып. 61. — С. 85–89.

**Овсяный Е.И., Романов А.С., Игнатъева О.Г.** Распределение тяжелых металлов в поверхностном слое донных осадков Севастопольской бухты (Черное море) // Мор. экол. журн. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 85–93.

**Пат. РФ № 2308720** Способ биологического мониторинга окружающей среды (варианты) и система для его осуществления / С.В. Холодкевич, А.В. Иванов, Е.Л. Корниенко, А.С. Куракин. — Заявлено 20.06.2006; Опубликовано. 20.10.2007, Бюл. № 29.

**Переслегина И.А.** Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 20–23.

**Подгурская О.В., Кавун В.Я., Лукьянова О.Н.** Аккумуляция и распределение тяжелых металлов в органах мидии *Crenomytilus grayanus* из районов апеллингов Охотского и Японского морей // Биол. моря. — 2004. — Т. 30, № 3. — С. 219–226.

**Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В.** Антиоксидантный ферментный комплекс тканей двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в норме и условиях окислительного стресса (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2007. — Т. 43, № 5. — С. 621–628.

**Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В.** Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Журн. эвол. биохим. и физиол. — 2008. — Т. 44, № 2. — С. 150–155.

**Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В.** Функциональные состояния антиоксидантного ферментного комплекса тканей *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях окислительного стресса // Журн. эвол. биохим. и физиол. — 2014. — Т. 50, № 3. — С. 183–189.

**Терещенко Н.Н., Лазоренко Г.Е., Мирзоева Н.Ю. и др.** Радиохемоэкологическое состояние бухты Казачья (Черное море) в отношении токсических металлов Hg, <sup>90</sup>Sr, <sup>238,239,240</sup>Pu и <sup>210</sup>Po // Мор. экол. журн. — 2014. — Т. 13, № 3. — С. 59–74.

**Трахтенберг И.М., Короленко Т.К., Утко Н.А., Мурадян Х.К.** Свинец и окислительный стресс // Соврем. пробл. токсикол. — 2001. — № 4. — С. 50–53.

**Трусевич В.В., Гайский П.В., Кузьмин К.А., Мишуров В.Ж.** Биомаркеры поведенческих реакций черноморской мидии для автоматизированного биомониторинга экологического состояния водной среды // Системы контроля окружающей среды. — Севастополь : ИПТС, 2015. — Вып. 1(21). — С. 13–18.

**Трусевич В.В., Столбов А.Я., Вялова О.Ю. и др.** Особенности метаболизма черноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) из различных биотопов Карадагского заповедника // Мор. экол. журн. — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 79–86.

**Федотов В.П., Холодкевич С.В., Строчило А.Г.** Изучение сократительной активности сердца раков с помощью нового неинвазивного метода // Журн. эвол. биохим. и физиол. — 2000. — Т. 36, № 3. — С. 219–222.

- Фролов В.М.** Уровни функционирования физиологических систем и методы их определения : моногр. — Л. : Медицина, 1972. — 176 с.
- Холодкевич С.В., Иванов А.В., Трусевич В.В., Кузнецова Т.В.** Экотоксикологический биомаркер для биоиндикации состояния водных экосистем на основе оценки адаптационной способности обитающих в них двустворчатых моллюсков // Доп. НАН України. — 2012. — № 6. — С. 138–142.
- Холодкевич С.В., Кузнецова Т.В., Трусевич В.В. и др.** Особенности движения створок и кардиоактивности двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* при различных стрессовых воздействиях // Журн. эвол. биохим. и физиол. — 2009. — Т. 45, № 4. — С. 432–434.
- Холодкевич С.В., Шаров А.Н., Кузнецова Т.В.** Перспективы и проблемы использования биоэлектронных систем в мониторинге состояния экологической безопасности акваторий Финского залива // Регион. экология. — 2015. — № 2(37). — С. 16–26.
- Черепанов В.В.** Эволюционная изменчивость водных и наземных животных : моногр. — Новосибирск : Наука, 1986. — 237 с.
- Чуйко Г.М.** Биомаркеры в гидроэкотоксикологии: принципы, методы и методология, практика использования. Гл. 15 // Экологический мониторинг. Ч. 8. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем : учеб. пособие. — Нижний Новгород : Нижегород. госун-т, 2014. — С. 310–326.
- Bakhmet I.N., Fokina N.N., Nefedova Z.A., Nemova N.N.** Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination // Environ. Monit. Assess. — 2009. — Vol. 155, № 1–4. — P. 581–591. DOI: 10.1007/s10661-008-0457-5.
- Bamber S.D., Depledge M.H.** Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments // Mar. Biol. — 1997. — Vol. 129, Iss. 4. — P. 667–672.
- Beliaeff B., Burgeot T.** Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment // Environ. Toxicol. Chem. — 2002. — Vol. 2, № 6. — P. 1316–1322.
- Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress** / eds R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle, H.L. Bergman. — Boca Raton : Lewis Publishers, 1992. — 347 p.
- Bloxham M.J., Worsfold P.J., Depledge M.H.** Integrative biological and chemical monitoring: in situ physiological responses of freshwater crayfish to fluctuations in environmental ammonia concentrations // Ecotoxicology. — 1999. — Vol. 8, № 3. — P. 225–237.
- Borcherding J.** Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring // Hydrobiologia. — 2006. — Vol. 556, № 1. — P. 417–426.
- Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D. et al.** Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers // Aquat. Toxicol. — 2004. — Vol. 66(3). — P. 267–278.
- Curtis T.M., Williamson R., Depledge M.H.** Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper // Mar. Biol. — 2000. — Vol. 136, Iss. 5. — P. 837–846.
- Davies I.M. and Vethaak A.D.** Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects : ICES Cooperative Research Report. — 2012. — № 315. — 277 p.
- Depledge M.H., Aagaard A., Györkös P.** Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers // Mar. Pollut. Bull. — 1995. — Vol. 31, Iss. 1–3. — P. 19–27.
- Depledge M.H., Andersen B.B.** A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. — 1990. — Vol. 96, Iss. 4. — P. 473–477. DOI: 10.1016/0300-9629(90)90664-E.
- Depledge M.H., Fossi M.C.** The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates // Ecotoxicol. — 1994. — Vol. 3, Iss. 3. — P. 161–172. DOI: 10.1007/BF00117081.
- Depledge M.H., Galloway T.S.** Healthy animals, healthy ecosystems // Frontiers in Ecology and the Environment. — 2005. — Vol. 3(5). — P. 251–258. DOI: 10.2307/3868487.
- Fokina N.N., Ruokolainen T.R., Nemova N.N., Bakhmet I.N.** Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. composition under cadmium and copper toxic effect // Biol. Trace Elem. Res. — 2013. — Vol. 154, № 2. — P. 217–225. DOI: 10.1007/s12011-013-9727-3.
- Handy R.D., Galloway T.S., Depledge M.H.** A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology // Ecotoxicol. — 2003. — Vol. 12, Iss. 1–4. — P. 331–343.
- Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kornienko E.L., Kurakin A.S.** Method of biological environment monitoring (versions) and a system for realization thereof : US Pat. № 8442809. — 05.14.2013.

**Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S. et al.** Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations // J. of Environmental Bioindicators. — 2008. — Vol. 3, Iss. 1. — P. 23–34.

**Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Lehtonen K.K., Kurakin A.S.** Experiences on ecological status assessment of the Gulf of Bothnia different sites based on cardiac activity biomarkers of caged mussels (*Mytilus edulis*): ICES Annual Science Conference 2011. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2011/R/R2011.pdf>, 12 p.

**Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Sharov A.N. et al.** Applicability of a bioelectronic cardiac monitoring system for the detection of biological effects of pollution in bioindicator species in the Gulf of Finland // J. Mar. Syst. — 2017. — Vol. 171. — P. 151–158. DOI: 10.1016/j.jmarsys.2016.12.005.

**Kopecka J., Lehtonen K.K., Baršiene J. et al.** Measurements of biomarker levels in the flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic) // Mar. Pollut. Bull. — 2006. — Vol. 53, Iss. 8–9. — P. 406–421. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2006.03.008.

**Kramer K.J.M., Foekema E.M.** The «Musselmonitor<sup>®</sup>» as biological early warning system — the first decade // Biomonitoring and biomarkers as Indicators of Environmental Change 2 / eds. F.M. Butterworth, M.E. Gensebatt-Bonaparte, A. Gunatilaka. — N.Y. : Kluwer Academic and Plenum Publishers, 2000. — P. 59–87.

**Kuznetsova T.V., Kholodkevich S.V.** Comparative assessment of surface water quality through evaluation of physiological state of bioindicator species: Searching a new biomarkers // 4rd Mediterranean Conference on Embedded Computing. — Budva ; Montenegro, 2015. — P. 339–344.

**Kuznetsova T.V., Kholodkevich S.V., Kurakin A.S.** Experience on ecological status assessment based on adaptive potential diagnostics in selected invertebrates of the Baltic Sea sub-regions (in English) // Фундаментальная и прикладная гидрофизика. — 2018. — Т. 11, № 2. — С. 75–85. DOI: 10.7868/S2073667318020065.

**Lehtonen K.K., Sundelin B., Lang T., Strand J.** Development of tools for integrated monitoring and assessment of hazardous substances and their biological effects in the Baltic Sea // AMBIO. — 2014. — Vol. 43, № 1. — P. 69–81. DOI: 10.1007/s13280-013-0478-3.

**Lloret J., Shulman G., Love R.M.** Conditions and health indicators of exploited marine fishes. — Wiley Blackwell, 2014. — 262 p.

**Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.

**Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. — 1979. — Vol. 95, № 2. — P. 351–358. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.

**Rodriguez-Ortega M.J., Alhama J., Funes V. et al.** Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral // Environ. Toxicol. Chem. — 2002. — Vol. 21, № 3. — P. 542–549. DOI: 10.1002/etc.5620210311.

**Roméo M., Frasila C., Gnassia-Barelli M. et al.** Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis* // Water Res. — 2005. — Vol. 39, Iss. 4. — P. 596–604.

**Roméo M., Gnassia-Barelli M.** Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* // Comp. Biochem. Physiol. — 1997. — Vol. 118, Iss. 1. — P. 33–37. DOI: 10.1016/S0742-8413(97)00079-0.

**Sheehan D., McIntosh J., Power A., Fitzpatrick P.J.** Environmental biochemistry // Biochem. Soc. Trans. — 1995. — Vol. 23. — P. 419–422.

**Stankovic S., Jovic M., Milanov R., Joksimovic D.** Trace elements concentrations (Zn, Cu, Pb, Cd, As and Hg) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and evaluation of mussel quality and possible human health risk from cultivated and wild sites of the southeastern Adriatic Sea, Montenegro // J. Serb. Chem. Soc.. — 2011. — Vol. 76, № 12. — P. 1725–1737. DOI: 10.2298/JSC110420095S.

**Turja R., Höher N., Snoeijs P. et al.** A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*) // Sci. Total Environ. — 2014. — Vol. 473–474. — P. 398–409. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.038.

**Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I.** Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview // Cell. Mol. Biol. — 2000. — Vol. 46, № 2. — P. 407–417.

## References

**Alemasova, A.S., Rokun, A.N., and Shevchuk, I.A.,** *Analiticheskaya atomno-absorbtsionnaya spektroskopiya* (Analytical Atomic Absorption Spectroscopy), Donetsk: Donetsk. Nats. Univ., 2003.

**Baevsky, R.M. and Berseneva, A.P.**, *Otsenka adaptatsionnykh vozmozhnostei organizma i risk razvitiya zabolevanii* (Assessment of Adaptive Capabilities of Organism and the Risk of Progression of Diseases), Moscow: Meditsina, 1997.

**Budko, D.F., Demina, L.L., Martynova, D.M., and Gorshkova, O.M.**, Trace elements in organisms of different trophic groups in the White Sea, *Oceanology*, 2015, vol. 55, no. 5, pp. 730–741. doi 10.1134/S0001437015050021

**Girin, S.V.**, Modification of the method for determination of catalase activity in biological substrates, *Lab. Diagn.*, 1999, no. 4, pp. 45–46.

**Gubanov, V.I., Kopytov, Y.P., and Bobko, N.I.**, Assessment of bottom sediments in Crimea coastal regions pollution by heavy metals, *Morsk. Ekol. Zh.*, 2010, vol. 9, no. 4, pp. 38–47.

**Igatieva, O.G., Ovsyani, E.I., and Romanov, A.S.**, Heavy metal pollution of sediments in Sebastopol bay, in *Geopolitika i ekogeodinamika regionov* (Geopolitics and Ecogeodynamics of Regions), Simferopol: Tavricheskii Nats. Univ., 2005, vol. 1, no. 1, pp. 92–95.

**Klimova, Y.S., Chuiko, G.M., Gapeeva, M.V., and Pesnya, D.S.**, The use of biomarkers of oxidative stress in zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) for chronic anthropogenic pollution assessment of the Rybinsk Reservoir, *Contemp. Probl. Ecol.*, 2017, vol. 24, no. 2, pp. 178–183. doi 10.1134/S199542551702007X

**Kozintsev, A.F.**, Season dynamics of the heavy metals contents in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Kazachjya Bay (the Black Sea), *Morsk. Ekol. Zh.*, 2006, vol. 5, no. 4, pp. 41–47.

**Kuznetsova, T.V.**, Change of salinity of medium as a function loading in estimating functional state of the crayfish *Astacus leptodactylus*, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2013, vol. 49, n. 5, pp. 498–502.

**Kuznetsova, T.V., Sladkova, S.V., and Kholodkevich, S.V.**, Evaluation of functional state of crayfish *Pontastacus leptodactylus* in normal and toxic environment by characteristics of their cardiac activity and hemolymph biochemical parameters, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 241–250.

**Kuftarkova, E.A., Rodionova, N.Yu., Gubanov, V.I., and Bobko, N.I.**, Hydrochemical characteristics of several bays of Sevastopol coast, *Tr. Yuzhn. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 2008, vol. 46, pp. 110–117.

**Lazorenko, G.E. and Pirkova, A.V.**, Indication of ecological condition of the Black sea mussels and their habitat using natural radionuclide polonium-210, *J. Sib. Fed. Univ., Biol.*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 59–73. doi 10.17516/1997-1389-0008

**Luk'yanova, O.N. and Korchagin, V.P.**, Integral biochemical index of the state of aquatic organisms under polluted conditions, *Biol. Bull. (Moscow)*, 2017, vol. 44, no. 2, pp. 203–209. doi 10.1134/S106235901702011X

**Men'shchikova, E.B. and Zenkov, N.K.**, Antioxidants and inhibitors of radical oxidation processes, *Usp. Sovrem. Biol.*, 1993, vol. 113, no. 4, pp. 442–455.

**Mironov, O.G., Kirukhina, L.N., and Alyomov, S.V.**, Ecological characteristic of Kazachya Bay (the Black Sea), *Ekol. Morya*, 2002, vol. 61, pp. 85–89.

**Ovsyani, E.I., Romanov, A.S., and Ignatieva, O.G.**, Distribution of heavy metals in superficial layer of bottom sediments of Sevastopol Bay (the Black Sea), *Morsk. Ekol. Zh.*, 2003, vol. 2, no. 2, pp. 85–93.

**Kholodkevich, S.V., Ivanov, A.V., Kornienko, E.L., and Kurakin, A.S.**, RF Patent no. 2308720, Method for biological monitoring the environment (variants) and a system for its implementation, *Byul.*, 2007, no. 29.

**Pereslegina, I.A.**, Activity of antioxidant enzymes of saliva in healthy children, *Lab. Delo*, 1989, no. 11, pp. 20–23.

**Podgurskaya, O.V., Kavun, V.Ya., and Lukyanova, O.N.** Heavy metal accumulation and distribution in organs of the mussel *Crenomytilus grayanus* from upwelling areas of the Sea of Okhotsk and the Sea of Japan, *Russ. J. Mar. Biol.*, 2004, vol. 30, no. 3, pp. 188–195.

**Soldatov, A.A., Gostyukhina, O.L., and Golovina, I.V.**, Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: A review, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007, vol. 43, no. 5, pp. 556–562.

**Soldatov, A.A., Gostyukhina, O.L., and Golovina, I.V.**, State of the antioxidant enzyme complex of tissues of the Black Sea mollusc *Mytilus galloprovincialis* under natural oxidative stress, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2008, vol. 44, art. ID 175. doi 10.1134/S0022093008020047

**Soldatov, A.A., Gostyukhina, O.L., and Golovina, I.V.**, Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2014, vol. 50, no. 3, pp. 206–214.

**Tereshchenko, N.N., Lazorenko, G.E., Mirzoyeva, N.Yu., Egorov, V.N., and Plotitsyna, O.V.**, Radio-chemoecological state of the Kazachja Bay (the Black Sea) in respect of toxic metals Hg, <sup>90</sup>Sr, <sup>238,239,240</sup>Pu and <sup>210</sup>Po, *Morsk. Ekol. Zh.*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 59–74.

**Trakhtenberg, I.M., Korolenko, T.K., Utko, N.A., and Muradyan, Kh.K.**, Lead and oxidative stress, *Sovrem. Probl. Toksikol.*, 2001, no. 4, pp. 50–53.

**Trusevich, V.V., Gaisky, P.V., Kuz'min, K.A., and Mishurov, V.Zh.**, Biomarkers of behavioral responses of the Black Sea mussel for the automated biomonitoring the ecological condition of the aquatic environment, in *Sistemy kontrolya okruzhayushchei sredy* (Environmental Monitoring Systems), Sevastopol: Inst. Prirodno-Tekh. Sist., 2015, vol. 1, no. 21, pp. 13–18.

**Trusevich, V.V., Stolbov, A.Y., Vyalova, O.Yu., Kondrat'eva, T.P., Morozova, A.L., and Shulman G.E.**, Features of metabolism of the Black Sea mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) from the different biotopes of the Karadag reserve, *Morsk. Ekol. Zh.*, 2004, vol. 3, no. 1, pp. 79–86.

**Fedotov, V.P., Kholodkevich, S.V., and Strochilo, A.G.**, Study of contractile activity of the crayfish heart with the aid of a new non-invasive technique, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2000, vol. 36, no. 3, pp. 288–293.

**Frolov, V.M.**, *Urovni funktsionirovaniya fiziologicheskikh sistem i metody ikh opredeleniya* (The Levels of Functioning of Physiological Systems and the Methods to Measure Them), Leningrad: Meditsina, 1972.

**Kholodkevich, S.V., Ivanov, A.V., Trusevich, V.V., and Kuznetsova, T.V.**, Ecotoxicological biomarker for bioindication of the condition of aquatic ecosystems based on assessment of the adaptive capacity of bivalves inhabiting them, *Dopov. Nats. Akad. Nauk Ukr.*, 2012, no. 6, pp. 138–142.

**Kholodkevich, S.V., Kuznetsova, T.V., Trusevich, V.V., Kurakin, A.S., and Ivanov, A.V.**, Peculiarities of valve movement and of cardiac activity of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* at various stress actions, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2009, vol. 45, art. ID 524. doi 10.1134/S0022093009040100

**Kholodkevich, S.V., Sharov, A.N., and Kuznetsova, T.V.**, Perspectives and problems of application of bioelectronic systems for monitoring of environmental safety state in the Gulf of Finland aquatoria, *Region. Ekol.*, 2015, no. 2(37), pp. 16–26.

**Cherepanov, V.V.**, *Evolutsionnaya izmenchivost' vodnykh i nazemnykh zhitovnykh* (Evolutionary Variability of Aquatic and Terrestrial Animals), Novosibirsk: Nauka, 1986.

**Chuiko, G.M.**, Biomarkers in hydroecotoxicology: The principles, the techniques and methodology, and the practice of use, in *Ekologicheskii monitoring. Ch. 8. Sovremennyye problemy monitoringa presnovodnykh ekosistem* (Ecological Monitoring, part 8: Modern Problems of Monitoring Freshwater Ecosystems), Nizhny Novgorod: Nizhegorod. Gos. Univ., 2014, ch. 15, pp. 310–326.

**Bakhmet, I.N., Fokina, N.N., Nefedova, Z.A., and Nemova, N.N.**, Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination, *Environ. Monit. Assess.*, 2009, vol. 155, no. 1–4, pp. 581–591. doi 10.1007/s10661-008-0457-5

**Bamber, S.D. and Depledge, M.H.**, Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments, *Mar. Biol.*, 1997, vol. 129, no. 4, pp. 667–672.

**Beliaeff, B. and Burgeot, T.**, Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2002, vol. 2, no. 6, pp. 1316–1322.

**Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., eds., Boca Raton, Fla.: Lewis, 1992.

**Bloxham, M.J., Worsfold, P.J., and Depledge, M.H.**, Integrative biological and chemical monitoring: in situ physiological responses of freshwater crayfish to fluctuations in environmental ammonia concentrations, *Ecotoxicology*, 1999, vol. 8, no. 3, pp. 225–237.

**Borcherding, J.**, Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring, *Hydrobiologia*, 2006, vol. 556, no. 1, pp. 417–426.

**Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., and Depledge, M.H.**, Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers, *Aquat. Toxicol.*, 2004, vol. 66, no. 3, pp. 267–278.

**Curtis, T.M., Williamson, R., and Depledge, M.H.**, Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper, *Mar. Biol.*, 2000, vol. 136, no. 5, pp. 837–846.

**Davies, I.M. and Vethaak, A.D.**, Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects, *ICES Coop. Res. Rep.*, 2012, no. 315.

**Depledge, M.H., Aagaard, A., and Györkös, P.**, Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers, *Mar. Pollut. Bull.*, 1995, vol. 31, nos. 1–3, pp. 19–27.

**Depledge, M.H. and Andersen, B.B.**, A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990, vol. 96, no. 4, pp. 473–477. doi 10.1016/0300-9629(90)90664-E

**Depledge, M.H. and Fossi, M.C.**, The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates, *Ecotoxicology*, 1994, vol. 3, no. 3, pp. 161–172. doi 10.1007/BF00117081

**Depledge, M.H. and Galloway, T.S.**, Healthy animals, healthy ecosystems, *Front. Ecol. Environ.*, 2005, vol. 3, no. 5, pp. 251–258. doi 10.2307/3868487

**Fokina, N.N., Ruokolainen, T.R., Nemova, N.N., and Bakhmet, I.N.**, Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. composition under cadmium and copper toxic effect, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2013, vol. 154, no. 2, pp. 217–225. doi 10.1007/s12011-013-9727-3

**Handy, R.D., Galloway, T.S., and Depledge, M.H.**, A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology, *Ecotoxicology*, 2003, vol. 12, nos. 1–4, pp. 331–343.

**Kholodkevich, S.V., Ivanov, A.V., Kornienko, E.L., and Kurakin, A.S.**, US Patent 8442809, Method of biological environment monitoring (versions) and a system for realization thereof, 2013.

**Kholodkevich, S.V., Ivanov, A.V., Kurakin, A.S., Kornienko, E.L., and Fedotov, V.P.**, Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations, *Environ. Bioindic.*, 2008, vol. 3, no. 1, pp. 23–34.

**Kholodkevich, S.V., Kuznetsova, T.V., Lehtonen, K.K., and Kurakin, A.S.** Experiences on ecological status assessment of the Gulf of Bothnia different sites based on cardiac activity biomarkers of caged mussels (*Mytilus edulis*), *ICES Annu. Sci. Conf.*, 2011. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2011/R/R2011.pdf>. Accessed April 12, 2017.

**Kholodkevich, S.V., Kuznetsova, T.V., Sharov, A.N., Kurakin, A.S., Lips, U., Kolesova, N., and Lehtonen, K.K.**, Applicability of a bioelectronic cardiac monitoring system for the detection of biological effects of pollution in bioindicator species in the Gulf of Finland, *J. Mar. Syst.*, 2017, vol. 171, pp. 151–158. doi 10.1016/j.jmarsys.2016.12.005

**Kopecka, J., Lehtonen, K.K., Baršiene, J., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Gercken, J., and Pempkowiak, J.**, Measurements of biomarker levels in the flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic), *Mar. Pollut. Bull.*, 2006, vol. 53, nos. 8–9, pp. 406–421. doi 10.1016/j.marpolbul.2006.03.008

**Kramer, K.J.M. and Foekema, E.M.**, The “Musselmonitor<sup>®</sup>” as biological early warning system—the first decade, *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*, Butterworth, F.M., Gonsebatt-Bonaparte, M.E., and Gunatilaka, A., eds., New York: Kluwer Academic and Plenum Publishers, 2000, pp. 59–87.

**Kuznetsova, T.V. and Kholodkevich, S.V.**, Comparative assessment of surface water quality through evaluation of physiological state of bioindicator species: Searching a new biomarkers, 4<sup>th</sup> Mediterr. Conf. Embedded Comput., Budva, Montenegro, 2015, pp. 339–344.

**Kuznetsova, T.V., Kholodkevich, S.V., and Kurakin, A.S.**, Experience on ecological status assessment based on adaptive potential diagnostics in selected invertebrates of the Baltic Sea sub-regions, *Fundam. Prikl. Gidrofiz.*, 2018, vol. 11, no. 2, pp. 75–85. doi 10.7868/S2073667318020065

**Lehtonen, K.K., Sundelin, B., Lang, T., and Strand, J.**, Development of tools for integrated monitoring and assessment of hazardous substances and their biological effects in the Baltic Sea, *Ambio*, 2014, vol. 43, no. 1, pp. 69–81. doi 10.1007/s13280-013-0478-3

**Lloret, J., Shulman, G., and Love, R.M.**, *Conditions and Health Indicators of Exploited Marine Fishes*, West Sussex, UK: Wiley, 2014.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.**, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.

**Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K.**, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 95, no. 2, pp. 351–358. doi 10.1016/0003-2697(79)90738-3

**Rodríguez-Ortega, M.J., Alhama, J., Funes, V., Romero-Ruiz, A., Rodríguez-Ariza, A., and López-Barea, J.**, Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2002, vol. 21, no. 3, pp. 542–549. doi 10.1002/etc.5620210311

**Roméo, M., Frasila, C., Gnassia-Barelli, M., Damiens, G., Micu, D., and Mustata, G.**, Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*, *Water Res.*, 2005, vol. 39, no. 4, pp. 596–604.

**Roméo, M. and Gnassia-Barelli, M.**, Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussates*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, vol. 118, no. 1, pp. 33–37. doi 10.1016/S0742-8413(97)00079-0

**Sheehan, D., McIntosh, J., Power, A., and Fitzpatrick, P.J.**, Environmental biochemistry, *Biochem. Soc. Trans.*, 1995, vol. 23, pp. 419–422.

**Stankovic, S., Jovic, M., Milanov, R., and Joksimovic, D.**, Trace elements concentrations (Zn, Cu, Pb, Cd, As and Hg) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and evaluation of mussel quality and possible human health risk from cultivated and wild sites of the southeastern Adriatic Sea, Montenegro, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2011, vol. 76, no. 12, pp. 1725–1737. doi 10.2298/JSC110420095S

**Turja, R., Höher, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Kuznetsova, T., Kholodkevich, S.V., Devier, M.-H., Budzinski, H., and Lehtonen, K.K.**, A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*), *Sci. Total Environ.*, 2014, vol. 473–474, pp. 398–409. doi 10.1016/j.scitotenv.2013.12.038

**Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., and Panfili, I.**, Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview, *Cell. Mol. Biol.*, 2000, vol. 46, no. 2, pp. 407–417.

**Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC)**, 19–23 March 2007, Alessandria, Italy: ICES, 2007, no. CM 2007/MHC:03.

*Поступила в редакцию 27.06.18 г.*

*Принята в печать 13.07.18 г.*