ПРИМЕНЕНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В МОНИТОРИНГЕ ПРИБРЕЖНОЙ АКВАТОРИИ СЕВАСТОПОЛЯ (ЧЕРНОЕ МОРЕ)

О.В. Машукова¹, Е.Н. Скуратовская¹, Ю.Б. Шилова²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН" (ФГБУН ИМБИ)

РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

E-mail: olgamashukova@yandex.ru

²Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного образования г. Севастополя "Малая академия наук города Севастополя"

РФ, Севастополь, пр. Генерала Острякова, 163

E-mail: julia.shilova01@gmail.com

Приведены примеры использования современных биофизических и биохимических методов в мониторинге прибрежной акватории Севастополя. Показано несомненное их преимущество в сравнении с другими методами в точности, объективности и оперативности получаемой информации. Биофизические методы более показательны при изучении состояния и продуктивности планктонных сообществ различной размерной структуры. Биохимические методы позволяют наблюдать нарушения на самых ранних этапах повреждения. Их применение в экологическом мониторинге прибрежных акваторий целесообразно при исследовании донных организмов. Представленные материалы свидетельствуют о том, что выбор биоиндикаторных видов и используемых методов в оценке состояния морских экосистем определяется задачами мониторинга и средой исследования.

Ключевые слова: экологический мониторинг, биолюминесценция, биоиндикация, биохимические маркеры, морская биота.

Поступила в редакцию: 28.01.2019. После доработки: 07.03.2019.

Введение. В современных условиях интенсивного антропогенного воздействия на морские сообщества важнейшее значение имеет экологический мониторинг. Его успешное проведение позволяет обнаружить изменение характеристик отдельных звеньев экосистемы и на основании этого предсказывать ее дальнейшую эволюцию во времени [1–3].

Экологическая оценка качества морской среды является важнейшим этапом разработки программ хозяйственного использования водоемов и мероприятий по их охране. Принципиальное значение в этом отношении имеет получение экспресс-информации о состоянии морских экосистем и их компонентов в результате воздействия различных внешних факторов. Принципиально важно получить эту информацию задолго до того, как результат внешних воздействий на организмы проявится в видимых признаках, таких, как сокращение скорости роста и продолжительности жизни, численности

особей популяций, нарушение трофических связей, снижение биоразнообразия [1, 4, 5]. Отвечающие этим требованиям экспрессные биофизические и биохимические методы оценки функционального состояния морских сообществ по параметрам их жизнедеятельности уже давно признаны приоритетными при организации экологического мониторинга. Реакции «поствоздействия» популяций при использовании биофизических и биохимических критериев проявляются в кратчайшие сроки после воздействия поллютантов [6, 7].

Применение биофизических методов является перспективным для прогнозирования состояния и продуктивности сообществ планктона в естественных водоемах, их использование вносит значительный вклад в мониторинг окружающей среды. Наибольшее развитие в последние годы получили различные спектральные и люминесцентные методы, которые используются главным об-

разом для диагностики состояния клеток микроводорослей под влиянием факторов среды в водных экосистемах [7]. В природных водоемах различные антропогенные загрязнения могут оказать существенное угнетающее влияние на фотосинтетический аппарат водорослей, что в итоге уменьшает продуктивность всей водной экологической системы. Регистрация действия внешних факторов на состояние фотосинтетических мембран клеток микроводорослей позволяет тем самым следить и за состоянием водной среды [8].

Биохимические методы позволяют наблюдать нарушения на самых ранних этапах повреждения, как правило, до появления физиологических, морфологических и других отклонений от нормы, дают возможность выявить границы адаптационных способностей, определить фазу воздействия и на основании этого делать выводы о степени устойчивости и чувствительности видов. Такого рода исследования важны как для выяснения механизмов развития приспособительных реакций у гидробионтов в ответ на воздействие разнообразных факторов среды, так и для прогноза возможных изменений сообществ в водоеме [9, 10].

В работе приведены примеры использования современных биофизических и биохимических методов в мони-

торинге прибрежной акватории Севастополя.

Биофизические методы. В качестве основного биофизического метода в мониторинге прибрежной зоны Севастополя использовали биолюминесцентный анализ. Известно, что биолюминесценция является тонким показателем функционального состояния организмов и представляет возможность проведения экспресс-индикации загрязнения пелагиали [11, 12]. В настоящее время уже выявлен ряд зависимостей параметров светозлучения (амплитудных, частотных, временных, энергетических) от физиологического состояния ряда организмов [7].

Исследования поля биолюминесценции прибрежных районов проводили в фотическом слое (0–60 м) с использованием гидробиофизических комплексов «САЛЬПА» и «САЛЬПА-М», которые определяли соленость и температуру, биолюминесценцию и мутность. В дневное время, кроме того, измеряли фотосинтетически активную радиацию (ФАР) и люксметром освещенность [13].

Биофизический мониторинг акватории бухты Севастополя и двухмильной зоны от неё выполняется отделом биофизической экологии ФГБУН ИМБИ с августа 2007 (рис. 1).

Рис. 1. Схема станций биофизического мониторинга в прибрежье Севастополя. Пунктирная линия показывает направление буксировки. Знаком Δ обозначены точки выполнения вертикальных зондирований комплексом «Сальпа-М»

В основе метода лежат инструментальные измерения *in situ* в реальном масштабе времени амплитудно-частотных параметров поля биолюми-

несценции в режимах вертикального зондирования и буксировки. Было выполнено 26 буксировок по Севастопольской бухте и прилегающей акватории,

которые выполнялись в период с октября 2008 г. по ноябрь 2013 г., один–два раза в месяц. Измерения проводились в дневное и ночное время, произведено 460000 замеров каждого параметра. Прибор буксировался на скорости 3,0–3,5 узлов до станции 4 («Авлита») (см. рис. 1). По ходу буксировки производился отбор приповерхностных биологических проб. В момент взятия каждой пробы синхронно определялись гидрологические и оптические параметры среды.

Перед каждой буксировкой выполняли несколько зондирований водной толщи (на 4 станциях, рис. 1, с использованием гидробиофизического зонда «Сальпа» или «Сальпа-М»). На станции 1 (траверз бухты Круглая) отбирали пробы планктона с использованием сети Джеди.

Результаты анализа данных, полученных при буксировке комплекса «САЛЬПА-М», выполненной в летнее время по ходу следования судна, представлены на рис. 2.

Рис. 2. Значения биолюминесценции (А) и мутности (Б) прибрежной акватории г. Севастополя, зарегистрированные на глубине 4 м 13 июня 2012 г., при буксировке комплексом «Сальпа» от траверза бухты Круглая до бухты Авлита

Трасса буксировки проходит через акватории с различной гидрологической структурой вод и многочисленными локальными источниками загрязнений, таких как бухты Круглая, Стрелецкая, Карантинная, Артиллерийская, Южная, Авлита. Мутность морской воды определяется взвесью, содержащейся в ней, и на ее формирование оказывают влияние различные факторы, такие как речной сток, штормы, цветения водорослей, бактерий. Вместе с тем, в прибрежной акватории, в условиях ан-

тропогенной нагрузки, формируется сложная по структуре взвесь, образованная из комплексов неорганических и органических компонент. Поэтому уровень загрязнения по маршруту буксировки можно проследить, в частности, по показаниям канала мутности (рис. 2) на момент буксировки.

Вся акватория по маршруту буксировки, с учетом измеренных параметров, была поделена на четыре участка: условно чистый (акватория на траверзе бухты Круглая); умерен-

но загрязненный (акватория бухты Артиллерийская); сильно загрязненный (район бухты Авлита) и очень сильно загрязненный – бухта Южная. В связи с этим для более детального исследования неоднородностей биолюминесценции вся исследуемая акватория была поделена на секторы, границы которых определялись с учетом уровня загрязнения и рельефа береговой полосы [13].

После определения природы распределения анализируемых данных, используя процедуры преобразования и сглаживания ряда, был проведен полный спектральный (Фурье) анализ. Поскольку цель спектрального анализа – выделить основные периодичности, преобразование ряда начали с вычитания среднего. Для уменьшения проблем рассеивания, т.е. для определения главной функции синуса или косинуса, применяли

сглаживание ряда перед началом анализа (косинус сглаживание) и затем дополнительно производили сглаживание периодограммы, с помощью преобразования взвешенно скользящего среднего (метод Хемминга). Эти преобразования позволили определить основные спектральные плотности, которые существенно влияют на цикличность поведения ряда.

Для исследования мелкомасштабной неоднородности дополнительно анализировались выборки по 200 измерений поля биолюминесценции в каждом секторе, что соответствует, учитывая скорость судна и цикличность измерений, 80-метровым отрезкам измерений. В результате проведенного анализа было получено более 230 периодограмм, часть которых отображена на рис. 3.

Рис. 3. Крупномасштабная (А) и мелкомасштабная (Б) структура неоднородностей поля биолюминесценции при буксировке от траверза бухты Круглая до бухты Авлита

Расчеты показали, что характер изменения интенсивности поля биолюминесценции, измеренной в исследуемых участках прибрежной зоны, описывается различными периодами колебаний. Отличие термохалинных, топографических (глубины) и экологических особенностей исследованного региона (уровня загрязнённости) предопределило различие пространственных спектров исследованных полей в этих регио-

нах. Так, для условно чистой акватории (траверс бухты Круглая) значения мутности не превышали значений 0,49 ЕМФ (единица мутности по Формазину) на фоне неоднородностей, достигающих 100-метровых интервалов, при минимальных масштабах изменчивости интенсивности поля биолюминесценции 8–13 м. По мере продвижения по трассе буксировки при входе в Севастопольскую бухту с увеличением мутности до

значений 1,65 ЕМФ цикличность неоднородностей увеличилась до 310-метровых интервалов. Соответственно от 13 до 25 м возросли и минимальные масштабы изменчивости интенсивности поля биолюминесценции. Наконец, в районе сильного загрязнения (срединная часть Севастопольской бухты), где значения загрязнения увеличились до значений 2,31 ЕМФ цикличность неоднородностей мутности возросла до уровня 600 м, что, несомненно, повлияло и на минимальные масштабы изменчивости интенсивности поля биолюминесценции, которые возросли до 17–28 м (рис. 3).

Результаты спектрального анализа данных буксировки гидробиофизического зонда «САЛЬПА-М» подтверждают, что прослеживается достоверная связь вариабельности поля биолюминесценции с экологическим состоянием региона исследований. Следовательно, цикличность распределения биолюминесцентного поля (масштаб его изменчивости) может рассматриваться как показатель состояния продуцентов поля биолюминесценции, в данном случае – планктонного сообщества. Это, в свою очередь, подтверждает постулат о том, что биолюминесценция является важным элементом функционирования планктонного сообщества и может использоваться для экспресс-оценки его структурированности и функционального состояния [11].

Биохимические методы. Важнейшим и стремительно развивающимся направлением в биотестировании и биоиндикации морских акваторий является использование биохимических методов. Совершенно очевидно, что поиск и область применения биохимических маркеров для экотоксикологической характеристики водных объектов перспективны, поскольку позволяют достаточно быстро получить адекватную

информацию о состоянии водной среды по ответным реакциям присутствующей в ней биоты. В качестве таких биомаркеров широко используются иммунологические показатели, активность холинэстераз (ХЭ), содержание сывороточных белков и низкомолекулярных антиоксидантов, активность антиоксидантных ферментов, индукция которых происходит в результате развития окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями ксенобиотиков и их метаболитов в среде и в организме. Избыточное количество токсикантов в среде и накопление их в организме усиливает свободнорадикальные процессы, что приводит к снижению содержания жизненно важных биомолекул и нарушению их структуры. В этом случае в качестве биомаркеров окислительного стресса и повреждающего действия токсических веществ применяют параметры перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков [14–17].

Определение концентрации белков сыворотки крови имеет важное диагностическое значение для оценки функционального состояния печени, метаболического статуса, стрессового состояния, а также качества окружающей среды [18]. Активность ХЭ является биомаркером загрязнения среды фосфорорганическими и карбаматными соединениями, тяжелыми металлами, детергентами. При отравлении этими веществами происходит ингибирование ферментативной активности, и как одно из следствий – блокада холинэргических синапсов. Определение активности ХЭ и ее ингибирование при различных воздействиях является удобным, быстрым и адаптивным тестом оценки токсичности ряда химических соединений [19].

Следует отметить, что для биохимической индикации состояния при-

брежных акваторий необходимо выбирать такие виды, которые отвечали бы следующим требованиям: повсеместное распространение, хорошо изученная биология, доступность для исследований, относительно оседлый образ жизни. Таким требованиям соответствуют представители донной ихтиофауны – морской ерш *Scorpaena porcus* и бычок-кругляк *Neogobius melanostomus*, которые успешно используются в качестве биоиндикаторных видов в экологическом мониторинге прибрежной зоны Черного и Азовского морей [3, 14–17, 20].

Многолетние исследования донной прибрежной ихтиофауны в районе Севастополя позволили выявить многообразие адаптаций рыб к условиям существования на разных уровнях биологической организации. При этом полученные результаты продемонстрировали большую информативность биохимических маркеров состояния рыб и среды их обитания по сравнению с морфофизиологическими и популяционными параметрами [3, 21].

Анализ биохимических маркеров рыб, отловленных в бухтах с разным

уровнем загрязнения (рис. 4), свидетельствует об эффективности и целесообразности их применения для оценки состояния прибрежных акваторий. В результате исследований определен характер зависимости биохимических параметров от условий среды обитания. В частности, установлено, что загрязнение морской среды модифицирует активность антиоксидантных ферментов крови и печени морского ерша *Scorpaena porcus*. При этом отмечены как адаптивные ответные реакции, характеризующиеся повышением ферментативной активности с увеличением антропогенной нагрузки, так и токсические, проявляющиеся в ингибировании активности в районах с максимальным уровнем загрязнения. Отмечено снижение активности ХЭ, содержания общего белка и альбумина, повышение уровня окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов в тканях рыб, обитающих в наиболее загрязненных районах г. Севастополя [14–17, 22].

Рис. 4. Районы отлова рыб в прибрежной акватории г. Севастополя

Заключение. Представленные в работе материалы свидетельствуют о том,

что применение в экологическом мониторинге морских акваторий биофизиче-

ских и биохимических методов является чрезвычайно важным и стремительно развивающимся направлением современной гидробиологии. Биофизические методы более показательны при изучении состояния и продуктивности планктонных сообществ различной размерной структуры. Биохимические методы позволяют наблюдать нарушения на самых ранних этапах повреждения. Их применение в экологическом мониторинге прибрежных акваторий целесообразно при исследовании донных организмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ по темам: «Суперпозиция физических, химических и биологических процессов в формировании качества морской среды и функционального состояния гидробионтов в Азово-Черноморском бассейне» регистрационный номер НИОКТР: АААА-А18-118020790154-2 и «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» регистрационный номер НИОКТР: АААА-А18-118020890074-2 и при частичной поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-34-50005 («Наставник»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. № 4. С. 7–13.
2. Биологические методы оценки качества вод: часть 1. Биоиндикация / Т.И. Моисеенко, С.Н. Гашев, А.Г. Селюков [и др.] // Вестник ТГУ. 2010. № 7. С. 20–40.
3. Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя (отв. ред.: Руднева И.И.) / А.В. Завьялов, И.Н. Залевская, Т.Б. Ковырина [и др.]. М.: ГЕОС. 2016. 360 с.
4. Adams S.M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems // Mar. Pollut. Bull. 2005. Vol. 51. № 8–12. P. 649–657.
5. Advances in Marine Biology. Biomarker response of Black Sea scorpion fish *Scorpaena porcus* to anthropogenic impact (Editors: Adam Kovács and Patrik Nagy) / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, I.I. Chesnokova [et al.] // In Nova Science Publishers. 2016. Chapter 5. Vol. 1. P. 119–165.
6. Токарев Ю.Н. Основы биофизической экологии гидробионтов. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2006. 342 с.
7. Токарев Ю.Н., Евстигнеев П.В., Машикова О.В. Планктонные биолуминесцентные Мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светоизлучения в норме и при антропогенном воздействии. Севастополь: Орианда. 2016. 340 с.
8. Использование флуоресценции хлорофилла для оценки продукционных характеристик фитопланктона / Д.Н. Маторин, С.И. Погосян, В.А. Осипов [и др.] // Биотехнология, экология, охрана окружающей среды / под ред. А.П. Садчикова, С.В. Котелевцева. М.: Изд-во «Графикон-принт». 2005. С. 189–194.
9. Оценка состояния водных организмов по биохимическому статусу / Н.Н. Немова, О.В. Мещерякова, Л.А. Лысенко [и др.] // Труды КарНЦ. 2014. № 5. С. 18–29.
10. Лукьянова О.Н., Корчагин В.П. Интегральный биохимический индекс состояния водных организмов в условиях загрязнения // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2017. № 2. С. 174–180.
11. The bioluminescence field as an indicator of the spatial structure and physiological state of the planktonic community at the Mediterranean sea basin / Yu.N. Tokarev, E.P. Bityukov, R. Williams [et al.] // The eastern Mediterranean as a laboratory basin for the assessment of contrasting ecosystems. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1999. P. 407–416.
12. Aronsohn M.D. Studying Bioluminescent Blooms in the Arabian Sea // State of planet. December 4, 2017 URL: <https://blogs.ei.columbia.edu/2017/12/04/studying-bioluminescent-blooms-arabian-sea/>.
13. Выявление пространственной неоднородности поля биолуминесценции с помощью буксируемого гидробиофизического комплекса «Сальпа-М» / Ю.Н.

Токарев, В.И. Василенко, В.Ф. Жук [и др.] // Морской экологический журнал. 2014. Т. 13. № 2. С. 71–81.

14. Скуратовская Е.Н. Состояние антиоксидантной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Одесса. 2009. 20 с.

15. Сравнительный анализ биохимических параметров морского ерша *Scorpaena porcus* L. из бухт г. Севастополя с разным уровнем загрязнения / Е.Н. Скуратовская, Т.Б. Ковырина, И.И. Руднева [и др.] // Морские биологические исследования: достижения и перспективы: сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции (г. Севастополь, 19–24 сентября 2016 г.). Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2016. Т. 3. С. 222–225.

16. Application fish blood biomarkers in evaluation of marine environment health / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, I.I. Dorokhova [et al.] // World Journal of Science and Technology. 2012. Vol. 2. № 7. P. 19–25.

17. Хлорорганические соединения в черноморском ерше *Scorpaena porcus* LINNAEUS, 1758 в акватории Севастополя: пространственное распределение и биологический отклик на уровень накопления загрязнителей / Л.В. Малахова,

Е.Н. Скуратовская, Т.В. Малахова [и др.] // Морской биологический журнал. 2018. Т. 3.4. С. 51–63.

18. Лукьяненко В.И., Хабаров М.В. Альбуминовая система сыворотки крови разных по экологии видов осетровых рыб. Ярославль: ВВО РЭА. 2005. 205 с.

19. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review / R. van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen // Environ. Toxicol. and Pharmacol. 2003. V. 13. P. 57–149.

20. Ковырина Т.Б. Применение биомаркеров бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) для оценки экологического состояния прибрежных вод Черного и Азовского морей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Севастополь. 2017. 22 с.

21. Bioindication of the Environmental State of Marine Areas with the Use of Fish Biomarkers / I.I. Rudneva., E.N. Skuratovskaya, I.I. Dorokhova, Yu.A. Grab // Water resources. 2011. Vol. 38, iss. 1. P. 107–112.

22. Шилова Ю.Б. Показатели белкового обмена как индикаторы состояния черноморских рыб в различных условиях обитания // Новое время: материалы XIV Междунар. салона изобретений и технологий (г. Севастополь, 27–29 сентября 2018 г.). 2018. С. 323–325.

BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL TECHNIQUES IN MONITORING THE COASTAL WATERS OF SEVASTOPOL (BLACK SEA)

O.V. Mashukova¹, E.N. Skuratovskaya¹, J.B. Shilova²

¹The A.O. Institute of Marine Biological Research of RAS (IMBR) Russian Federation, Sevastopol, Nakhimov Av., 2

²State Budgetary Educational Institution of Additional Education of the city of Sevastopol "Junior Academy of Sciences of the city of Sevastopol", Russian Federation, Sevastopol, 163 General Ostryakov Ave.

The examples of application of modern biophysical and biochemical techniques in monitoring the coastal waters of Sevastopol are given. Their distinct advantages in comparison with other techniques in terms of accuracy, objectiveness and efficiency of the information obtained are shown. Biophysical methods are more indicative for studying the state and productivity of plankton communities of various size structures. Biochemical techniques enable to observe failures at the earliest stage of damage. Their application in ecological monitoring of coastal waters is appropriate and worthwhile when studying benthic organisms. The data presented prove that the tasks of monitoring and the environment under study determine the choice of bio-indicator species and applied methods in estimation of the state of marine ecosystems.

Keywords: ecological monitoring, bioluminescence, bio-indication, biochemical markers, marine biota.