

УДК 574.587+574.24+57.084.1

КАРДИОАКТИВНОСТЬ *Pontastacus leptodactylus* (Decapoda) ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ СРЕДЫ ПОВЫШЕННОЙ СОЛЕННОСТИ: О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ РАКОВ В ТЕСТИРОВАНИИ СОЛОНОВАТЫХ ВОД

© 2023 г. С. В. Сладкова^{a, b, *}, Т. В. Кузнецова^a, В. А. Любимцев^a, С. В. Холодкевич^{a, c}

^aСанкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

^bСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

^cИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

*e-mail: sladkova_sv1@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 26.05.2023 г.

Изучены характеристики кардиоактивности речных раков *Pontastacus leptodactylus* Esch. при длительном содержании животных в среде с повышенной соленостью (6.5‰) для оценки возможности использования их как тест-организмов в биоэлектронных системах мониторинга качества морских прибрежных вод с высокой антропогенной нагрузкой. Близкие значения солености отмечены для многих заливов Балтийского моря (например, Таллинского и Ботнического), характеризующихся интенсивным загрязнением. Установлено, что увеличение солености воды с 0 до 6.5‰ вызывало начальное кратковременное повышение частоты сердечных сокращений на 30%. Показано, что раки могут не только успешно выживать в течение 1 мес в воде повышенной солености, но и в небольшой степени изменять характеристики сердечной активности. На протяжении экспозиции в солевом растворе раки демонстрировали четкий суточный (циркадный) ритм кардиоактивности. Суточная динамика частоты сердечных сокращений исчезала за несколько суток до линьки и в пресной, и в соленой воде. Сделано заключение о возможности использования пресноводных раков в биоэлектронных системах непрерывного мониторинга функционального состояния представителей местной биоты и для выявления биологических эффектов загрязняющих веществ в пресной и в солоноватой воде.

Ключевые слова: речные раки *Pontastacus leptodactylus*, функциональные показатели, неинвазивная регистрация кардиоактивности, изменение солености среды, раки как биосенсоры загрязнения окружающей среды

DOI: 10.31857/S0320965223050169, **EDN:** CJKVUQ

ВВЕДЕНИЕ

Пресноводных и морских беспозвоночных широко используют в качестве живых “мониторов” состояния среды их обитания, а также в экотоксикологических и токсикологических опытах. Удобным объектом являются пресноводные десятиногие раки — биосенсоры, используемые в биоэлектронных системах непрерывного длительного мониторинга токсичности природных вод (Kozák and Kuklina, 2016; Kholodkevich et al., 2021). Известно, что пресноводные раки имеют

широкий диапазон толерантности к изменению солености среды и способны выживать в водах до 12–18‰ (McMahon, 1986; Holdich et al., 1997; Holdich, 2002). Однако к настоящему времени в литературе отсутствуют данные о кардиоактивности речных раков как интегральной меры их функционального состояния при длительном нахождении животных в воде с повышенной соленостью.

Имеются единичные работы, посвященные вопросу о возможном применении пресноводных беспозвоночных в биотестировании загрязненных солоноватых вод. Опыты с инфузориями, типичными пресноводными организмами, которых акклиматизировали к солоноватой воде до 12‰, пока-

Сокращения: ЧСС — частота сердечных сокращений, ЧССп — частота сердечных сокращений в покое в дневной период, ЧССн — частота сокращений в ночной период, ЧССр — частота сердечных сокращений в начальной реакции на соль.

зали их способность выявлять токсические эффекты меди в соленой воде (Попова, Смуров, 2009).

Речные раки обладают довольно широкими адаптивными способностями и толерантны к разнообразным изменениям среды их обитания (Köksal, 1988; Holdich et al., 1997; Yildiz et al., 2004). Раки *Pontastacus (Astacus) leptodactylus* Esch. — аборигены для многих водных объектов России. Они способны обитать и в пресных водах, и при повышенной солености в прибрежных водах Черного и Каспийского морей, адаптируясь к обитанию даже при 14‰ (Черкашина, 1972; Cherkashina, 1975). Показано, что узкопалые раки могли выживать в среде до 21‰ в течение 9 нед., а в среде с соленостью 7‰ из икры раков вылупилась молодь, которая впоследствии успешно перелиняла (Holdich et al., 1997). Это обстоятельство позволило сделать предположение о возможности колонизации узкопалыми раками *P. leptodactylus* солоноватых вод (Holdich et al., 1997) и последующем их влиянии на биоту экосистемы (Beatty, Morgan, Gill, 2005; Cruz, Rebelo, 2007). Влияние вселенцев ракообразных, например *Gmelinoides fasciatus* Stebbing, на представителей местной биоты и роль этих животных как биоиндикаторов экологического состояния водоемов обсуждается в работе И.А. Барышева (2021).

Цель настоящего исследования — выяснить возможность использования раков *Pontastacus leptodactylus* в качестве биоиндикаторов в биоэлектронных системах мониторинга качества воды по показателям их кардиоактивности для оценки качества солоноватых вод.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 14 половозрелых самцах *P. leptodactylus*, не имевших признаков заболеваний из пресноводных водоемов Алтайского края. Их масса тела 32.1 ± 2.1 г, общая длина и длина карапакса 102.3 ± 3.3 и 51.8 ± 1.2 мм соответственно. Об удовлетворительном функциональном состоянии животных до опыта (адаптированных в течение месяца к лабораторным условиям) судили по их подвижности, поедании корма и хорошо выраженной защитно-оборонительной реакции — поднятию клешневых конечностей при хэндлинге. Перед началом экспериментов каждого рака маркировали, на его карапакс над областью сердца приклеивали миниатюрный держатель для крепления волоконно-оптического датчика, соединенного с фотоплетизмографом. Раков отсаживали в отдельные аквариумы размером $40 \times 35 \times 19.5$ см³, заполненные на 8–10 см проточной циркулирующей дехлорированной водой, что обеспечивалось установкой замкнутого водоснабжения. Животных кормили 1 раз в 3 сут личинками *Chironomus* spp. из расчета 2% массы тела на суточный рацион. На следующие после корм-

ления сутки частично (на 30%) заменяли воду для ее очистки от продуктов метаболизма рака. Температура воды была 20°C, режим освещенности — 12 ч свет : 12 ч темнота. Длина волоконно-оптического кабеля позволяла животному свободно передвигаться по аквариуму и заходить в убежище. Кардиоактивность раков непрерывно регистрировали системой “БиоАргус” в течение всего эксперимента, используя способ неинвазивной регистрации и последующего анализа ЧСС в режиме реального времени (Kholodkevich et al., 2021). В настоящем эксперименте устанавливали два ряда аквариумов по семь в каждом: первый ряд — с раками в контрольной (отстоянной водопроводной) воде и второй — с опытными раками, куда после 10 сут наблюдения через резервную емкость подавали раствор соли (NaCl) из расчета 6.5 г на 1000 мл. Соленость среды в аквариумах контролировали рефрактометром RSA0100A Salinity/SG Refractometer (TransInstrument, Singapore), расчетный уровень 6.5‰ достигался за 2–3 мин. Каждые трое суток 1/3 объема воды в аквариуме заменяли на свежую с добавлением расчетного количества соли для поддержания постоянной солености в 6.5‰. Эксперимент прекратили после того, как все животные успешно перелиняли.

Поскольку имеются данные, что осмоляльность гемолимфы для некоторых видов раков остается постоянной по мере увеличения солености от 0 до 10‰ (Rina et al., 2021), в настоящем исследовании осмоляльность не измеряли.

Данные о частоте сердечных сокращений оценивали с помощью программного обеспечения Statistica v. 6 для Windows. Чтобы выявить первичный эффект воздействия повышения солености на сердечную деятельность, ЧСС, зарегистрированную в течение 15 мин до воздействия, сравнивали с ЧСС, зарегистрированной в течение 15 мин после воздействия, используя парный *t*-критерий для зависимых величин. Для оценки эффекта по сравнению с контрольной группой раков применяли *t*-критерий для независимых переменных, предварительно проверяя нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Изменения ЧСС считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через трое суток после помещения раков в экспериментальную установку у них установился суточный ритм кардиоактивности с более высокими значениями ЧСС в темное время суток (ЧССн) по сравнению с ЧСС в светлое время суток (ЧССд). После этого проводили эксперимент.

Быстрое увеличение солености воды от 0 до 6.5‰ вызывает “аларм” реакцию раков (ЧССр),

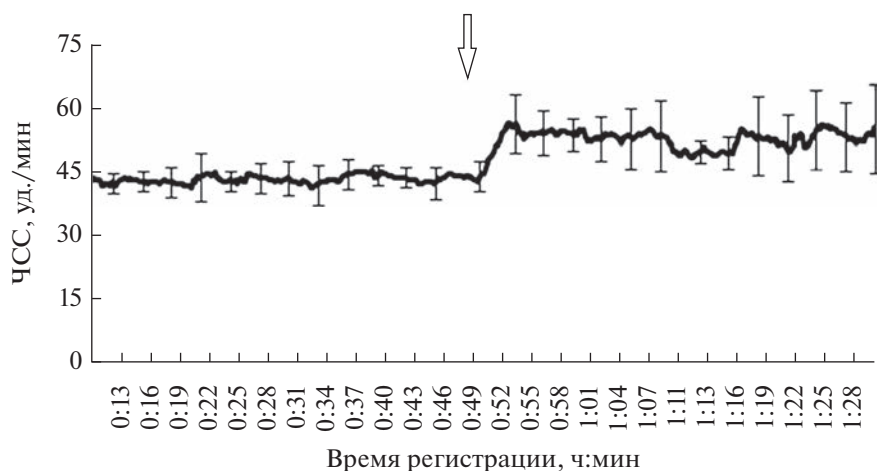


Рис. 1. Динамика ЧСС раков при изменении солёности воды до 6.5‰. Стрелкой указано время подачи соли (0:50). Вертикальные линии – стандартное отклонение по группе раков ($n = 7$).

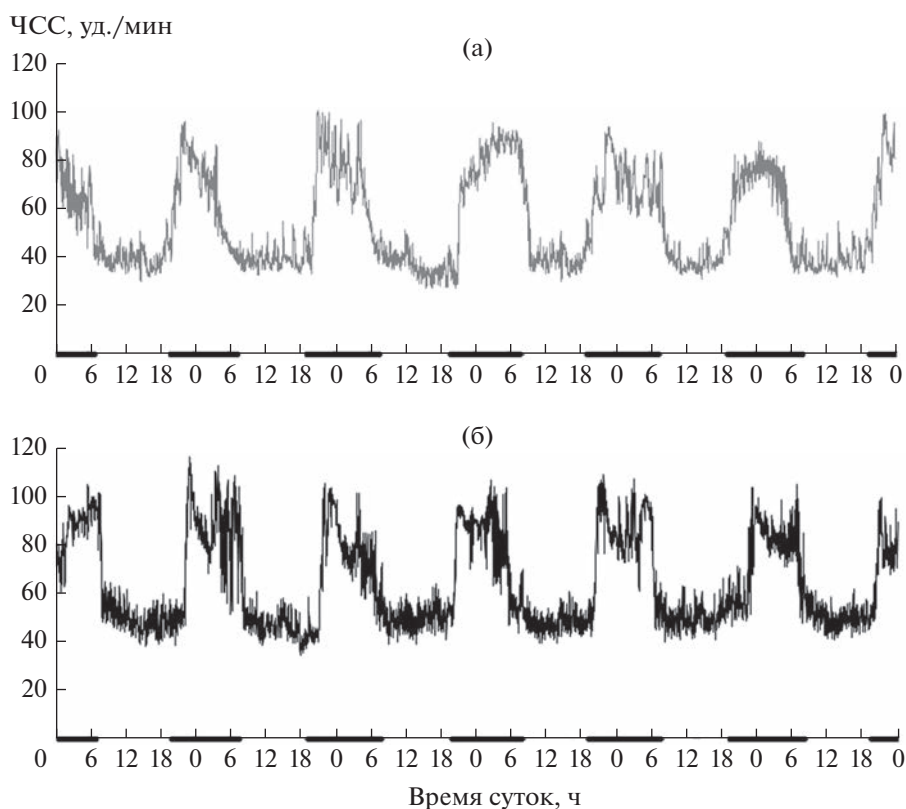


Рис. 2. Примеры типичной динамики ЧСС раков в течение 6 сут непрерывной регистрации: а – ЧСС рака № 1 в контрольной среде, б – ЧСС рака № 2 в воде с солёностью 6.5‰. Выделенные участки на оси абсцисс – длительность темного периода.

выражающуюся в кратковременном (15–20 мин) повышении ЧССп на 30% (рис. 1).

Реакция на повышение солёности кратковременна и не оказывает влияния на показатели суточного ритма кардиоактивности раков (рис. 2), который сохраняется и в солёной воде. Типичные

примеры циркадной ритмики в ЧСС приведены на рис. 2.

ЧССп и ЧССн раков в солёной и контрольной воде, полученные, начиная с пятых суток после помещения животных в экспериментальную установку, показаны на рис. 3.

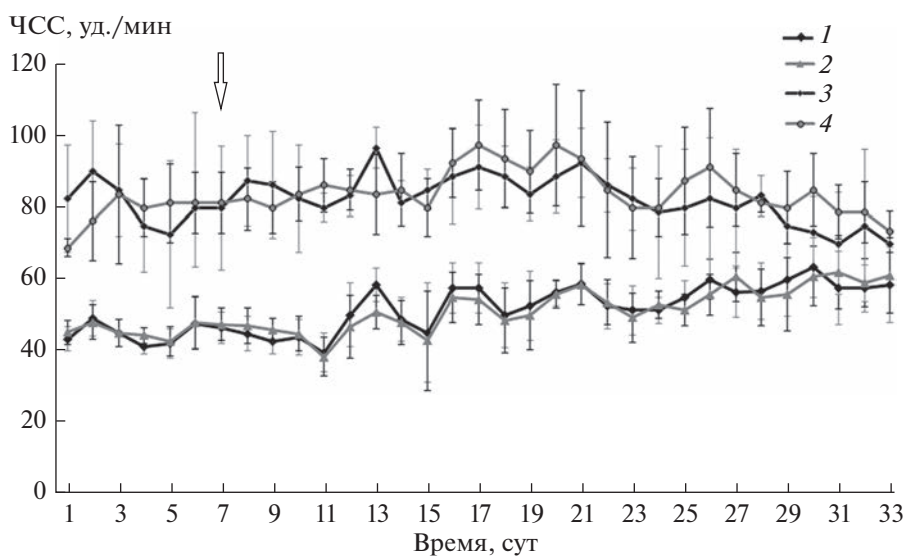


Рис. 3. ЧСС раков в соленой и пресной (контрольной) воде в течение эксперимента. 1 – ЧССп (соль), 2 – ЧССп (контроль), 3 – ЧССн (соль), 4 – ЧССн (контроль). Стрелкой указано время подачи соли.

Суточная динамика ритма кардиоактивности раков задается режимом искусственного освещения (с 8:00 до 20:00 – освещение в 300 лк, с 20:00 до 8:00 – темнота), и этот ритм характеризуется следующими показателями ЧСС: период – 24 ч, длительность ночной активности >8 ч, максимальная ЧСС ночной активности (ЧССн) в диапазоне 80–110 уд./мин и ЧСС покоя (ЧССп) в дневное время в диапазоне 40–60 уд./мин. Этот ритм наблюдался у всех раков в контрольной и соленой воде в течение 3–4 нед. (рис. 2). Однако следует отметить, что у раков в соленой воде повышалась интенсивность небольших по амплитуде периодических флуктуаций ЧССп, при этом среднее значение ЧССп сохранялось. Проведенный частотный анализ значений ЧССп показал, что на кривых дневной динамики ЧСС для раков, экспонировавшихся в соленой воде, интенсивность периодических колебаний сердечного ритма имеет длительность от шести до трех мин, с максимумом ~ 4.8 мин, что значительно превышает контроль. Рассчитанный на основе полученных периодограмм коэффициент удельного веса кратковременных колебаний ЧССп (отношение интенсивности колебаний с периодом от двух до 10 мин к интенсивности всех флуктуаций) за двое суток до и после подачи соли, а также спустя 15 сут экспозиции показал достоверное (t -критерий, $p < 0.05$) увеличение удельного веса таких колебаний в соленой воде: 0.21 ± 0.03 ; 0.32 ± 0.07 ; 0.30 ± 0.05 соответственно.

За несколько суток до линьки (5–7 сут в зависимости от конкретной особи) наблюдали постепенные однонаправленные изменения ритма и у экспериментальных, и у контрольных животных. Эти изменения заключались в неуклонном повы-

шении ЧССп в дневное время и некотором снижении ЧСС в темное время суток, однако циркадный характер ритма кардиоактивности сохранялся, как и реакция на включение света. За двое суток, предшествующих линьке (сбросу старого карапакса), циркадный ритм не наблюдали. Ночные и дневные ЧССп становились сходными по значениям за счет постепенного повышения дневной ЧСС и некоторого снижения ЧСС ночной активности. Типичный паттерн ЧСС в течение трех суток, непосредственно предшествующих линьке, для контрольной и экспериментальной групп раков показан на рис. 4. Амплитуда и интенсивность флуктуаций значений ЧСС были более выражены у раков в соленой воде (рис. 4б). В сутки сброса карапакса ритм и реакция на включение/выключение света, а также периодичность колебаний отсутствовали (вторая пунктирная вертикальная линия на рис. 4). В течение эксперимента все раки выжили и успешно перелиняли.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пороги толерантности пресноводных раков при изменении солёности среды, при всей актуальности тематики (Хлебович, 2012), к настоящему времени изучены недостаточно (Yildiz et al., 2004; Rida et al., 2021). Кроме того, остается вопрос: могут ли пресноводные тест-организмы быть использованы для тестирования биологических эффектов поллютантов в солоноводных акваториях Балтики с солёностью, например, до 10–12‰ (Попова, Смуров, 2009). Установлено, что это возможно при предварительной акклиматизации инфузорий к соленой воде (12‰) в течение 10 сут, выявлены четкие реакции инфузорий на

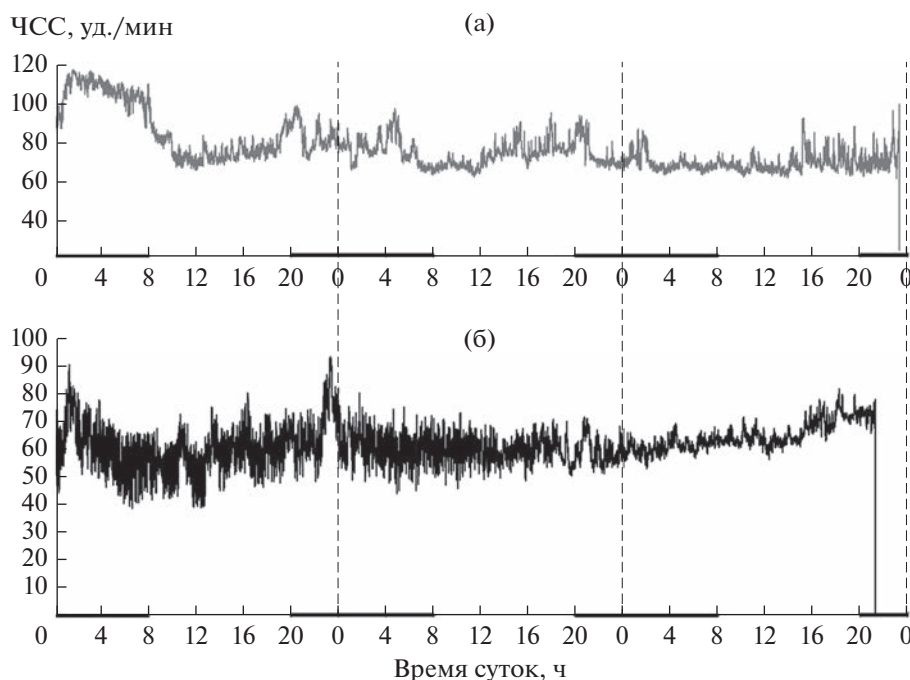


Рис. 4. Примеры типичной динамика ЧСС в конце предлиньной стадии (запись в течение 3 сут непосредственно перед линькой): а — ЧСС рака № 1 в контрольной среде, б — ЧСС рака № 2 в соленой воде. Черные участки на оси абсцисс — длительность темнового периода, пунктирные вертикальные линии — суточные интервалы.

присутствие в соленой воде токсичных для них ионов меди (Попова, Смуров, 2009).

Ранее показано (Yildiz et al., 2004), что *P. leptodactylus* способен к гиперрегуляции при солёности 10‰ в течение 96 ч. В физиологические механизмы адаптации к повышению солёности среды у раков вовлечены эпителиальные клетки жабр, желудочно-кишечного тракта, другие органы и ткани (McMahon, 1986; Holdich et al., 1997).

Полученные нами результаты свидетельствуют, что пресноводные раки *P. leptodactylus* реагируют на быстрое изменение солёности воды от 0 до 6.5‰ “аларм” реакцией, выражающейся в кратковременном (15–20 мин) повышении ЧСС на 30%. Такой ответ сердечно-сосудистой системы раков — характерная первичная реакция организма на стрессовый фактор. Именно этот тип реакции сердечно-сосудистой системы положен в основу принципа биоэлектронного метода оценки качества водной среды по показателям кардиоактивности раков и моллюсков (Kholodkevich et al., 2021). В соленой воде раки сохраняют хемосенсорную реакцию на изменение кислотности среды, что отражается на их кардиоактивности (Safronova et al., 2018).

Наблюдающийся циркадный ритм ЧСС у раков и в контрольной, и в соленой воде связан с особенностью поведения раков как животных, активных в сумеречное время. Четкое проявление циркадианной ритмики ЧСС является показате-

лем хорошего (здорового) функционального состояния раков в межлиньный период (Styrishave et al., 2007; Kuznetsova et al., 2010; Сладкова и др., 2017). Характерные изменения паттерна кардиоритма узкопалых раков на предлиньной стадии типичны для высших раков и связаны с физиологической подготовкой к сбросу старого панциря. Аналогичные изменения ритма отмечены нами ранее для раков *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Сладкова и др., 2017). Наблюдаемое в настоящей работе в соленой воде некоторое увеличение флуктуаций среднего значения ЧССп в дневное время, имеющих вид кратковременных амплитудных колебаний длительностью ~5 мин, возможно, свидетельствует о включении дополнительных физиологических (предположительно, висцеро-кардиальных) механизмов поддержания осмоляльности гемолимфы, что требует дополнительных энергетических затрат.

Выживаемость раков (100%) и их успешная линька также указывают на удовлетворительное функциональное состояние животных, которое принципиально не изменилось в ходе эксперимента с воздействием на них соленой воды.

Выводы. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что пресноводные раки *P. leptodactylus* могут значительное время переживать в среде с повышенной солёностью в 6.5‰, не изменяя своего физиологического статуса, фиксируемого по показателям кардиоактивности, неин-

вазивно регистрируемой в процессе эксперимента. Таким образом, они могут успешно использоваться в биоэлектронных системах мониторинга кардиоритма как интегрального показателя их здоровья и индикативного показателя стресса животного при токсическом воздействии, в качестве биосенсоров в солоноватых водах на протяжении, по крайней мере, двух месяцев.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена с использованием оборудования РЦ “Обсерватория экологической безопасности” Научного парка СПбГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041100085-8) “Научные основы оценки здоровья экосистем Северо-Запада России и предупреждения угроз экологической безопасности”, а также GZ_MDF-2023-1 СПбГУ, ID проекта: 101662710.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышев И.А., Сидорова А.И., Георгиев А.П., Калинкина Н.М. 2021. Биомасса популяции, продукция за вегетационный период и биоресурсное значение инвазивного *Gmelinoides fasciatus* (Crustacea: amphipoda) в Онежском озере // Биология внутр. вод. № 4. С. 423.
<https://doi.org/10.31857/S0320965221040057>
- Попова О.С., Смуров А.О. 2009. *Paramecia nephridiatum* – удобный объект биотестирования воды Балтийского моря // X Международный экологический форум “День Балтийского моря”. Сборник тезисов. СПб.: ООО “Макси-Принт”. С. 196.
- Сладкова С.В., Холодкевич С.В., Сафронова Д.В., Борисов Р.Р. 2017. Кардиоактивность раков *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868) в различных физиологических состояниях // Принципы экологии. Т. 3. С. 40.
<https://doi.org/10.15393/jl.art.2017.6442>
- Черкашина Н.Я. 1972. Питание длиннопалого и толстопалого раков в туркменских водах Каспия // Труды ВНИРО. Т. 90. С. 55.
- Хлебович В.В. 2012. Экология особи (очерки фенотипических адаптаций животных). СПб.: Зоол. ин-т РАН.
- Beatty S., Morgan D., Gill H. 2005. Role of life history strategy in the colonisation of Western Australian aquatic systems by the introduced crayfish *Cherax destructor* Clark, 1936 // Hydrobiologia. V. 549(1). P. 219.
- Cherkashina N.Y. 1975. Distribution and biology of genus *Astacus* (Crustacea, Decapoda, Astacidae) in the Turkmen waters of Caspian Sea // Freshwater Crayfish. V. 2. P. 553.
- Cruz M.J., Rebelo R. 2007. Colonization of freshwater habitats by an introduced crayfish in Southwest Iberian Peninsula // Hydrobiologia. V. 575(1). P. 191.
- Holdich D.M., Harlioglu M.M., Firkins I. 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* и *Pacifastacus leniusculus* // Estuarine, Coastal and Shelf Science. V. 44. P. 147.
- Holdich D.M. 2002. Biology of Freshwater Crayfish. Oxford: Blackwell Science.
- Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Sladkova S.V. et al. 2021. Industrial Operation of the Biological Early Warning System BioArgus for Water Quality Control Using Crayfish as a Biosensor // Water Science and Sustainability. Sustainable Development Goals Series. Cham: Springer. P. 127.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-57488-8_10
- Köksal G. 1988. *Astacus leptodactylus* in Europe // Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation. London: Chapman. P. 365.
- Kozák P., Kuklina I. 2016. Crayfish as tools of water quality monitoring // Freshwater Crayfish: A Global Overview. Boca Raton: CRS Press. P. 275.
- Kuznetsova T.V., Sladkova S.V., Kholodkevich S.V. 2010. 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. V. 46(3). P. 241.
- McMahon B.R. 1986. The adaptable crayfish: mechanisms and physiological adaptation // Freshwater Crayfish. V. 6. P. 59.
- Rida R., Zein-Eddine R., Kreydiyyeh S. et al. Influence of salinity on survival, growth, hemolymph osmolality, gill sodium potassium ATPase activity, and sodium potassium chloride co-transporter expression in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* // J. World Aquac. Soc. 2021. V. 52. P. 466.
- Safronova D., Lyubimtsev V., Kholodkevich S. 2018. The possibility of usage a bioelectronic system based on the control of changes in the cardioactivity of freshwater crayfish for detection of cases of instantaneous pollution of brackish waters in the eastern part of the Gulf of Finland. International Scientific Forum “Gulf of Finland – natural dynamics and anthropogenic impact” Abstracts, Russia. St. Petersburg, October 17–18, 2018 (VSEGEI). P. 97.
- Styrishave B., Bojsen B.H., Witthoff H., Andersen O. 2007. Diurnal variations in physiology and behaviour of the noble crayfish *Astacus astacus* and the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* // Mar. Freshwater Behav. Physiol. V. 40. № 1. P. 63.
- Yildiz H.Y., Köksal G., Karasu Benli A.C. 2004. Physiological response of the crayfish, *Astacus leptodactylus* to saline water // Crustaceana. V. 77. № 10. P. 1271.

Cardiac Activity of *Pontastacus leptodactylus* Esch. (Decapoda) under Prolonged Exposure to High Salinity: on the Possibility of Using Freshwater Crayfish in Testing of Brackish Waters

S. V. Sladkova^{1, 2, *}, T. V. Kuznetsova¹, V. A. Lyubimtsev¹, and S. V. Kholodkevich^{1, 3}

¹St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia

²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, Russia

*e-mail: sladkova_sv1@mail.ru

In this study, we analyzed the characteristics of the cardiac activity of crayfish during long-term keeping of animals in an environment with high salinity (6.5‰) in order to find out the fundamental possibility of using them as bioindicators in bioelectronic systems for monitoring the quality of marine coastal waters under high anthropogenic load. Similar salinity values were noted for many bays of the Baltic Sea sub-regions, for example, the Tallinn and Bothnian bays, which are characterized by intense anthropogenic load. It was found that an increase in water salinity from 0 to 6.5‰ caused an initial short-term increase in heart rate (HR) by 30%. It has been shown that crayfish can not only successfully survive for 1 month in high salinity water, but also change the characteristics of cardiac activity to a small extent. Some features were revealed in crayfish in water with altered salinity. During exposure to saline solution, crayfish showed a clear diurnal rhythm of cardiac activity. The rhythmicity of the heart rate disappeared a few days before the molt in both fresh and salt water. The study made it possible to draw a conclusion about the possibility of using freshwater crayfish in bioelectronic systems for continuous monitoring of the functional state of representatives of the local biota and for identifying the biological effects of pollutants in both fresh and brackish water.

Keywords: freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*, functional parameters, non-invasive recording of cardiac activity, response to salinity change, crayfish as biosensors for environmental assessment