

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОЛЕННОСТИ НА ЧАСТОТУ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И СОЛЕННОСТНУЮ ТОЛЕРАНТНОСТЬ *HIATELLA ARCTICA* L. (BIVALVIA, HETERODONTA)*

Важным вопросом при изучении акклимации двухстворчатых моллюсков к какому-либо фактору среды является выбор тестируемой функции организма. Исследуемая функция должна закономерно меняться в процессе акклимации и быть не слишком трудоемкой для регистрации. Традиционно используемые методы (степень выдвинутости сифона, активность фильтрации, интенсивность биссусообразования) не всегда применимы для конкретного объекта. Ранее при исследовании акклимации *H. arctica* в качестве тестируемой функции была выбрана степень выдвинутости сифона [16]. Проведенные нами исследования показали, что восстановление этой функции после изменения солёности происходит очень быстро - в течение суток, независимо от первоначальной солёности акклимации и величины переноса. Незначительный срок нормализации этой функции не позволяет рассматривать процесс ее восстановления как акклимацию. В связи с этим представлялся логичным поиск другой тестируемой функции, процесс нормализации которой удовлетворял бы критериям акклимации.

Мы апробировали возможность применения оценки сердечной активности при изучении солёностной акклимации *H. arctica*, которая ранее успешно была применена при исследовании акклимации у *Mytilus edulis* [20].

При этом решались следующие задачи:

- 1) оценка солёностных толерантных диапазонов при различных солёностях акклимации и потенциальной солёностной толерантности *H. arctica*;
- 2) исследование изменений сердечной ритмики животных в течение периода акклимации к пониженной и повышенной солёности внутри оцененного на предыдущем этапе толерантного диапазона;
- 3) исследование изменений сердечной ритмики животных в течение периода последующей деакклимации.

Материалы и методы исследования. Работа была выполнена в августе 2005 г. на Беломорской биологической станции им. О. А. Скарлато Зоологического института РАН. Моллюски *H. arctica*, стандартизованные по размеру, были собраны в бухте Круглой Чупинской губы Кандакшского залива Белого моря с установок для культивирования мидий (глубина 1-3 м). Сразу после сбора животные были помещены в аквариумы с аэрируемой морской водой солёностью 25‰, которые располагались в изотермической комнате при температуре $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Кормление не производилось. Вода сменялась ежесуточно на 80-90%. Моллюски были использованы в работе через две недели после сборов и адаптации к аквариальным условиям. Солёности определялись с помощью рефрактометра-солемера Atago S/Mill. Экспериментальные среды готовились разведением морской воды пресной или выпариванием.

Оценка значений солёностных толерантных границ проводилась разработанным нами ранее методом [5]. Моллюски в количестве 5 экземпляров помещались в микроаквариумы объёмом

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты РФФИ № 04-04-49801_а, № 03-04-49701_а и 06-04-48789_а).

мом 200 мл с различными тестовыми соленостями. Тестовые солености готовились с интервалом 2‰. Ежедневно в течение двух недель определялось количество живых моллюсков в каждом микроаквариуме и производилась смена воды. Эксперименты проводились в трех повторностях для каждого значения тестовой солености. Критерием смерти моллюсков служило отсутствие реакции на укол иглой.

Соленость, в которой выживало 100% исследуемых организмов в течение 14 дней, считалась принадлежащей толерантному диапазону. Соответственно за оценку толерантной границы принимали середину интервала между максимальной (в случае определения верхней границы толерантного диапазона) соленостью, при которой выживало 100% организмов, и следующей за ней минимальной летальной соленостью, при которой гибли все особи. В случае определения нижней границы поступали аналогичным образом. Мы предлагаем назвать этот метод оценки толерантных границ методом интервалов. Для оценки значений толерантных границ были использованы животные, акклиматизированные к 15, 20, 25, 30, 35 и 40‰. Полученные данные позволили оценить потенциальный соленостный толерантный диапазон и построить соленостный толерантный полигон.

Частоту сердечных сокращений (ЧСС) моллюсков исследовали при помощи методики дистантной регистрации изменения объема сердечной мышцы (плетизмограмма). Она основана на излучении инфракрасного света в область расположения сердца и записи отраженных лучей [24]. В нашей работе были использованы оптические сенсоры CNY-70. С помощью специально разработанного усилителя с системой фильтров и портативного цифрового осциллографа Fluke™ 125 сигнал передавался на персональный компьютер. Его запись и обработка производились при помощи программы Fluke View 3.0 [23, 28].

Для изучения влияния солености среды на ЧСС были выбраны заведомо находящиеся внутри толерантного полигона солености.

Эксперименты выполнялись по следующей схеме: в 5 аквариумов с ежедневно сменяемой и аэрируемой водой объемом 5 л поместили по 7 моллюсков с заранее приклеенными датчиками; через сутки была начата регистрация ЧСС. Затем в 4 аквариумах (опыт) вода нормальной для Белого моря солености (25‰) сменялась на 4 варианта солености - 15, 20, 30 и 35‰ соответственно. Условия содержания в пятом аквариуме (контроль) оставались прежними. Регистрация ЧСС хиателл производилась сразу после снижения солености и далее через каждые 6 ч. Через 8 сут. была начата деакклимация: подопытных животных возвратили в исходные условия (25‰). При этом регистрация ЧСС осуществлялась также через каждые 6 ч.

ЧСС измерялась в количестве сердечных сокращений в минуту (сс/мин). Рассчитывались средние арифметические значения и их средние квадратические ошибки. При построении графиков ЧСС у моллюсков в контроле брали за 100% и нормировали соответственно показатели сердечной активности у животных, подвергавшихся воздействию. При сравнении выборок использовался параметрический критерий Стьюдента (t). Для сглаживания вариабельности данных применяли метод скользящего среднего [8].

Результаты исследования и их обсуждение. Исследования, выполненные на разных видах моллюсков, показали, что характер смещения границ толерантности по отношению к солености акклимации имеет линейный характер лишь на отдельных участках исследованного диапазона [2, 6, 7, 9, 17, 27, 22, 29, 30].

Как правило, зависимость толерантной границы от условий акклимации описывается линейной функцией. Гиперболическая зависимость отмечена только для немногих видов [21, 26, 30]. В некоторых случаях гиперболическая зависимость только кажущаяся и, вследствие недостатка данных на участке, где величина толерантной границы меняется линейно.

Верхняя и нижняя потенциальные соленостные границы равны высшей и низшей солености, при которой может существовать вид.

Способ оценки нижней потенциальной соленостной границы был предложен А. А. Филипповым [15, 25]. Он состоит в расчете точки пересечения линии регрессии нижней толерантной границы с прямой изоосмотичности.

Согласно нашим данным, для *H. arctica* формула нижней толерантной границы $S^t = (12,819 \pm 0,891) + (0,0914 \pm 0,031)S^a$ ($n = 6$), где S^t - значение нижней толерантной границы, S^a - соленость акклимации. Коэффициенты достоверны при уровне значимости ($p < 0,05$). Эта линия пересекается с прямой изоосмотичности в точке 14,11‰.

Величина верхней потенциальной толерантной границы находится аналогичным образом. Формула для верхней толерантной границы $S^t = (42,282 \pm 0,694) - [(55,371 \pm 14,10) / (S^a - (11,125 \pm 0,840))]$ ($n = 6$), где S^t - значение верхней толерантной границы, S^a - соленость акклимации, имеет достоверные коэффициенты при уровне значимости ($p < 0,05$). График этой функции пересекает линию изоосмотичности в точке 40,39‰.

Таким образом, диапазон потенциальной соленостной толерантности *H. arctica*, по нашим данным 14-40‰. Он очень близок к определенному ранее другим методом диапазону толерантности, который был равен 12,5-42‰ [16].

Полученные нами данные по изменению границ толерантности в зависимости от изменения солености акклимации удобно представить в виде толерантного полигона. Соленостный толерантный полигон представляет график зависимости верхней и нижней толерантной границы от значения солености акклимации [17].

Для построения толерантного полигона мы рассчитали линейную регрессию между значением верхней толерантной границы и величиной солености акклимации на участке 15-25‰: $S^t = (14,000 \pm 7,071) + (1,00 \pm 0,35)S^a$ ($n = 3$), где S^t - значение нижней толерантной границы, S^a - соленость акклимации, имеет недостоверные коэффициенты при уровне значимости ($p < 0,05$).

В пользу того, что величина верхней толерантной границы меняется линейно в зависимости от условий акклимации, свидетельствует величина углового коэффициента. Ранее нами было показано, что у видов морского происхождения, изоосмотичных по отношению к внешней среде, верхняя граница толерантного диапазона на том участке, где она меняется с изменением солености акклимации, параллельна линии изоосмотичности, имеющей такой же угловой коэффициент [7].

График зависимости нижней толерантной границы от солености акклимации мы построили на основании приведенной выше формулы.

Для анализа видовых температурных полигонов было предложено использовать два метода, основанных на геометрическом разбиении полигона на три отдельные зоны относительно четырех ключевых температур: нижней и верхней потенциальных температурных границ, нижней и верхней толерантных границ [13].

Наибольшее значение имеет зона тестовых температур, в которой организм выживает при любых температурах акклимации. Зона температурной толерантности, лежащая выше зоны тестовых температур носит название верхней зоны, зависящей от температуры акклимации, а лежащая ниже называется нижней зоной, зависящей от температуры акклимации. Можно рассматривать верхнюю и нижнюю зоны вместе, выделяя так называемую комбинированную зону тестовых температур, зависящую от температуры акклимации.

Оба метода анализа выделяют одни и те же зоны, но на основании разных геометрических представлений. Первым методом, который назван линейным [13], выделяют зоны тестовых температур разбиением диапазона потенциальной толерантности. Вто-

рой метод основан на разделении площади толерантного полигона на три части. Соответственно в первом случае единицей измерения служат °С, а во втором °С².

Так как соленостные и температурные толерантные полигоны имеют близкую форму и особенности [22], разработанные ранее методы анализа можно применить и по отношению к фактору солености.

Общая площадь соленостного толерантного полигона у *H. arctica* равна 630,24‰². Зона тестовых соленостей, не зависящая от акклимации, имеет площадь 362,46‰², что составляет 57,51% от общей площади. Верхняя зона, зависящая от солености акклимации, равна 237,15‰², нижняя - 30,63‰². Это составляет 37,63 и 4,86% от общей площади соответственно. Комбинированная площадь равна 267,78‰² и составляет 42,49% площади полигона.

При анализе полигона линейным методом выделяются диапазоны соленостей: не зависящий от акклимации - 16,48-28,11‰, нижний зависящий от акклимации - 14,11-16,47‰, верхний зависящий от акклимации 28,11-40‰ (рис. 1). Доли каждого диапазона по отношению к диапазону потенциальной соленостной толерантности (14,11 - 40‰) незначительно отличаются от оценок полученных методом площадей. Они равны 44,94, 9,14 и 45,92% соответственно.

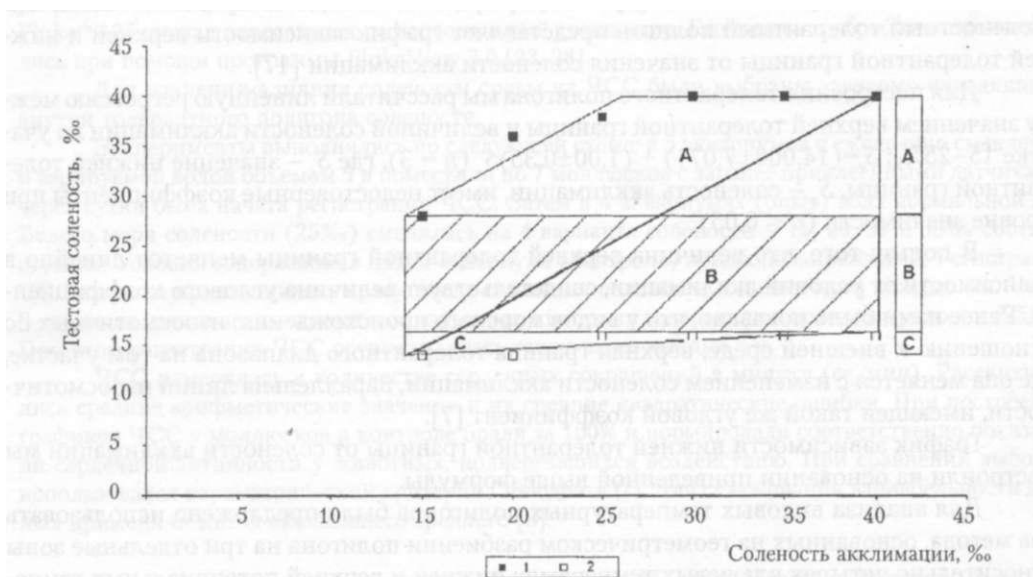


Рис. 1. Соленостный толерантный полигон *H. arctica*

1 - величина верхней толерантной границы, 2 - величина нижней толерантной границы.

A - верхняя зона толерантности, зависящая от солености акклимации, B - зона толерантности, не зависящая от солености акклимации, C - нижняя зона толерантности, зависящая от солености акклимации.

Таким образом, оба метода показывают, что от акклимации зависит около 50% адаптационных способностей *H. arctica*. Полученные при анализе полигона результаты можно использовать для анализа распространения *H. arctica* в Белом море. Очевидно, что с зоной тестовых соленостей, не зависящей от акклимации, должен быть связан максимум обилия этого вида.

ЧСС моллюсков, акклимированных к 25‰ (контроль), составила в среднем $11,2 \pm 0,5$ сс/мин. За 14 дней эксперимента наблюдалась тенденция к понижению сердечной активности животных от 12,2 до 11,1 сс/мин, однако достоверных изменений не отмечено. Это объясняется, вероятно, некоторым истощением организмов за время эксперимента. ЧСС у моллюсков в контроле варьировала в широких пределах - от 7,1 до 16,0 сс/мин. В то же время крайние значения встречались достаточно редко, и коэффициент вариации составил 12%. Низкое значение коэффициента вариации доказывает невысокую изменчивость показателей сердечной активности у данного вида моллюсков в стандартных условиях. Кроме того, распределение частотных показателей сердечной активности хиателл подчинялось нормальному закону, в отличие от ЧСС мидии [12], что свидетельствует в пользу отсутствия приливо-отливной или иной околоциркадной ритмики.

Помещение *N. arctica* в воду солености 15 и 35‰ вызвало резкое, на 85 и 63% соответственно, падение ЧСС (рис. 2, А). При этом у части моллюсков наблюдалась остановка сердечных сокращений, что никогда не наблюдалось в контроле (рис. 3). Понижение сердечной активности животных при солености 15‰ в среднем было более выражено, по сравнению с соленостью 35‰, однако это различие в большей степени объясняется количеством «молчащих» моллюсков (рис. 3). На 5-е сутки акклимации сердечная активность возобновляется у всех животных. В дальнейшем, по ходу акклимации, ЧСС подопытных моллюсков достигает уровня контроля на 8-е и 9-е сутки при соленостях 15 и 35‰ соответственно (рис. 2, А). В то же время часть животных, находившихся при 15‰, на 9-е сутки погибла. В связи с этим эксперимент по деакклимации производился только с моллюсками, находившимся при солености 35‰. Однако значительных изменений в ЧСС отмечено не было.

Вода соленостью 20 и 30‰ оказала сходный эффект на сердечную активность *N. arctica*, однако понижение ЧСС происходило постепенно и достигло своего минимума только через 2 суток после воздействия. При этом степень понижения сердечной активности моллюсков была в 2 раза меньше, чем при соленостях 15 и 35‰ (см. рис. 2, Б). У части животных также отмечалось прекращение сердечной активности, однако этот эффект наблюдался только в течение первых суток эксперимента. Возврат ЧСС *N. arctica* к контрольному уровню происходил на 5-е сутки эксперимента, т.е. на несколько суток раньше, чем при использовании солености в 15 и 35‰ (см. рис. 2, А и Б). В то же время некоторые колебания ЧСС около уровня контроля продолжались до завершения эксперимента (рис. 2, Б). Однако в случае с соленостью 30‰ ЧСС моллюсков на 9-е сутки эксперимента достоверно ($p < 0,04$) превысила контрольный уровень на 15%, что, вероятно, свидетельствует о продолжающемся акклимационном процессе.

Перенос животных, находившихся в воде соленостью 30‰, в исходную соленость вызвал понижение их сердечной активности до контрольного уровня с отсутствием достоверных изменений в дальнейшем (см. рис. 2, Б). Напротив, деакклимация *N. arctica*, подвергшихся воздействию воды с пониженной соленостью, происходила на фоне активизации сердечной ритмики с последующими колебаниями и возвратом к контрольному уровню на 4-е сутки (см. рис. 2, Б).

Явление акклимации обычно изучается путем исследования изменения какой-либо функции организма (например, дыхание, скорость передвижения) или его резистентности, которая в свою очередь тестируется по наличию или отсутствию выбранной функции организма, например ресничного движения, в ответ на определенную дозу фактора. В работах по изучению акклимации [1, 11] были выявлены ее характерные черты, такие

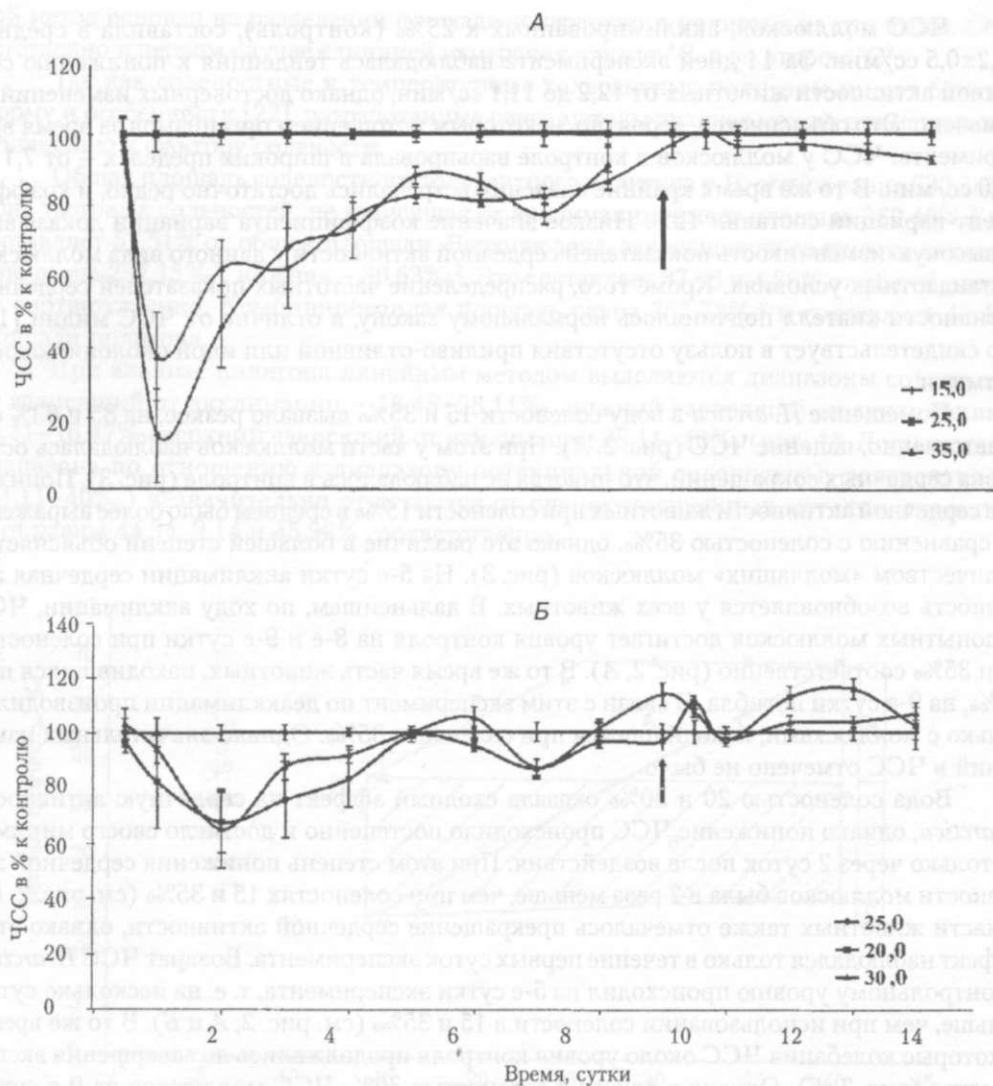
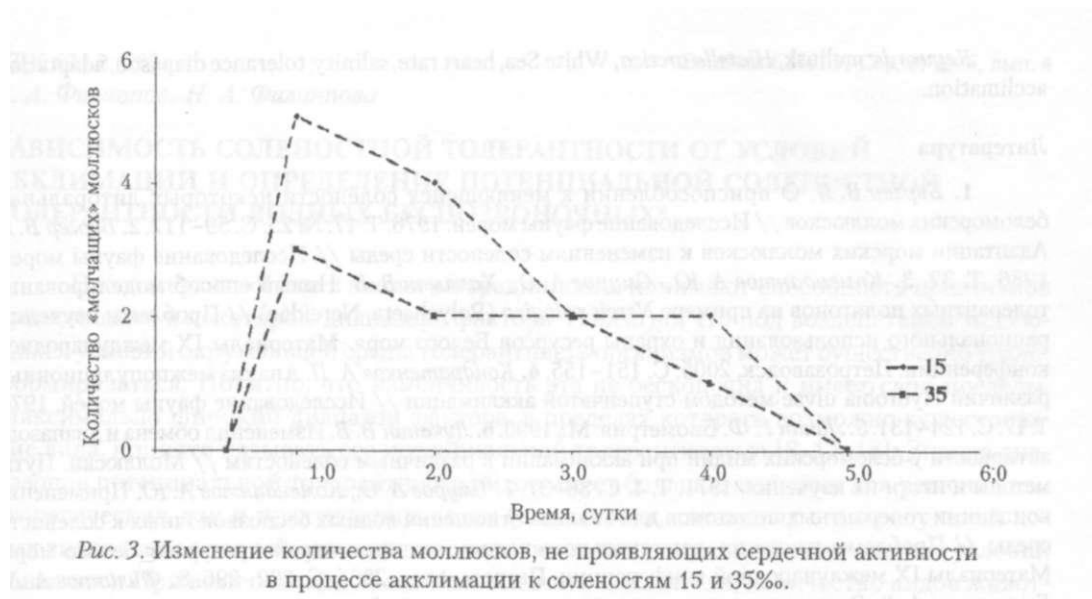


Рис. 2. Изменение частоты сердечных сокращений (ЧСС) *H. arctica* в процессе акклимации и деакклимации (указано стрелкой) к соленостям 15 и 35 ‰ (А) и 20 и 30 ‰ (Б).

как фазный характер, зависимость амплитуды отклика от величины воздействия и обратимость.

В процессе адаптации *H. arctica* к изменению солености среды мы наблюдали: фазный характер изменения частоты сердечных сокращений в ответ на изменение среды, соответствующие сроки нормализации функции (в течение 1-2 недель), явление деадаптации, протекающее аналогично процессу адаптации. Все перечисленные выше критерии, отличающие акклимацию от других адаптационных процессов, имеют место при адаптации *H. arctica* к изменению солености среды. Поэтому мы полагаем возможным рассматривать процесс восстановления сердечной деятельности у моллюсков в ответ на изменение солености среды как акклимацию.



По-видимому, выбор сердечной активности в качестве исследуемой функции при акклимации сублиторальных моллюсков к изменениям факторов среды выглядит более оправданным, чем применявшаяся нами ранее [9] степень выдвинутости сифонов.

Согласно полученным ранее данным, диапазон активности моллюсков, акклимированных к разной солености среды, уже через одни сутки экспозиции примерно соответствовал границам толерантности, определенным по 100%-ной выживаемости [9]. Это обстоятельство позволило определить потенциальный соленостный толерантный диапазон *H. arctica*, который практически совпал с полученным нами. Быстрое, в течение суток, восстановление активности, оцениваемой по степени выдвинутости сифонов, не позволяет рассматривать ее как акклимацию.

Необходимо отметить одно ограничение использования сердечной активности в качестве тестовой функции при исследовании акклимации. Данные, полученные для литоральных и сублиторальных *M. edulis*, обнаружили значительную динамику частоты сердечных сокращений в течение суток [12]. Моллюски, обитающие только в условиях сублиторали, должны иметь гораздо менее выраженную динамику этой функции, как это показано нами для *H. arctica*.

Summary

Komendantov A.Yu., Bakhmet I.N., Smurov A.O., Khalaman V.V. The effect of salinity change on the heart rate and salinity tolerance of *Hiatella arctica* L. (Bivalvia, Heterodonta).

Adaptive abilities of White Sea mollusk *Hiatella arctica* L. to change environment salinity are investigated. Salinity tolerance ranges for certain values of acclimation salinity are determined. The obtained data are used for constructing salinity tolerance polygon and estimating potential salinity range. According to the obtained results *H. arctica* can exist in the range of 14-40‰. In addition the heart rate is monitored by a non-invasive method for some days of acclimation salinity. It is shown that mollusks react by changing heart rate after salinity changing. The changing of heart rate has oscillatory character and is stabilized during several days. Returning mollusks to initial conditions results in a new authentic change of heart rate. The subsequent normalization of heart activity is finished within 4 days after the beginning of deacclimation.

Keywords: mollusk, *Hiatella arctica*, White Sea, heart rate, salinity, tolerance diapason, adaptation, acclimation.

Литература

1. Бергер В. Я. О приспособлении к меняющейся солености некоторых литоральных беломорских моллюсков // Исследование фауны морей. 1976. Т. 17. № 25. С. 59-112.
2. Бергер В. Я. Адаптации морских моллюсков к изменениям солености среды // Исследование фауны морей. 1986. Т. 32. № 3.
3. Комендантов А.Ю., Смуров А.О., Халаман В.В. Новый способ моделирования толерантных полигонов на примере *Nereis pelagica* (Polychaeta, Nereidae) // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря. Материалы IX международной конференции. Петрозаводск, 2005. С. 151-155.
4. Кондратенков А.П. Анализ межпопуляционных различий *Hydrobia ulvae* методом ступенчатой акклимации // Исследование фауны морей. 1976. Т. 17. С. 124-131.
5. Лакин Г.Ф., Биометрия. М., 1990.
6. Луканин В.В. Изменения обмена и диапазона активности у беломорских мидий при акклимации к различным соленостям // Моллюски. Пути, методы и итоги их изучения. 1971. Т. 4. С. 36-37.
7. Смуров А.О., Комендантов А.Ю. Применение концепции толерантных полигонов для анализа отношения водных беспозвоночных к солености среды // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря. Материалы IX международной конференции. Петрозаводск, 2005. С. 292-296.
8. Филиппов А.А., Герасимова А. В. Влияние акклимации на соленостную устойчивость мерцательного эпителия мидии *Mytilus edulis* L. // VIII региональная научно-практическая конференция «Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря». Тезисы докладов. 16-18 апреля 2001 г. Беломорск, Республика Карелия. Архангельск, 2001. С. 224-225.
9. Филиппов А.А., Комендантов А.Ю., Халаман В.В. Соленостная толерантность беломорского моллюска *Hiatella arctica* (Bivalvia, Heterodonta) // Зоол. журн. 2003. Т. 82. № 8. С. 913-918.
10. Хлебович В. В., Кондратенков А. П. Потенциальная эвригалинность беломорского моллюска *Hydrobia ulvae* // Моллюски. Пути, методы и итоги их изучения. 1971. Т. 4. С. 37-38.
- ii. Хлебович В. В. Акклимация животных организмов. Л., 1981.
12. Bakhmet I.N., Berger V.Ja., Khalaman V.V. The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones // J. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 318. N 2. P. 121-126.
13. Beitinger L. T., Bennett A. W. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes // Environ. Biol. of Fish. 2000. Vol. 58. P. 277-288.
14. Damgaard R.M., Davenport J. Salinity tolerance, salinity preference and temperature tolerance in the high-shore harpacticoid copepod *Tigriopus brevicornis* // Marine biology. 1994. Vol. 118. P. 443-449.
15. De Pirro M., Santini G., Chelazzi G. Cardiac responses to salinity variations in two differently zoned Mediterranean limpets // J. Comp. Physiol. B. 1999. Vol. 169. Iss. 7. P. 501-506.
16. 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. 1991. Vol. 96. P. 474-477.
17. Filippov A. A. On the method for estimating the salinity tolerance of water invertebrates // Russian J. Ecology. 1998. Vol. 29. N 4. P. 253-257.
18. Orlova M.I., Khlebovich V.V., Komendantov A.Yu. Potential eurihalinity of *Dreissena polymorpha* (Pallas) and *Dreissena bugensis* (Andr.) // Russian J. Aquatic Ecology. 1998. Vol. 7. P. 17-28.
19. Pora E.A. Problemes de physiologie animale dans la Mer Noire // Bulletin de L'Institut Oceanographique [de Monaco]. 1946. N 903. P. 1-43.
20. Santini G., Williams G. A., Chelazzi G. Assessment of factors affecting heart rate of the limpet *Patella vulgata* on the natural shore // Marine Biology. 2000. Vol. 137. P. 291-296.
21. Smurov A.O., Fokin S.I. Resistance of *Paramecium* species (Ciliophora, Peniculia) to salinity of environment // Protistology. 1999. Vol. 1. P. 43-53.
22. Smurov A.O., Fokin S.I. Use of salinity tolerance data for investigation of phylogeny of *Paramecium* (Ciliophora, Peniculia). Protistology. 2001. Vol. 2. P. 130-138.