

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

*На правах рукописи*

Саидов Даниял Магомедович

**КРИТЕРИЙ ТОКСИЧНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНО-ЛИЧИНОЧНОГО  
ТЕСТИРОВАНИЯ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ**

1.5.16 – Гидробиология

диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

научный руководитель:  
к.б.н., доцент, Косевич Игорь Арнольдович

Москва – 2023

## Содержание

Введение.....	5
1. Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	5
2. Цели и задачи.....	7
3. Положения, выносимые на защиту.....	7
4. Объект и предмет исследования .....	8
5. Научная новизна исследования.....	8
6. Теоретическая и практическая значимость исследования .....	9
7. Методология диссертационного исследования.....	9
8. Личный вклад автора .....	10
9. Степень достоверности и апробация результатов исследования .....	10
10. Структура и объем диссертации .....	12
Обзор литературы.....	13
1. Эмбриональное и личиночное развитие <i>Mytilus edulis</i> .....	13
1.1 Развитие от яйцеклетки до раннего велигера .....	13
1.2 Завершение развития и строение раннего велигера (D-велигера).....	18
1.3 Особенности формирования личиночной раковины .....	23
1.4 Заключение .....	28
2. Эмбрионально-личиночное тестирование двустворчатых моллюсков.....	29
2.1 Общие положения .....	29
2.2 Порядок проведения.....	29
2.3 Условия проведения.....	30
2.4 Получение гамет.....	31
2.5 Продолжительность и кормление .....	32
2.6 Контроль.....	33
2.7 Критерии токсичности .....	34
2.8 Расчёт уровня воздействия .....	36
3. Эмбрионально-личиночное тестирования морских ежей .....	39
3.1 Общие положения .....	39
3.2 Критерии токсичности .....	39
3.3 Расчёт уровня воздействия .....	43
3.4 Заключение .....	45
4. Особенности воздействия негативных факторов при проведении ЭЛТ .....	47
4.1 Воздействие на динамику развития.....	47

4.2 Тяжелые металлы .....	48
4.3 Закисление мирового океана .....	51
4.4 Восстановление после негативного воздействия .....	58
Материалы и методы.....	62
1. Объект исследования .....	62
2. Проведение экспериментов .....	62
3. Световая микроскопия.....	64
4. Исследование анатомии личинок. ....	64
5. Статистические методы .....	65
Результаты.....	68
1. Эксперименты по токсическому воздействию .....	68
2. Оценка способности к восстановлению .....	71
2.1 Выживаемость .....	71
2.2 Динамика соотношений морфотипов.....	73
2.3 Рост и размеры.....	75
3. Кластерный анализ эффектов воздействия.....	78
4. Прогностическое моделирование .....	79
5. Особенности анатомии личинок .....	80
5.1 Особенности строения прямозамкового велигера (D-велигера).....	80
5.2 Особенности строения велигеров с "выступающей мантией" (PM).....	83
5.3 Особенности строения велигеров с "седловидным замком" (CH).....	85
5.4 Особенности строения "асимметричных" личинок (A).....	86
Обсуждение результатов .....	88
1. Воздействие $K_2Cr_2O_7$ .....	88
1.1 Особенности токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$ .....	88
1.2 Динамика соотношения морфотипов как показатель негативного воздействия.....	90
2. Отмывка и реабилитация .....	93
2.1 Изменение соотношения морфотипов.....	93
2.2 Выживаемость .....	94
2.3 Рост и размеры.....	94
3. Особенности анатомии личинок .....	96
3.1 "Выступающая мантия" .....	96
3.2 "Седловидный замок" .....	97
3.3 "Асимметрия" .....	98

4. Оценка критериев токсического воздействия и их пересмотр.....	99
Выводы.....	106
Список литературы .....	108
Приложение .....	116

## Введение

### 1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

Глобальные изменения климата, усиливающееся антропогенное воздействие на окружающую среду ставит перед человечеством множество серьезных задач. Среди них – необходимость оценки и прогнозирования результатов длительного и кратковременного воздействия на экосистемы, включая биоразнообразие. Во многих случаях решение этих задач затрудняется недостаточностью инструментария для проведения оценочных мероприятий и отсутствием обоснованных критериев оценки негативного воздействия. В большинстве случаев оценка негативного антропогенного воздействия на окружающую среду основана на методах биотестирования, результаты которых зачастую не позволяют обосновывать долгосрочные прогнозы.

Эмбрионально-личиночное тестирование с использованием двустворчатых моллюсков на сегодняшний день является одним из наиболее часто используемых методов биотестирования для оценки негативного воздействия окружающей среды (Boukadida et al., 2016; Brenko et al., 1977; Courtright et al., 1971), воздействия химических веществ (Martin et al., 1981; Nadella et al., 2009; Малахов и Медведева, 1991) и даже влияние закисления океана вследствие увеличения выбросов углекислого газа в атмосферу (Andersen et al., 2013; Gazeau et al., 2007; Kurihara et al., 2008, 2007). Данный тест рекомендован как общепринятый протокол тестирования при оценке воздействия на морские экосистемы (ASTM, 2012a; USEPA, 2016).

Показателями негативного воздействия при проведении тестирования являются как низкая выживаемость личиночных стадий во время теста, так и высокая доля особей, развивающихся с морфологическими отклонениями (ASTM, 2012a; His et al., 1999a). Если низкая выживаемость достаточно однозначно демонстрирует эффект негативного воздействия, то доля особей, развивающихся с морфологическими отклонениями, может значительно варьировать в зависимости от принятых критериев оценки отклонений. Согласно общепринятой классификации, личинок, сформировавшихся во время проведения эмбрионально-личиночного биотестирования и зафиксированных по его окончании, принято делить на шесть морфологических классов (в дальнейшем - морфотипов): D-велигер (типичная личинка двустворчатого моллюска, развивающаяся без негативного воздействия), велигер с выемкой на краю раковины, велигер с выступающей мантией, велигер с седловидным замком раковины, трохофорная личинка и личинка с несформированной раковинной. Авторы, придерживающиеся наиболее строгих критериев оценки отклонений (His et al., 1997; Krasso et al., 1997), считают, что в качестве нормальной личинки по

окончании можно рассматривать только D-велигер с полностью развитой, идеально симметричной раковиной и парусом мягких тканей. Любые визуальные морфологические отклонения мягких тканей или асимметричность раковины необходимо расценивать как аномалию. Сторонники менее строгих критериев допускают наличие морфологических отклонений в строении D-велигера по окончании тестирования, в особенности в форме раковины или её размеров, принимая за ключевую характеристику наличие полностью сформированной D-образной раковины (ASTM 2012a; USEPA 2016). Современные методики и протоколы придерживаются как более, так и менее строгих критериев, и вопрос выбора между данными критериями остаётся открытым (ASTM, 2012a; Leverett and Thain, 2013). Учитывая особенности подсчета результатов (фиксированный материал), использование различных критериев оценки морфологических отклонений от "нормы" будет оказывать огромное влияние на конечный результат эмбрионально-личиночного тестирования с использованием двустворчатых моллюсков.

Сложность выбора между строгими и менее строгими критериями оценки морфологических отклонений личинок двустворчатых моллюсков можно объяснить по крайней мере двумя причинами. Во-первых, до сих пор не изучено тонкое строение личинок, сформировавшихся во время проведения эмбрионально-личиночного биотестирования и характеризующихся наличием морфологических отклонений. Это затрудняет сравнение анатомии таких личинок с таковой типичных D-велигеров, и не позволяет различать реальные патологии развития и особенности фиксации. Во-вторых, не известна дальнейшая судьба личинок после окончания кратковременного воздействия. Вполне вероятно, что некоторые типы личинок с морфологическими отклонениями обладают способностью к дальнейшему развитию с восстановлением нормального строения. Следовательно, дополнительные исследования в этих двух направлениях помогут решить вопрос о разделении личинок, сформировавшихся во время тестирования, на особей с остановкой развития и особей с задержкой в развитии, что сделает результаты тестирования более точными и обоснованными. Кроме того, использование уточненного критерия негативного воздействия увеличит обоснованность и достоверность долгосрочных прогнозов кратковременных воздействий на окружающую среду.

## 2. Цели и задачи

Целью данной работы было обоснование критерия токсического воздействия в эмбрионально-личиночном тесте *Mytilus edulis* [Linnaeus, 1758] с учетом способности личинок к восстановлению после негативного воздействия

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение эмбрионально-личиночного тестирования для комплексной оценки токсического воздействия ряда концентраций модельного токсиканта  $K_2Cr_2O_7$  на раннее эмбриональное развитие *M. edulis*.
2. Анализ морфологических особенностей личинок *M. edulis*, развивавшихся при различных уровнях негативного воздействия в ходе эмбрионально-личиночного тестирования с применением модельного токсиканта.
3. Оценка выживаемости и способности личинок с морфологическими отклонениями, полученных в результате токсического воздействия при проведении эмбрионально-личиночного тестирования, к восстановлению типичной D-образной формы раковины.
4. Изучение тонкого строения и особенностей анатомии личинок с выявленными морфологическими отклонениями.
5. Разработка и обоснование критерия токсичности, который учитывает особенности строения и способность к восстановлению личинок *M. edulis*.

## 3. Положения, выносимые на защиту

1. При различных уровнях негативного воздействия соотношения долей нормальных велигеров и личинок с различными вариантами морфологических отклонений различны и тесно связаны с уровнем негативного воздействия.

2. Личинки с морфологическими отклонениями имеют принципиальную возможность для восстановления нормального строения раковины.

3. Значимое повышение уровня личиночной смертности коррелирует с уровнем воздействия, при котором по окончании воздействия полностью отсутствуют личинки со сформированной раковинной, наличие которой может рассматриваться как маркер обратимости воздействия.

4. Обнаружены следующие особенности тонкого строения личинок с морфологическими отклонениями:

а. личинки с "выступающей мантией" представляют собой прямозамковые велигеры, зафиксированные на различных стадиях ретракции вельюма, а выступающие за пределы раковины ткани являются тканями вельюма;

б. личинки с "седловидным замком" раковины имеют протяженные зияющие участки раковины с передней и задней сторон замкового края, не скрепленные лигаментом, что и обуславливает особенность их морфологии;

в. основной особенностью "асимметричных" личинок является несоответствие степени развития раковины и висцеральной массы; ввиду небольших размеров раковины и развитой пищеварительной системы личинки имеют недостаточный для полной ретракции вельюма объем мантийной полости.

5. Обоснована необходимость использования критерия оценки воздействия, учитывающего способность личинок после кратковременного негативного воздействия к дальнейшему развитию. Предложенный D-индекс увеличивает качество оценки уровня воздействия, и может быть использован в качестве критерия токсичности при эмбрионально-личиночного тестирования двустворчатых моллюсков.

#### 4. Объект и предмет исследования

Объектом исследования является двустворчатый моллюск *Mytilus edulis*. Предмет исследования – влияние кратковременного воздействия модельного токсиканта  $K_2Cr_2O_7$  на раннее эмбриональное развитие *M. edulis*. В работе уделяется внимание анализу изменения соотношения долей личинок с морфологическими отклонениями в зависимости от концентрации токсиканта, анализу изменения анатомии личинок под воздействием токсиканта и оценке выживаемости и способности личинок с морфологическими отклонениями к восстановлению типичного строения.

#### 5. Научная новизна исследования

Впервые показана фундаментальная способность велигеров двустворчатых моллюсков *M. edulis* к восстановлению строения D-образной раковины после кратковременного негативного воздействия концентраций бихромата калия. Восстановление строения и развития наблюдается даже после воздействия концентраций модельного токсиканта, превышающего  $EC_{50}$ . На основании данных по посттравматической смертности показана прямая корреляция между наличием раковины у личинок с морфологическими отклонениями, сформировавшихся при кратковременном воздействии модельного токсиканта, и значимым уровнем смертности после снятия негативного воздействия. Впервые описано тонкое строение личинок с выраженными морфологическими отклонениями, такими как "выступающая мантия", "седловидный замок" раковины и их

комбинации. Предложена модель и обоснован критерий оценки воздействия в эмбрионально-личиночном тестировании двустворчатых моллюсков, увеличивающие точность классификации различных уровней негативного воздействия.

#### 6. Теоретическая и практическая значимость исследования

Оценка способности подверженных кратковременному негативному воздействию тест-объектов к восстановлению имеет важный биологический смысл, поскольку большинство техногенных катастроф приводит к резкому, но непродолжительному негативному воздействию на окружающую среду. Краткосрочные тесты, применяемые в настоящее время в биотестировании, в большинстве своем основаны на использовании критериев, не учитывающих возможность дальнейшего развития подвергшихся негативному воздействию организмов. Вместе с тем, именно возможность восстановления организмов после негативного воздействия может служить мерой его тяжести и позволяет оценить долгосрочные последствия такого воздействия на экосистему.

Все вышеуказанное касается и тестирования на эмбриональных или личиночных этапах развития, негативное воздействие на которые может вызывать как задержку, так и остановку в развитии. Следовательно, оценка возможности восстановления личиночных стадий многоклеточных организмов после различных степеней негативного воздействия позволяет решить целый ряд теоретических и практических вопросов. Изучение тонкого строения подверженных негативному воздействию особей (в особенности с предполагаемыми патологиями) позволяет детальнее разобраться в обоснованности применяемых критериев. Ряд морфологических аномалий может быть обусловлен не столько реальным негативным воздействием, сколько методическими причинами - особенностью фиксации и подсчета особей в тесте.

Построенные модели и обоснование использования критерия оценки кратковременного воздействия модельного токсиканта на личиночное развитие двустворчатых моллюсков создают основу для дальнейших исследований с целью разработки критериев оценки и долгосрочного моделирования последствий воздействий различного типа на окружающую среду.

Информация об эмбрионально-личиночном тестировании двустворчатых моллюсков и морских ежей, обобщенная в литературном обзоре, может быть использована в качестве методического пособия при проведении курсов лекций и практик для студентов кафедр общей экологии и гидробиологии, зоологии беспозвоночных и эмбриологии.

#### 7. Методология диссертационного исследования

Методологической основой настоящего исследования является комплексный подход к анализу кратковременного негативного влияния модельного токсиканта на эмбрионально-

личиночное развитие мидии. Эксперименты проведены с использованием стандартных методов сбора и содержания живого материала, получения половых продуктов и оплодотворения. Постановка токсикологических экспериментов осуществлена с учетом действующих рекомендаций. Первоначальный анализ результатов проведен с применением методов световой микроскопии и гистологических методов (изучение морфологии личинок, фиксация и заключение объектов, подготовка серий гистологических срезов, анализ серий гистологических срезов), и использования искусственной нейронной сети в анализе и количественной обработке данных биотестирования. Полученные данные проанализированы с применением различных статистических методов анализа и методов математического моделирования.

#### 8. Личный вклад автора

Автором диссертации совместно с научным руководителем разработан план исследования и проведен анализ полученных результатов. Автором диссертации получены все данные, представленные в работе. Автором выполнен анализ литературных источников. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, сбор, подготовку и обработку материала. Исследования морфологии и анатомии личинок и статистическая обработка результатов проведены автором. При подготовке публикаций автором была проведена значительная работа над текстом статей, подготовка иллюстраций, а также переписка с редакторами и рецензентами.

#### 9. Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, полученных в диссертационной работе, обеспечивается корректным использованием современных методов исследования. При постановке экспериментов были соблюдены все основные требования (стандарты) к проведению биотестирования, эксперименты проведены с необходимой повторностью и объемами выборок. Используются стандартные методы гистологических исследований. Фотоизображения и микрофотографии, полученные в ходе исследований, подвергались незначительной корректировке яркости и контрастности, затрагивающей все пиксели изображений. Используются адекватные статистические методы.

Результаты исследования были представлены на всероссийских и международных конференциях:

1. XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2013", МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 8-12 апреля 2013;
2. Морские биологические исследования: достижения и перспективы, Севастополь, Россия, 19-24 сентября 2016;

3. Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ – НОВЫЙ ВЕК», Москва, Россия, 19-21 декабря 2018;

По результатам исследования опубликовано 3 статьи в научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI, а также 3 тезисов докладов конференций в сборниках, входящий в списки цитирования

Публикации в научных журналах:

1. **Саидов Д. М.**, Косевич И. А. Влияние тяжелых металлов (Cu, Co, Cd) на раннее развитие *Mytilus edulis* (Mollusca; Bivalvia) // Экология. — 2019. — № 1. — С. 55–61.  
**Saidov D. M.**, Kosevich I. A. Effect of heavy metals (Cu, Co, Cd) on the early development of *Mytilus edulis* (Mollusca; Bivalvia) // Russian Journal of Ecology. — 2019. — Vol. 50, no. 1. — P. 58–64.
2. **Saidov D. M.**, Kosevich I. A. Rehabilitation of *Mytilus edulis* larvae abnormalities induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in short-term experiments // Ecotoxicology. — 2021. — Vol. 30, no. 6. — P. 1242–1250.
3. Мостовщикова П. С., **Саидов Д. М.**, Косевич И. А. Отклонения в строении эфир при химической индукции стробилиации у *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) // Онтогенез. — 2022. — Т. 53, № 2. — С. 1–18.  
Mostovshchikova P. S., **Saidov D. M.**, Kosevich I. A. Morphological deviations in ephyrae after chemical induction of strobilation in *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) // Russian Journal of Developmental Biology. — 2022. — Vol. 53, no. 2. — P. 82–98.

Подготовка к публикации полученных результатов в научных трудах [1, 3] проводилась совместно с соавторами. Вклад автора в научных трудах [3] составляет 1/3. В научных трудах [1] и [2] вклад автора определяющий.

Прочие публикации:

1. Саидов Д. М. Влияние солей тяжелых металлов на раннее развитие двустворчатых моллюсков (Mollusca, Bivalvia) // Материалы Международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2013 / Под ред. А. Андреев, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов, М. Чистякова. — Москва: Москва, 2013. — С. 127–128.
2. Саидов Д. М., Косевич И. А. Особенности раннего развития *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia) в применении к биотестированию // Зоология беспозвоночных – Новый Век: материалы конференции, посвященной 160-летию Кафедры зоологии беспозвоночных Биологического

факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (19-21 декабря 2018 г.) / Под ред. И. И. Гордеев. — Москва, 2018. — С. 109.

3. Саидов Д. М., Саидов Г. М. Использование искусственной нейронной сети в анализе и количественной обработке данных биотестирования // Морские биологические исследования: достижения и перспективы: в 3-х т.: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции. — Т. 1. — ЭКОСИ-Гидрофизика Севастополь, 2016. — С. 279–281.

#### 10. Структура и объем диссертации

Текст работы изложен на 120 страницах и состоит из введения, четырех глав: обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение результатов, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 100 источников, из которых 5 представлены русскоязычными источниками, а 95 источниками на иностранном языке.

## Обзор литературы

### 1. Эмбриональное и личиночное развитие *Mytilus edulis*

Исследования, посвященные эмбриональному и личиночному развитию двустворчатых моллюсков, известны начиная с конца 19 века, во многом благодаря работе Мейзенхаймера по исследованию эмбрионального и личиночного развития *Dreissena polymorpha* [Pallas, 1771] (Meisenheimer, 1901). Во второй половине 20-го века исследования эмбрионального и личиночного развития были выполнены на многих видах двустворчатых моллюсков, например, таких как *Ostrea edulis* [Linnaeus, 1758] (Waller, 1981), *Spisula soldissima* [Dillwyn, 1817] (Eyster and Morse, 1984), *Mytilus galloprovincialis* [Lamarck, 1819] (Kniprath, 1980) и многих других (Kniprath, 1981). Одним из наиболее ранних исследований эмбрионального развития *M. edulis* была работа Филда (Field, 1922), в которой автор достаточно подробно описывает начальные этапы развития моллюска. Позднее, эмбриональное развитие *M. edulis* было детально изучено в работах Малахова и Медведевой (Малахов и Медведева, 1991, 1985), данные из которых легли в основу настоящего обзора.

#### 1.1 Развитие от яйцеклетки до раннего велигера

##### 1.1.1 Дробление

Половозрелые особи *M. edulis* вымётывают во время нереста в морскую воду яйцеклетки, которые имеют немного неправильную, но близкую к сферической форму. Сразу после оплодотворения яйцеклетки начинают менять форму, округляясь одновременно с отделением оболочки оплодотворения и миграцией ядра спермия внутрь клетки. Филд (Field, 1922) в своей работе отметил появление первого полярного тельца примерно через 15-20 минут после оплодотворения, второго – еще через 10-20 минут (автор не предоставляет данных о температуре) (рис. 1, б). Место отделения полярных телец маркирует анимальный полюс зародыша. После отделения полярных телец следует период покоя, продолжительность которого составляет от 20 минут (Field, 1922) до одного часа (Малахов и Медведева, 1985). Первое деление дробления начинается с выпячивания на вегетативном полюсе яйцеклетки грушевидной лопасти прозрачной цитоплазмы - первой полярной лопасти (рис. 1, в-г). Круговая борозда первого деления дробления появляется с некой задержкой по отношению к началу формирования полярной лопасти. Сформированная полярная лопасть связана с основной массой цитоплазмы только перетяжкой. По размеру полярная лопасть эквивалентна каждому из двум новообразующимся бластомерам. По мере завершения первого деления дробления лопасть сливается с одним из формирующихся бластомеров, объем которого в результате вдвое превышает объем другого (рис. 1, д).

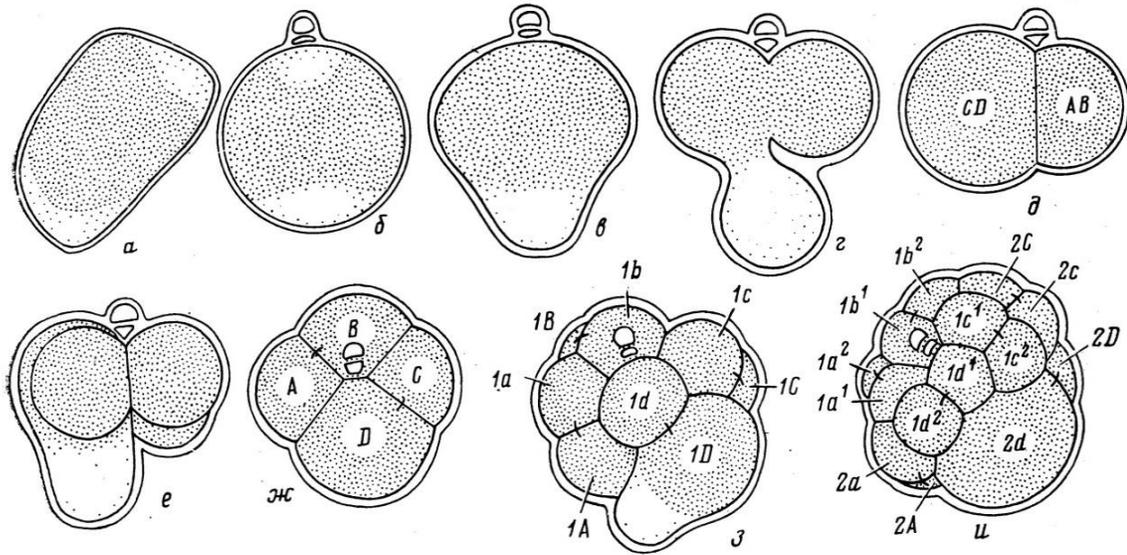


Рисунок 1. Дробление яйца *Mytilus edulis*: а – яйцеклетка сразу после вымета, б – выделение полярных телец, в – начало первого деления, г – завершение первого деления, д – стадия двух бластомеров, е – завершение второго деления, ж – стадия четырех бластомеров, з – завершение третьего деления, и – стадия 16 бластомеров (Малахов и Медведева, 1985).

Больший бластомер принято называть CD, а меньший AB (Field, 1922; Малахов и Медведева, 1985). Второе деление дробления начинается с образования на вегетативном полюсе бластомера CD второй полярной лопасти, которая в конце второго деления сливается с одним из потомков бластомера CD – клеткой D. В результате Бластомер D значительно выделяется размером среди первого квартета бластомеров зародыша (рис. 1, ж). Третье деление дробления начинается с образования на вегетативном полюсе бластомера D третьей полярной лопасти. Бластомер D делится раньше других бластомеров зародыша на более крупный вегетативный бластомер 1D, с которым сливается третья полярная лопасть, и меньший анимальный бластомер 1d. Вслед за бластомером D делится бластомер C, затем бластомеры A и B. Третье деление дробления приводит к формированию первого квартета микромеров 1a, 1b, 1c, 1d и первого квартета макромеров 1A, 1B, 1C, 1D (рис. 1, з).

Четвертое деление дробления начинается с деления бластомера 1D на две неравные клетки: более крупную 2d и меньшую 2D. Спустя 4-5 минут начинают равномерно делиться все остальные бластомеры зародыша (рис. 1, и). Четвертым делением дробления заканчиваются синхронные деления бластомеров. Бластомер 2d далее делится несколько раз неравномерно, отделяя от себя мелкие клетки. Остальные бластомеры зародыша делятся равномерно и постепенно обрастают единственную крупную клетку зародыша, представляющую собой бластомер X- потомок бластомера 2d (см. рис. 2, а).

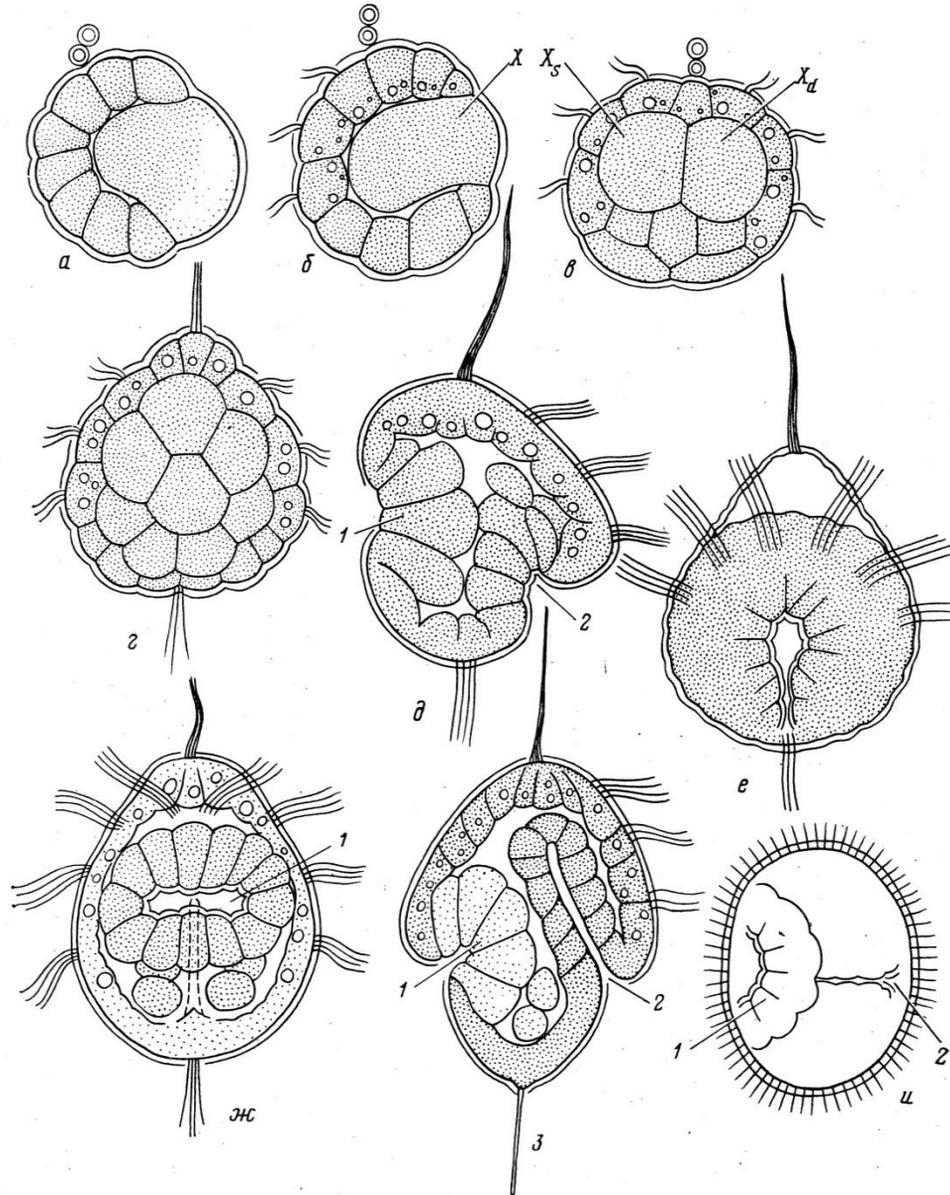


Рисунок 2. Формирование стерробластулы и конхостомы у *Mytilus edulis*: а – стадия 32 бластомеров; б, в – стерробластула; г – личинка с четырехклеточным зачатком раковинной железы; д, е – гастрюляции; ж, з, и – конхостома; а, б, д, з – саггитальный оптический срез; в, г, ж – вид со спинной стороны; е – вид со стороны бластопора; и – вид с вегетативного полюса; 1 – зачаток раковинной железы, 2 – бластопор (Малахов и Медведева, 1985).

В окружении более мелких бластомеров бластомер X делится еще раз, образуя два бластомера  $X_s$  и  $X_d$ , из потомков которых в дальнейшем формируется раковинная железа. На этом этапе личинка представляет собой ресничную стерробластулу (рис 2, б-в). Время развития зародыша до формирования стерробластулы (рис. 2, г) различается по данным разных авторов и составляет от

4.5-5 часов (Field, 1922) до 9-10 часов (Малахов и Медведева, 1985). Различия в скорости развития связаны, скорее всего, с разной температурой воды в местах обитания двустворки в период размножения. Подвижность стерробластулы обеспечивается за счет биения ресничек трёх рядов ресничных клеток, происходящих от бластомеров  $1a^2-1d^2$ . Подвижная стерробластула при этом всё еще покрыта остатками оболочки оплодотворения, которую пронизывают реснички. Полярные тельца при этом сохраняются на анимальном полюсе плавающей личинки и лишь спустя некоторое время отпадают. (Малахов и Медведева, 1991).

### 1.1.2 Гастрюляция и формирование конхостомы

Гастрюляция начинается через 14-15 часов после оплодотворения (Малахов и Медведева, 1985) и протекает в форме инвагинация (рис. 2, *и*). По завершении гастрюляции на поверхности зародыша видна бороздка, которая тянется от вегетативного полюса на вентральную сторону зародыша. На её конце, расположенном на вентральной стороне зародыша, различимо небольшое отверстие, которое связывает новообразованный архентерон с внешней средой – бластопор (рис. 2, *з*). На этом этапе в полости тела личинки также можно различить потомки мезодермального бластомера  $4d$  (рис. 2, *з*). Еще до начала гастрюляции бластомеры  $X_s$  и  $X_d$  равномерно делятся, формируя зачаток раковинной железы. Так как  $X$ -бластомер был окружен клетками, то и сформированный зачаток раковинной железы оказывается погруженным в тело личинки (рис. 2, *д*). Этот зачаток образован крупными клетками, расширенные апикальные части которых занимают большую часть полости зародыша. Узкими апикальными частями клетки окаймляют небольшую полость зачатка раковинной железы, которая связана с внешней средой широкой поперечной щелью – конхостомом. В морфологическом отношении такая личинка отличается от типичной трохофорной личинки глубоко впяченной раковинной железой и носит специальное название – **конхостома** (рис. 2, *ж*) (Малахов и Медведева, 1985). На этом этапе активно плавающая личинка характеризуется значительным увеличением ресничного покрова и появлением апикального и каудального пучка чувствительных жгутиков (рис 2 *ж*, *з*). В течении последующих 18-20 часов общая организация конхостомы *M. edulis* остается практически неизменной и только на поздних этапах развития органическая раковинка становится видна через отверстие раковинной железы (Малахов и Медведева, 1991).

### 1.1.3 Формирование велигера

Стадия конхостомы завершается выворачиванием зачатка раковинной железы, которое приводит к значительным перестройкам в организации личинки (рис 3). В результате область

вегетативного полушария личинки сдвигается на брюшную сторону и личинка приобретает морфологию типичной трохофоры (рис 3, б).

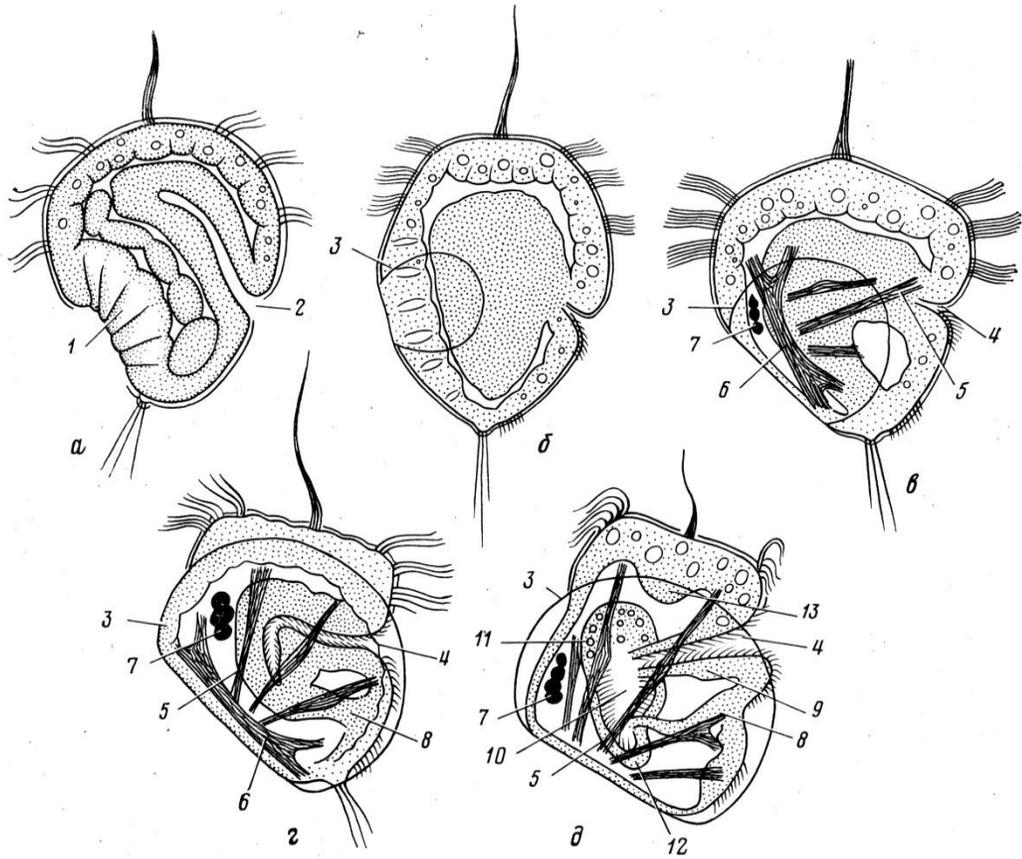


Рисунок 3. Выворачивание раковинной железы и формирование велигера у *Mytilus edulis*: а – выворачивание раковинной железы, б – начало формирования раковины, в-д – последовательные этапы формирования велигера; 1 – зачаток раковинной железы, 2 – бластопор, 3 – раковина, 4 – ротовое отверстие, 5 – личиночные ретракторы, 6 – продольные мышцы, 7 – передний аддуктор, 8 – задняя кишка, 9 – пищевод, 10 – желудок, 11 – зачаток печени, 12 – слепой вырост желудка, 13 – зачаток церебрального ганглия (Малахов и Медведева, 1985)

По мере увеличения пластинки личиночной раковины область, располагавшаяся у конхостомы между бластопором и отверстием раковинной железы, сдвигается на вентральную сторону и занимает теперь положение между ртом и задним концом тела (рис 3, в-г). Клетки вывернувшейся раковинной железы занимают область на спинной и на боковых сторонах личинки от ресничных колец до заднего конца тела личинки. Рот – производное бластопора, смещается вперед по брюшной стороне (рис 3, в). Кишечник изменяет свою ориентацию внутри личинки и прикрепляется бывшим слепым апикальным концом к эктодерме заднего конца тела (рис 3, г).

Передняя часть конхостомы разрастается в латеральных направлениях и приобретает уплощенную двулопастную форму, формируя велюм. Личиночная раковины, значительно увеличиваясь в размерах начинает полностью закрывать мягкие ткани личинки. Первоначально целая пластинка раковины расщепляется на две половинки на дорзальной стороне личинки, формируя D-образную раковину с прямым замковым краем (Малахов и Медведева, 1991). Из-за характерной формы раковины и наличия велюма данная стадия носит название прямозамкового **велигера** или **D-велигера** (рис 3, *д*).

### 1.2 Завершение развития и строение раннего велигера (D-велигера)

Важной особенностью строения велигера является наличие специфического личиночного органа локомоции – **велюма**, представляющего собой разрастание передней части конхостомы (эписферы трохофорной личинки). Центральная часть велюма представляет собой погруженное апикальное поле, не несущее длинных ресничек, за исключением апикального султанчика. По периферии велюм несет три ряда локомоторных ресничек, соответствующих трем рядам ресничек, обнаруживаемых у конхостомы *M. edulis* (Малахов и Медведева, 1991). Два верхних ряда представляют собой длинные реснички, отходящие от двух крупных клеток с большими базальными ядрами. Третье ресничное кольцо образовано широкой полоской коротких ресничек, сформированных вооружением более уплощенных клеток (Cragg, 1989; Малахов и Медведева, 1991).

Ранний велигер двустворчатых моллюсков обладает развитым сократительным аппаратом, включающего в себя мускулатуру ретракторов велюма и висцеральной массы, и мускулы аддукторы. Наиболее представленной на стадии раннего велигера является поперечнополосатая мускулатура ретракторов велюма, которая закладывается на стадии продиссоконха I (рис 4).

Мейзенхаймер (Meisenheimer, 1901), описывая мускулатуру велигера *D. polymorpha* выделяет три пары ретракторов – дорзальный, медиальный и вентральный. Все три пары мускулов прикреплены к внутренней поверхности раковины вдоль её замочного края в непосредственной близости друг от друга, расходясь в разные зоны велюма. Дорзальная и медиальная мышцы имеют сходный размер и форму, разделяясь на множество ветвей в зоне мягких тканей велюма, и различаются лишь расположением в теле личинки. Вентральный мускул значительно короче и меньше остальных ретракторов, и не имеет разветвления в зоне прикрепления к мягким тканям в районе анального отверстия (рис 4А, *вр*). В дополнении к основным мышечным пучкам, автор также указывает на наличие небольшой отдельной дорзальной ветви, которая также прикреплена в тканях велюма, недалеко от переднего мускула-аддуктора.

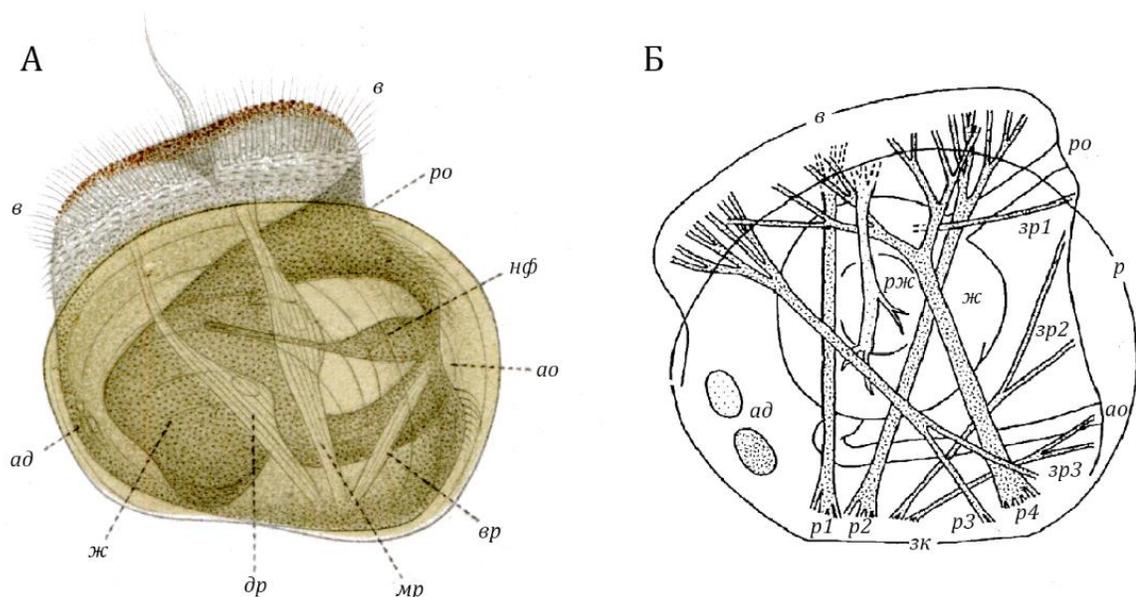


Рисунок 4. Мускулатура раннего велигера *Bivalvia* на примере *Dreissena polymorpha* (А) и *Pecten maximus* (Б). А – общее строение раннего велигера *D polymorpha* (Meisenheimer, 1901); Б – схема общего строения мускулатуры велигера *P. maximus* возрастом от 12 до 20 дней (Cragg, 1985). Условные обозначения: *ад* – мускул-аддуктор, *ао* – анальное отверстие, *в* – велюм, *вр* – вентральный ретрактор, *др* – дорзальный ретрактор, *ж* – желудок, *зк* – замковый край, *зр1-3* – задние(вентральные) ретракторы, *мр* – медиальный ретрактор, *нф* – нефридий, *р* – раковина, *р1-4* – ретракторы велюма, *рж* – ретрактор желудка, *ро* – ротовое отверстие.

Исследования, посвященные строению велигеров других видов двустворчатых моллюсков, свидетельствуют об аналогичной схеме строения мускулатуры, включающей три группы ретракторов: дорзальной, медиальной и вентральной (Cragg, 1985; Dyachuk and Odintsova, 2009; Kakoï et al., 2008; Odintsova et al., 2007). Так, Крагг (Cragg, 1985), после детального исследования процессов ретракции велигера *Pecten maximus* предложил следующую схему строения личиночной мускулатуры (рис 4Б). Автор описывает у личинок возрастом 12-20 дней четыре пары ретракторов велюма (рис 4Б, *р1-р4*), три пары вентральных ретракторов (рис 4Б, *зр1-3*), два передних мускула-аддуктора и небольшой гладкомышечный тяж, поддерживающий желудок. Одинцова с соавторами (Odintsova et al., 2007), описывая строение мускулатуры велигера *Mytilus trossulus* [Gould, 1850] возрастом 57 часов выделяет пять пар ретракторов, которые включают ретракторы велюма и вентральные ретракторы. В работе авторов явно показана поперечнополосатая природа веллярных

ретракторов, поскольку для выявления использованы антитела к твитчину (рис 5А). Аналогичное строение мускулатуры имеет и велигер *Saccostrea kegaki* [Torigoe & Inaba, 1981] (рис 5Б) (Kakoi et al., 2008). Таким образом, несмотря на то что число ретракторов возрастает по мере роста личинки, они все соответствуют группам ретракторов, выделенными Мейзенхаймером (Meisenheimer, 1901).

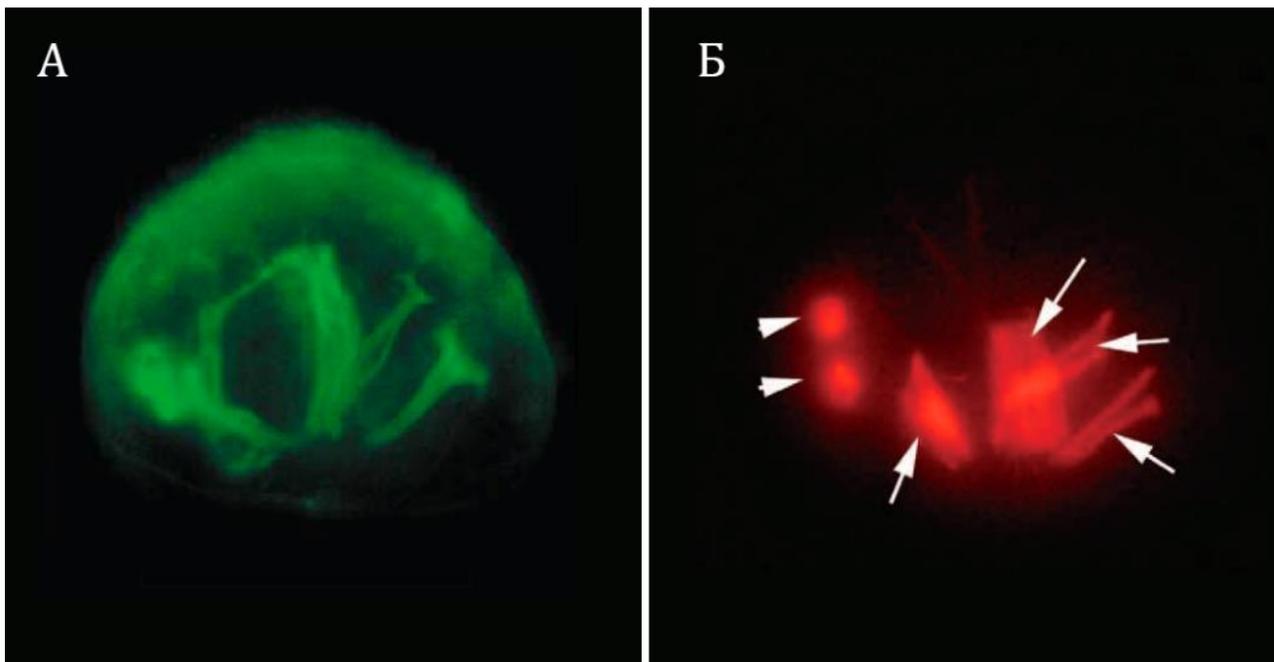


Рисунок 5. Иммуноцитохимическое окрашивание велигеров двустворчатых моллюсков: А - раннего велигера (57 часов) *Mytilus trossulus*, окраска антителами к твитчину, конъюгированными с флуоресцентной меткой (Odintsova et al., 2007); Б – раннего велигера (24 часа) *Saccostrea kegaki*, окраска фибриллярного актина фаллоидином, конъюгированным с флуоресцином (Kakoi et al., 2008).

Крагг (Cragg, 1985) предложил следующую схему ретракции/протракции вельюма велигера и работы мускулатуры при этом (рис. 6).

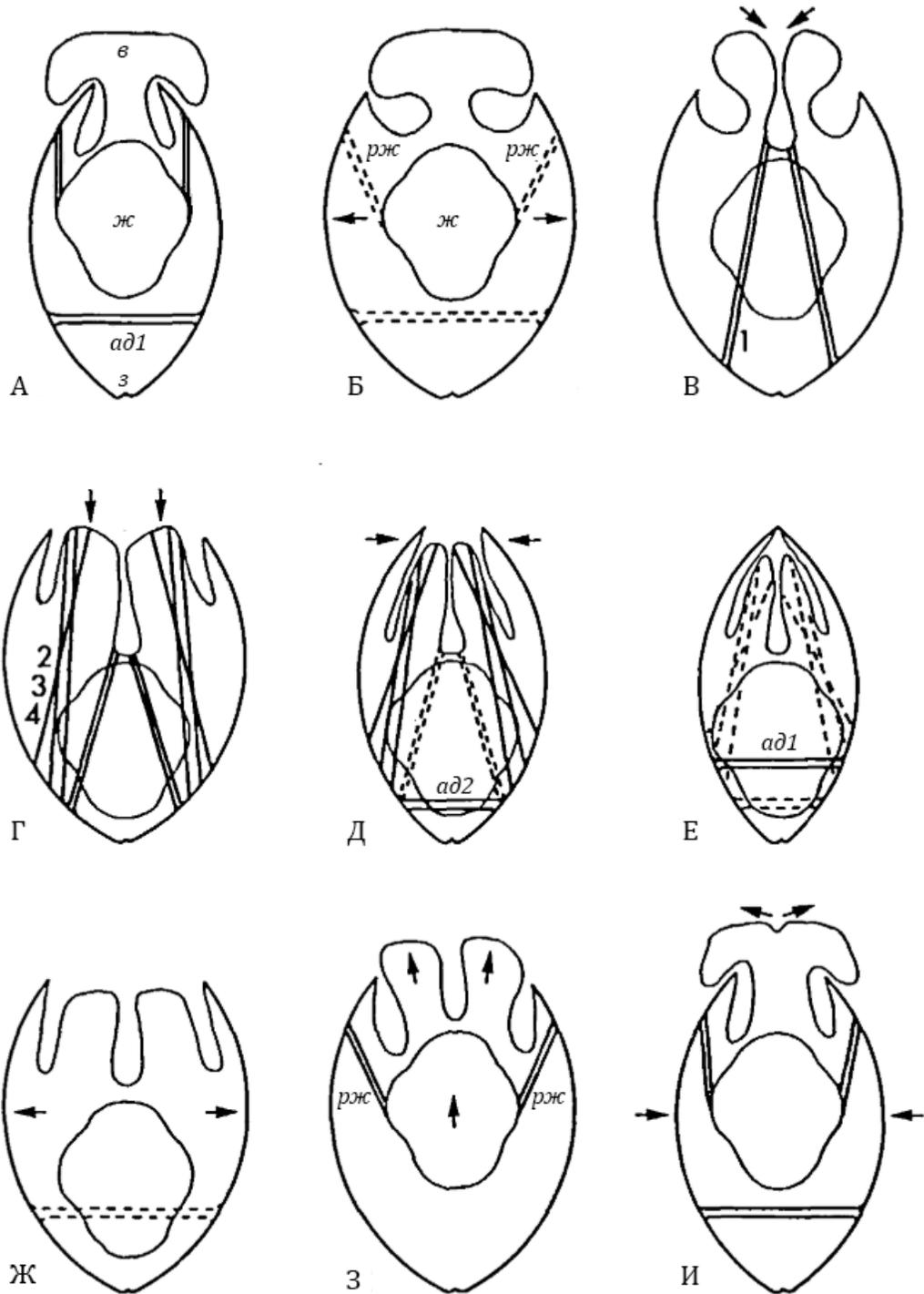


Рисунок 6. Схемы стадий ретракции (А-Е) и протракции вельюма (Ж-И) прямозамкового велигера *Pecten maximus*. Условные обозначения: ад1/ад2 – мускулы переднего аддуктора; в – вельюм; ж – желудок; з – замок; рж – ретрактор желудка. Стрелками обозначено направление движения раковины и мягких тканей; цифрами – порядок сокращения мускулов-ретракторов вельюма.

Сокращённая мускулатура показана цельными линиями, пунктирными – расслабленная (Cragg, 1985).

При движении велигера в толще воды (рис. 6А), велюм полностью вывернут, а висцеральная масса занимает центральное положение между замковым краем и краями створок раковины. Ретракторы велюма максимально расслаблены, тогда как передние аддукторы и ретракторы желудка частично сокращены. Ретракция велюма начинается с расслабления переднего аддуктора (рис. 6Б, *ад1*) и следующего за этим расширением просвета створок раковины. Одновременно с этим сокращается пара ретракторов велюма, расположенных центрально (рис. 6В, *1*), после чего сокращаются остальные три пары ретракторов (рис. 6Г 2-4). Вворачивающийся велюм полностью скрывается под створками и сдвигает желудок в более дорзальное положение (рис. 6Г). Как только велюм оказывается полностью ввернут, сокращаются передние аддукторы, завершая процесс ретракции велюма (рис. 6Д, Е). Протракция также начинается с расслабления передних аддукторов и раскрытия створок личиночной раковины (рис. 6Ж, *ад1*) и последующего за этим расправления тканей велюма (рис. 6З). Крагг (Cragg, 1985) предполагает, что основную роль в протракции велюма играет мускулатура, поддерживающая желудок, за счет сокращения которой висцеральная масса выталкивает велюм за пределы раковины (рис. 6З), а дальнейшее сокращение передних аддукторов завершает процесс выворачивания велюма (рис. 6И). Автор отмечает различия в скорости ретракции и протракции велюма, отмечая ретракцию как "стремительную", а протракцию – как "гладкую и аккуратную". Эти особенности также свидетельствуют о различных механизмах, участвующих в данных процессах (Cragg, 1985). Помимо различных групп мускулов, отмеченных Краггом следует обратить внимание на то, что при указанной схеме ретракции/протракции протракция будет осуществляться в основном за счёт давления мягких тканей на велюм. Ретракция осуществляется преимущественно за счёт сокращения мускулатуры, закрепленной на жесткой раковине, что увеличивает скорость ретракции по сравнению с протракцией.

Ранний велигер двустворчатых моллюсков имеет достаточно развитые пищеварительную, выделительную и нервную системы. Нервная система представлена отдельными нейронами, представляющих собой зачатки церебрального и pedalного ганглиев (Voronezhskaya et al., 2008). Выделительная система очень проста и представлена парой протонефридиев (Waller, 1981). Большую часть объема тела личинки занимает пищеварительная система. Пищеварительная система подразделяется на переднюю кишку (стомодеум), желудок, печеночные выросты, тонкую среднюю кишку и заднюю кишку (проктодеум). Стомодеум имеет воронкообразную форму и ресничную выстилку, принимающую участие в захвате и продвижении пищи в желудок (рис. 3д). Между

желудком и стомодеумом присутствует ресничный клапан, препятствующий обратному выходу пищевых частиц. Задняя кишка формируется как инвагинация эктодермы, которая соединяется с тканью кишечника в районе заднего конца личинки. Первоначально расположенное на заднем конце конхостомы анальное отверстие из-за разрастания раковины смещается на вентральную сторону. Эндодермальная часть кишечника дифференцирована на желудок, печень и среднюю кишку. Формирование печени у двустворчатых моллюсков начинается сразу же после выворачивания раковинной железы. Уже на стадии раннего велигера передняя стенка желудка *Mytilus edulis* состоит из печеночной ткани. По мере развития личинки передняя стенка разрастается формируя печеночный выросты (Малахов и Медведева, 1991).

### 1.3 Особенности формирования личиночной раковины

Описанный выше порядок формирования раковинной железы из бластомера X является, видимо, общим для двустворчатых моллюсков и описан, например, у *S. solidissima* (Eyster and Morse, 1984), *M. galloprovincialis* (Kniprath, 1981) и ряда других видов. Первоначально авторы придерживались мнения о формировании раковины непосредственно в полости раковинной железы (Humphreys, 1969). Однако в последующих исследованиях развития *M. galloprovincialis* было показано, что полость раковинной железы формируется как эпителиальный карман и зарастает через два часа после формирования, что подтверждается наличием десмосом между клетками раковинной железы в зоне предполагаемой полости (рис 7, 3).

Сразу же после формирования десмосом, эпителиальные клетки смыкаются над погруженной раковинной железой и выделяют гликокаликс, который окружает всю личинку. Формирование органической раковинной пластинки происходит непосредственно на границе между эпителиальными клетками и погруженными клетками раковинной железы (рис 7, Е-Ж).

Исследование строения личинки *S. solidissima* (Eyster and Morse, 1984) показало более сложное строение полости раковинной железы. Раковинная железа включает две зоны: внутренняя зона инвагинации (inner invagination), образованной непосредственно клетками раковинной железы и зона внешней инвагинации (outer invagination), образованной клетками эпителия, окружающего железу. При этом формирование раковинной пластинки происходило не на границе инвагинации, а именно на границе этих зон (рис. 8, а, б) (Eyster and Morse, 1984).

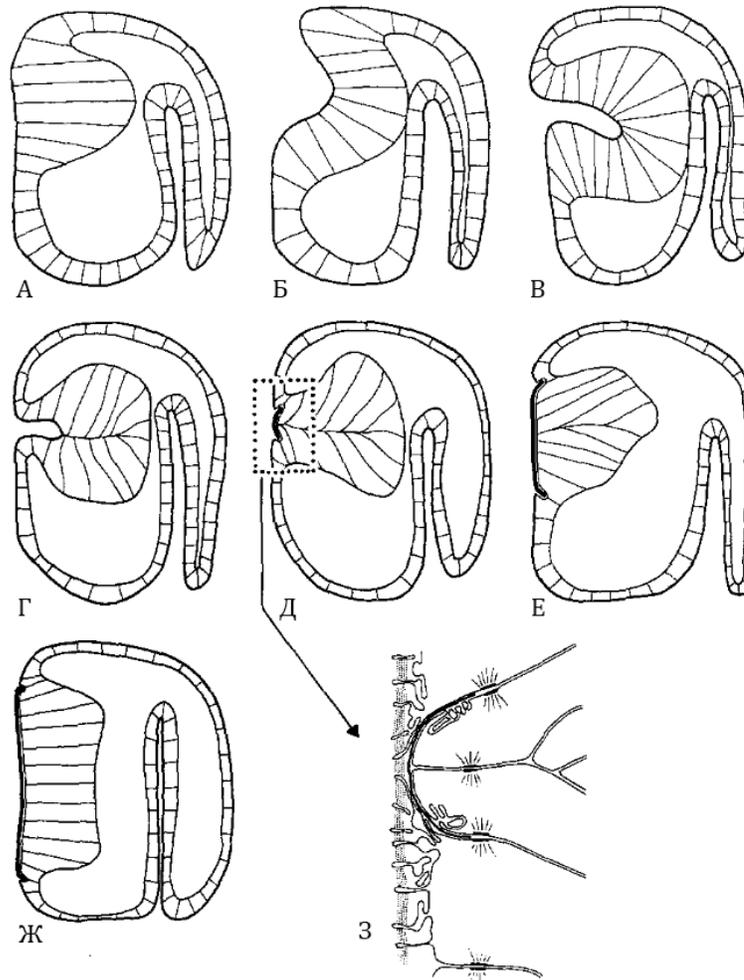


Рисунок 7. Схематическое изображение процесса развития раковинной железы и формирования раковины *Mytilus galloporovincialis*, полученное на основе фазового контраста и электронных микрографов. А-В - инвагинация; Г-Д – замыкание границы внешней и внутренней зоны инвагинации; Д – секреция раковинной пластинки; Е, Ж – выворачивание железы; З – детальное отображение схемы Е (Kniprath, 1980).

Одной из основных гипотез необходимости погружения клеток раковинной железы с образованием полости является индукция формирования раковины при контакте клеток зачатка раковинной железы с архентероном. Это было показано на ряде представителей типа Mollusca (Kniprath, 1981). Дальнейший рост раковины предполагает "выворачивание" внешней зоны (в случае *S. solidissima*) с последующим ростом раковины по мере разрастания железы по дорзальной поверхности личинки. Именно после выворачивания раковинной железы многие авторы отмечают наличие пластинки раковины на поверхности личинки (Малахов и Медведева, 1985).

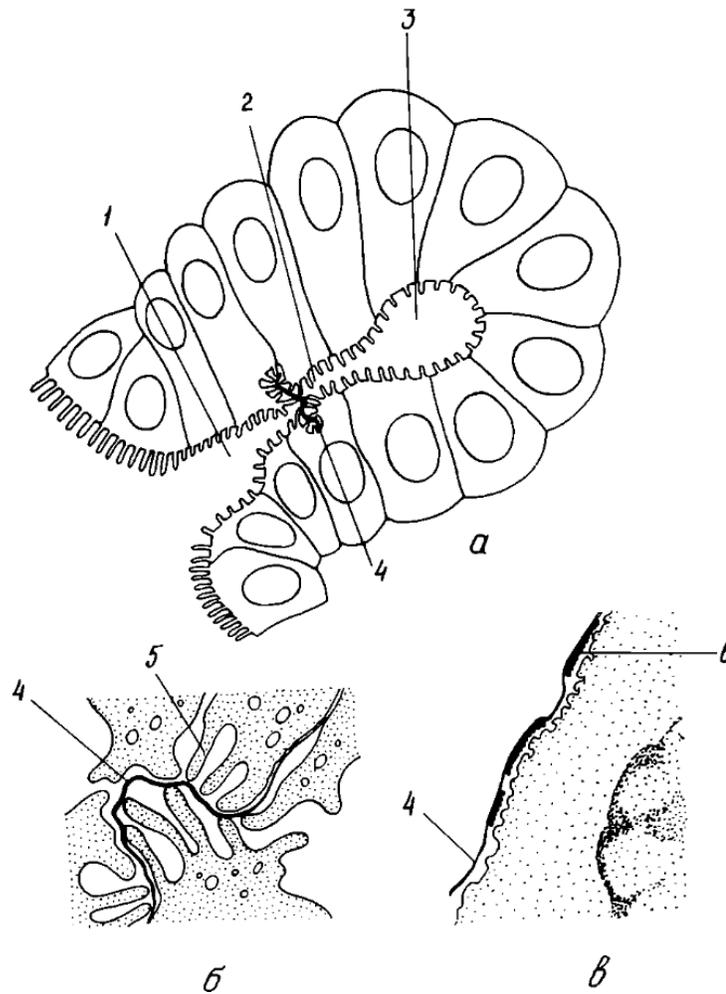


Рисунок 8. Схема строения раковинной железы и закладки раковины *Spisula solidissima* возрастом 28 часов (по: Easter and Morse, 1984): а — зачаток раковинной железы на сагиттальном срезе конхостомы; б — органический зачаток раковины между микроворсинками; в — откладка гранул углекислого кальция под органическим зачатком раковины. 1 — наружная зона инвагинации; 2 — сужение просвета; 3 — внутренняя зона инвагинации; 4 — органический зачаток раковины; 5 — микроворсинки; 6 — гранулы углекислого кальция (Малахов и Медведева, 1991).

Пластинка раковины, сформированная раковинной железой, сразу же после выворачивания начинает быстро увеличиваться в размерах, что обеспечивает формирование личиночной раковины (Waller, 1981; Малахов и Медведева, 1991). Кальцификация органической раковинной пластинки начинается уже на стадии поздней конхостомы. По результатам рентгенографических исследований аморфный карбонат кальция обнаруживается сразу же после выворачивания раковинной железы и перемещения гантелевидной пластинки раковины на поверхность личинки. Начиная со стадии

поздней конхостомы рентгенографические исследования показывают переход аморфного карбоната кальция в арагонит и кальцит. Первоначально в раковине поздней конхостомы откладывается кальцит (до 7%), который является, вероятно, центром кристаллизации для дальнейшего нарастания минеральной составляющей раковины. Минеральная часть раковина велигера состоит уже преимущественно из арагонита лишь с небольшими (около 1%) включениями кальцита (Medaković, 2000; Medaković et al., 1997).

Описывая рост и строение планктонных личинок двусторчатых моллюсков, Вернер (Werner, 1939) предложил разделить стадии формирования личиночной раковины (продиссоконха), а также соответствующие стадиям развития участки личиночной раковины, на **продиссоконх I** и **II** (например, рис. 9). предложил разделить участки личиночной раковины (продиссоконха), соответствующие стадиям развития личинки, на **продиссоконх I** и **II**.

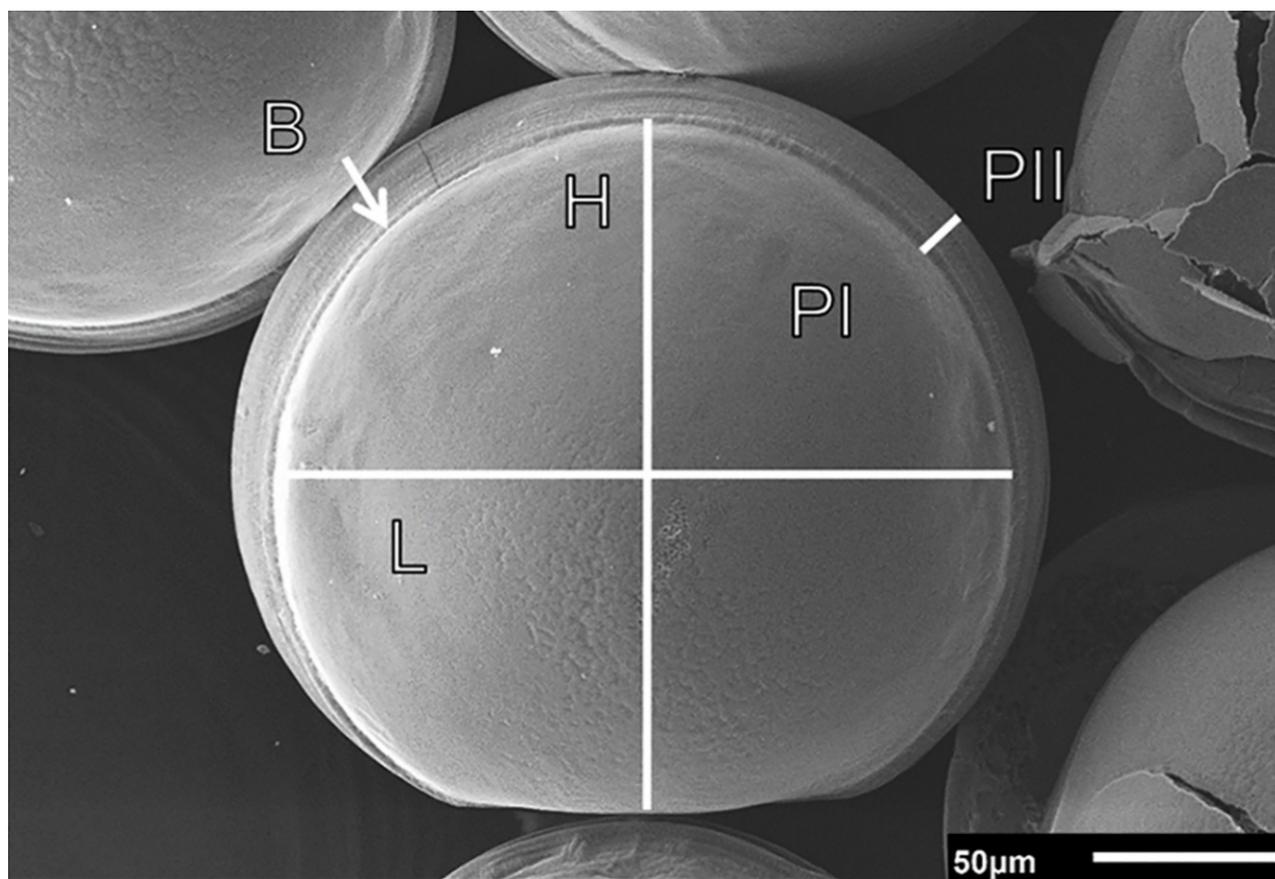


Рисунок 9. Схема строения личиночной раковины велигера *Laternula elliptica*. PI – продиссоконх I; PII – продиссоконх II; B – граница продиссоконха I/II; H – "высота" раковины; L – "длина" раковины (Bylenga et al., 2017).

Согласно предложенному разделению, продиссоконху I соответствует участок раковины от начала кальцификации до окончания формирования гладкой, либо слегка радиально-исчерченной D-

образной раковины, который формируется за короткий этап развития. Стадия продиссоконха II представляет собой более продолжительный этап развития раковины от момента окончательного формирования продиссоконха I вплоть до постметаморфической раковины. Строение продиссоконха II отличается от продиссоконха I характеризуется появлением выраженных кольцевых линий нарастания по краю раковины. Зона перехода продиссоконха I в продиссоконх II при этом хорошо заметна ввиду появления концентрических линий роста, возникающих на поверхности раковины.

Наблюдая за формированием личиночной раковины *O. edulis* Уоллер (Waller, 1981) отметил важные особенности процесса кальцификации личиночной раковины. Первоначально, в центральной части каждой из лопастей раннего продиссоконха I начинается закладка мелких зерен и игл (порядка 0.1 мкм в диаметре) карбоната кальция, формирующих полигональную структуру (со стороной 1-3 мкм) "точечной" центральной зоны. Ближе к периферии расположение аналогичных гранул и игл карбоната кальция меняется на радиальное, формируя уже "радиально-лучистую" зону. Таким образом, для продиссоконха I характерен точечно-звездчатый ("punctate-stellate") паттерн кальцификации. По мере приближения к границе продиссоконха I/II радиально залегающие гранулы и иглы арагонита сближаются между собой пока не образуют единый слой плотно упакованных гранул (Waller, 1981).

Наблюдаемое значительное изменение микроструктуры раковины от наиболее ранней части продиссоконха I к продиссоконху II позволили Уоллеру высказать предположение о смещении зоны кальцификации раковины от раковинной железы к эпителию края мантии. Наиболее ранним участком раковины по мнению является "точечная" зона, представляющая собой единый лист периостракума, равномерное полигональное залегание гранул и игл арагонита на внутренней поверхности которого свидетельствуют о единовременном процессе кальцификации на всей площади. В дальнейшем кальцификация смещается в краевую зону раковины – происходит формирование радиально-лучистого слоя (Waller, 1981). Видимо, переход секреции раковины от раковинной железы к мантии начинается еще на стадии продиссоконха I и полностью завершается на стадии продиссоконха II.

Значительное усиление кальцификации при переходе от продиссоконха I к II находит своё подтверждение как в данных рентгенографических исследований разновозрастных личинок (Medaković et al., 1997, 1989), так и при оценке активности карбонатгидразы (Medaković, 2000). Коллективы авторов этих исследований показали, что возрастание активности карбонатгидразы *O. edulis* наблюдается непосредственно перед переходом процесса формирования личиночной

раковины от продиссоконха I в II. Одновременно наблюдается значительное увеличение фракции арагонита в личиночной раковине.

#### 1.4 Заключение

Таким образом, эмбриональное развитие *M. edulis* характеризуется спиральным гетероквадратным дроблением, с характерным для ряда моллюсков (*Bivalvia*, *Scaphopoda* и ряда *Gastropoda*) формированием полярных лопастей. Потомки бластомеров, в которые попадают материал полярных лопастей участвуют в формировании раковинной железы. Первой свободноплавающей личиночной стадией является стерробластула, несущая два крупных потомка бластомера 2d – X<sub>s</sub> и X<sub>d</sub>. Дальнейшее развитие стерробластулы приводит к формированию конхостомы: личинки, имеющей глубоко впяченный зачаток раковинной железы, открывающийся конхостомом на дорсальной стороне. Впячивание эндодермальных клеток формирует архентерон, связанный с окружающей средой щелевидным бластопором, расположенным на вентральной стороне. Выпячивание и разрастание раковинной железы совокупно с формированием личиночной раковины приводит к формирования сложно устроенного велигера. Отличительной чертой велигера является значительное уплощение тела в латеральной плоскости, развитие личиночной раковины и формирование вельюма – разрастания передней части конхостомы с рядами локомоторных ресничек. В спокойном состоянии вельюм расправлен и участвует в движении личинки, а в случае опасности, втягивается в личиночные створки раковины. Внутренностный мешок устроен достаточно просто, однако личинка имеет основные системы органов, включая пищеварительную, нервную и выделительные системы.

## 2. Эмбрионально-личиночное тестирование двустворчатых моллюсков

### 2.1 Общие положения

Эмбрионально-личиночным тестированием с использованием раннего развития двустворчатых моллюсков (сокращенно – ЭЛТ двустворчатых моллюсков) принято называть процедуру оценки негативного воздействия факторов внешней среды, в том числе токсических агентов, на раннее развитие двустворчатых моллюсков от стадии зиготы до прямозамкового велигера (D-велигера). Особенностью данного тестирования является оценка воздействия на всём промежутке раннего развития, включая как дробление зиготы от момента оплодотворения до формирования подвижной стерробластулы, так и дальнейшее личиночное развитие через стадию конхостомы до раннего велигера. Ключевым моментом данного тестирования является формирование характерной личиночной стадии – **прямозамкового велигера**, или **D-велигера**.

ЭЛТ двустворчатых моллюсков является распространённым методом биотестирования (Andersen et al., 2013; His et al., 1999a; Kurihara et al., 2008; Nadella et al., 2009), и используется на уровне общепринятых протоколов тестирования (ASTM, 2012a; USEPA, 2016). Эмбрионально личиночный тест – это достаточно вариативный способ оценки воздействия, поскольку позволяет оценивать как незначительное воздействие, вызывающее задержку или отклонение в развитии (Kurihara et al., 2008; Nadella et al., 2009), так и несовместимое с жизнью влияние, приводящее к гибели эмбрионов на той или иной стадии (Beiras and His, 1995; Малахов и Медведева, 1991).

### 2.2 Порядок проведения

Процедура проведения ЭЛТ двустворчатых моллюсков достаточно проста, но требует соблюдения определенных требований. Все начинается со стимуляции нереста взрослых особей двустворчатых моллюсков. Полученные половые продукты смешивают в чистой морской воде требуемой солёности при контролируемой температуре. После контроля оплодотворения зиготы или более поздние стадии развития, вплоть до 8-клеточного зародыша (USEPA, 2016), перемещают в экспериментальные условия, воздействие которых предполагается оценить в ходе проведения эксперимента. Часть особей при проведении эксперимента необходимо перенести для развития в чистую морскую воду для осуществления отрицательного контроля. В течение эксперимента личинки растут и развиваются. По завершении эксперимента **личинок фиксируют**, производят подсчёт и анализ результатов, на основании которого делают выводы о степени воздействия исследуемого токсиканта (His et al., 1999a; USEPA, 2016).

### 2.3 Условия проведения

Тест должен проводиться при температуре и солёности морской воды, которые соответствуют таковой в месте и времени массового нереста особей используемого вида в естественной среде обитания. Эмбриональные стадии двустворчатых моллюсков достаточно толерантны к колебаниям **температуры и солёности** (Brenko et al., 1977; Brenko and Calabrese, 1969; Nadella et al., 2009; Saidov and Kosevich, 2019), причём значимое влияние температуры больше, нежели солёности (Saidov and Kosevich, 2019). Однако, даже незначительное изменение температуры приводит к ускорению или замедлению развития (Вауне, 1976), что делает контроль температуры более существенным, нежели контроль солёности. Негативное влияние изменения солёности проявляется только при значительном её изменении (Brenko et al., 1977; His et al., 1999a; Saidov and Kosevich, 2019), а в границах толерантности к изменению солёности колебания доли D-велигеров не превышают 10% (His et al., 1999a). Например, протокол OCSPP (Office of Chemical Safety and Pollution Prevention) №850.1055 (USEPA, 2016) при проведении эмбрионально-личиночного тестирования не предписывает точный уровень солёности, а указывает лишь рекомендуемый интервал ( $12-20 \pm 2$  ppt в зависимости от типа используемой морской воды). Температурные режимы, напротив, жёстко закреплены – например, ЭЛТ с использованием *M. edulis* необходимо проводить при температуре  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ . Влияние показателя **pH** изучено в меньшей степени, но опираясь на проведенные исследования (Calabrese and Davis, 1970, 1966) можно сказать, что влияние изменений уровня pH и солёности сходно. Внутри границ зоны толерантности, например, воздействие изменения уровня pH в диапазоне от 7 до 9 на раннее развитие *Crassostrea virginica* и *Mecernaria mecernaria*, незначимо (Calabrese and Davis, 1966). **Концентрация кислорода** является еще одним важным параметром, ограничивающим, в первую очередь, плотность посадки тест-организмов. Личинки двустворчатых обладают достаточно высокой толерантностью к колебаниям концентрации кислорода в воде: значимое воздействие снижения концентрации кислорода наблюдали при концентрации ниже 4 мг/л, а гипероксию - при превышении 13,7 мг/л (His et al., 1997). Уровень потребления кислорода незначителен вследствие небольших размеров личинок: например, каждый D-велигер *Perna perna* (размером 120-200 мкм) при  $17 \pm 2^\circ\text{C}$  потребляет около  $1.96 \pm 0.62$  нг/ч  $\text{O}_2$  (Lemos et al., 2003). Таким образом, в полностью изолированной ёмкости для снижения концентрации кислорода со 100% (при  $17^\circ\text{C}$  это 9.65 мг/л) до 4 мг/л в течении 48 часов необходима плотность более 60 особей на мл. Большинство авторов сходятся во мнении, что достаточной для сохранения нормального развития является плотность посадки в 30 особей на мл (His et al., 1997). Однако в ряде работ исследователи наблюдали полностью нормальное развитие велигеров и при посадке плотностью 50 и даже 100

особей на мл (Granmo, 1972; Granmo et al., 1988; Thain, 1991). Учитывая показатели потребления кислорода, рекомендация к плотности посадки в 30 особей является избыточной и полностью исключает возможное влияние недостатка кислорода при развитии.

#### 2.4 Получение гамет

Получение гамет является безусловно одним из важнейших составляющих проведения тестирования, поскольку от качества гамет во многом зависит успешный исход тестирования. Основным способом получения гамет является стимуляция естественного нереста в лабораторных условиях. Наиболее малоинвазивным способом стимуляции нереста является температурный сдвиг на +5-10°C, рекомендуемый большинством общепринятых методик (ASTM, 2012a; USEPA, 2016). Помимо температурного сдвига, стимулировать нерест также могут колебания солёности, приливно-отливная динамика и УФ-излучение, однако ввиду низкой эффективности эти способы на сегодняшний день используются мало (Swalingam, 1977). Добавление растворов химических веществ в нерестовую ёмкость или непосредственно в мантийную полость и ткани моллюсков также может стимулировать высвобождение гамет. Так, нерест можно стимулировать добавлением в нерестовую среду замороженной/перегретой семенной жидкости (His et al., 1999a; USEPA, 2016), повышением pH, добавлением или инъекцией растворов, содержащие ионы  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{K}^+$  (Iwata, 1951; Swalingam, 1977), комбинацией повышения температуры и pH (Swalingam, 1977). Серотонин и ингибиторы его реабсорбции (SSRIs) при добавлении как в среду, так и при инъекции также оказывают воздействие, стимулирующее нерест у морских и пресноводных двустворчатых моллюсков (Aji, 2011; Nonkoop et al., 1999).

Альтернативным способом получения половых продуктов является вскрытие моллюсков и извлечение гонад из иссеченных тканей. Этот способ является менее предпочтительным, поскольку повреждение тканей способствует попаданию значительного количества фрагментов тканей в воду, что приводит к загрязнению полученные половые продукты.

Кроме того, использование иссеченных гонад для получения яйцеклеток наталкивается на фундаментальные различия в созревании ооцитов у разных различных видов двустворчатых моллюсков (Colas and Dubé, 1998). Ооциты двустворчатых моллюсков могут быть условно разделены на ооциты I или II класса. Ооциты I класса (напр. у видов р. *Spisula*) способны к оплодотворению в состоянии первого блока мейоза на стадии профазы I, тогда как ооцитам II класса (напр. у видов р. *Mytilus*) для оплодотворения необходим переход в состояние второго блока мейоза на стадии метафазы I. Таким образом, иссечение гонад для получения ооцитов с целью

последующего тестирования актуально только в случае использования ооцитов I класса. При попытке получения ооцитов II класса из гонад (напр. *Mytilus*) авторы сталкиваются с тем, что большая часть ооцитов, находящихся на стадии зародышевых пузырьках разрушаются при попадании в морскую воду. С этим могут быть связаны противоречивые данные, полученные авторами при проведении ЭЛТ с использованием половых продуктов, полученных из иссеченных гонад (His et al., 1999a). Исследователи, использующие для проведения биотестирования различные виды устриц (*Ostrea*, *Crassostrea*, т.е. моллюсков с ооцитами I типа) допускают использование гамет, полученных путём иссечения гонад, так как получаемые таким образом яйцеклетки не уступают в качестве, полученным при нересте (Allen et al., 1988; Thain, 1991). Напротив, при использовании для аналогичных целей виды рода *Mytilus* или *Mecernaria* (моллюсков с ооцитами II типа) авторы заявляют, что только часть яйцеклеток из иссеченных гонад способны развиваться нормально (Loosanoff and Davis, 1963) и проведенные эксперименты с такими яйцеклетками часто имеют повышенную долю недоразвитых, уродливых личинок и неудовлетворительные результаты (ASTM, 2012a).

## 2.5 Продолжительность и кормление

Продолжительность эмбрионально-личиночного тестирования зависит от используемого вида двустворчатых моллюсков и в преобладающем большинстве протоколов составляет 48 часов (ASTM, 2012a; His et al., 1999a; USEPA, 2016). В отдельных случаях, при использовании в тестировании теплолюбивых видов, таких как *Crassostrea gigas*, продолжительность может быть сокращена до 24 часов (His et al., 1997; Leverett and Thain, 2013; Thain, 1991).

Кормление развивающихся личинок при проведении эксперимента может оказать большое влияние на результат тестирования. Основу личиночного рациона двустворчатых моллюсков составляет фитопланктон (His et al., 1999a), причём личинки очень избирательны в рационе (Baldwin, 1995; Cogne et al., 2001). Кроме того, показано, что значительную роль в питании велигеров играет растворённая органика – даже в пресной воде абсорбция растворённого органического вещества до 6% прироста биомассы велигеров *Dreissena polymorpha* (Barnard et al., 2006). Растворённые органические вещества и кормовые объекты могут как вступать во взаимодействие с исследуемым токсикантом, так и оказывать дополнительный негативный эффект вследствие снижения уровня кислорода, тем самым искажая получаемые результаты (Nadella et al., 2009). Кроме того, использование фитопланктона в качестве пищи предполагает очень точное дозирование и использование схожих (а лучше идентичных) видов микроводорослей, что практически невозможно при широком использовании единой методологии тестирования. Таким образом,

учитывая, что личинки двусторчатых моллюсков без проблем переносят голодание в течении 72 часов (ASTM, 2012a), современные протоколы проведения эмбрионально-личиночного тестирования (ASTM, 2012; USEPA, 2016) не предполагают кормления личинок в течении всего эксперимента. Дополнительное кормление развивающихся личинок предполагается только при проведении более длительных экспериментов (His et al., 1999a).

## 2.6 Контроль

При проведении ЭЛТ двусторчатых моллюсков предусмотрена обязательная постановка контрольных экспериментов. Чаще всего проводят **отрицательный контроль** в чистой морской воде без добавления какого-либо токсиканта. Развитие моллюсков в такой воде идёт аналогично развитию в природных условиях, и по завершении эксперимента большая часть моллюсков в данной контрольной ёмкости представлена D-личинками. Для оценки качества проведения контрольного эксперимента применяют такой параметр как **приемлемость (acceptability)**. Отрицательный контроль можно считать приемлемым, если по завершении ЭЛТ доля аномальных личинок в контроле не превышает определенных пределов (His et al., 1999a). Некоторые исследователи предлагают использовать жесткие пороги уровня аномальных личинок в контроле - от 2.5% до 20% (His et al., 1999a). Современные протоколы (ASTM, 2012a; Leverett and Thain, 2013; USEPA, 2016) допускают достаточно высокий уровень аномалий в контроле: контроль признают приемлемым если средняя доля аномальных личинок менее 30% при проведении тестирования на *C. virginica* и *C. gigas* или менее 40% при проведении на *M. mercenaria* и *M. edulis*. Среднюю долю аномальных личинок в контроле можно рассчитать используя, например, следующий метод подсчёта (ASTM, 2012a):

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n A = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(N - B)}{N} \times 100 \quad (1)$$

где:

*M* – средняя доля личинок (где *n* – количество повторов), которые на момент подсчёта не достигли стадии прямозамкового велигера с полностью развитой раковинной;

*A* – количество личинок не достигших стадии прямозамкового велигера с полностью развитой раковинной на момент окончания эксперимента;

*B* – количество личинок достигших стадии прямозамкового велигера с полностью развитой раковинной на момент окончания эксперимента;

$N$  – количество внесенных в начале эксперимента эмбрионов на стадии двухклеточного зародыша или более поздних стадиях;

Использование растворителей при проведении ЭЛТ двустворчатых моллюсков предполагает использование дополнительного контроля – **контроль растворителя** (ASTM, 2012a; USEPA, 2016). Контроль растворителя необходим для оценки возможного негативного воздействия используемого растворителя на раннее развитие при проведении ЭЛТ. Требования к приемлемости контроля растворителя аналогичны требованиям к отрицательному контролю (ASTM, 2012a; USEPA, 2016).

**Положительный контроль** не включен в используемые на сегодняшний день стандартные протоколы (ASTM, 2012a; Leverett and Thain, 2013; USEPA, 2016), однако играет важную роль при оценке сравнительной токсичности. Стандартные протоколы рекомендуют использование токсикантов сравнения для оценки качества используемых личинок и эмбрионов. В качестве токсикантов сравнения возможно использование солей тяжелых металлов (например, сульфата цинка), ПАВ (додецилсульфата натрия) и даже хлорида натрия (His et al., 1999a; Leverett and Thain, 2013).

## 2.7 Критерии токсичности

При проведении ЭЛТ, личинки, развивающиеся в контрольных условиях, представляют собой полностью развитые D-велигеры с идеальной раковиной. Согласно требованиям приемлемости, доля таких личинок в контроле по окончании эксперимента должна составлять не менее 70%. Особи, подвергшиеся негативному воздействию, могут иметь морфологические особенности, отличающие их от D-велигеров. Опираясь на данные собственных исследований и массив литературных данных, Хис с соавторами (His et al., 1997) предложили классификацию личинок, обнаруживаемых при проведении ЭЛТ, основанную на их морфологии. Авторы разделили все найденные морфологически различимые классы личинок (далее мы будем называть их **морфотипами**) личинок на шесть классов (рис. 10):

–**D-велигер** (D-veliger, D-larva), представляющий собой классический прямозамковый велигер с идеально ровной, D-образной раковиной.

–Велигер с **седловидным замковым краем** (convex hinged, kidney-shape), представляет собой велигер, замковый край которого вогнут в сторону створок раковины таким образом, что напоминает седловидный силуэт.

–Велигер с **выступающей мантией** (protruded mantle), представляет собой велигер, ткани мантии или велюма которого в зафиксированном состоянии выступают за предел края раковины, формируя видимость протрузии.

–Велигер с **выемкой на краю раковины** (intended shell margin), представляет собой велигер, край раковины которого ввиду особенностей развития или жизнедеятельности имеет незначительную деформацию.

–Личинка с **не полностью сформированной раковиной** (incomplete shell), представляет собой конхостому, которая после выворачивания раковинной железы не завершила формирование раковину и несущая её деформированный зачаток, прикрывающий лишь часть личинки;

–**Трохофорная личинка, трохофора** (trochophore). Поскольку в зарубежной литературе не выделяют конхостому как отдельный тип личинки, всех личинок, не имеющих раковину ко времени формирования прямозамкового велигера (24-72 часа для разных видов) авторы относят к трохофорным личинкам (не представлена на рисунке).

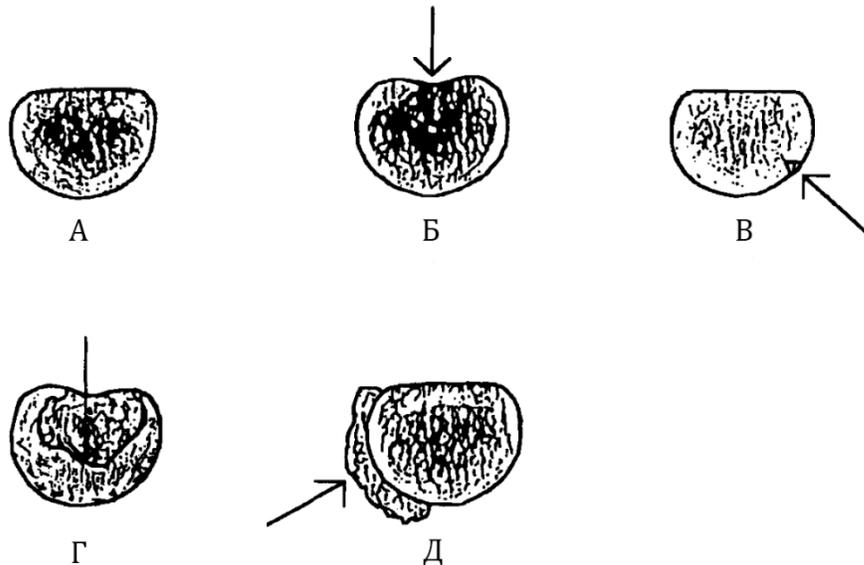


Рисунок 10. Различные виды морфологических деформаций, отмеченных у D-велигеров устриц *C.gigas* при проведения эмбрионально-личиночного биотестирования: А – нормальный D-велигер; Б – седловидный замок; В – выемка на краю раковины; Г – недоразвитая/несформированная раковины; Д – выступающая мантия (His et al., 1997).

Выделив данные морфологические классы личинок, авторы используют при оценке негативного воздействия различные критерии "аномальности" личинок. Подавляющее большинство авторов принимают за нормальный только прямозамковый велигер (D-велигер) с теми или иными отклонениями в строении. Придерживающиеся наиболее жесткой позиции авторы (Klockner et al., 1985, His et al., 1997, Krasso et al., 1996) считают, что **нормальный D-велигер должен иметь полностью развитую, идеально симметричную раковину и развитый вельюм**. Любые визуальные аномалии мягких тканей или асимметричность раковины необходимо расценивать как аномалию. Недопустимой также считают и протрузию мантии/вельюма в уже зафиксированных велигерах (Beiras and Albentosa, 2004). Хис с соавторами (His et al., 1997) подчёркивают, что аномалии личинок должны быть чётко определены не на основании исследований *in vitro*, а на основании развития велигеров из естественной среды обитания. Так как авторы не обнаружили велигеров с морфологическими аномалиями в природных местообитаниях, они считают любые отклонения от формы D-велигера аномальными. Более современные методологии проведения тестирования допускают наличие отклонений в строении D-велигера, в особенности формы раковины или её размер, принимая за ключевую характеристику наличие раковины (ASTM, 2012a; USEPA, 2016). Так, согласно OCSPP 850.1055 (USEPA, 2016), при обработке результатов тестирования велигеры с **полностью сформированной D-образной раковинной и личинки с полностью сформированной, но деформированной раковинной** признаются нормальными. В таком случае аномальными личинками являются личинки без раковины или с несформированной до конца раковинной.

## 2.8 Расчёт уровня воздействия

Показателями негативного воздействия по окончанию эксперимента является как низкая выживаемость велигеров, так и высокая доля аномально<sup>1</sup> развивающихся особей (ASTM, 2012a; His et al., 1997; USEPA, 2016). Для оценки выживаемости используют дополнительное контрастирование нейтральными красителями, например, нейтральным красным который окрашивает живых личинок в розовый, тогда как мёртвые остаются бесцветными (ASTM, 2012a).

При меньших уровнях воздействия гибель личиночных стадий перестаёт носить массовый характер, но возрастает доля аномально развивающихся особей. Именно с такими уровнями воздействия ЭЛТ и применяют в большинстве случаев.

---

<sup>1</sup> Определения и термины, представленные в литературном обзоре сохранены и соответствуют источникам.

Для оценки негативного воздействия осуществляют подсчёт доли D-велигеров по окончании проведения теста. Изначальную несмещенную оценку необходимо корректировать с учётом средней доли аномально развивающихся личинок в контроле. Так, согласно ASTM E724-98 (ASTM, 2012a) несмещенную долю аномальных личинок каждого повтора рассчитывают согласно выражению:

$$A = \frac{(N - B)}{N} \times 100 \quad (2)$$

где:

A – количество личинок не достигших стадии прямозамкового велигера с полностью развитой раковиной на момент окончания эксперимента;

B – количество личинок достигших стадии прямозамкового велигера с полностью развитой раковиной на момент окончания эксперимента;

N – количество внесенных в начале эксперимента эмбрионов на стадии двухклеточного зародыша или более поздних стадиях;

Расчёт показателей негативного воздействия при использовании несмещенной оценки очень требователен к качеству контроля. Снижение в отрицательном контроле доли D-велигеров более чем на 10% привело к использованию авторами поправки Аббота (Finney, 1971) и расчёта и использования смещенной оценки (His et al., 1999a).

Для расчёта **смещенной относительно контроля (E)** доли аномально развивающихся личинок применяют коррекцию Аббота для каждой тестовой пробы:

$$E = \frac{100 \times (A - M)}{100 - M} \quad (3)$$

где:

A, M – см. уравнение 1.

Полученную скорректированную оценку можно использовать как для прямого сравнения уровней воздействия, так и для расчёта токсикометрических показателей, таких как полулетальная (LC<sub>50</sub>), полуэффективная (EC<sub>50</sub>) концентрация или доза токсиканта, а также ряда других. Таким образом, основным способом оценки негативного воздействия при проведении ЭЛТ двустворчатых моллюсков является **подсчёт доли нормально развивающихся велигеров (D-велигеров).**

Несмотря на различные подходы к критериям нормальности (His et al., 1997; USEPA, 2016), учёт и ранжирования аномальных личинок в предлагаемых протоколах и методиках не предусмотрены.

### 3. Эмбрионально-личиночное тестирования морских ежей

#### 3.1 Общие положения

ЭЛТ представляет собой достаточно распространённую процедуру оценки токсичности в которой помимо моллюсков могут использоваться представители и других групп, например – иглокожих (His et al., 1999b; Kobayashi, 1990, 1985). Эмбрионально-личиночный тест на морских ежах (далее – ЭЛТ морских ежей) является довольно распространённым способом биотестирования (Arizza et al., 2009; Chiarelli et al., 2021; Kobayashi and Okamura, 2005, 2004; Pinsino et al., 2010), и также как и с двустворчатыми моллюсками, используется на уровне общепринятых протоколов тестирования (например, ASTM, 2012b). При проведении ЭЛТ морских ежей используют множество различных видов морских ежей, например, согласно ASTM E1563 (ASTM, 2012b) в тестировании можно использовать развитие четырех видов: *Strongylocentrotus purpuratus* [Stimpson, 1857], *S. droebachiensis*, *Arbacia punctulata* [Lamarck, 1816] и *Dendraster excentricus* [Eschscholtz, 1831]. Принципиальный элемент тестирования, а именно – оценка токсичности на всём промежутке раннего развития от стадии зиготы до ключевой личиночной стадии (при данном варианте – плютеус), аналогичны уже описанному эмбрионально-личиночному тестированию двустворчатых моллюсков.

Процедура проведения начинается со стимуляции нереста взрослых особей электрическим током или инъекции 0.5M KCl. Полученные половые продукты смешивают и через четыре часа рассаживают эмбрионы по экспериментальным ёмкостям. Аналогична и постановка контрольного эксперимента, и способ оценки приемлемости контроля. Важным отличием от двустворчатых моллюсков является стенотермность и стеногалинность морских ежей, и использование строго определенных абиотических условий для каждого вида. В зависимости от используемых видов и температуры проведения, продолжительность тестирования составляет от 48 до 96 часов (ASTM, 2012b). Основным способом оценки негативного воздействия является подсчёт доли нормально развивающихся личинок (плютеусов) на момент окончания эксперимента (ASTM, 2012b). В ряде исследований можно отметить использование для оценки воздействия на промежуточных или в укороченных тестах таких стадий развития как гастрюлы, призмы или раннего плютеуса (Chiarelli et al., 2021; His et al., 1999b; Morroni et al., 2018).

#### 3.2 Критерии токсичности

Критерии токсичности, используемые при оценке негативного воздействия ЭЛТ морских ежей, во многом повторяют используемые для двустворчатых моллюсков. Поскольку особи,

подвергшиеся негативному воздействию, часто имеют морфологические особенности, отличающие их от "идеальных" плютеусов (рис 11, Б), в качестве нормальных рассматривают только особи, удовлетворяющие целому ряду морфологических критериев. Во многом, как критерии токсичности, так и особенности морфологических деформаций личиночных стадий морских ежей были описаны Клёнкером с соавторами (Klöckner et al., 2000).

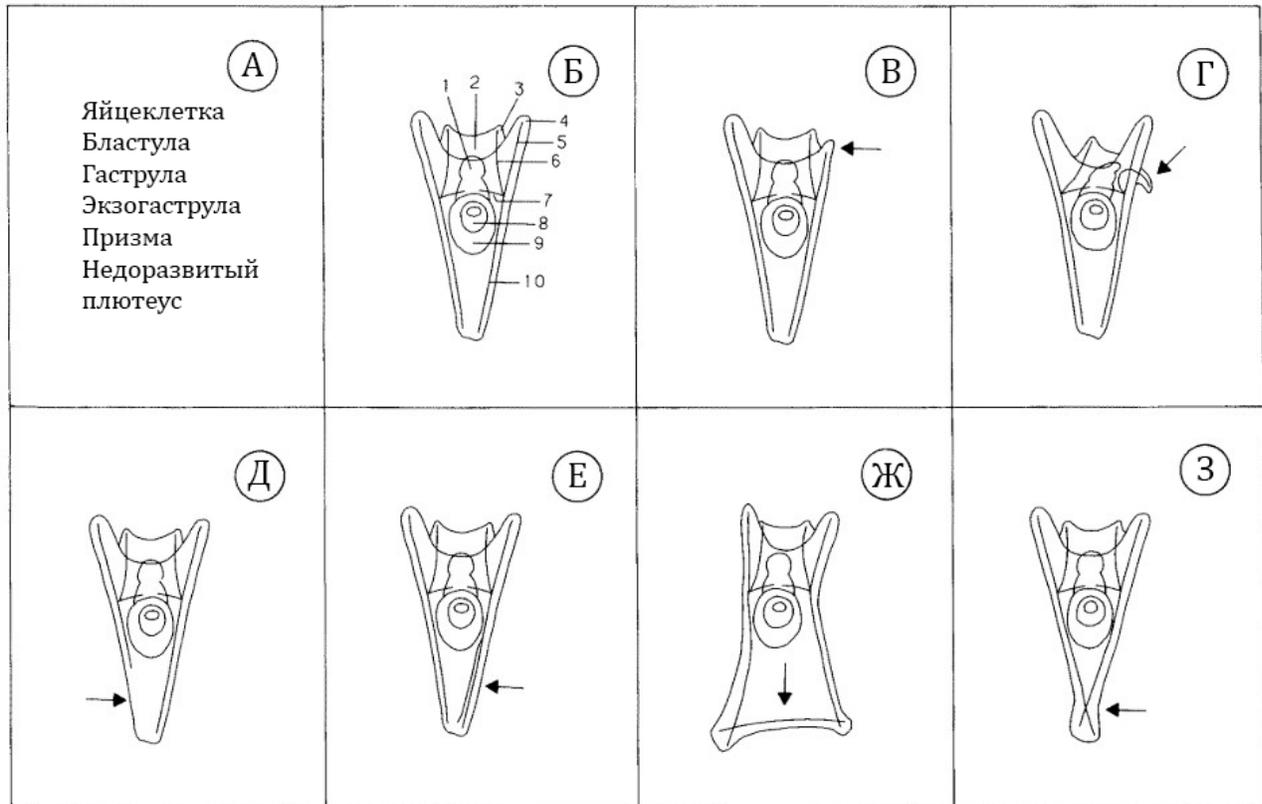


Рисунок 11. Иллюстрация морфологического критерия, используемого при определении нормально и аномально развивающихся эхиноплютеусов *Psammechinus miliaris* через 32 часа развития при 24°C. "Нормально" развитый эхиноплютеус представлен на Б. "Аномальные" личинки: А – стадии развития, со значительной задержкой или деформациями, начиная с 2-клеточного зародыша заканчивая ранним плютеусом, В-З – различные типы деформаций эхиноплютеусов: В – неравная длина посторальных отростков; Г – деформация орального отростка ("руки"); Д – отсутствие апикальной части спикулы; Е – раздвоенная апикальная спикула; Ж – расхождение апикальных спикул; З – перекрест апикальных спикул. Номерами на схеме Б отмечены: 1 – ротовое отверстие, 2 – оральная лопасть, 3 – оральные отростки, 4 – посторальные отростки, 5 – посторальные иглы, 6 – оральные иглы, 7 – поперечные иглы, 8 – кишечник и анальное отверстие, 9 – желудок, 10 –

соматические иглы. Эхиноплютеус изображен с брюшной стороны (исходные размеры около 350 мкм) (Klöckner et al., 2000).

Авторами выделены и описаны шесть различных вариантов деформаций эхиноплютеусов, такие как: неравная длина оральных и посторальных личиночных рук (В); деформация личиночных рук (Г); отсутствие части (Д) или раздвоение спикул (Е); апикальное расхождение (Ж) или перекрест спикул (З). Только полностью развитый эхиноплютеус без морфологических отклонений (Б) на момент окончания экспериментом может считаться нормальным. С учётом возможности оценки промежуточных личиночных стадий, можно заключить, что **эмбрионы классифицируются как нормальные только если они удовлетворяют ряду критериев:** (1) соответствие стадии развития временному промежутку (гаструла через 24 ч или плютеус через 48 ч), (2) симметрия левой/правой и спинной/вентральной эмбриональной оси, (3) дифференциация оральной/аборальной эктодермы и эндодермы, (4) развитие и формирование скелета плютеуса (Pinsino et al., 2010). Последний (4), так называемый, "скелетный критерий", был сформулирован Карбальера с соавторами (Carballeira et al., 2012), на основании данных полученных в экспериментах по воздействию сточных вод относительно низкой токсичности на раннее развитие *Paracentrotus lividus*. Как ясно из названия, данный критерий построен исключительно на наличии/деформации скелетных элементов у развитых плютеусов. Несмотря на то, что во многом данный критерий повторяет описанные ранее деформации (рис 11), коллектив авторов предложил ранжировать наблюдаемые деформации в соответствии с уровнем деформации и наличия/отсутствия скелетных элементов (рис. 12):

0 уровень. Морфологически идеальные эхиноплютеусы конической формы, с полностью развитыми отростками и скелетными элементами.

1 уровень. Эхиноплютеусы с неправильным расположением или строением скелетных игл, в том числе апикальным перекрестом или срастанием, сросшимися или деформированными "руками".

2 уровень. Эхиноплютеусы с недеформированными или деформированными скелетными элементами, в том числе – с частично отсутствующими скелетными иглами.

3 уровень. Полностью деформированные проплютеусы или более ранние стадии развития.

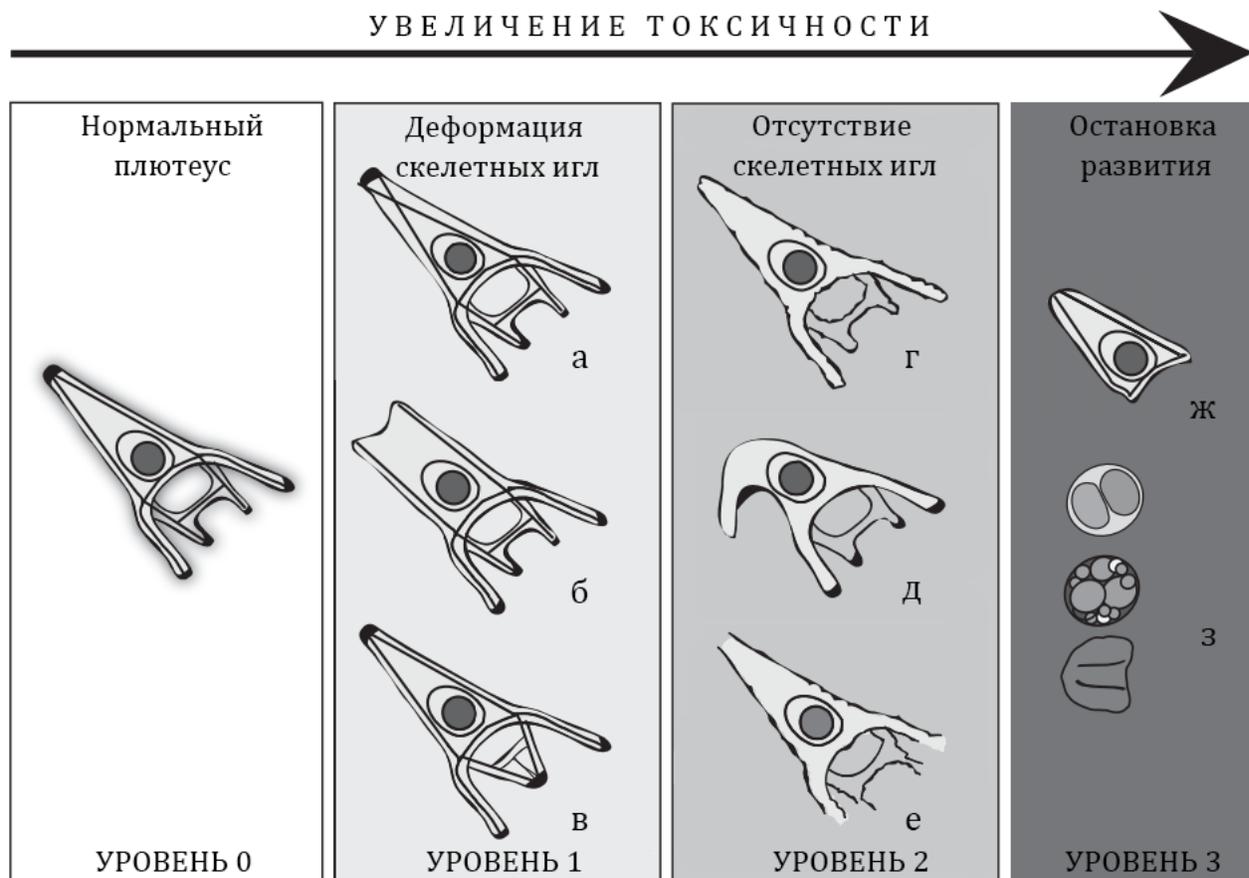


Рисунок 12. Классификация морфологических деформаций личинок *Paracentrotus lividus* в соответствии с выделенными уровнями загрязнения. Условные обозначения: а – апикальный перекрест скелетных игл; б – апикальное расхождение скелетных игл; в – срастание "рук"; г – отсутствие скелетных игл при сохранении нормальной формы тела; д – апикальная деформация; е – фрагментация эпителия; ж – призма; з – ранние стадии развития (зигота, бластула, гастрюла) (мод. по Carballeira et al., 2012).

Важно, что выделяемые авторами уровни воздействия подкреплены повышенными значениями долей личинок с соответствующими морфологическими деформациями в каждом из выделенных уровней.

Дальнейшим развитием скелетного критерия можно считать разработанный Моррони с соавторами (Bonaventura et al., 2021; Morroni et al., 2016) интегральный индекс токсичности (в оригинале Integrative Toxicity Index - ИТИ) для формирования более точного и биологически верного критерия "аномальности". На основе комплексного анализа развития *P. lividus* в норме и при воздействии негативных факторов среды, авторы отметили, что среди наблюдаемых

морфологических деформаций лишь часть появляется ввиду остановки или необратимого аномального развития личинок (в оригинале *abnormal*). Другая часть, зачастую большая, является следствием замедления развития (в оригинале *delayed*), вызванного негативным воздействием. Несомненно, что остановка и необратимая деформация должны быть наделена большим негативным "весом", нежели замедление в развитии, чего и добиваются авторы добавлением индексирования морфологически различимым типам - морфотипам (рис 13). Таким образом, чем больший индекс получает указанный морфотип, тем больший негативный вклад вносит он в общую оценку, и тем о большем негативном воздействии свидетельствует его наличие.

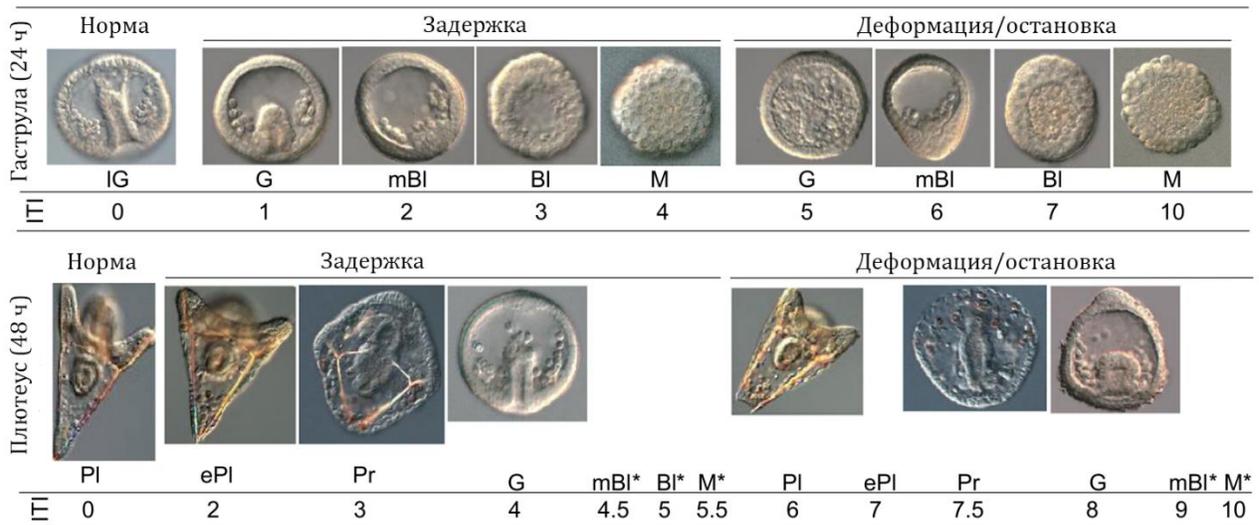


Рисунок 13. Личиночные морфотипы и аномалии развития (и показатели ПТИ), наблюдаемые через 24 (сверху) и 48 (снизу) часов развития *Paracentrotus lividus*, подвергавшихся воздействию тяжелых металлов. Условные обозначения: IG – поздняя гастрюла; G – гастрюла, mBl – мезенхимальная бластула; Bl – бластула; M – морула; ePl – ранний плютеус; Pl – плютеус; Pr – стадия призмы. Звёздочкой помечены морфотипы не представленные ввиду аналогичные по строению через 48 и 24 часа (Morroni et al., 2016).

### 3.3 Расчёт уровня воздействия

Расчёт негативного эффекта производят в зависимости от критериев токсичности, применяемых при подсчёте эффекта воздействия. При использовании общепринятых протоколов тестирования (ASTM, 2012b), основным показателем негативного воздействия является высокая доля аномально развивающихся особей, не подходящих под вышеописанные критерии. Аналогично с тестом двустворчатых моллюсков, расчёт доли нормально развивающихся плютеусов необходимо осуществлять с учётом доли эхиноплютеусов, развивающихся в контрольных условиях, применяя

коррекцию Аббота (см. уравнения 2 и 3). Скорректированные относительно контроля значения используют для расчёта токсикометрических показателей, например  $EC_{50}$  (ASTM, 2012b).

Коренным образом отличается подсчёт эффекта токсичности с использованием интегрального индекса токсичности, предложенного Моррони с соавторами (Bonaventura et al., 2021; Morroni et al., 2016). Как было уже сказано ранее, авторы присваивают цифровые индексы от 0 до 10 каждому из личиночных морфотипов в зависимости от степени задержки в развитии, его остановки или формирования деформаций. После присвоения индексов авторы рассчитывают интегральный индекс ( $ITI$ ), который представляет собой сумму частот каждой аномалии, помноженной на присвоенный индекс:

$$ITI = \sum_{i=10}^n \frac{(S_i * F_i)}{100} \quad (4)$$

Где:

$i$  – порядковый номер морфотипа;

$n$  – общее количество обнаруженных морфотипов;

$S_i$  – присвоенный индекс;

$F_i$  - частота встречаемости данного морфотипа.

Основным преимуществом данного подхода, по мнению авторов, является возможность использования цифровых индексов в качестве "веса" тяжести патологии, что позволяет различить просто задержку и остановку в развитии. Использование интегрального критерия значительно расширяет возможности тестирования, превращая его из бинарного в многомерный. Для примера использования  $ITI$  авторы приводят сравнение результатов анализа 25 (включая контроль) образцов воды из бухты Трапани (Trapani Harbor) классическим методом и с использованием интегральной оценки (рис. 14).

Среди данных образцов, оценка стандартным критерием (А) может быть информативной только в десяти образцах, поскольку в них присутствуют нормальные плютеусы. Остальные образцы при использовании стандартного критерия, ввиду отсутствия нормальных плютеусов, признаются максимально токсичными. Использование интегральной оценки позволило произвести оценку всех 25 образцов, присваивая каждому из них оценку от 0 до 10, разделяя таким образом даже самые токсичные образцы. Более того, интегральная оценка выявила ряд завышено-негативных оценок

стандартного метода, поскольку в некоторых анализируемых образцах авторы обнаружили высокую долю личинок, с незначительной задержкой в развитии (например, 8A). Авторы отмечают, что ключевое преимущество интегральной оценки состоит в большей чувствительности и расширении диапазона оценки при работе с достаточно токсичными образцами, что позволяет отделять менее серьезные задержки в развитии от существенных морфологических патологий.

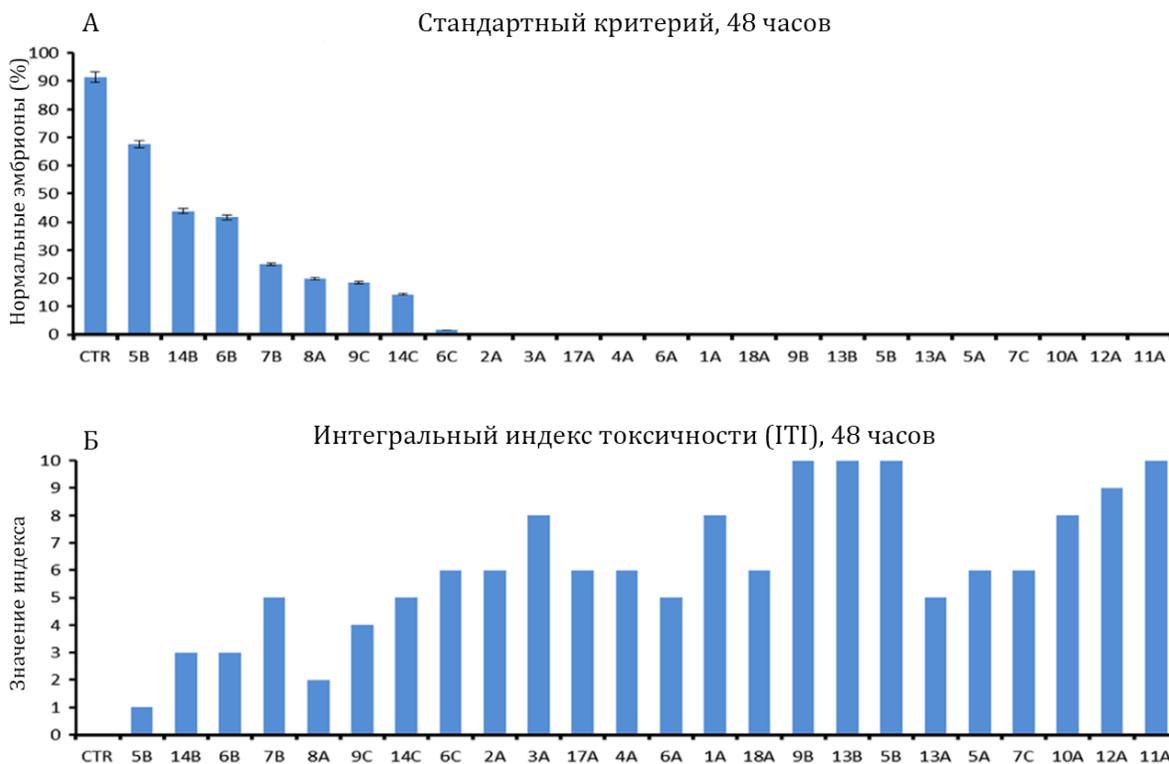


Рисунок 14. Сравнение значений классического критерия токсичности (А) и ИТИ (Б) при интерпретации результатов эмбрионально-личиночного биотестирования *Paracentrotus lividus* 24-х проб морской воды из гавани Трапани (по оси абсцисс) (Morroni et al., 2016).

### 3.4 Заключение

Таким образом, эмбрионально-личиночное тестирование морских ежей представляет собой процедуру тестирования, очень близкую к ЭЛТ двустворчатых моллюсков. Подавляющее большинство аспектов и параметров теста сходны (время проведения, абиотические условия) или практически идентичны (оценка приемлемости контроля, способ расчёта токсического эффекта). Оба теста направлены на поиск негативного воздействия именно на процесс развития начиная с делений дробления до формирования важной личиночной стадии. Аналогичны и используемые критерии токсичности. Данная особенность не могла оставаться незамеченной и обсуждалась в

литературе (His et al., 1999b). Важно, что сходство тестов формирует и общую проблематику, во многом связанную с применяемыми критериями токсичности (Mogroni et al., 2016).

#### 4. Особенности воздействия негативных факторов при проведении ЭЛТ

Вне зависимости от принимаемых критериев "нормальности", авторы большого количества работ отмечают значимое воздействие на раннее развитие широкого спектра негативных факторов, начиная с неблагоприятных абиотических условий среды, заканчивая весьма высокими концентрациями тяжелых металлов. При этом основное внимание уделяется именно уровню воздействия, нежели особенностям или специфичностью его проявления. Последний аспект практически не затронут в литературе.

##### 4.1 Воздействие на динамику развития

Одними из важнейших и подробных работ, описывающих негативное воздействие на процессы развития можно назвать работы Кобаяши, посвященные совершенствованию методологии ЭЛТ морских ежей с использованием *Anthocidaris crassispina* и *Hemicentrotus pulcherrimus* (Kobayashi, 1990, 1985). Исследуя воздействия на раннее развитие изучаемых видов морских ежей тяжелых металлов (Cu и Zn), органических соединений (алкилбензилсульфат - ABS) и хлорида аммония, автор выделил такие ключевые стадии развития как: зигота, двухклеточный зародыш, бластула, гастрюла, экзогастрюла и плютеус (нормальный и аномальный). В качестве меры воздействия Кобаяши рассчитывал доли и соотношения данных стадий развития через 1, 15 и 24 часа и также отмечал финальную стадию.

Согласно полученным результатам, при возрастании концентраций действующих веществ меняются стадии, обнаруживаемые автором на протяжении эксперимента. Например, через 15 часов развития при концентрации хлорида цинка 50 мкг/л 97% всех зародышей представляли собой гастрюлы, тогда как при 200 мкг/л доля таких зародышей была лишь 51%, а остальные представляли собой либо аномальные гастрюлы, либо бластулы. В максимальной исследованной концентрации хлорида цинка – 500 мкг/л, доля бластул достигала 34%. Другим важным параметром автор считал окончательное состояние развития (ultimate state), которое могло свидетельствовать о гибели особей, задержке или остановке в их развитии на определённой стадии. Проведя анализ полученных результатов, автор отмечал закономерность, что вне зависимости от природы токсиканта, при увеличении его концентрации (а следовательно - и уровня негативного воздействия) увеличивается задержка в развитии. Согласно полученной закономерности минимальное негативное воздействия вызывает лишь небольшую задержку в развитии, слабое – может вызывать большую задержку и появление морфологических отклонений. Среднее воздействие приводит к существенным задержкам в развитии, а сильное – к остановке развития на ранних стадиях. Тем самым, постулирует

Кобаяши, большее негативное воздействие ведет к задержке или остановке в развитии на более ранних стадиях.

Данный постулат находит своё подтверждение во множестве работ, одной из которой является уже рассмотренная ранее работа Курихары с соавторами, посвященная воздействию закисления мирового океана на раннее развитие *M. galloprovincialis* (Kurihara et al., 2008). Оценивая соотношение стадий развития (зигота, 2-/4-бластомера, морула, гастрюла, трохофора и D-велигер) на разных временных промежутках тестирования, авторы отметили, что значимая задержка в развитии наблюдается с промежутка от 24 до 54 часов с начала эксперимента. Повышенное до 2000 мкاتم  $pCO_2$  приводит к тому, что более 70% личинок в этот временной промежуток тестирования не имеют раковины, тогда как в контроле все личинки представлены D-велигерами. Через 120-144 часа все личинки из закисленной среды имели раковины, однако последние часто несли различного рода морфологические деформации.

#### 4.2 Тяжелые металлы

Повышение концентраций тяжелых металлов, как показывают многочисленные исследования, оказывает крайне негативное воздействие на развитие двустворчатых моллюсков (Beiras and Albentosa, 2004; His et al., 1999a; Martin et al., 1981; Moreira et al., 2018; Nadella et al., 2009; Xie et al., 2017; Малахов и Медведева, 1991; Ярославцева и Сергеева, 2005). Одним из самых часто наблюдаемых негативных эффектов при проведении ЭЛТ двустворчатых моллюсков является полное отсутствие или значительная деформация раковины даже при относительно невысоких концентрациях ионов тяжелых металлов. Так, Малахов с Медведевой (Малахов и Медведева, 1991) отмечают, что эмбрионы *M. edulis*, развитие которых проходило при повышенных концентрациях солей меди, цинка и кадмия (до 0.04, 1 и 5 мг/л соответственно), имели уродливые черты и рано или поздно погибали, не способные к дальнейшему развитию. Раковины велигеров, развивающихся в таких условиях, имели створки неравной величины, часто меньшего, по сравнению с контрольными, размера и с неровными краями. Авторы отмечают, что при максимальных концентрациях ионы тяжелых металлов могут иметь выраженную специфичность воздействия, которая проявляется в особенностях приобретенных деформаций (рис 15). Согласно проведенным исследованиям, воздействие ионов меди в концентрации 0.04 мг/л приводит к формированию уменьшенной раковины со створками неправильной формы (рис 15а). Кристаллы карбоната кальция в раковинах таких личинок откладываются только в виде крупных глобул в центре створок. Повышение концентрации цинка до 1 мг/л приводят к полному отсутствию у личинок сформированной раковины и образованию эпителиальных пузырей на месте створок (рис 15б). Ионы кадмия в

концентрации 5 мг/л приводят к формированию у личинки крошечной раковины с широко раскрытыми створками (рис 15в).

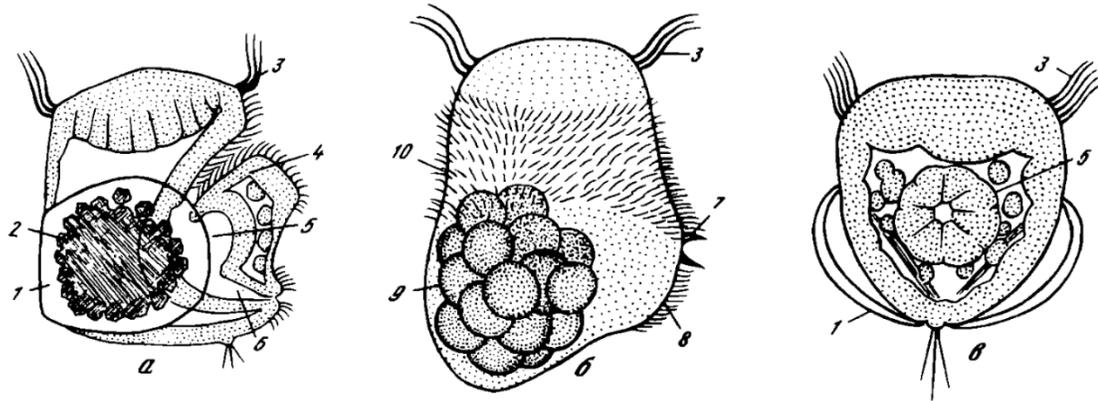


Рисунок 15. Морфологические деформации личинок *Crassostrea gigas* на стадии велигера под действием ионов меди (а), цинка (б), кадмия (в). Условные обозначения: 1 — органическая раковина; 2 — кристаллы углекислого кальция; 3 — велюм; 4 — стомодеум; 5 — желудок; 6 — задняя кишка; 7 — ресничный «клапан» между стомодеумом и желудком; 8 — неввернутый материал стомодеума; 9 — материал раковинной железы; 10 — гипертрофированно развитый ресничный покров (Малахов и Медведева, 1991).

Авторы справедливо отмечают, что несмотря на видимые различия, воздействие всех трёх металлов приводит, в частности, к нарушению процесса формирования раковины. Следует отметить, что во всех трёх вариантах деформаций, наблюдаемых у исследованных видов двустворчатых моллюсков, авторы почти всегда отмечали нормальное развитие мягких тканей моллюска. К сожалению, авторы не осуществляли классификацию деформированных личинок, отмечая лишь общее снижение доли D-велигеров при увеличении концентрации тяжелых металлов (Малахов и Медведева, 1991).

Воздействие тяжелых металлов может быть напрямую связано с формированием раковины. Отсутствие раковины при воздействии тяжелых металлов может быть связано с нарушением функционирования основного белка раковины, участвующего в формировании кристаллов карбоната кальция (major extrapallial protein - **EP**). Данный белок находится в жидкости между

структурами раковины и мантийным краем, и принимает активное участие в связывании и транспортировке ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Важно, что среди прочих особенностей данный белок обладает способностью помимо ионов  $\text{Ca}^{2+}$  связывать и другие двухвалентные ионы –  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , и  $\text{Mn}^{2+}$  (Hattan et al., 2001).

Другим важным белком, выделенным из гемолимфы *M. edulis*, является НР белок (heavy metal binding protein), который активно связывает ионы тяжелых металлов (Yin et al., 2005). Исследования структуры данного белка показало большое сходство в последовательности с белком ЕР, а различия в строении отмечены только в 9 из 213 аминокислотных остатков. Столь высокая степень сходства позволила авторам предположить, что обнаруженные белки представляют собой один и тот же белок, выделенный из разных частей моллюска (Yin et al., 2005). Присутствие НР белка в гемолимфе, по мнению авторов, может свидетельствовать о его защитной функции при интоксикации тяжелыми металлами. Тогда, после связывания двухвалентными ионами тяжелых металлов НР белка в гемолимфе ионы металлов начнут связывать ЕР белок, что приведет к нарушению процесса формирования раковины

Наличие ионов тяжелых металлов оказывает непосредственное воздействие и на активность карбоангидраз, способствующих гидратации диоксида углерода. Катионы тяжелых металлов, такие как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Ag}^+$ , могут выступать как в роли кофакторов, так и конкурентных и неконкурентных ингибиторов Zn-зависимых карбоангидраз. Например, показано что ионы  $\text{Co}^{2+}$ , ввиду аналогичного ионного радиуса, способны конкурентно заменять ионы  $\text{Zn}^{2+}$  в молекулах  $\alpha$ -  $\beta$ - и  $\gamma$ -карбоангидраз, снижая таким образом их активность (Giulia et al., 2012). Таким образом, повышение концентрации ионов тяжелых металлов могут нарушать процесс связывания и транспортировки ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , и как следствие, процесса формирования раковины.

Одним из важных элементов оценки негативного воздействия является поиск возможной связи особенностей деформации личинок, полученных при неблагоприятных условиях среды с уровнем негативного воздействия. Подобную взаимосвязь можно обнаружить при детальной классификации типов личиночных деформаций, полученных при оценке негативного воздействия среды, как это было сделано, например в работе Морейра с соавторами (Moreira et al., 2018). В данном исследовании авторы произвели оценку воздействия ряда концентраций ионов мышьяка (As) при различных абиотических условиях и построили распределение различных типов выявленных личиночных деформаций *C. gigas*. Согласно полученным результатам, появление различного рода морфологических деформаций во многом зависит как от используемой

концентрации токсиканта, так и условий проведения эксперимента (например, рис. 16). Авторы отмечают, что при отсутствии негативного воздействия токсиканта и неоптимальном температурном режиме, максимальную долю среди всех аномалий составляют личинки с "выступающей мантией" (до 30% при 28°C и 19%) и личинки с "выемкой на краю раковины" (при 28°C и солёностях от 24 до 32‰). При минимальной исследованной концентрации мышьяка (100 мкг/л) в зависимости от абиотических условий превалирующей аномалией является либо личинки с "выступающей мантией" (при 32°C и солёностях 24-32‰), либо с "седловидным замком" раковины (при 24 и 28°C). При концентрации 300 мкг/л вне зависимости от абиотических условий личинки оказываются не способными сформировать раковину.

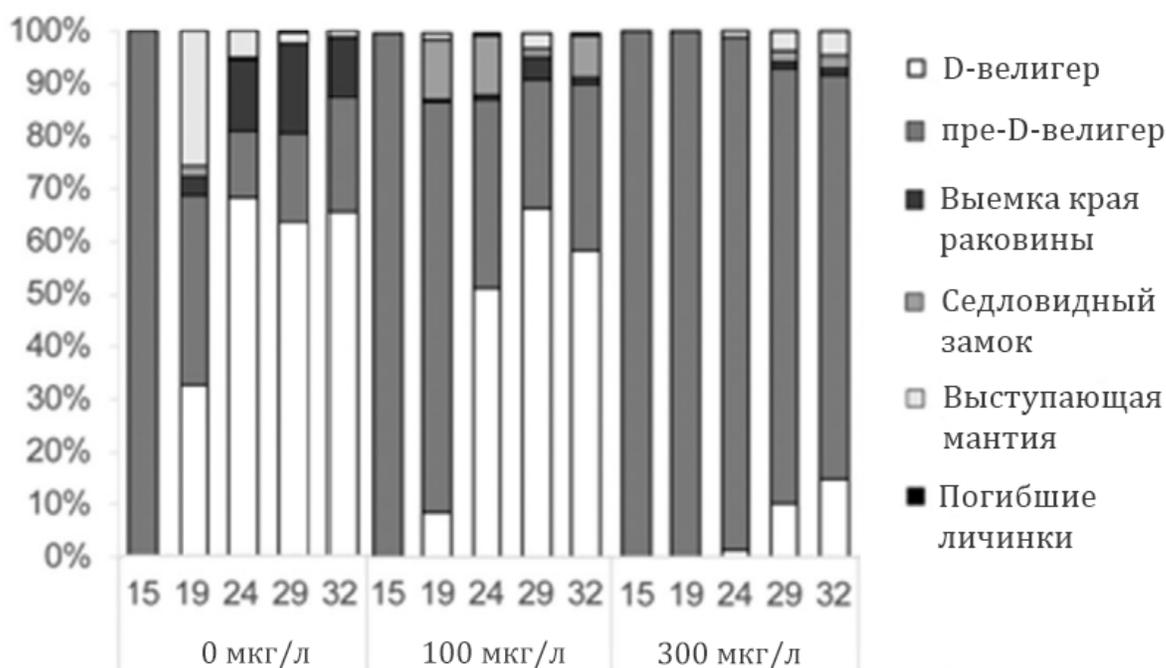


Рисунок 16. Соотношение количества наблюдаемых типов личиночных деформаций *Crassostrea gigas* при оценке воздействия ряда концентраций ионов мышьяка (As) при температуре 28°C и солёности от 15 до 32‰ (по оси абсцисс). (Moreira et al., 2018)

#### 4.3 Закисление мирового океана

Снижение pH (закисление) мирового океана ввиду увеличения эмиссии CO<sub>2</sub> в атмосферу является еще одним фактором, которому уделяется пристальное внимание. Ряд работ по оценке воздействия этого воздействия проведен с использованием раннего эмбрионального развития двустворчатых моллюсков, их роста и развития (Andersen et al., 2013; Gazeau et al., 2010; Haruko Kurihara, 2008; Kurihara et al., 2008, 2007; Szalaj et al., 2017). В указанных работах, авторы отмечают

закономерности, которые были нами детально рассмотрены на примере данных по влиянию ряда прогрессирующих концентраций тяжелых металлов.

Например, Андерсен с соавторами (Andersen et al., 2013) оценили влияния повышения уровня  $p\text{CO}_2$  до 469, 807, 1164 и 1599 мкатм и соответствующего уровням  $p\text{CO}_2$  снижения уровня pH до 7.98, 7.78, 7.64 и 7.51. Оценивая негативное воздействия закисления среды, авторы отмечают наличие всех личиночных морфотипов, выделяемых согласно общепринятой классификации (His et al., 1997). Важная особенность исследованного воздействия состоит в том, что при всех изученных уровнях  $p\text{CO}_2$  количество личинок, сформировавших раковину (включая деформированные) было достаточно велико – около 82-88%. При этом, доля D-велигеров среди раковинных личинок в проведенных экспериментах уменьшается с 64 до 28% по мере возрастания  $p\text{CO}_2$  до 1599 мкатм. Анализируя соотношение различных видов личиночных деформаций, авторы отмечают, что доминирующим во всём изученном диапазоне  $p\text{CO}_2$  морфотипом является велигер с "выемкой на краю раковины". Доля таких личинок превалирует при всех уровнях  $p\text{CO}_2$  и составляет от 30 до 57%, достигая максимума при среднем уровне  $p\text{CO}_2$  равного 807 мкатм. Другим важным морфотипом является "седловидный замок" раковины, доля которого значимо больше чем в контроле только при максимальном  $p\text{CO}_2$ . Кроме того, при максимальном уровне  $p\text{CO}_2$  (1599 мкатм) также значимо повышается доля личинок с проявлением одновременно двух деформаций раковины – "выемки на краю раковины" и "седловидного замка" раковины.

В упомянутом выше исследовании, Курихара с соавторами, исследовав воздействие аналогичных уровней  $p\text{CO}_2$  (1000 и 2000 мкатм) на раннее развитие *C. gigas* и *M. galloprovincialis*, также отметил наличие личинок с морфологическими деформациями раковины (Haruko Kurihara, 2008; Kurihara et al., 2008, 2007). Рассматривая соотношение личинок *M. galloprovincialis* через 120-144 часа развития при  $p\text{CO}_2$  равном 2000 мкатм, авторы отмечают высокую долю личинок (64-65%), несущих одновременно две деформации - "выступающую мантию" и "седловидный замок" раковины. Значимо отличной от контроля при этом является как доля велигеров с "выступающей мантией" (23-24%), так и с "седловидным замком" (8-11%). При этом личинки с "выемкой на краю раковины" в экспериментальной выборке практически отсутствуют (менее 1% при 2000 мкатм).

Похожую закономерность распределения морфологических деформаций показали эксперименты по оценке влияния как статичного повышения, так и колебаний уровня  $p\text{CO}_2$  (и связанного с этим уровня pH) на раннее развитие *M. galloprovincialis* (Kapsenberg et al., 2018) (рис. 17). Закисление морской воды до pH=7.8 приводит лишь к незначительному увеличению доли

личинок с "выступающей мантией" до 2-3%. Снижение рН до 7.4 приводит как к большему увеличению доли личинок с "выступающей мантией" (до 30%), так и к появлению 16-18% личинок с "седловидным замком" или несущих одновременно две деформации. Исследуя воздействия колебаний рН с 24-часовым периодом, авторы заметили, что доля личинок с морфологическими деформациями значительно возрастает, если на промежуток 27-35 часов приходятся минимальные значения уровня рН морской воды (7.4). Дополнительно проведенные эксперименты полностью подтвердили предположение авторов, показав значительное увеличение личинок с "седловидным замком" (до 18%) и "выступающей мантией" (до 30%) в экспериментах, в которых уровень рН морской воды снижался до 7.4 только в промежутке между 27 и 35 часами с начала развития.

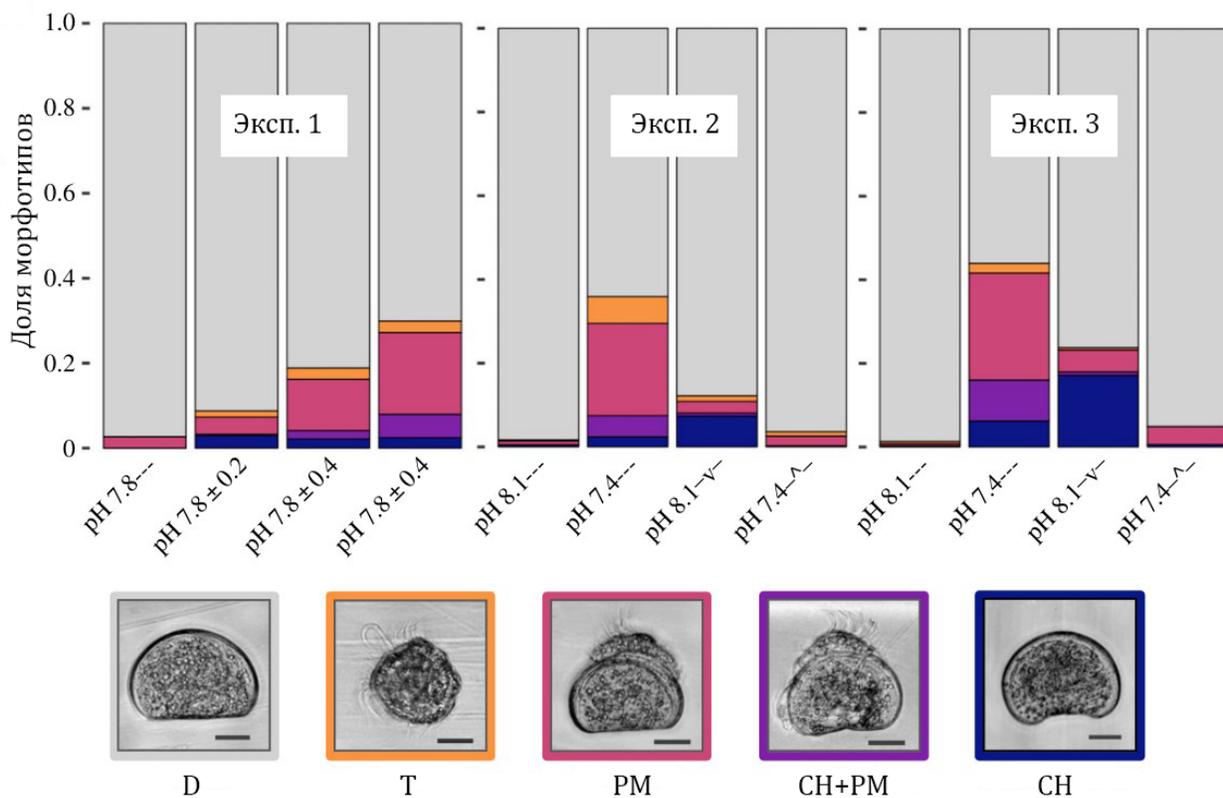


Рисунок 17. Влияние колебаний рН морской воды, связанной с увеличением  $p\text{CO}_2$  на раннее развитие *Mytilus edulis*. Условные обозначения: D – D-велигер; T – "трохофора"; PM – "выступающая мантия"; CH – "седловидный замок" раковины; CH+PM – одновременное проявление "выступающей мантии" и "седловидного замка" (Kapsenberg et al., 2018).

Нельзя не отметить, что наиболее часто наблюдаемым эффектом, описываемым авторами в работах при оценке воздействия закисления мирового океана, становится изменение размеров велигеров. Так, в одном из обзоров по данной тематике (Gazeau et al., 2013) показано, что из 23-х

работ в 17 авторы отмечают снижение размеров велигеров как одно из основных негативных последствий закисления окружающей среды. Во всех исследованиях по оценке воздействия закисления мирового океана на развитие двусторчатых моллюсков, рассмотренные нами выше, авторы также отмечают, что развивающиеся в закисленной среде личинки значительно меньше контрольных. Например, в работе Курихары с соавторами (Kurihara et al., 2008) показано, что D-велигеры *M. galloprovincialis*, на всём протяжении эксперимента развивавшиеся при повышенном содержании CO<sub>2</sub>, меньше контрольных D-велигеров более чем на 30 мкм.

Негативное влияние закисления мирового океана на формирование известковых скелетных элементов, вследствие увеличения парциального давления углекислого газа достаточно хорошо изучено (Gazeau et al., 2013, 2007; Waldbusser et al., 2015). Принцип формирования известковых элементов основан на осаждении кристаллов карбоната кальция из растворённых в морской воде карбонат-ионов (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) и ионов кальция (Ca<sup>2+</sup>). Основным параметром морской воды, определяющим возможность формирования известкового скелета, является насыщенность (Ω) воды карбонатом кальция, рассчитываемая согласно уравнению:

$$\Omega = \frac{[Ca^{2+}][CO_3^{2-}]}{K'_{sp}} \quad (4)$$

где в числителе представлено произведение концентрации ионов кальция и карбонат-ионов в морской воде, а в знаменателе – константа растворимости соответствующего минерала (арагонита или кальцита) при текущем давлении и температуре. Формирование арагонитовой или кальцитовой раковины при этом возможно только если насыщенность морской воды для соответствующего минерала больше единицы, иными словами – морская вода должна быть насыщена или перенасыщена карбонатом кальция. При этом, насыщенность морской воды арагонитом и кальцитом различается даже при идентичных условиях среды: например, при уровне атмосферного pCO<sub>2</sub> в 421 мккатм, температуре 20°C и солёности 30‰, Ω<sub>арагонита</sub> составляет 3.4, а Ω<sub>кальцита</sub> почти вдвое выше – 6.3 (Gazeau et al., 2007).

Непосредственное влияние насыщенности морской воды арагонитом, среди множества других изменений, вызываемых повышением pCO<sub>2</sub>, детально рассмотрено в исследовании Уолдбассера с соавторами (Waldbusser et al., 2015). При проведении исследования, путём добавления растворённой органики, защелачивания и подкисления, коллектив исследователей смог добиться независимого изменения значений pH, растворённого CO<sub>2</sub> и Ω<sub>арагонита</sub> в морской воде. В общей сложности при постановке эксперимента было создано 16 различающихся

экспериментальных условий, при которых шло развитие *Mytilus californianus* [Conrad, 1837], а чистая морская вода выступала в качестве контроля. Согласно полученным результатам наибольший вклад как в снижении доли нормальных D-велигеров, так и в размер личиночной раковины оказало именно снижение  $\Omega_{\text{арагонита}}$ . Так, развитие при низком уровне насыщенности арагонитом оказывается катастрофическим для личинок (рис. 18А) в достаточно широком диапазоне pH, снижая уровень D-велигеров ниже 20%. В то же время, снижение уровня pH независимо от снижения насыщенности не оказывает такого воздействие ни на уровень D-велигеров (рис. 18А), ни на размеры личиночной раковины (рис. 18Б). Во всех исследованиях негативного воздействия закисления мирового океана, рассмотренных выше, значительное снижение доли D-велигеров наблюдается именно при уровне  $p\text{CO}_2$  при которых  $\Omega_{\text{арагонита}}$  оказывается меньше единицы. Так, в вышеупомянутой работе Уолбассера с соавторами доля D-велигеров и линейные размеры резко возрастают одновременно с превышением  $\Omega_{\text{арагонита}}$  единицы (рис 18).

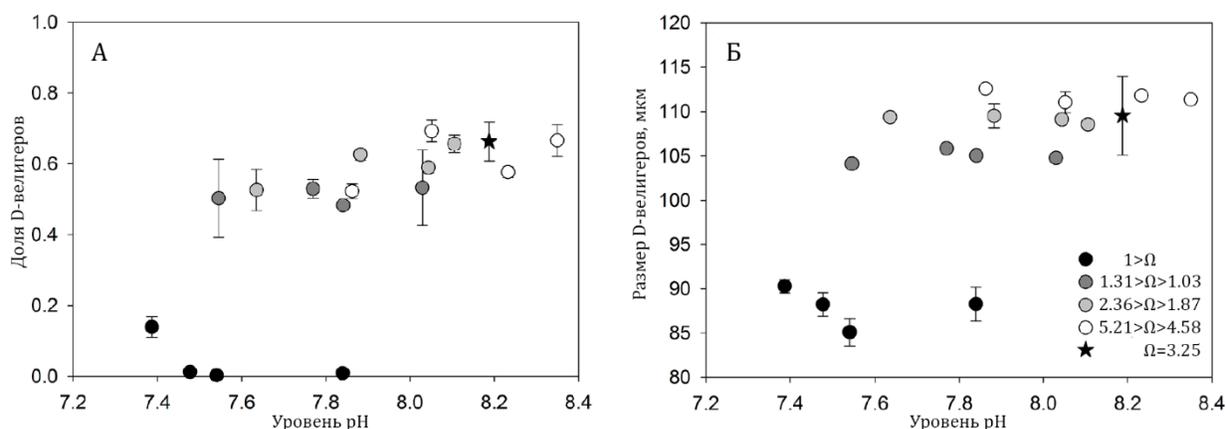


Рисунок 18. Влияние насыщенности морской воды арагонитом  $\Omega_{\text{арагонита}}$  на долю D-велигеров (А), и средний размер личиночной раковины (Б) *Mytilus californianus* при различных уровнях pH (по оси абсцисс). Значения  $\Omega_{\text{арагонита}}$  согласно промежуткам отмечены оттенками серого, звездочкой отмечен контроль (Waldbusser et al., 2015).

В работах Курихары с соавторами (Kurihara et al., 2008, 2007) совокупная доля личинок с деформированными, частично минерализованными раковинами и без раковин превышает 50% при  $p\text{CO}_2$  от 1924 до 2268, при которой  $\Omega_{\text{арагонита}}$  составляет 0.49 и 0.68 соответственно. В описанной работе Андерсена с соавторами (Andersen et al., 2013), при максимальном значении  $p\text{CO}_2 = 1599$  совокупная доля личинок с деформациями раковины и без раковин также составляет 72% при  $\Omega_{\text{арагонита}} = 0.88$ . Работа Капсенберга с соавторами (Kapsenberg et al., 2018) демонстрирует

фундаментальную особенность формирования личиночной раковины. Проведя серию экспериментов, автор показал, что наиболее чувствительным к увеличению  $p\text{CO}_2$  является этап закладки раковины в интервале с 27 до 35 часов после начала развития. Если на данном этапе развития личинки будут помещены в закисленную до  $\text{pH}=7.4$  (путём повышения уровня  $p\text{CO}_2$ ) морскую воду, то доля личинок с деформациями раковины будет такая же, как и в эксперименте целиком проведенным в морской воде, закисленной до  $\text{pH} = 7.4$ . Напротив, смена на этом этапе развития закисленной до  $\text{pH} = 7.4$  морской воды на природную ( $\text{pH} = 8.1$ ) приводит к тому, что доля "аномальных" велигеров не будет отличаться от контроля. Исследование структуры раковины с использованием сканирующей электронной микроскопии позволили авторам отметить наличие деформации текстуры раковины в зоне продиссоконха I, особенно, в центральной его части (рис 19А). При этом, деформация начинается еще с раннего процесса формирования периостракальной пластинки. Комбинированное контрастирование периостракальной пластинки калькофлуором (окрашивание 1,4  $\beta$ -глюканов) и зоны кальцификации кальцеином (окрашивание новообразованного  $\text{CaCO}_3$ ) позволили авторам детально проследить процесс деформации раковины (рис. 19Б).

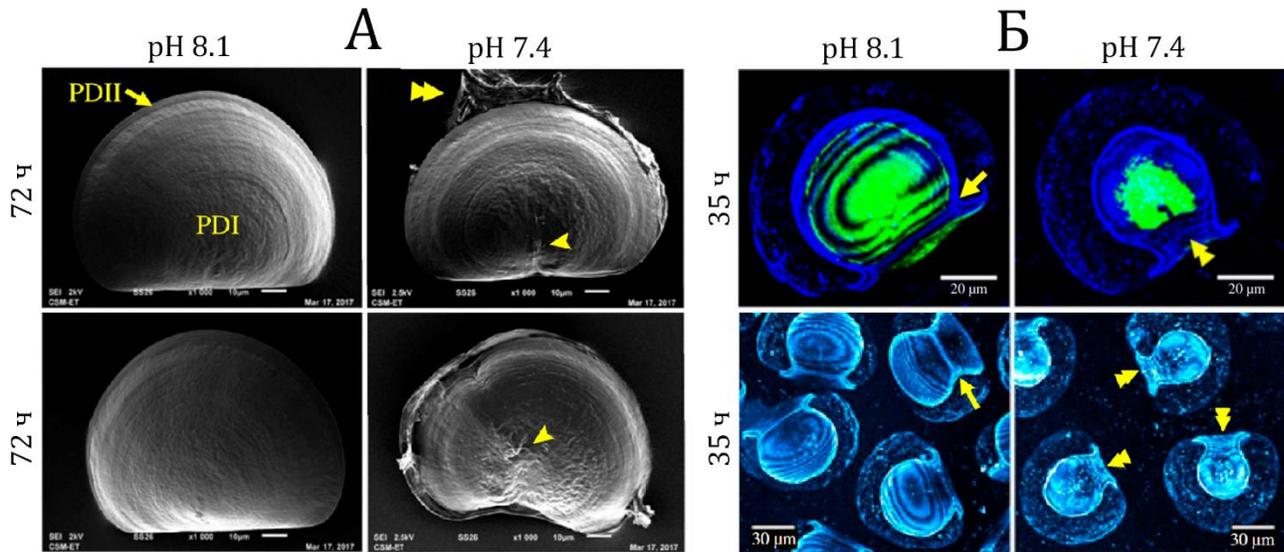


Рисунок 19. А - электронно-микроскопическая фотография деформации раковины, обнаруженные при развитии в закисленной повышением  $p\text{CO}_2$  до соответствующего уровня  $\text{pH}$  морской воды. Стрелкой указана зона деформации раковины, двойной стрелкой – выступающая часть мантии, PDI и PDIИ обозначают зоны продиссоконха I и II. Б - Серия конфокальных изображений личинок возрастом 35 часов с контрастированием комбинацией калькофлуора (хитин, голубой) и кальцеина ( $\text{CaCO}_3$ , зеленый). Стрелкой обозначен замок недеформированной раковины, двойной стрелкой –

зона деформации личиночной раковины, сформированной в закисленной в закисленной с повышением  $p\text{CO}_2$  до соответствующего уровня pH морской воды (Kapsenberg et al., 2018).

Авторы отмечают, что у трохофоры возрастом 35-часов, развивавшейся при  $\text{pH}=7.4$ , периостракальная пластинка (центральная часть продиссоконха I) уже деформирована и имеет углубленную часть вследствие неполного выворачивания раковинной железы. В отличие от нормального паттерна кальцификации в центральной части периостракальной пластинки не идет заложение кристаллов карбоната кальция, а в более поздних личинках можно хорошо заметить в этой части зону утолщения раковины (Kapsenberg et al., 2018). Возможно, что корректный паттерн кальцификации раковины задаётся именно на этапе формирования продиссоконха I, нарушения которого приводит к формированию деформированных личинок (например, с "седловидным замком" раковины).

Таблица 1. Преобладание различных типов морфологических деформаций, обнаруженных авторами при исследовании негативного воздействия закисления морского океана, в зависимости от уровня снижения pH (вызванного увеличением  $p\text{CO}_2$ ).

Вид	"Выемка на краю раковины"	"Выступающая мантия"	"Седловидный замок"	Комбинация	Источник:
<i>Pecten maximus</i>	7.9-8.0	-	7.51	7.51	(Andersen et al., 2013)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	7.8	-	-	7.42	(Kurihara et al., 2008)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-	7.8	7.4	7.4	(Kapsenberg et al., 2018)
<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-	7.42	(Haruko Kurihara, 2008)
<i>Perna perna</i>			7.6	7.6	(Szalaj et al., 2017)

Суммируя данные экспериментов, проведенных с различного рода негативными воздействиями, можно отметить важную закономерность. Вероятность обнаружения той или иной морфологической деформации личинок меняется в зависимости от уровня негативного воздействия (таблица 1). Минимальный уровень воздействия приводит к появлению в экспериментах личинок с незначительными деформациями – "выемкой на краю раковины" или "выступающей мантией". Увеличение уровня негативного воздействия приводит к появлению личинок с деформацией замка раковины, дальнейшее увеличение – к одновременному формированию двух различных деформаций

("выступающая мантия" или "выемка на краю раковины" вместе с "седловидным замком" раковины). Максимальный нелетальный уровень воздействия проявляется в крайне низком уровне развития раковины или её полному отсутствию.

#### 4.4 Восстановление после негативного воздействия

Одним из ключевых критериев, позволяющих отличить остановку в развитии от задержки в развитии, является возможность восстановления строения и жизнедеятельности организма (личинки) после оказанного воздействия. Таким образом, морфотипы личинок, способные продолжить развитие, будут маркировать задержку в развитии, а неспособные – остановку.

##### 4.4.1 Морские ежи

Оценка возможности восстановления нормального строения после перенесенного негативного воздействия и стало задачей работы Моррони с соавторами после введения ими интегрального индекса ИТІ (Morroni et al., 2018). В данной работе авторы оценили возможность восстановления после кратковременного (24 ч) воздействия тяжелых металлов (Cd, Cu, Pb and Zn) в ряду четырех концентраций и последующей отмывке в чистой морской воде в течении 24 и 48 часов. Согласно полученным результатам авторы подтвердили значимое увеличение доли нормальных эхиноплютеусов после отмывки для большинства исследованных концентраций. Так, после 24 ч экспозиции эмбрионов в среде с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации 70 мкг/л доля поздних гаструл (IG) не превышала 50% ( $\text{EC}_{50} = 72.82 \pm 7.95$  мкг/л). Продолжение эксперимента при аналогичных условиях в течении последующих 48 часов приводит к формированию менее 10% плутеусов ( $\text{EC}_{50} = 40.65 \pm 6.64$ ). Если же сменить среду с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  на чистую морскую воду через сутки развития, то доля нормально развивающихся плутеусов (PI) через 48 часов отмывки составит около 60% ( $\text{EC}_{50} = 212.13 \pm 1.5$  мкг/л). Таким образом, авторы утверждают, что часть стадий развития, принимаемых аномальными в соответствии со стандартным критерием, являются по факту стадиями с задержкой в развитии, способными к восстановлению после непродолжительной отмывки. Критерии интегрального метода оценки токсичности (ИТІ), заключают авторы, позволяют шире оценивать реальную токсичность и тератогенный потенциал загрязнений, поскольку учитывает не только непосредственное влияние, но и потенциал к восстановлению после негативного воздействия (Morroni et al., 2018).

##### 4.4.2 Двустворчатые моллюски

Исследования, посвященные оценке возможности восстановления после перенесенного негативного воздействия проводились и для ЭЛТ двустворчатых моллюсков (Ярославцева и

Сергеева, 2005). Таковыми можно считать и исследования, оценивающие эффект воздействия кратковременного повышения уровня негативного воздействия на ранние стадии развития двустворчатых моллюсков с последующей отмывкой (Armstrong and Millemann, 1974; Granmo, 1972; Kapsenberg et al., 2018).

Например, Ярославцева и Сергеева (Ярославцева и Сергеева, 2005) в своей работе оценили негативное воздействие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  до 20 мкг/л на развитие *M. trossulus* продолжительностью вплоть до 240 часов в пяти различных сценариях, условно разделенных на три группы:

1. Оплодотворение и последующее развитие продолжительностью до 240 часов в морской воде с добавлением ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ;
2. Оплодотворение и развитие до определенной стадии развития (бластулы, раннего велигера, велигера или великонха) в чистой морской воде с последующим развитием продолжительностью до 240 часов в морской воде с добавлением ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ;
3. Оплодотворение и развитие до определенной стадии развития (зиготы, бластулы, раннего велигера или велигера) в чистой морской воде с последующим кратковременным (24 и 48 ч) переносом в среду с повышенным содержанием ионов меди и последующей отмывкой от 3 до 7 суток.

Наибольший интерес представляет вторая и третья группа экспериментов, поскольку именно в них авторы предполагают воздействие на определенных этапах развития, а также восстановление после кратковременного воздействия повышенными концентрациями ионов меди.

Опираясь на результаты первой группы экспериментов, авторы отмечают, что минимальная концентрация ионов меди, оказавшая негативное воздействие на раннее развитие *M. trossulus* составляет 10 мкг/л. Пересадка в экспериментальную среду более поздних стадий развития (вторая группа экспериментов), первоначально не отличается по уровню воздействия. Так, пересадка в экспериментальную среду бластулы вместо дробящейся зиготы не приводит ни к значимому увеличению доли переходящих на следующую стадию развития личинок, ни к увеличению линейных размеров раковины. Например, через 120 часов экспозиции при концентрации 10 мкг/л размеры личиночных раковин особей, пересаженных на стадиях зиготы и бластулы, оказываются сопоставимы ( $97.30 \pm 9.36$  и  $94.50 \pm 11.17$  мкм). Однако если сравнивать особей, внесенных в экспериментальную среду с концентрацией ионов меди в 20 мкг/л на стадии зиготы и раннего велигера, то окажется, что через 120 часов экспозиции, доля личинок, перешедших на стадию

великонха со стадии велигера увеличивается с 27.5% до 62% по сравнению долей перешедших на аналогичную стадию со стадии зиготы. Размеры личиночных раковин таких великонхов также оказываются крупнее и составляют  $93.10 \pm 6.67$  мкм, по сравнению с  $73.50 \pm 18.45$  мкм. Несмотря на снижение негативного воздействия ионов меди при пересадке на более поздних стадиях развития, велигеры, подверженные воздействию, значительно меньше контрольных ( $127.07 \pm 8.61$  мкм). Следовательно, личинки со сформированной раковиной оказываются менее восприимчивы к негативному воздействию, а основной эффект выражается в уменьшении размеров (задержке роста) личиночной раковины.

Если же развитие со стадии зиготы проходит сначала в среде с повышенной концентрацией меди, а потом в течении 120 часов в чистой морской воде (третья группа экспериментов), то конечные размеры личинок будут существенно различаться с предыдущим вариантом эксперимента (24-48 часов в чистой морской воде и 120 часов в среде с медью). Так, экспозиция в течении 48 часов после оплодотворения при концентрации меди в 10 мкг/л и последующей отмывке в течении 120 часов приводят к формированию велигеров с размерами лишь  $82.33 \pm 13.66$  мкм по сравнению с  $102.55 \pm 10.08$  мкм в обратном варианте эксперимента (48 часов в чистой морской воде и 120 часов при концентрации 10 мкг/л). Таким образом, **имеет значение не только продолжительность негативного воздействия, но и стадия развития, при котором личинки испытывают данное воздействие.** Чем позже личинки испытывали негативное воздействие, тем меньше угнетался их рост (Ярославцева и Сергеева, 2005). Анализируя данные, полученные в эксперименте с пересадкой подверженных воздействию особей в чистую морскую воду, авторы считают результаты такой "отмывки" неудовлетворительными, оперируя лишь размерами велигеров. К сожалению, авторы никак не классифицируют личинок с деформациями ни до пересадки в чистую морскую воду, ни на момент окончания эксперимента.

Похожие закономерности были получены при оценке воздействия инсектицида Sevin и его гидролитического продукта на раннее развитие *M. edulis* (Armstrong and Millemann, 1974). Авторы выяснили, что **токсичность инсектицида и его гидролитического продукта тем выше, чем на более ранние стадии развития приходится его воздействие.** Расчётные значения  $EC_{50}$  после кратковременного воздействия инсектицида (1 час) на зародыш на стадии формирования первой полярной лопасти и последующее развитие личинки до стадии прямозамкового велигера в чистой воде составляют 5.3 мг/л. По мере использования в оценке воздействия всё более развитых стадий развития (64-клеточный зародыш, бластула, трохофора и ранний велигер) расчётные значения  $EC_{50}$  увеличиваются от 8.3 до 24 мг/л соответственно.

Рассмотренная ранее работа Капсенберга с соавторами (Kapsenberg et al., 2018) также свидетельствует о важности этапа, при котором осуществляется негативное воздействие. Закисляя повышением  $p\text{CO}_2$  среду развития личинок с 8.1 до 7.4 промежутке между 27 и 35 часами с начала развития, авторы показывают значимое возрастание доли деформированных личинок не только по сравнению с контрольным экспериментом (проведенным без закисления при  $\text{pH} = 8.1$ ), но также и по сравнению с экспериментом из закисленной воды, развитие личинок которых на промежутке между 27 и 35 часами с начала развития шло в нормальной морской воде.

Опираясь на литературные данные, можно заключить, что в применении к ЭЛТ двустворчатых моллюсков важное значение имеет не только продолжительность негативного воздействия, но и стадия развития, при котором личинки испытывают данное воздействие. Чем на более ранний этап развития приходится негативное воздействие, тем больший негативный эффект оно окажет. Более того, одним из наиболее критичных этапов развития, в применении к ЭЛТ, является этап закладки личиночной раковины, негативное воздействие во время которого может приводить к формированию различного рода морфологических деформаций. Важно, что дальнейшая судьба деформированных личинок, остаётся неизвестной как после относительно короткого (7 часов) воздействия в момент формирования раковины (Kapsenberg et al., 2018), так и относительно длительного (до 240 часов) воздействия (Ярославцева и Сергеева, 2005).

## Материалы и методы

### 1. Объект исследования

Эксперименты были проведены в 2016-2021 годах на Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ББС МГУ). Взрослые особи *Mytilus edulis* были собраны в проливе Великая Салма в окрестностях биостанции, Губе Кислая и бухте Биофильтров. После сбора взрослых моллюсков содержали в ёмкостях с проточной естественной морской водой при температуре 10-14°C и солёности 24‰. Для стимуляции нереста в мантийную полость каждой особи производили 0.5-1 мл 0.5М раствора KCl (Iwata, 1951), после чего каждого моллюска помещали в отдельную ёмкость для получения половых продуктов. Полученные яйцеклетки промывали с использованием 40 µm фильтра(BD), а семенную жидкость проверяли на активность сперматозоидов и разбавляли для предотвращения полиспермии. Подготовленные половые продукты переносили в морскую воду, фильтрованную с использованием 5-10 µm фильтра (далее – фильтрованная морская вода), в которой и осуществляли оплодотворение. В качестве контроля оплодотворения выступало отделение полярных телец, после обнаружения которых зиготы отмывали от избытков сперматозоидов с использованием 40 µm фильтра. В заключении определяли долю неоплодотворённых яйцеклеток, которая никогда не превосходила 20%.

### 2. Проведение экспериментов

Экспериментальная часть данной работы включает две ключевые серии экспериментов: **предварительная** (оценка токсического воздействия и развитие личинок с морфологическими отклонениями) и **основная** (оценка способности личинок к восстановлению после перенесенного негативного воздействия). В качестве токсического агента был использован модельный токсикант  $K_2Cr_2O_7$ (ХИММЕД, ХЧ, ГОСТ 4220-75) в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л. Выбранные концентрации токсиканта были подобраны по результатам пробных экспериментов для максимального разнообразия морфологических отклонений. Для приготовления растворов конечных концентраций использованы два промежуточных разведения концентрациями 1 и 10 г/л. В качестве отрицательного контроля использована фильтрованная морская вода.

Серия **предварительных экспериментов** была направлена на оценку негативного воздействия модельного токсиканта ( $K_2Cr_2O_7$ ) и анализа возможных морфологических отклонений. Серия экспериментов была проведена по общепринятой методике эмбрионально-личиночного теста двустворчатых моллюсков продолжительностью 48 часов (ASTM, 2012a; His et al., 1999a; USEPA, 2016). Эксперимент проводили в 6-луночных культуральных планшетах (TPP), в каждой лунке

которого был помещен раствор с определенной концентрацией. Конечный объем среды в каждой лунке после внесения зигот составляла 8 мл. Различные концентрации  $K_2Cr_2O_7$  влияло на pH экспериментальной среды. Водородный показатель чистой морской воды в контроле составляет 8.2, а при максимальной концентрации токсиканта (50 мг/л) составляла 7.6. Учитывая снижение pH в результате внесения токсиканта в концентрациях от 10 до 50 мг/л, дополнительно была проведена серия экспериментов с доведенными до естественного уровня (8.2) значениями pH в экспериментальных лунках путём добавления 0.1М раствора NaOH. Контроль солёности был осуществлен рефрактометром ТМС V2, контроль pH – pH метром Экотест-2000. Количество внесенных эмбрионов не превышало четырёмсот на каждую экспериментальную лунку.

После окончания предварительного эксперимента часть пробы была зафиксирована 4% раствором параформальдегида. В полученных пробах (образцах) проведен подсчёт количества и измерение размерных характеристик личинок с морфологическими отклонениями различного типа.

Серия **основных экспериментов** направлена на оценку способностей личинок *M. edulis*, подвергшихся негативному токсическому воздействию, к восстановлению строения и продолжения развития. Для этого, часть личинок, подвергшихся негативному токсическому воздействию на протяжении **предварительного эксперимента** были пересажены на отмывку в фильтрованную морскую воду. Из каждой концентрации эксперимента по оценке токсического воздействия было отобрано по 50 личинок и перенесено в лунки с чистой морской водой для отмывки в течении 24 и 48 часов в двух независимых экспериментах. Дополнительно, по 50 личинок из каждой концентрации использовали для **оценки темпов роста D-велигеров, восстанавливающихся во время отмывки**. При оценках темпов роста, в экспериментальные лунки ежедневно вносили порцию микроводорослей *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) плотностью до  $10^4$  кл/мл (Wai and Levinton, 2004) в качестве кормовой базы. Продолжительность отмывки с кормлением составляла от 24 до 96 часов.

Перенос личинок из лунок предварительного эксперимента в чистую морскую воду основного эксперимента осуществляли с использованием капиллярной микропипетки Brand IntraMARK с капилляром объемом 20 мкл. Объем перенесённой с личинками среды с токсикантом не превышал объем капилляра (20 мкл). Данный эксперимент также проведен в 6-луночных культуральных планшетах (TRP), каждая лунка которого вместо растворов токсиканта была заполнена 8 мл фильтрованной морской воды. После окончания основного эксперимента всех личинок из экспериментальных лунок фиксировали 4% раствором параформальдегида. В

полученных фиксированных пробах (образцах) был проведен подсчёт количества и определение (измерение) размерных характеристик личинок с морфологических отклонений различного типа. Часть основных экспериментов была проведена без подсчёта соотношений и размерных характеристик типов личинок и использована исключительно для оценки выживаемости. Указанные эксперименты были проведены независимо друг от друга не менее чем в трёхкратной повторности.

### 3. Световая микроскопия.

Визуальный контроль состояния личинок в течение эксперимента, отбор и перенос личинок проводили под стереомикроскопом Olympus SZX7. Первоначальный анализ личинок после воздействия токсикантов проводили под микроскопом Eclipse Ti-S (Nikon). Выделение различных классов строения личинок, их подсчёт, а также оценка выживаемости были проведены с использованием материала, зафиксированного 4% параформальдегидом после окончания экспериментов, с использованием микроскопов AxioPlan 2, оснащенного камерой AxioCam HRm (Zeiss), или Eclipse Ti-S, оснащенного камерой Di-Vi1 (Nikon). Исследование серий гистологических срезов проведено с использованием моторизированного микроскопа Olympus VS120.

### 4. Исследование анатомии личинок.

Для анатомических исследований D-велигеры и личинки с морфологическими отклонениями, полученные в предварительном и основном эксперименте, были зафиксированы раствором 2,5% глютаральдегида на 0.1M какодилатном буфере (далее – 2,5%ГА) в течение 24 часов при комнатной температуре. Зафиксированные образцы после двукратной отмывки буфером были постфиксированы в растворе 0.1% OsO<sub>4</sub> на том же буфере в течение 1-2 часов. После отмывки буфером образцы обезживали путём проведения через серию спиртов возрастающей концентрации, ацетон и заключали в эпоксидную смолу. Для лучшей сохранности особенностей морфологии личинок дегидратация, вплоть до 70%, проведена по спиртам, разведенным на 0.1M Na-какодилатном буфере вместо дистиллированной воды:

- 10% Этанол/буфер – 30 минут;
- 20% Этанол/буфер – 30 минут;
- 30% Этанол/буфер – 30 минут;
- 40% Этанол/буфер – 30 минут;
- 50% Этанол/буфер – 30 минут;
- 60% Этанол/буфер – 30 минут;
- 70% Этанол/буфер – 30 минут;

- 70% Этанол/д.вода – 30 минут/хранение;
- 82% Этанол/д.вода – 2×15 минут;
- 96% Этанол – 2×15 минут;
- Этанол/ацетон, смесь 3:1 – 2×15 минут;
- Этанол/ацетон, смесь 1:1 – 2×15 минут;
- Этанол/ацетон, смесь 1:3 – 2×15 минут;
- Ацетон – 15 минут;
- Смола/ацетон, смесь 1:3 – 12 часов;
- Смола/ацетон, смесь 1:1 – 12 часов;
- Смола/ацетон, смесь 3:1 – 12 часов;
- Смола при 37°C – 3-12 часов;
- Смола при 60°C – 48 часов;

В данной работе использовали приготовленную—согласно прописи Молленхауэра (Mollenhauer, 1964) смесь эпоксидных смол EPON/ARALDITE :

- EPON 812 – 30,5 г;
- ARALDITE 6005 – 29 г;
- DDSA – 60,3 г;
- DMP-30 – 2,19 г;

Серии полутонких срезов 0.5-1 мкм получены на ультратоме LKB V (Bromma), окрашены по Twort в модификации Манских (Manskikh and Sheval, 2020) и окраской Толуидиновым/Метиленовым синим по Миронову (Миронов, 1994). Всего было получено не менее пяти серий полутонких срезов личинки целиком для каждого морфотипа.

## 5. Статистические методы

Подсчёт и измерение личинок осуществлен с использованием программного пакета Fiji (Schindelin et al., 2012). При подсчёте личинок и классификации морфологических отклонений были использованы обученные нами ранее свёрточные нейронные сети (Саидов и Саидов, 2016). При анализе результатов оценки токсичности и проведенной отмывки было подсчитано и проанализировано более 5000 особей. Из них: при анализе восстановления строения - 2476 особей; анализе темпов роста при питании - 795 особей; оценке выживаемости - 2290 особей.

Анализ полученных данных осуществлен в программной среде R (R Core Team, 2022) с использованием основных и дополнительных пакетов: “stats” вер. 4.1.1 (R Core Team, 2022), “agricolae” вер. 1.3-5 (Mendiburu, 2019), “bestNormalize” вер. 1.4.2 (Peterson, 2021), “drc” ver. 3.0-1 (Ritz et al., 2015), “MASS” вер. 7.3-54 (Venables and Ripley, 2002), “pROC” вер. 1.18.1 (Robin et al., 2011), “margins” вер. 0.3.26 (Leeper, 2021) и “ggplot2” ver. 3.2.1 (Wickham, 2016).

Оценка выживаемости и оценка темпов восстановительного роста раковины при реабилитации, включая расчёт полуэффективных и полуметальных концентрации ( $EC_{50}$  и  $LC_{50}$ ), произведен с использованием **регрессионного анализа**. При оценке выживаемости для расчёта скорректированных долей выживших особей использовали поправку Аббота (см. уравнение 3). Все регрессионные модели выбраны основываясь на минимальных значениях критерия Акиаке (AIC).

Для оценки значимости различий между размерами D-велигеров на протяжении отмывки в основном эксперименте использован **критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна**. Для коррекции множественных сравнений использовали поправку **Холма-Бонферрони**.

Оценку значимости различий в соотношении типов личинок, выявленных в пробах при различных концентрациях токсиканта и на протяжении отмывки, производили с использованием критериев **хи-квадрат Пирсона и Кохрана-Мантеля-Хензеля**. Для поиска зависимости изменения долей обнаруженных типов личинок и их комбинации при увеличении концентрации токсиканта построены **обобщенные линейные модели (GLM)** (McCullagh and Nelder, 1989). Построенные модели оптимизированы по количеству предикторов методом комбинированного включения с использованием критерия Акиаке.

Дополнительно, для группировки полученных проб в соответствии с соотношением морфотипов личинок (и как следствием – степенью перенесенного негативного воздействия) проведён иерархический кластерный анализ методом Варда. Для проведения кластерного анализа данные были предварительно модифицированы для нивелирования различий в смертности между повторами. Общее количество обнаруженных в каждой концентрации личинок было нормировано по количеству внесенных (50 личинок) с учётом средней смертности для данной концентрации:

$$N_{adj} = N_{obs} \times SR \frac{50}{N_t}$$

где:

$N_{adj}$  – скорректированное количество личинок данного морфотипа

$N_{obs}$  – обнаруженное в пробе количество личинок данного морфотипа

SR – средняя выживаемость для пробы отмывки из данной концентрации и времени отмывки

$N_t$  – общее количество личинок обнаруженное в данной пробе.

При такой модификации соотношение личинок внутри эксперимента не меняется. В этом случае при сравнении между двумя экспериментами нет необходимости использовать дополнительные веса.

Для выбора оптимального способа оценки токсичности использован сравнительный ROC-анализ с использованием в качестве классификатора как отдельных долей различных морфотипов и их совокупностей, так и обобщенных линейных моделей (GLM) их основе (Fawcett, 2006).

## Результаты

Результаты проведенной работы представлены в соответствии с экспериментальной схемой, и последовательностью поведения экспериментов:

1. Оценка токсического воздействия бихромата калия, как **предварительного эксперимента** для оценки уровней воздействия токсиканта и поиска концентраций, при которых большинство личинок будет отличаться от D-велигеров.
2. **Основной эксперимент:** оценка принципиальной возможности восстановления строения D-раковины у личинок, пересаженных после перенесенного негативного воздействия в чистую морскую воду для отмывки
3. Оценка восстановления темпов роста D-велигеров, сформированных во время отмывки от перенесенного негативного воздействия, для подтверждения реабилитации восстановленных D-велигеров.
4. Отдельное внимание уделено тонкому строению личинок, полученных как во время проведения предварительного, так и основного экспериментов.
5. Проведение кластерного анализа и моделирование для поиска особенностей негативного воздействия и возможной модификации критериев токсичности.

### 1. Эксперименты по токсическому воздействию

Для оценки токсического воздействия модельного токсиканта и получения особей с различными морфологическими деформациями был проведен ЭЛТ с использованием ряда концентраций  $K_2Cr_2O_7$  от 10 до 50 мг/л. Проведенные эксперименты показали, что воздействие  $K_2Cr_2O_7$  в ряду исследованных концентраций приводит к значимому увеличению личинок с различного рода морфологическими отклонениями, отличающихся по строению от прямозамковых велигеров (D-велигеров). Далее в работе, все выделенные морфологически обособленные классы, как описанные ранее в литературе, так и выделенные по результатам данной работы, мы будем называть, по аналогии с Моррони (Morroni et al., 2018), **морфотипами**.

В настоящей работе в экспериментах по токсическому воздействию  $K_2Cr_2O_7$  были обнаружены следующие морфотипы личинок, выделенные в соответствии с общепринятой классификацией морфологических отклонений (His et al., 1997): "выступающая мантия" (сокращенно - РМ), "седловидный замок" (сокращенно - СН), "трохофора" (сокращенно - Т) и "несформированная раковина" (сокращенно - ISH). Помимо этих морфотипов, описанных ранее в литературе, нами были обнаружены личинки небольшого размера (в среднем  $68,91 \pm 1,05$  мкм,

рисунок П1 и таблица П1 приложения) с ассиметричной раковиной и выступающими за её пределы мягкими тканями. Опираясь на общепринятую классификацию данный морфотип может быть описан как комбинация "выступающей мантии" и "седловидного замка". Поскольку основным признаком выделения этого морфотипа является небольшой размер и визуальная асимметрия выступающих тканей, в дальнейшем будем называть такой морфотип "ассимметричным" (сокращенно - А) (рис. 21Г).

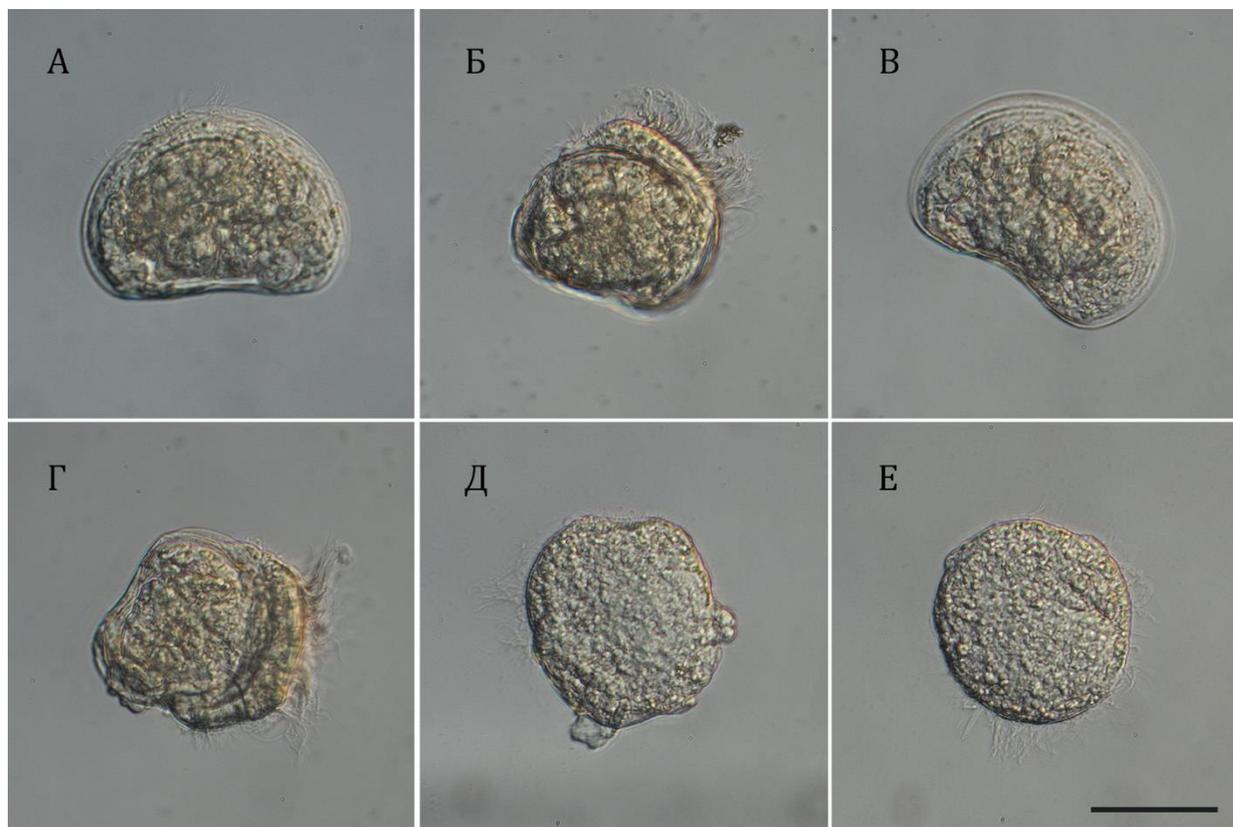


Рисунок 21. Морфотипы личинок, обнаруженные при различных концентрациях после окончания эксперимента по оценке токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$ . Условные обозначения: А – D-велигер, Б – велигер с "выступающей мантией", В – велигер с "седловидным замком" раковины, Г – "ассимметричный" велигер, Д – личинка с "несформированной раковиной", Е – "трохофорная" личинка. Шкала 50 мкм.

Согласно полученным данным, токсическое воздействие различных концентраций  $K_2Cr_2O_7$  в течении 48 часов приводит к значимым изменениям соотношения личиночных морфотипов в ряду увеличения концентраций, что подтверждается тестом хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2 = 1014.16$ ,  $p < 0.01$ ). Результаты оценки токсического воздействия, совместно с тестом Пирсона, представлены на

диаграмме соотношения морфотипов личинок на рис. 22. Подробно доли всех обнаруженных морфотипов представлены в приложении (таблица П1).

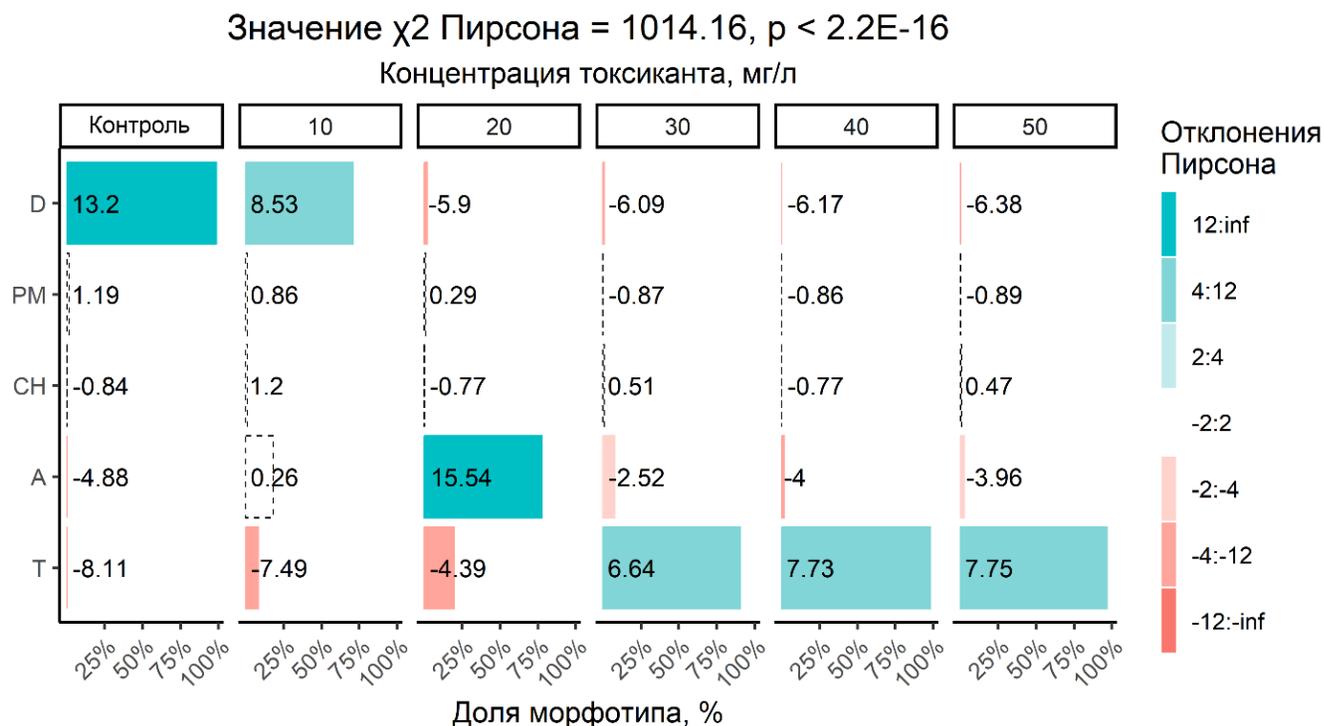


Рисунок 22. Распределение морфотипов личинок по данным эксперимента по оценке токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$ . Морфотипы личинок обозначены в виде сокращений по оси ординат, а доля каждого морфотипа – по оси абсцисс. Здесь и далее - цветом, согласно шкале, обозначены доли имеющие высокие значения отклонений Пирсона (Pearson residuals), указанных на каждом столбце. Положительные значения отклонений свидетельствуют о большей, нежели ожидаемая, наблюдаемой доле конкретного морфотипа; отрицательные – о меньшей

Контрольные пробы практически полностью представлены D-велигерами, доля которых составляет  $98.25 \pm 4.79\%$ . Кроме D-велигеров в контроле также эпизодически встречаются личинки морфотипа "выступающая мантия" составляя лишь  $1.75 \pm 4.26\%$ . При концентрации токсиканта 10 мг/л по окончании воздействия в пробах также преобладают D-велигеры ( $69.4 \pm 14.51\%$ ), однако возрастает доля личинок с деформациями (например, "асимметричных" – до  $21.11 \pm 12.85\%$ ). При повышении концентрации токсиканта до 20 мг/л по окончании эксперимента в пробах преобладают "асимметричные" личинки, составляющие в среднем  $77.9 \pm 16.49\%$  всех обнаруженных при данной концентрации личинок. Важно, что доля D-велигеров при концентрации токсиканта 20 мг/л сокращается почти до нуля ( $4.44 \pm 10.64\%$ ). При концентрации 30 мг/л D-велигеры встречаются в повторах эксперимента эпизодически (средняя доля составляет  $4.76 \pm 16.1\%$ ), тогда как основную

массу составляют "трохофорные" личинки ( $85.93 \pm 13.73\%$ ) и небольшое количество "асимметричных" личинок ( $8.27 \pm 11.61\%$ ). Негативное воздействие  $K_2Cr_2O_7$  в концентрации выше 30 мг/л в течение 48 часов приводит к практически полному преобладанию "трохофорных" личинок, доля которых достигает  $99.22 \pm 3.63\%$  при концентрации токсиканта 40 мг/л.

Доля некоторых морфотипов личинок значительно варьировала между повторами предварительного эксперимента, например, доля "асимметричных" велигеров при концентрации токсиканта 20 мг/л варьирует от 60% до 92,8%. Однако, результаты теста Кохрана-Ханзеля-Мантеля (далее – **КХМ тест**) с использованием соотношения морфотипов в разных повторах предварительного эксперимента не показали значимых различий ( $M^2 = 10.926$ ,  $p = 0.3633$ ). КХМ тест также показал отсутствие значимых различий в соотношении морфотипов личинок в эксперименте со скорректированными значениями рН и без коррекции ( $M^2=4.09$ ,  $p=0.25$ ). Однако при рассмотрении проб из аналогичных концентраций ( $K_2Cr_2O_7$  от 10 до 30 мг/л) в экспериментов с коррекцией рН и без коррекции рН, то присутствует значимая разница в размерах D-велигеров (t-тест,  $p < 0.01$ ). Несмотря на значимость различий, максимальная разница в размерах D-велигеров не превосходят 4%: например, размеры D-велигеров при концентрации 10 мг/л составляли  $96.65 \pm 1.88$  мкм и  $93.57 \pm 4.75$  мкм в растворе с коррекцией рН и без коррекции рН соответственно.

## 2. Оценка способности к восстановлению

### 2.1 Выживаемость

Первоначально, для оценки способности личинок к восстановлению была оценена выживаемость личинок на протяжении отмывки от ряда концентраций  $K_2Cr_2O_7$ . Результаты показали, что выживаемость личинок, пересаженных на отмывку из контроля и концентрации токсиканта 10 мг/л, сопоставима и составляет на первые сутки отмывки  $97 \pm 7.23\%$  и  $95.8 \pm 4.88\%$  в контроле и при отмывке от 10 мг/л  $K_2Cr_2O_7$  соответственно (таблица ПЗ приложения). Далее, значения выживаемости будут представлены с поправкой относительно контроля (по Абботу). Минимальной концентрацией токсиканта, при отмывке от которой возрастает смертность, является 20 мг/л (КХМ тест,  $M^2=19.2$ ,  $p<0.01$ ) - выживаемость личинок с при отмывке снижается до  $91.34 \pm 13.57\%$ . При отмывке личинок от концентрации  $K_2Cr_2O_7$  30 мг/л выживаемость снижается еще сильнее и составляет через сутки  $61.56 \pm 16.04\%$ . При этом выживаемость личинок из контроля и отмываемых от концентраций  $K_2Cr_2O_7$  10 и 20 мг/л через 24 и 48 часов практически не меняется (рис. 23), а при отмывке от концентрации в 30 мг/л выживаемость значимо снижается до  $52.78 \pm 35.87\%$  через 48 часов (хи-квадрат,  $p<0.01$ ). Похожая ситуация наблюдается при отмывке от

токсиканта в концентрации 40 мг/л: через 24 часа отмывки выживаемость личинок составляет  $56.37 \pm 26.59$  %, а через 48 часов -  $37.22 \pm 18.34$  %. Интересно, что значение выживаемости личинок при отмывке от токсиканта в концентрации 50 мг/л через сутки составляющая  $49.52 \pm 29.88$  %, не изменяется и через двое суток, по-прежнему составляя  $55.56 \pm 19.36$  %. Более подробно данные о выживаемости представлены в приложении (таблица П3).

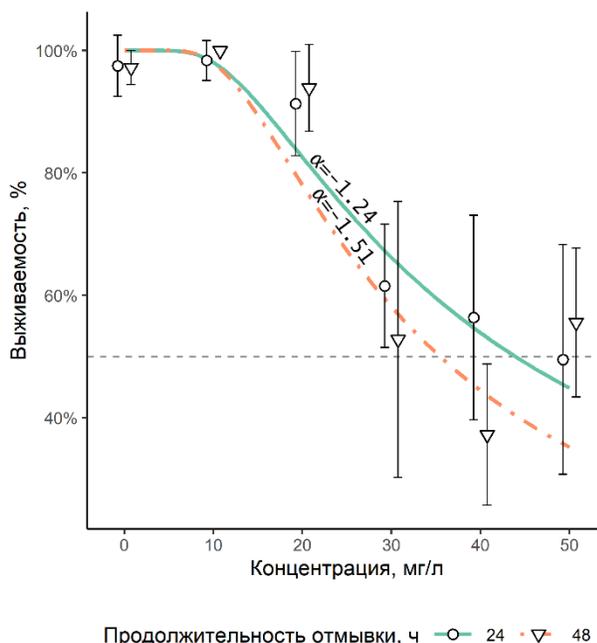


Рисунок 23. Регрессионные модели посттравматической выживаемости личинок, пересаженных на отмывку после негативного воздействия  $K_2Cr_2O_7$  в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л. По оси абсцисс указаны концентрации токсиканта, из которых личинки были пересажены на отмывку, по оси ординат — доля выживших особей. Средние значения выживаемости после воздействия токсиканта представлены с поправкой Аббота и даны с учётом 95% доверительных интервалов. Коэффициент  $\alpha$  модели обозначен на каждой кривой для сравнения угла наклона касательной в зоне свала.

Согласно результатам регрессионного анализа наилучшей моделью выживаемости, вне зависимости от продолжительности отмывки, является двухпараметрическая ассиметричная кривая Вейбулла (W2.2.). Полученные расчётные уровни  $LC_{50}$  (рис. 23) для каждой из продолжительностей отмывок составляют  $43.93 \pm 8.12$  мг/л (для 24 часов отмывки) и  $35.47 \pm 6.64$  мг/л (для 48 ч отмывки) соответственно.

## 2.2 Динамика соотношений морфотипов

Динамика соотношений морфотипов личинок на протяжении реабилитационной отмывки от токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$  представлена как на совокупном графике (рис. 24) и более подробно рассмотрена для отмывки от токсиканта в концентрациях от 10 до 30 мг/л (рис 25). Как показывают результаты, соотношение значительно меняется на протяжении отмывки от токсиканта в концентрации от 10 до 30 мг/л (тест хи-квадрат Пирсона, для всех рассмотренных концентраций  $p < 0.01$ , рис 25).

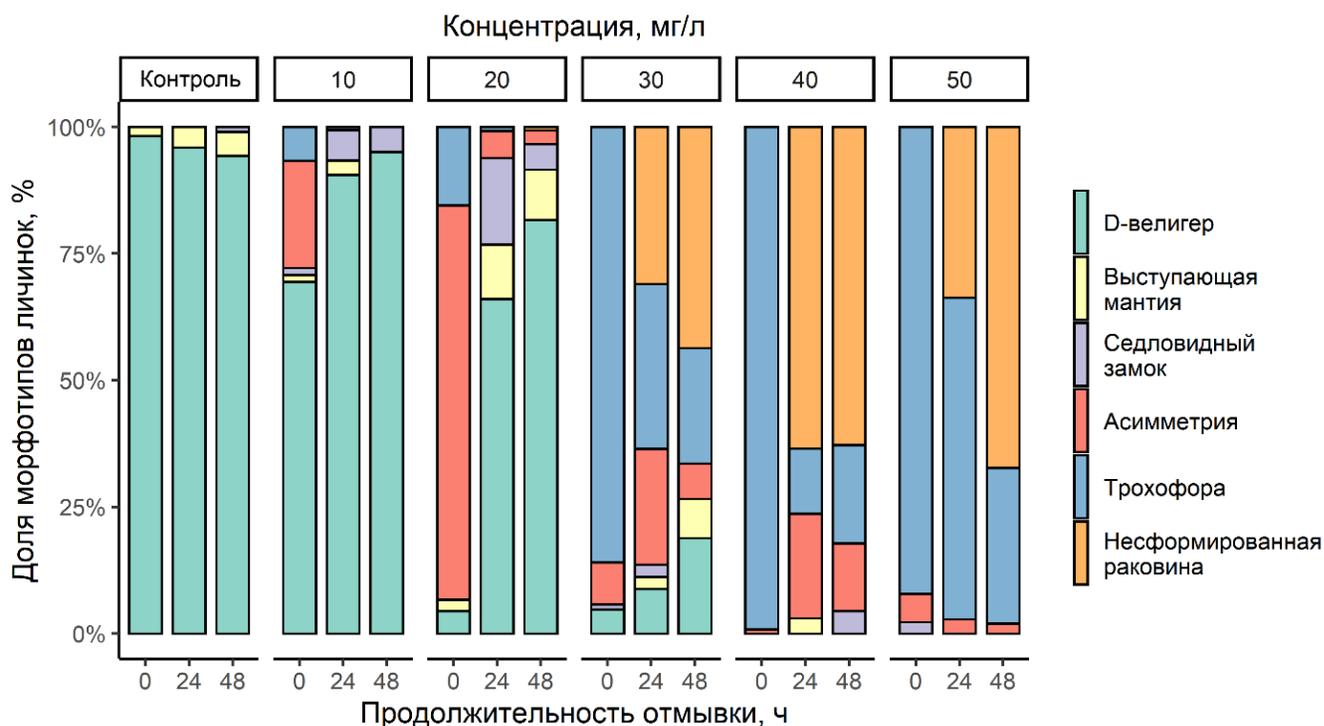


Рисунок 24. Распределение морфотипов личинок по данным эксперимента по оценке токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$  и проведенной реабилитации в чистой морской воде. По оси абсцисс отмечена продолжительность отмывки (здесь и далее продолжительность отмывки равная нулю – данные, соответствующие моменту завершения эксперимента по оценке токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$ ). По оси ординат – средняя доля каждого морфотипа. Соотношения разделены по группам, соответствующим концентрациям (сверху).

Так, доля D-велигеров при отмывке от  $K_2Cr_2O_7$  в концентрации 10 мг/л возрастает с  $69.4 \pm 14.51$  % до  $90.58 \pm 6.93$  % уже через сутки отмывки, достигая за двое суток  $95.05 \pm 6.74$  %. Одновременно с этим доля "асимметричных" личинок уже через сутки отмывки снижается с  $21.11 \pm 12.85$  % до нуля (рис 25). При отмывке личинок от  $K_2Cr_2O_7$  в концентрации 20 мг/л наибольший вклад в изменение

соотношения вносит резкое снижение доли "асимметричных" личинок за первые сутки отмывки с  $77.9 \pm 16.49\%$  до  $2.5 \pm 4.94\%$  и одновременное повышение с  $4.44 \pm 10.64\%$  до  $66 \pm 13.92\%$  доли D-велигеров. При этом на протяжении отмывки доля D-велигеров

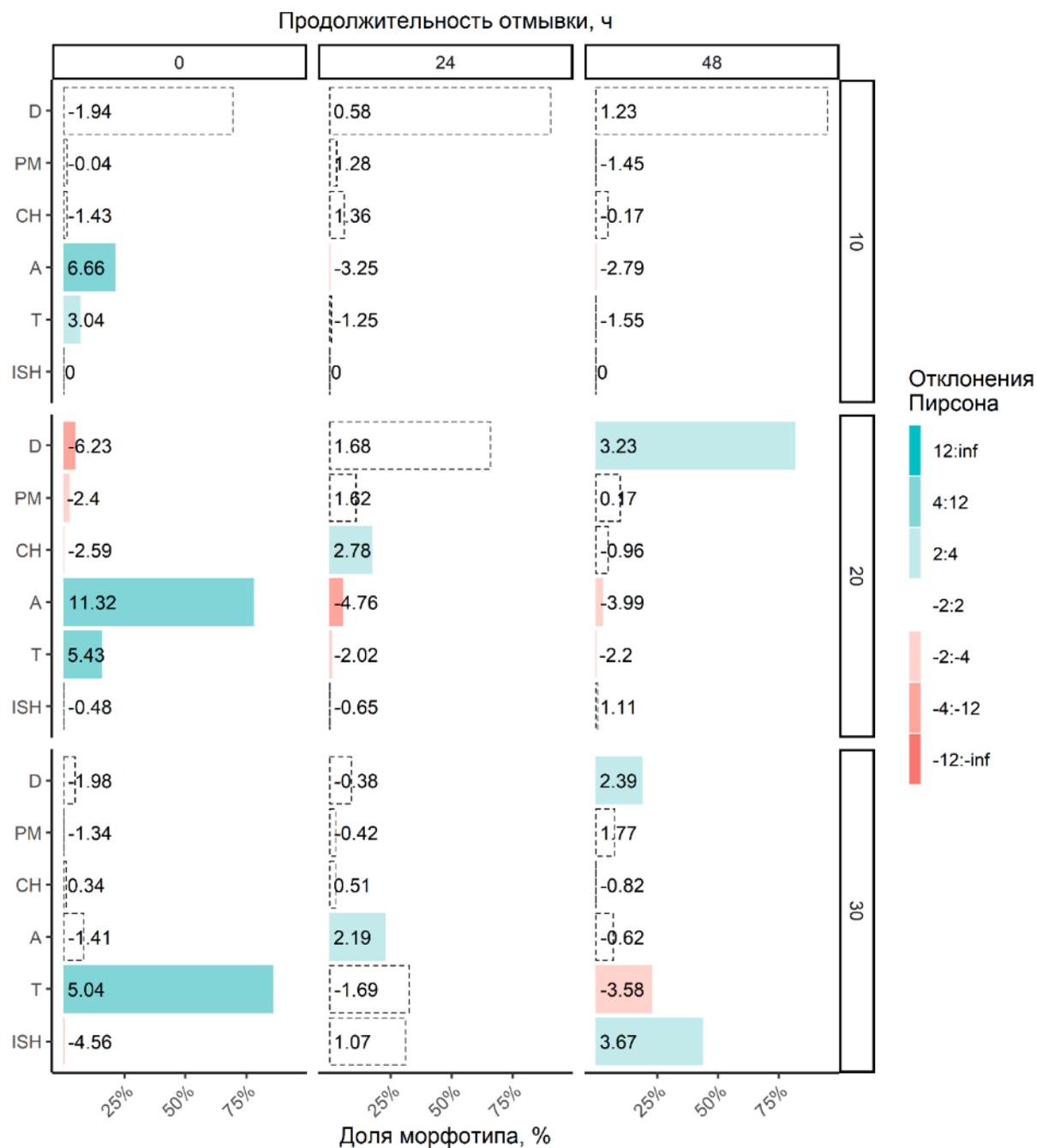


Рис. 25. Динамика распределения морфотипов на протяжении отмывки от негативного воздействия токсиканта в концентрациях от 10 до 30 мг/л. Соотношения разделены по продолжительности отмывки от 0 до 48 часов (указаны сверху) и по концентрациям, из которых были пересажены

личинки (указаны справа). Морфотипы личинок обозначены в виде сокращений по оси ординат, а доля каждого морфотипа – по оси абсцисс.

продолжает расти, достигая на вторые сутки  $81.64 \pm 12.56$  %. Реабилитация после воздействия  $K_2Cr_2O_7$  в концентрации 30 мг/л не так эффективна так как приводит к появлению  $18.86 \pm 15.86$  % D-велигеров лишь на вторые сутки. Основной вклад в значимость различий при отмывке от токсиканта в рассмотренной концентрации вносит снижение доли "трохофорных" личинок с  $85.93 \pm 13.73$  % до  $22.81 \pm 15.72$  %, и возрастание доли личинок с "несформированной раковиной" до  $43.64 \pm 19.09$  % на вторые сутки. Вклад изменений долей остальных морфотипов, хоть и значим в ряде случаев (рис 25), но в целом невелик. Отдельно можно отметить только значимое повышение доли личинок с "седловидным замком" раковины с нуля до  $17.1 \pm 11.06$  % через сутки отмывки от токсиканта в концентрации 20 мг/л.

### 2.3 Рост и размеры

Одновременно с восстановлением строения раковины, D-велигеры продолжают дальнейший рост и развитие. Проведенный тест Краскела-Уоллиса показал, что размеры D-велигеров значительно изменяются на протяжении отмывки ( $H = 511.22$ ,  $p < 0.01$ ). Согласно проведенному апостериорному тесту Данна все восстановленные D-велигеры оказались значительно меньше D-велигеров из контроля аналогичного возраста (рис 26Б). Несмотря на это, размеры D-велигеров, обнаруженных после первых суток отмывки от токсиканта в концентрации 10 мг/л ("10/24"), значительно больше как D-велигеров из экспериментальных растворов токсиканта при аналогичной концентрации до пересадки на отмывку ("10/0"), так и D-велигеров из контроля ("0/0") (рис 26Б, сравнение "10/24" по оси ординат с "10/0" и "0/0" по оси абсцисс). Опираясь на коэффициенты угла наклона линейной регрессии прироста  $\alpha$ , D-велигеры из раствора токсиканта в концентрации 10 мг/л в первые сутки отмывки демонстрировали большую скорость роста, нежели D-велигеры из контроля ( $\alpha = 0.50 \pm 0.02$  против  $0.34 \pm 0.02$  для D-велигеров из раствора токсиканта в концентрации 10 мг/л и контроля соответственно, коэффициенты представлены в виде **КОЭФ±С.О.**). Также, D-велигеры из раствора токсиканта в концентрации 10 мг/л демонстрируют максимальный суточный прирост на протяжении отмывки, который составляет 11.97 мкм. D-велигеры, восстановленные во время отмывки от раствора токсиканта в концентрации 20 мг/л, демонстрируют самые низкие темпы прироста из наблюдаемых ( $\alpha = 0.11 \pm 0.04$ ). Кроме того, прирост D-велигеров из концентрации 20 мг/л, по сравнению с контролем и 10 мг/л, смещен на вторые сутки отмывки. Важно отметить, что уровень значимости прироста размеров D-велигеров, восстановленных во время отмывки от раствора

токсиканта в концентрации 20 мг/л (рис 26Б, сравнение "20/48" по оси ординат с "20/24" по оси абсцисс) составляет 0.90.

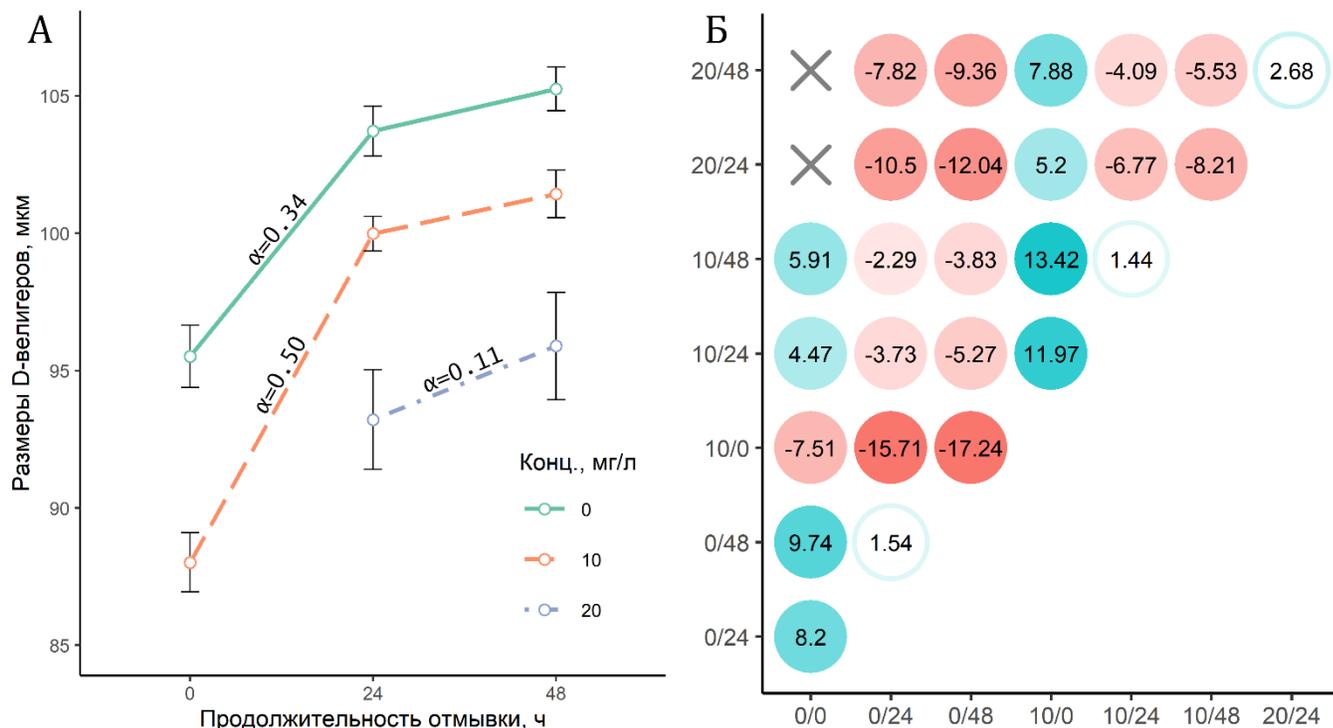


Рисунок 26. А - Динамика прироста D-велигеров, пересаженных из контроля и концентраций 10 и 20 мг/л на протяжении отмывки. Средние размеры D-велигеров отмечены по оси ординат, а продолжительность отмывки – по оси абсцисс. Средние размеры представлены с учётом 95% доверительных интервалов. Б - Различия в размерах D-велигеров, восстановленных во время проведения отмывки в зависимости от исходной концентрации токсиканта и времени отмывки. По осям отмечены комбинации "концентрации/времени отмывки" сравниваемых D-велигеров. Значения на графике отождествляют разницу средних размеров D-велигеров согласно выражению: "y + значение = x". Положительные/отрицательные различия дополнительно обозначены цветом. Уровни поддержки значимости различий, полученные согласно тесту Данна, обозначены следующим образом: различия на заполненном цветом круговом фоне, имеют уровень значимости 0.95; различия на незаполненном кольцевидном фоне имеют уровень значимости 0.90.

Для оценки способности личинок к восстановлению жизнедеятельности после негативного воздействия, включая питание и рост, а также возможного влияния питания на темпы роста, проведен эксперимент с внесением в качестве корма микроводорослей *Dunaliella salina*. Как показали результаты, полученные при оценке темпов роста D-велигеров, питающихся

микроводорослями *D. salina*, значимый прирост в размерах наблюдается на протяжении четырех суток отмывки (реабилитации). Согласно данным регрессионного анализа наилучшим образом динамику роста, вне зависимости от концентрации токсиканта из которой личинки были пересажены на отмывку, описывают трехпараметрические модели асимптотического роста (AR.3). Опираясь на значения коэффициентов перед зависимой переменной ( $e$ ) построенных асимптотических кривых (рис 27А), можно сравнивать темпы роста.

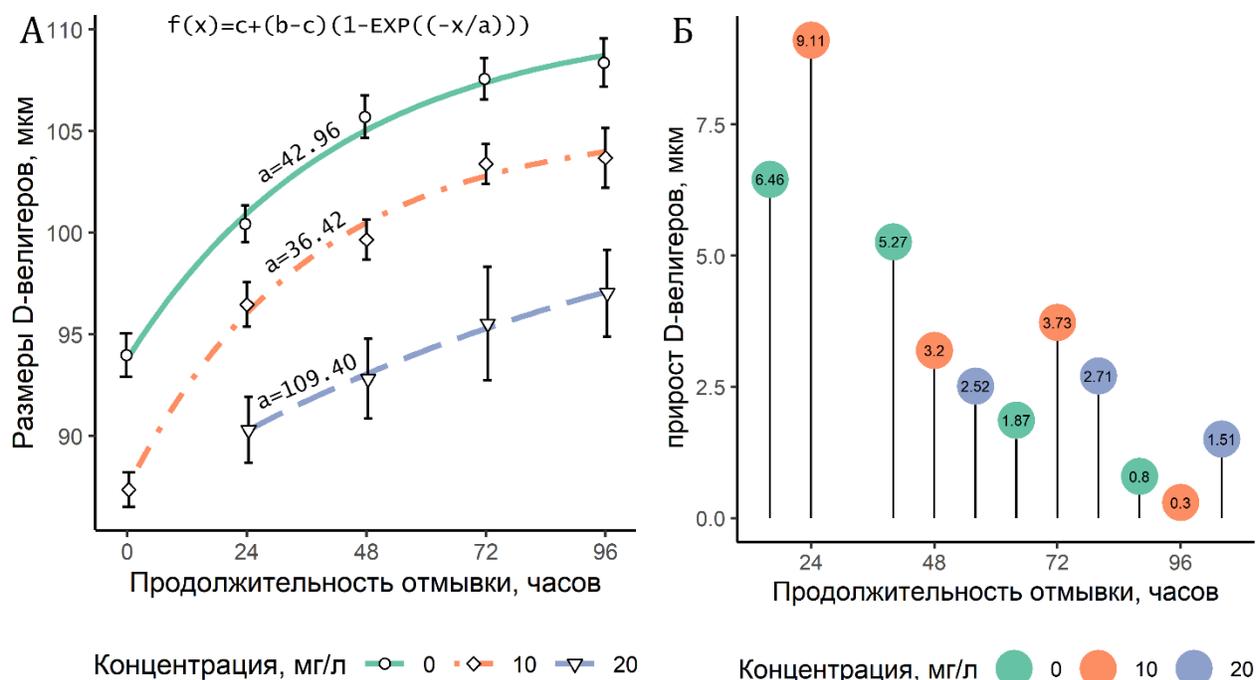


Рисунок 27. А – Регрессионные модели темпов роста D-велигеров, питающихся микроводорослями *D. salina* на протяжении четырех суток отмывки от негативного влияния токсиканта в концентрации 10 и 20 мг/л. Размеры D-велигеров отмечены по оси ординат, а продолжительность отмывки – по оси абсцисс. Средние размеры представлены с учётом 95% доверительных интервалов. Б – Значения суточных приростов размеров D-велигеров, питающихся микроводорослями *D. salina* на протяжении четырех суток отмывки от негативного влияния токсиканта в концентрации 10 и 20 мг/л. Прирост размеров D-велигеров отмечен по оси ординат, а продолжительность отмывки – по оси абсцисс.

Так, несмотря на исходную разницу в размерах, наблюдаемые темпы роста D-велигеров из контроля и при отмывке от токсиканта в концентрации 10 мг/л практически неразличимы, тогда как D-велигеры из токсиканта в концентрации 20 мг/л на протяжении отмывки растут медленнее – коэффициент  $e$  выбранной модели втрое меньше, чем у модели прироста контрольных D-

велигеров (0.009 против 0.0233). Как и в случае восстановления без добавления микроводорослей (рис. 26А), максимальный прирост размеров D-велигеров наблюдается при отмывке от токсиканта в концентрации 10 мг/л в первые сутки и составляет более 9 мкм (рис. 27Б).

### 3. Кластерный анализ эффектов воздействия

Для оценки различий в степени воздействия разных концентраций токсиканта и эффекта реабилитации проведен кластерный анализ, основанный на модифицированных соотношениях личиночных морфотипов (см. материалы и методы). Построенная иерархическая кластеризация методом Варда группирует все изученные экспериментальные пробы в два крупных кластера с несколькими группами в каждом из них (рис. 28).

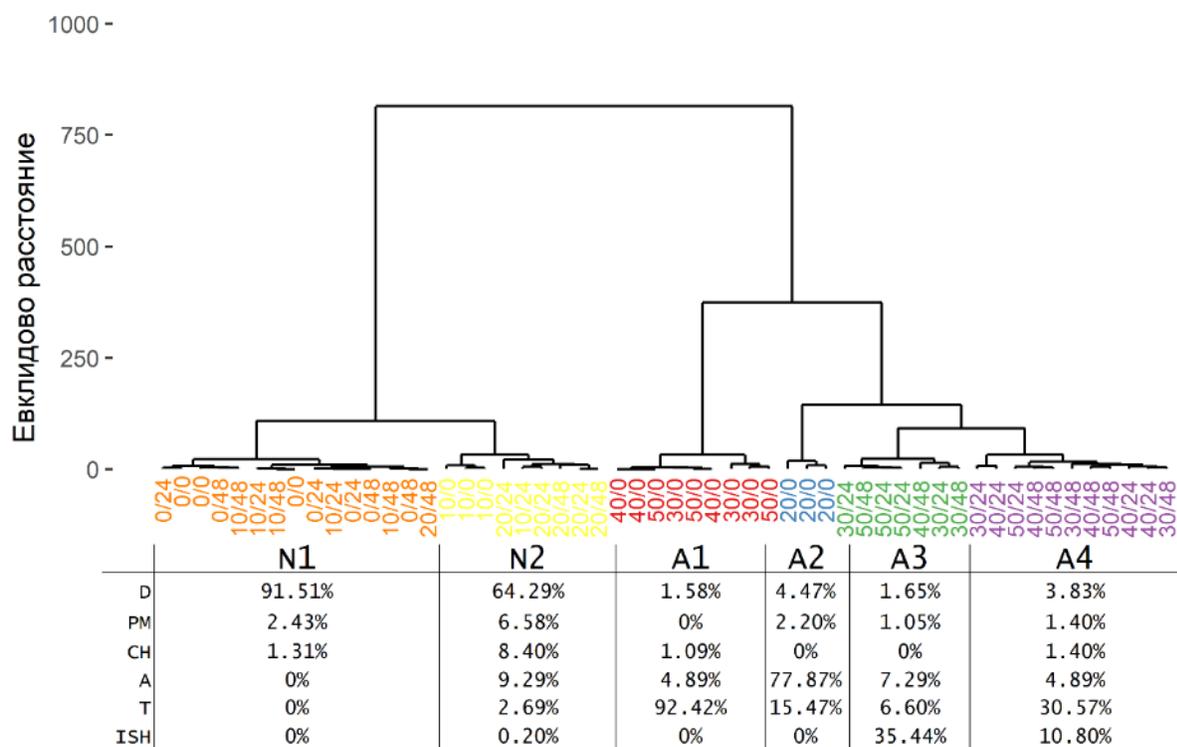


Рисунок 28. Иерархическая кластеризация, построенная на основании распределения морфотипов личинок, полученных как в ходе эксперимента по оценке токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$ , так и проведенной реабилитации в чистой морской воде. Единицей кластеризации является данные по соотношению морфотипов при условиях, записанных в виде "концентрации/времени отмывки". Характерные для выделенных групп средние доли морфотипов личинок (и их соотношения) указаны в таблице под выделенными кластерами.

Крупные кластеры принципиально отличаются по вкладу различных морфотипов: кластер N ("normal") включает экспериментальные пробы с доминированием D-велигеров ( $81.3 \pm 6.35\%$  в

среднем), тогда как в кластер **A** ("abnormal") попали экспериментальные пробы с низкими значениями долей **D**-велигеров и повышенными – морфотипов **A**, **T**, и **ISH** (со средними долями  $13.07 \pm 8.88$  %,  $38.83 \pm 14.09$  % и  $15.51 \pm 6.36$  % соответственно, рис. 28).

Подгруппы кластера **N** – **N1** и **N2** преимущественно различаются по доле **D**-велигеров и незначительно – других морфотипов. **N1** полностью представлен экспериментальными пробами с преобладанием **D**-велигеров (со средней долей  $91.51 \pm 3.19$  %), тогда как пробы из **N2** имеют меньшую долю **D**-велигеров (в среднем  $64.29 \pm 6.53$  %) и несколько повышенные доли морфотипов **PM**, **CH** и **A** (рис 28).

Подгруппы кластера **A** более вариативны и различаются не только преобладанием конкретного морфотипа в экспериментальных пробах, но и соотношениями морфотипов. Так, группа **A1** представлена пробами с преобладанием трохофорных личинок ( $92.42 \pm 7.88$  %), тогда как **A3** и **A4** различаются между собой соотношением морфотипов **T** и **ISH** (рис. 28). Отдельно следует выделить группу **A2** с высокой долей "асимметричных" велигеров ( $77.9 \pm 32.59$  % в среднем), состоящую только из проб после оценки воздействия  $K_2Cr_2O_7$  при концентрации 20 мг/л до пересадки на отмывку ("20/0").

#### 4. Прогностическое моделирование

Для поиска зависимости уровня воздействия (выраженном в концентрации токсиканта) от доли морфотипов и их соотношения построены прогностические обобщенные линейные модели (GLM). Согласно построенным модели, включающей доли всех морфотипов, имеющих раковину, уровень воздействия значимо зависит от наблюдаемого уровня **D**-велигеров и "асимметричных" личинок (таблица 2).

Таблица 2. Коэффициенты построенной обобщенной линейной модели. Коэффициенты переменных, значимо влияющих на значения модели выделены полужирным.

	Значение коэфф.	ст. отклонение	t-критерий	Pr(> t )
<b>Свобонный член</b>	<b>3.726</b>	<b>0.052</b>	<b>71.177</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>D-велигер</b>	<b>-0.026</b>	<b>0.002</b>	<b>-11.967</b>	<b>&lt; 0.01</b>
"Выступающая мантия"	0.013	0.034	0.365	0.72
"Седловидный замок"	0.028	0.022	1.311	0.19
<b>"Асимметрия"</b>	<b>-0.008</b>	<b>0.002</b>	<b>-4.893</b>	<b>&lt;0.01</b>

Согласно полученным значениям краевых эффектов, увеличение количества как наблюдаемых D-велигеров и "асимметричных" личинок уменьшают ожидаемый уровень концентрации. Полученные значения краевых эффектов также свидетельствуют о меньшем влиянии на ожидаемый уровень воздействия количества "асимметричных" личинок, нежели D-велигеров, в среднем в 0.32 раза (от 0.16 до 0.52).

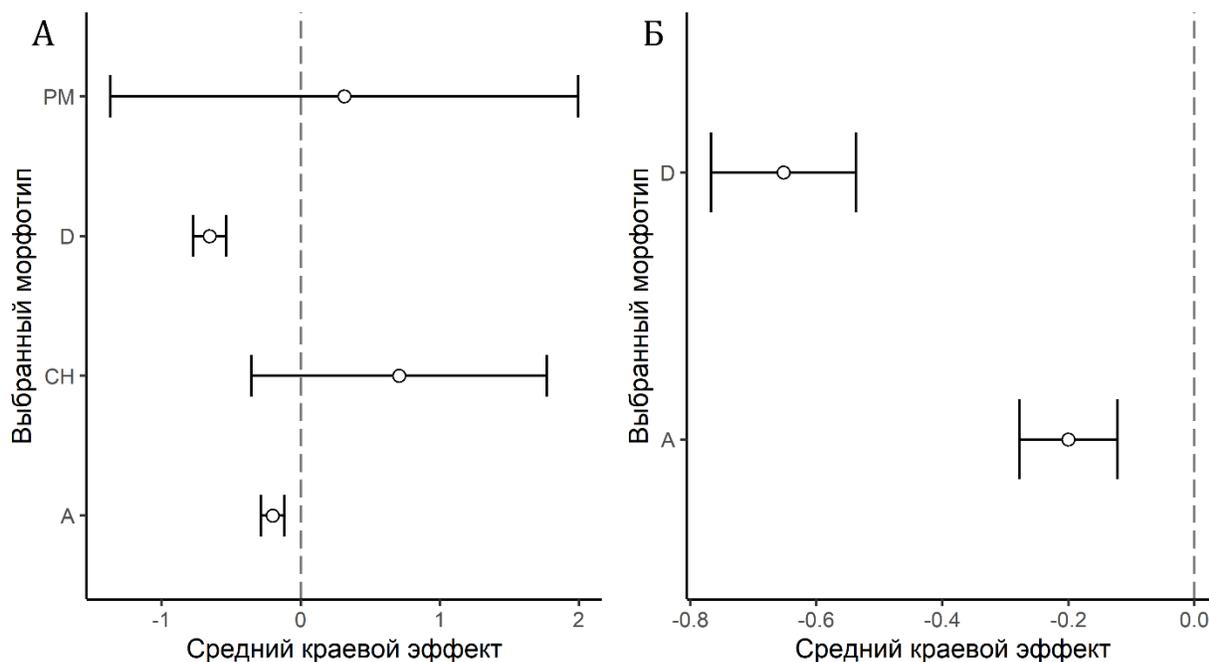


Рисунок 29. Значения средних краевых эффектов полученной общей(А) и оптимальной(Б) модели для каждого из исследованных морфотипов (по оси ординат). Средние краевые эффекты соответствуют изменению ожидаемой концентрации токсиканта при увеличении доли исследованных морфотипов на 1% (по оси абсцисс). Горизонтальной чертой отмечено нулевое приращение доли при изменении концентрации.

Оптимальная модель зависимости долей морфотипов от исследованных концентраций, полученной методом комбинированного включения, учитывает только доли D-велигеров и "асимметричных" личинок. Соотношение уровней краевых эффектов при этом у оптимальной модели аналогично общей (рис. 29Б)

## 5. Особенности анатомии личинок

### 5.1 Особенности строения прямозамкового велигера (D-велигера)

На поперечном срезе D-велигера видно, что всё мягкое тело личинки заключено между створками раковины. С внутренней стороны створки раковины покрыты слоем мантийного

эпителия, утолщенного в зоне края мантии (напр. рис. 30Г). Края створок, рассмотренных D-велигеров плотно сомкнуты, полностью закрывая мантийную полость. Всю мантийную полость и большую часть (до  $\frac{3}{4}$ ) внутреннего пространства между створками раковины, начиная от мускулов аддукторов в передней части личинки до вентрального валика перед анальным отверстием занимает ввёрнутый велюм (рис. 30 от А до В). Велюм состоит из крупных (до 12-15 мкм в длину) клеток с ядрами, расположенными в базальной части клеток, и снабженных жгутиком на поверхности. Часть клеток велюма содержат по несколько крупных вакуолей. В полости, образованной ввёрнутым велюмом, видно большое количество жгутиков вооружения велюма. Ротовое отверстие, расположенное в средней части D-велигера, открывается непосредственно в основании велюма (рис. 30В), и ведет в короткий пищевод (образованный жгутиковыми клетками), впадающий в переднюю треть дорзально расположенного желудка. Устройство желудка варьирует в зависимости от возраста исследованных личинок. У D-велигеров возрастом 48 часов желудок имеет лишь небольшой проксимальный вырост (рис. 30А). Желудок личинок возрастом 72 часа и более имеет как проксимальный вырост, образованный сильно вакуолизированными клетками (рис. 30А), так и латеральные выросты (рис. 30Б, В). Проксимальный вырост располагается перед впадением пищевода, а латеральные выросты желудка расположены в зоне непосредственного впадения пищевода и имеют небольшие полости (рис. 30Б). Стенки желудка в зоне выростов состоят из крупных, богатых мелкими везикулами клеток. В остальной части, стенки желудка образованы небольшими (7-10 мкм) клетками с базальными ядрами. Желудок имеет просвет около 10-15 мкм на всём протяжении, включая проксимальный вырост и латеральные ответвления. Пищеварительная система занимает основной объем висцеральной массы личинки. Мускулатура личинки хорошо развита и состоит из мускулов-замыкателей в передней части личинки и разветвлённой мускулатуры ретракторов велюма. Ретракторы велюма располагаются вдоль плоскости поперечного среза по бокам от висцеральной массы и крепятся в основании раковины (рис. 30В, Г). Гистологическое строение D-велигеров, сформированных за период реабилитации во время отмывки, не отличалось от строения D-велигеров из контроля.

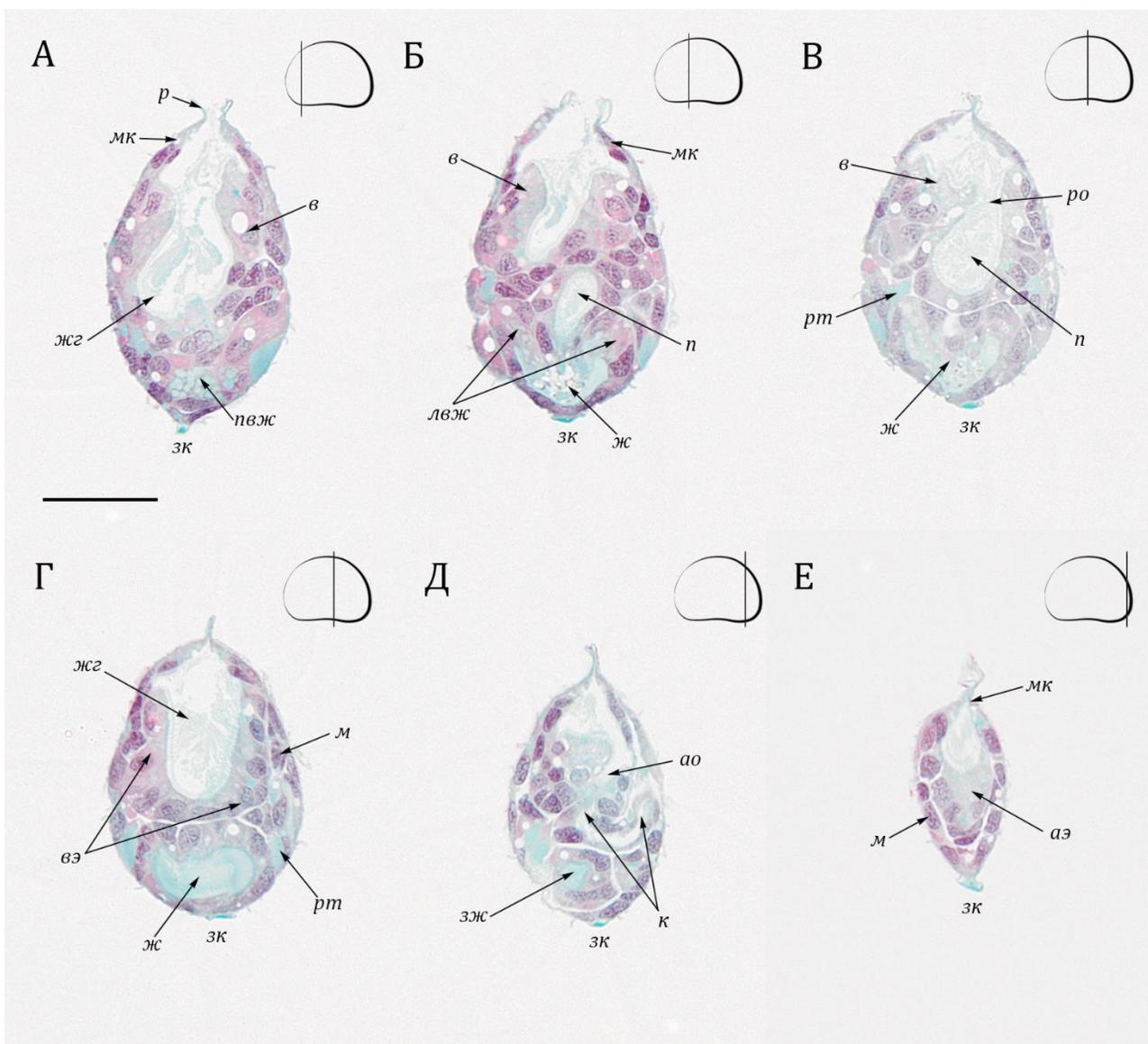


Рисунок 30. Серия поперечных срезов прямозамкового велигера *Mytilus edulis* после 24-часовой отмытки личинок, пересеженных из контроля. Окраска по Туорту в модификации Манских и Шеваль (Manskikh and Sheval, 2020). Пиктограммами в правом верхнем углу каждого среза обозначен уровень среза. А – срез через велюм на уровне переднего выроста желудка; Б - срез через велюм на уровне основания пищевода; В - срез на уровне ротового отверстия; Г - срез через вентральную часть личинки (между ротовым и анальным отверстием); Д - срез на уровне задней кишки и анального отверстия; Е – срез на уровне заднего края раковины. Условные обозначения: *ао* – анальное отверстие, *аэ* – абдоминальный эпителий; *в* – велюм; *вэ* – вентральный эпителий; *жс* – желудок; *жсг* – жгутики; *зк* – замковый край; *к* – кишечник; *лвж* – латеральные выросты желудка;

*мк* – мантийный край; *п* – пищевод; *пвж* – проксимальный вырост желудка; *р* – раковина; *рп* – ретрактор; *ро* – ротовое отверстие. Шкала 20 мкм

## 5.2 Особенности строения велигеров с "выступающей мантией" (PM)

Изучение гистологического строения личинок с мантийным выступом показало различия в общей схеме строения изученных особей. Основной чертой всех рассмотренных образцов является выступание части тканей велюма за край почти полностью закрытой раковины (рис. 10), чем и создает видимость "мантийного выступа". Степень выпячивания велюма за створки раковины варьирует между исследованными особями от практически полной – выступает весь велюм (рис. 31А), до едва выступающих за край створок небольшой части тканей велюма (рис. 31В). Велюм исследованных велигеров даже в максимально вывернутом состоянии имеет значительное углубление в зоне апикального поля, образующегося в результате сокращения расположенной под ним мускулатуры ретракторов. Мускулатура ретракторов велюма хорошо различима на серии гистологических срезов на разных уровнях личинки (рис. 31А). Следует отметить, что чем сильнее велюм втянут в мантийную полость, тем шире раскрыты створки раковины (рис. 31). В остальном гистологическое строение изученных особей полностью соответствует строению D-велигера, включая строения мантии, замкового края, пищеварительной системы и различных систем органов.

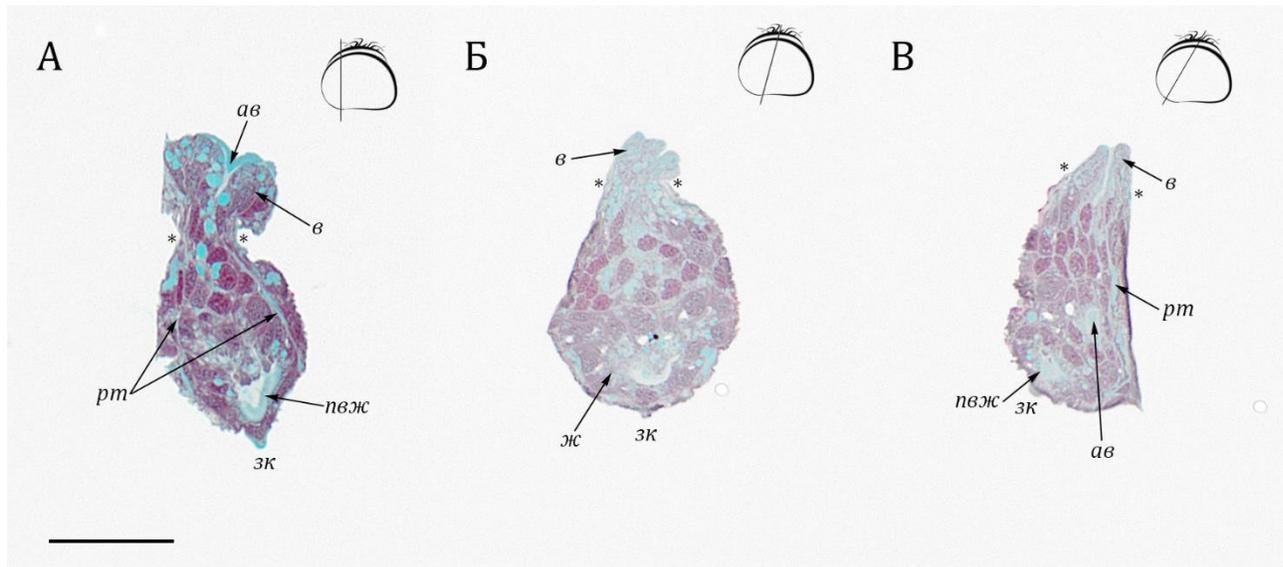


Рисунок 31. Поперечные срезы различных уровней особей морфотипа "выступающая мантия". Окраска по Туорту в модификации Манских и Шеваль (Manskikh and Sheval, 2020). Пиктограммами в правом верхнем углу обозначен уровень и угол среза, стрелками обозначен край раковины. А -

велигер с "выступающей мантией" после 24 часов отмывки от концентрации токсиканта 20 мг/л; Б, В - велигер с "выступающей мантией" после 48 часов отмывки от концентрации токсиканта 10 мг/л. Условные обозначения: *ав* – апикальная впадина; *в* – велюм; *жс* – желудок; *зк* – замковый край; *п* – пищевод; *пвжс* – проксимальный вырост желудка; *рт* – ретрактор. Звёздочками помечены края створок раковины. Шкала 20 мкм.

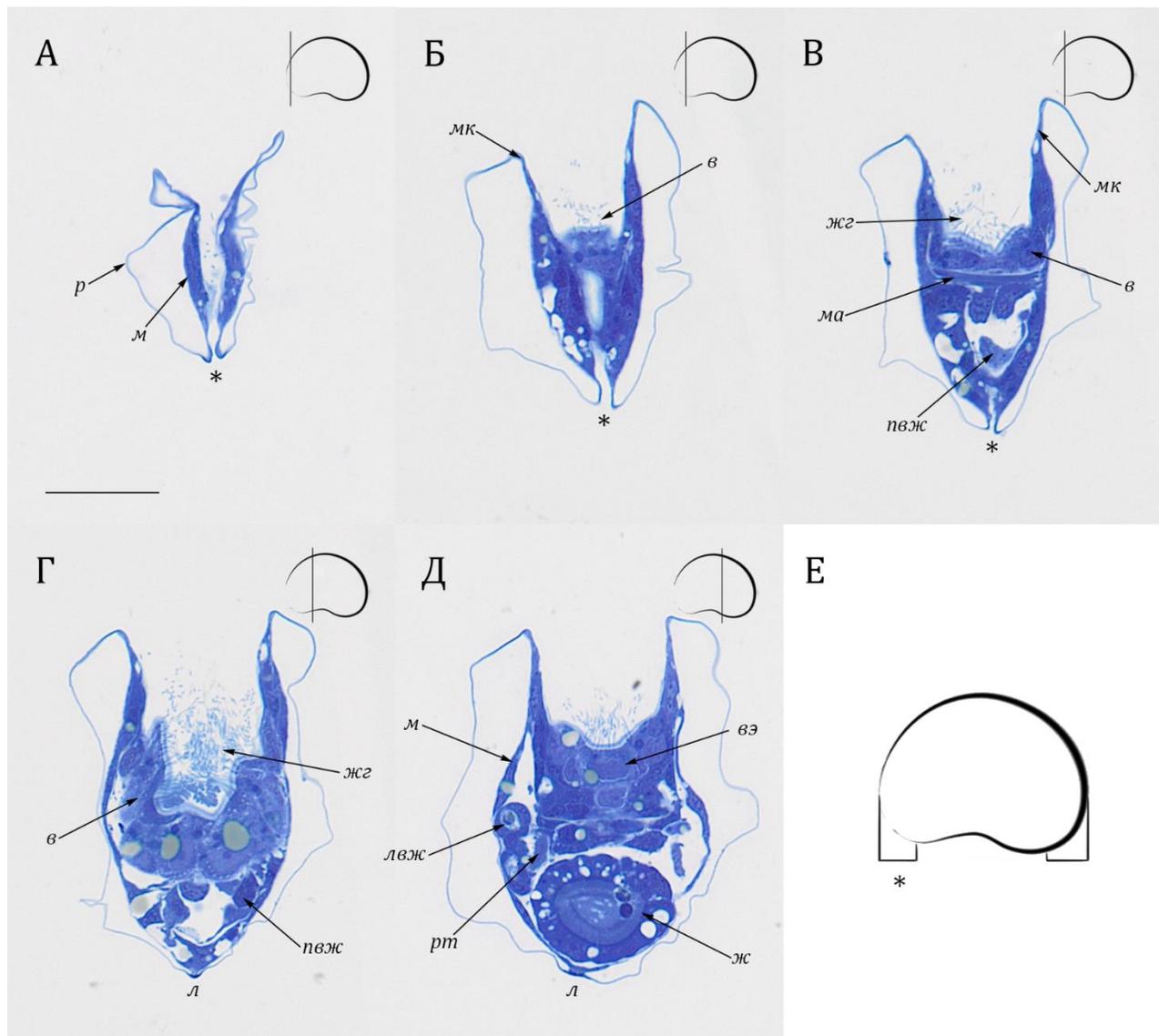


Рисунок 32. Серия поперечных срезов особи морфотипа "седловидный замок" после 48-часовой отмывки личинок, пересаженных из раствора токсиканта концентрацией 20 мг/л. Окраска толуидиновым/метиленовым синим по Миронову (Миронов, 1994). А-В – серия срезов на уровне края раковины (звёздочкой отмечена не скрепленная лигаментом часть замкового края, соответствующий зоне на схеме Е); Г - срез через велюм на уровне начала проксимального выроста желудка; Д - срез через вентральную часть личинки (между ротовым и анальным отверстием); Е –

схема участков, отмеченных звёздочкой на изображениях А-В. Условные обозначения: *в* – велюм; *вэ* – вентральный эпителий; *ж* – желудок; *жг* – жгутики; *к* – кишечник; *л* – лигамент; *лвж* – латеральные выросты желудка; *м* – ткани мантии; *ма* – мускул-аддуктор; *мк* – мантийный край; *пвж* – проксимальный вырост желудка; *р* – раковина; *рт* – ретрактор. Шкала 20 мкм.

### 5.3 Особенности строения велигеров с "седловидным замком" (СН)

Отличительной особенностью гистологического строения личинок данного морфотипа является форма замкового края личинки. В отличие типичного D-велигера, краевые части замкового края личинок данного морфотипа имеют протяжённые зияющие участки с апикального и каудального краёв замкового края личинки (рис. 32А-В, Д). Размер зияющих участков раковины с каждой стороны замка личинки возрастом 72 часа в среднем составляет около 18 мкм (рис. 33А).

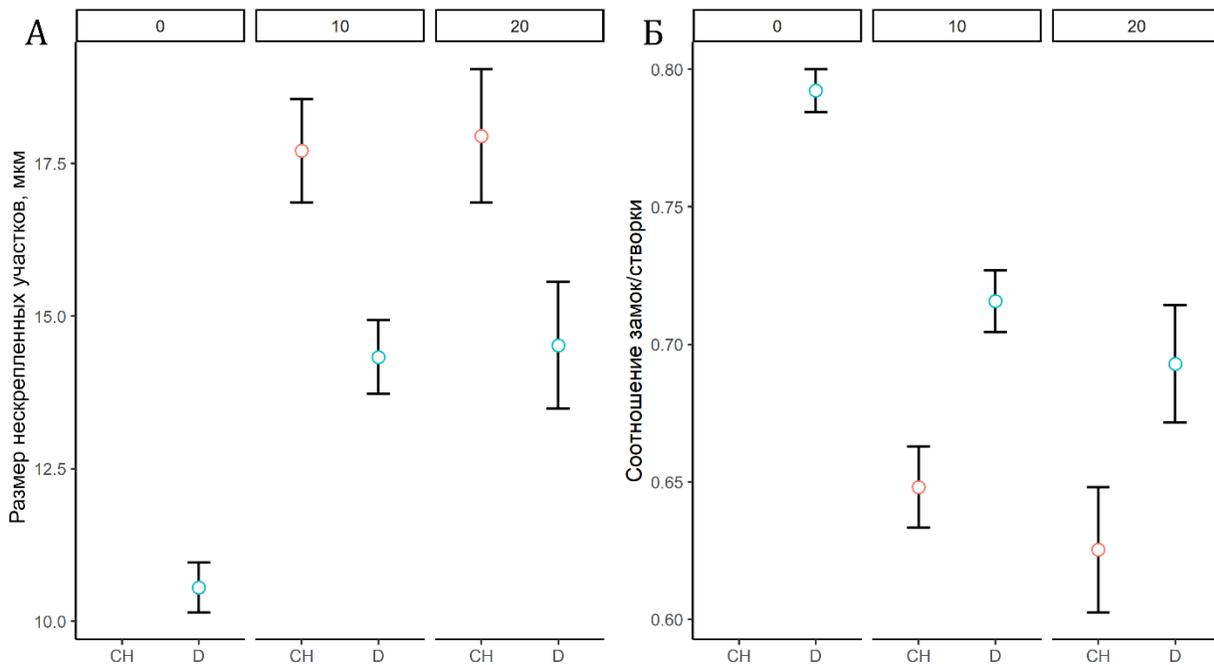


Рисунок 33. Средние значения участков раковины велигера возрастом 72 часа слева и справа от замка, скрепленного лигаментом (А) и соотношения размеров замкового края и общих размеров створок личиночных раковин (Б), при различных концентрациях  $K_2Cr_2O_7$  (сверху) у D-велигеров (D) и личинок с "седловидным замком" раковины (СН). Средние размеры представлены с учётом 95% доверительных интервалов

Скрепленный лигаментом замковый край начинается только от уровня мускулов аддукторов (рис. 32), занимая в среднем 62-65% всей личиночной раковины (рис. 33Б). Створки раковины типичного строения прямозамкового велигера скреплены лигаментом вдоль практически всего (до 80%)

замкового края (рис. 33Б). Размеры личинок с "седловидным замком" сопоставимы по размерам и даже несколько крупнее типичных прямозамковых велигеров, тогда как длина замкового края меньше ввиду деформации последнего (рис. 32В, Г). Другой особенностью строения личинок данного морфотипа является то, что створки раковины остаются широко раскрытыми даже при полностью втянутом вельюме (рис. 32Г). В остальном гистологическое строение данного морфотипа схоже с типичным D-велигером, включая строение пищеварительной системы, вельюма и мускулатуры.

#### 5.4 Особенности строения "асимметричных" личинок (А)

При рассмотрении гистологических срезов личинок асимметричного морфотипа обнаружен целый ряд особенностей строения. Первое, при значительно меньших линейных размерах раковины (рис. III приложения), расстояние между краями створок на срезе личинок данного морфотипа больше, чем у морфотипов рассмотренных ранее (напр., на срезе на рис. 34А, ширина среза 47 мкм, на срезе на рис. 32Г – 37 мкм).

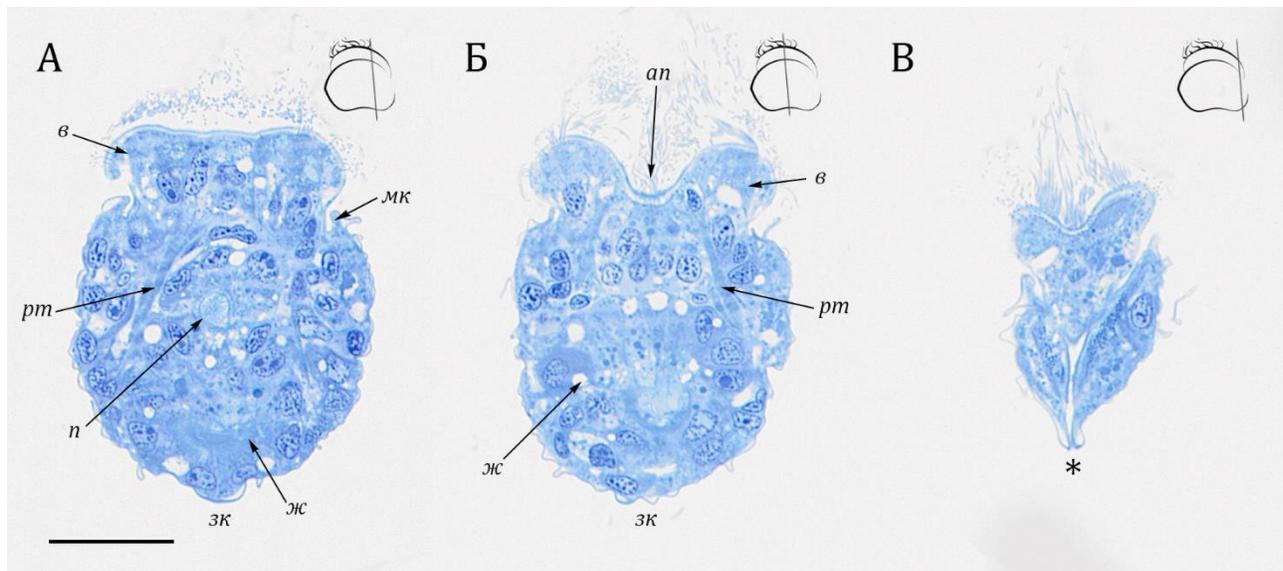


Рисунок 34. Серия поперечных срезов особи асимметричного морфотипа после 48-часовой отмывки личинок, пересаженных из раствора токсиканта концентрацией 30 мг/л. Окраска толуидиновым/метиленовым синим по Миронову (Миронов, 1994). Пиктограммами в правом верхнем углу обозначен уровень среза. А - срез через пищевод и передний отдел желудка; Б - срез через центральный отдел желудка; В - срез через край раковины и часть вельюма (звёздочкой отмечена не скрепленная лигаментом часть замкового края). Условные обозначения: *ап* –

апикальное поле; *в* – вельюм; *вэ* – вентральный эпителий; *жс* – желудок; *зк* – замковый край; *мк* – мантийный край; *п* – пищевод; *р* – раковина; *рп* – ретрактор. Шкала 20 мкм.

Второе, край створок раковины изученных особей раскрыт с одновременной значительной степенью протракции вельюма. Апикальное поле в средней части вельюма имеет углубление, что свидетельствует о сокращении ретракторов вельюма, которые можно хорошо различить на срезах данных участков (рис. 34Б). Третье, пищеварительная система занимает большую часть пространства между створками, тогда как вельюм в большей степени выступает за пределы створок. Важно, что ткани вельюма выступают за створки раковины в одинаковой степени у всех рассмотренных экземпляров. Несмотря на все особенности, такие личинки имеют все присущие системы органов, включая сложно устроенный разветвленный желудок, мускулатуру ретракторов, аддукторов и скреплённые в зоне замкового края створки раковины.

## Обсуждение результатов

### 1. Воздействие $K_2Cr_2O_7$

#### 1.1 Особенности токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$

Токсическое воздействие повышенных концентраций бихромата калия как модельного токсиканта на раннее развитие двустворчатых моллюсков изучено недостаточно подробно и ограничивается классическими способами оценки воздействия, при которых авторы оценивают только долю D-велигеров (Martin et al., 1981; Resgalla, 2016; Sung et al., 2006). Полученная в данной работе при оценке токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$  величина  $EC_{50} = 11.25 \pm 0.48$  мг/л, что несколько выше представленной в литературе. Например, при оценке токсичности ряда тяжелых металлов, включая хром (VI) на процесс раннего развития *S. gigas* и *M. edulis*, Мартин с соавторами (Martin et al., 1981) оценили  $EC_{50}$   $K_2Cr_2O_7$  для этих видов на уровне  $4,54 \pm 0,72$  мг/л и  $4,47 \pm 0,74$  мг/л соответственно. Ресгалла (Resgalla, 2016) использовал  $K_2Cr_2O_7$  в качестве модельного токсиканта при оценке различных способов активации яйцеклеток и их возможного влияния на качество эмбрионально-личиночного тестирования. Полученные автором в работе оценочные значения  $EC_{50}$  несколько больше и составляют, в зависимости от применяемого критерия токсичности, от  $6.76 \pm 2.29$  мг/л при использовании строгого критерия до  $7.32 \pm 2.11$  мг/л при использовании смягченного. Оценивая токсичность ряда тяжелых металлов на раннее развитие *M. galloprovincialis*, Сунг с соавторами (Sung et al., 2006) оценили как полуэффективную так и полулетальную концентрацию хрома, используя бихромата калия в качестве токсиканта. Полученная авторами полуэффективная концентрация при проведении эмбрионально-личиночного теста для  $K_2Cr_2O_7$  составляла  $2.223 \pm 0.082$  мг/л, а полулетальная была более чем на порядок выше полуэффективной, составляя 73.88 мг/л. Таким образом, несмотря на несколько большие значения  $EC_{50}$ , полученные в данной работе, показатели токсичности в целом соответствуют литературным данным. Большие значения могут быть обусловлены различиями в океанической солёности (32-35%) и солёности Кандалакшского залива Белого моря, а также локальными особенностями видовой группировки, обитающей на территории Великой Салмы.

Обнаруженные при проведении оценки токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$  личиночные морфотипы в целом соответствуют ранее описанным, обнаруженным и классифицированным Хис с соавторами (His et al., 1997), за исключением личинок "асимметричного" строения. Опираясь на предлагаемую классификацию можно описать "асимметрию" личинок как одновременное проявление "выступающей мантии" и "седловидного замка" раковины. Такие личинки очень схожи с обнаруженными при оценке негативного воздействия закисления мирового океана под действием

повышенного парциального давления  $\text{CO}_2$  (Kurihara et al. 2007, 2008; Gazeau et al. 2010; Andersen et al. 2013 и др.). Авторы данных работ отмечают одновременное проявление двух личиночных деформаций при высоком  $p\text{CO}_2$  (таблица 1), описывая личинок с одновременным проявлением "выступающей мантии" и "седловидным замком" раковины (Kapsenberg et al., 2018; Szalaj et al., 2017) или "личинок с выемкой на краю раковины" и "выступающей мантией" (Kurihara et al., 2008). Важно, что одновременное проявление более одной личиночной деформации характерно именно для высоких уровней  $p\text{CO}_2$  (таблица 1).

Личинки с похожей морфологией также фигурируют и в работах по оценке токсического эффекта  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  на раннее эмбриональное развитие двустворчатых моллюсков, однако авторы не акцентирует на этом внимания (Resgalla, 2016; Sung et al., 2006). Так, в вышеуказанной работе Ресгалла с соавторами такие личинки выделены в отдельный тип и упомянуты как деформированные (deformed), хотя детальное их описание отсутствует. Авторы упоминают также, что деформация раковины является основным проявлением негативного воздействия бихромата калия (Resgalla, 2016). В работе по оценке острого токсического эффекта  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  на выживаемость и развитие *M. galloprovincialis* похожие личинки упомянуты как недоразвитые (retarded) и обнаружены авторами по окончании вторых суток развития при повышенных концентрациях токсиканта (Sung et al., 2006).

Сходство воздействия повышения парциального давления углекислого газа и повышенных концентраций бихромата калия может быть связано с влиянием на уровень pH морской воды. Повышение  $p\text{CO}_2$  вызывает снижение pH за счёт смещения баланса в карбонат-гидрокарбонатной системе морской воды, а  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  вызывает аналогичное снижение за счёт перехода ионов  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  в  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Несмотря на снижение уровня pH при увеличении  $p\text{CO}_2$ , негативное воздействие закисления мирового океана определяется снижением насыщенности морской воды арагонитом ( $\Omega_{\text{арагонита}}$ ), что однозначно показано в исследовании Уолдбассера с соавторами (Waldbusser et al., 2015). Согласно проведённому исследованию, вклад снижения  $\Omega_{\text{арагонита}}$  в увеличении доли аномально развивающихся личинок вне зависимости от уровня pH составляет более 91%. Именно при снижении насыщенности морской воды карбонатом кальция, а именно арагонитом ( $\Omega_{\text{арагонита}} < 1$ ), большинством авторов отмечается существенное повышение доли деформированных личинок (Andersen et al., 2013; Kapsenberg et al., 2018; Kurihara et al., 2008, 2007). Непосредственное влияние водородного показателя на раннее развитие двустворчатых моллюсков крайне невелико. Например, при оценке влияния pH на раннее развитие *M. mecernaria* и *C. virginica* было показан крайне широкий диапазон оптимума для нормального развития личинок – от 6.75 до 8.75 (Calabrese and

Davis, 1966). Стандартные методики также допускают широкий диапазон pH при проведении тестирования – от 7.5 до 8.5, что косвенно свидетельствует о высокой толерантности развития двусторчатых моллюсков к колебаниям водородного показателя (ASTM, 2012a; USEPA, 2016).

Следовательно, непосредственное снижение pH в достаточно широком пределе, при высоком уровне  $\Omega_{\text{арагонита}}$  не оказывает существенного негативного воздействия. Более того, в данной работе повышение концентрации исследуемого токсиканта вызывает куда меньшее относительное снижение водородного показателя. Так, повышение концентрации  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  до 10 мг/л в сочетании с незначительным снижением pH до 8.1 привело к значимому изменению соотношения морфотипов личинок, и, в частности, к существенному снижению доли D-велигеров с  $98.25 \pm 4.79\%$  до  $69.4 \pm 14.51\%$ . Дальнейшее повышение концентрации до 20 мг/л приводит к преобладанию в пробах личинок со значительными деформациями раковины, определенными нами как "асимметричные" ( $77.9 \pm 16.49\%$  в среднем), тогда как значения pH снижаются лишь до 8.0. Дополнительно проведенный контроль pH свидетельствует о том, что основное негативное воздействие на раннее развитие именно оказывают хромат и дихромат ионы ( $\text{CrO}_4^{2-}$  и  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), поскольку выравнивание уровня pH морской воды до естественных значений не привело к изменению соотношения морфотипов, а лишь способствовало увеличению размеров D-велигеров.

#### 1.2 Динамика соотношения морфотипов как показатель негативного воздействия

Анализ полученных в данной работе результатов свидетельствует о значимом влиянии повышения концентрации  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (в исследованных пределах от 10 до 50 мг/л) на соотношение морфотипов личинок, что подтверждается тестом хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2 = 1014.16$ ,  $p < 0.01$ ). По мере увеличения концентрации токсиканта можно наблюдать снижение доли D-велигеров и увеличение долей других личиночных морфотипов, характеризующихся различными личиночными деформациями. Представленность различных морфотипов отличается в зависимости от концентрации токсиканта (рис. 22): увеличение концентраций  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  с 0 до 20 мг/л приводит к постепенному снижению доли D-велигеров и появлению личинок с "выступающей мантией" и "седловидным замком" раковины и их комбинации ("асимметричных" личинок). Последние начинают превалировать при 20 мг/л, а при превышении данной концентрации (30 мг/л и более), доля личинок, имеющих раковину, резко снижается. В экспериментах с концентрациями токсиканта более 30 мг/л и вплоть до 50 мг/л все личинки лишены раковины и представляют собой деформированные "трохофорные" личинки.

Наблюдаемые в настоящей работе особенности динамики соотношения личиночных морфотипов при возрастании уровня негативного воздействия хорошо согласуются с данными работ по оценке негативного воздействия закисления мирового океана (Andersen et al., 2013; Kurihara, 2008; Kapsenberg et al., 2018). Наблюдаемые авторами изменение соотношения и преобладание различных морфотипов личинок при увеличении  $p\text{CO}_2$  (таблица 1) похожи на полученное в данной работе. При повышении  $p\text{CO}_2$  до 1000 мкратм авторами обнаружены личинки с "выемкой на краю раковины" или с "выступающей мантией" (Andersen et al., 2013; Haruko Kurihara, 2008). Дальнейшее увеличение  $p\text{CO}_2$  до 1500-2000 мкратм приводит к появлению личинок с "седловидным замком" раковины и личинок, имеющих одновременно две деформации: "выступающую мантию" в совокупности с "седловидным замком" раковины или "выемкой на краю раковины" (Kapsenberg et al., 2018). "Асимметричные" личинки (рис 21), обнаруженные в данной работе как раз представляют собой комбинацию "выступающей мантии" и "седловидного замка" раковины, что согласуется с данными Капсенберга с соавторами (Kapsenberg et al., 2018). Значительное повышение  $p\text{CO}_2$ , при котором  $\Omega_{\text{арагонита}}$  опускается ниже единицы, приводит к полному угнетению развития раковины (Haruko Kurihara, 2008).

Похожие результаты получены и при оценке воздействия ионов тяжелых металлов или факторов среды на раннее развитие двустворчатых моллюсков, в которых авторы при оценке токсического эффекта осуществляли подсчёт морфотипов и их соотношений (Moreira et al., 2018). При анализе результатов оценки воздействия ряда концентраций ионов мышьяка (As) на развитие *S. gigas* при различных абиотических условиях можно наблюдать изменения соотношения морфотипов личинок. Проявлением минимального воздействия - неоптимального уровня температуры и солёности - является появление личинок с "выступающей мантией" или "выемкой на краю раковины" (рис 16). При среднем уровне воздействия – повышении концентрации мышьяка до 100 мг/л – возрастает доля личинок с "седловидным замком" раковины (при 24 и 28°C) и "выступающей мантией" (при 32°C и солёностях 24-32‰). И только при самой высокой концентрации токсиканта (300 мг/л) вне зависимости от абиотических условий личинки не формировали раковину.

Более того, изменения соотношений морфотипов личинок при возрастании негативного воздействия отмечены и в работах, посвященных ЭЛТ с использованием морских ежей (Carballeira et al., 2012; Kobayashi, 1990, 1985; Morroni et al., 2016). Кобаяши, исследуя воздействия токсикантов различной природы на раннее развитие морских ежей *A. crassispina* и *H. pulcherrimus*, отметил важную закономерность реакции на негативное воздействие. Проанализировав соотношение стадий

развития морских ежей при различных концентрациях токсикантов, автор показал, что вне зависимости от природы токсиканта, при увеличении его концентрации (а следовательно - и уровня негативного воздействия) увеличивается доля более ранних стадий. Похожую закономерность описывают и Карбальера с соавторами (Carballeira et al., 2012) при оценке токсичности сточных вод. Особенность распределения стадий развития *P. lividus* в зависимости от уровня загрязнения во многом повторяет высказанную гипотезу, поскольку в более токсичных сточных водах авторы обнаруживали большую долю особей на более ранних стадиях развития.

Значимое увеличение доли особей с морфологическими отклонениями при увеличении концентрации показано нами ранее и как побочный эффект при химической индукции стробилиации сцифистом (Мостовщикова и др., 2022). Так, при увеличении концентрации индуцирующего агента (5-метокси-2-метилиндола) с 5 нМ до 5 мкМ, значимо возрастает доля эфир с морфологическими отклонениями. По мере увеличения концентрации индуцирующего агента, доля эфир, имеющих нелетальные отклонения снижается, а доля нежизнеспособных эфир наоборот – растёт.

Таким образом, выявленное в данной работе распределение морфотипов личинок *M. edulis* можно представить в рамках закономерности, согласно которой большее негативное воздействие приводит к большим задержкам в развитии или остановке на более ранних стадиях (Kobayashi, 1985). Тогда о наименьшей задержке будут свидетельствовать появление личинок с незначительными деформациями ("выступающая мантия" и "выемка на краю раковины"), о средней – личинок со значительной деформацией раковины ("седловидный замок" раковины или комбинация нескольких типов деформаций), а отсутствие раковины будет свидетельствовать о самой высокой задержке.

Проведенный в настоящей работе кластерный анализ экспериментальных проб, в соответствии с соотношениями морфотипов личинок, косвенно подтверждает данную тезу. Чем меньше в общем соотношении экспериментальная проба имеет раковинных личинок, тем дальше при кластеризации она располагается от контроля (рис. 28). Рассматривая исключительно результаты эксперимента по оценке токсичности (до пересадки на отмывку) и опираясь на данные кластерного анализа, можно разделить токсическое воздействие исследованных концентраций  $K_2Cr_2O_7$  по степеням:

1. Без воздействия: все пробы контроля – кластер N1.

2. Слабое воздействие, минимально обнаруживаемое воздействие: экспериментальные пробы при концентрации токсиканта 10 мг/л – кластер N2

3. Среднее воздействие: экспериментальные пробы при концентрации токсиканта 20 мг/л - кластер A2

4. Сильное воздействие: все экспериментальные пробы после воздействия токсиканта при концентрациях выше 30 мг/л – кластер A1.

Принимая во внимание распределение морфотипов по данным кластерам, можно представить градацию морфотипов, основанную на увеличении степени негативного воздействия среды, и, как следствия, уровня задержки развития или деформации, в виде ряда D>PM>CH>A>T/ISH.

## 2. Отмывка и реабилитация

### 2.1 Изменение соотношения морфотипов

Анализ данных, полученных в настоящей работе, свидетельствует о принципиальной возможности восстановления личинок *M. edulis* с морфологическими отклонениями, сформировавшихся в результате негативного воздействия  $K_2Cr_2O_7$ , до типичного строения прямозамкового велигера (рис. 14, 15). Реабилитация личинок *M. edulis* во время проведенной отмывки подтверждает обратимость негативного влияния на эмбриональные и ранние постэмбриональные стадии развития низких концентраций токсикантов, показанную другими авторами (Ярославцева, Сергеева, 2005; Morroni et al, 2018). Уже после 24 часов отмывки после воздействия токсиканта в концентрации 20 мг/л, большинство личинок ( $66 \pm 13.92\%$ ) сформировало раковину, характерную для D-велигеров, а еще через 24 часа – D велигеры появились среди личинок с аномалиями, развивавшихся при концентрации токсиканта 30 мг/л ( $18.86 \pm 15.86\%$ ). Важно, что формирование D-раковин наблюдается при отмывке личинок из концентраций, даже превышающих  $EC_{50}$  для  $K_2Cr_2O_7$  – 20 и 30 мг/л. Похожие результаты получены и при оценке обратимости воздействий тяжелых металлов с использованием эмбриональных стадий морского ежа *P. lividus* (Morroni et al., 2018). Авторы показали, что после суток экспозиции в растворах тяжелых металлов и последующей отмывке в течение 48 часов в чистой морской воде доля аномальных личинок падает даже для концентраций, значительно превышающих  $EC_{50}$ .

Кластерный анализ подтверждает реабилитацию личинок на протяжении отмывки (рис. 28). Так, пробы из растворов токсиканта в концентрации 20 мг/л до пересадки на отмывку ("20/0"), принадлежат к суперкластеру А, объединяющего пробы после сильного и среднего воздействия.

Пробы, отобранные через 24 часа отмывки пересаженных из данных растворов личинок ("20/24") уже группируются в кластер N2 суперкластера N, тогда как формирующие данный кластер пробы из растворов токсиканта в концентрации 10 мг/л ("10/0") уже принадлежат кластеру N1 ("10/24").

## 2.2 Выживаемость

Анализ личиночной выживаемости при проведении отмывки позволил сопоставить параметры реабилитации и смертности. Сопоставляя полученные значения выживаемости (рис 23, таблица ПЗ приложения), можно заметить что переход между концентрациями 20 и 30 мг/л, которому соответствует различие высоких и низких темпов восстановления, характеризуется еще и обратной закономерностью в выживаемости. Личиночная смертность во время отмывки от 30 мг/л значительно возрастает по сравнению с более низкими концентрациями: так, выживаемость за первые сутки отмывки от токсиканта в концентрации 30 мг/л выживаемость составила  $61.56 \pm 16.04$  % по сравнению с  $91.34 \pm 13.57$  % при отмывке от 20 мг/л. Важно, что выживаемость личинок при отмывке от концентрации токсиканта 30 мг/л продолжает падать составляя на вторые сутки уже  $52.78 \pm 35.87$  %. Именно увеличение смертности личинок при отмывке от высоких концентраций токсиканта приводит к снижению полувлетальной концентрации отложенного эффекта  $K_2Cr_2O_7$  с  $43.93 \pm 8.12$  до  $35.47 \pm 6.64$  мг/л на вторые сутки отмывки

Основным различием наблюдаемого токсического эффекта рассматриваемых концентраций (20 и 30 мг/л) по окончании ЭЛТ является снижение доли личинок, сформировавших раковину (рис 22): при концентрации 30 мг/л большую часть морфотипов представляют "трохофорные" личинки, а в 20 мг/л преобладают "асимметричные" личинки, имеющие раковины, хотя и деформированные. Рассчитанный коэффициент корреляции ( $\rho$ ) между выживаемостью при проведении отмывки и количеством личинок, сформировавших раковину после проведения ЭЛТ составляет 0.876 (0.732 – 0.946,  $p < 0.01$ ) при учете всех морфотипов, имеющих раковину. При этом коэффициент корреляции между выживаемостью и количеством только D-велигеров меньше и составляет 0.714 (0.436 – 0.867,  $p < 0.01$ ). Следовательно, ключевое значение имеет не строение, а наличие раковины, при отсутствии которой, смертность, даже при снятии негативного воздействия, остаётся высокой и продолжает расти на протяжении отмывки.

## 2.3 Рост и размеры

Несмотря на высокие темпы реабилитации, все сформированные D-велигеры уступают контрольным в размерах (рис. 26 А,Б), но демонстрируют интересную динамику роста. Так, согласно углу наклона линейной регрессии приращения размеров, в первые сутки отмывки D-велигеров от

концентрации токсиканта 10 мг/л ( $\alpha = 0.50 \pm 0.03$ ) выше, чем у контрольных ( $\alpha = 0.34 \pm 0.03$ ). Приращение размеров D-велигеров при отмывке от токсиканта в концентрации 10 мг/л также выше ( $11.97 \pm 2.27$  мкм между "10/24" и "10/0") аналогичного значения из контроля ( $8.2 \pm 2.26$  мкм между "0/24" и "0/0"). Большее негативное воздействие токсиканта при концентрации 20 мг/л вызывает временной сдвиг активного роста во время отмывки и более чем двукратное снижение угла наклона регрессии ( $\alpha = 0.11 \pm 0.04$ ). Важно, что D-велигеры, пересаженные из концентрации 10 мг/л, уже через сутки отмывки ("10/24") превышают размерами контрольных D-велигеров, до пересадки в основной эксперимент ("0/0"). В отличие от личинок из раствора токсиканта в концентрации 10 мг/л, D-велигеры, сформированные во время отмывки от концентрации токсиканта в 20 мг/л, никогда не превышали D-велигеров из контроля (даже из "0/0") и демонстрировали лишь незначительный прирост на 3.09 мкм ( $p = 0.09$ ) во время реабилитации. Динамика размеров личинок, питающихся микроводорослями *D. salina* показала сходные с короткой отмывкой данные. Построенные модели асимптотического роста показывают схожие темпы роста D-велигеров из контроля и при отмывке от токсиканта в концентрации 10 мг/л, тогда как D-велигеры, сформированные при отмывке от концентрации 20 мг/л, растут значительно медленнее (рис. 27А). Как и в случае восстановления без добавления микроводорослей, максимальный прирост размеров D-велигеров наблюдается при отмывке от токсиканта в концентрации 10 мг/л в первые сутки и составляет более 9 мкм. Пиковые значения прироста D-велигеров также отличаются для исследованных концентраций: D-велигеры из токсиканта в концентрации 10 мг/л в первые сутки прибавляют более 9 мкм, тогда как максимальный суточный прирост D-велигеров, сформированные при отмывке от токсиканта в концентрации 20 мг/л не превышал 2.71 мкм (рис. 27Б). Как и в случае восстановления без кормления, размеры D-велигеров, развивавшихся при неблагоприятных условиях даже после отмывки оставались значимо меньше контрольных (рис. 27А).

Таким образом, личинки, подвергшиеся незначительному воздействию, имеют возможность восстановить скорость роста после снятия негативного воздействия, но не могут полностью компенсировать разницу в размерах по сравнению с контролем даже за 96 часов реабилитационной отмывки. Более того, сохраняющаяся разница в размерах четко указывает на уровень негативного воздействия токсиканта до отмывки. Успешная реабилитация характерна только для концентраций, при которых большинство морфотипов имеют раковину, а воздействие высоких концентраций токсиканта, приводящего к формированию безраковинных личинок, приводит к высокой посттравматической смертности во время отмывки.

### 3. Особенности анатомии личинок

#### 3.1 "Выступающая мантия"

Анализируя полученные серии срезов личинок с "выступающей мантией" (по классификации His, 1997) удалось выявить некоторые закономерности. Рассмотренные личинки данного морфотипа визуальнo отличаются по степени протракции тканей, что подтвердилось и при анализе серий срезов (рис. 31). Сопоставляя полученные срезы со схемой, представленной в работе Крагга (Cragg, 1985), можно заметить целый ряд сходств между различными стадиями ретракции вельюма, и полученными в работе срезами. Так, особь с максимальным уровнем мантийного выступа (рис. 31А) соответствует стадии максимальной протракции вельюма (рис. 6А) за исключением того, что апикальное поле вельюма исследованной особи несколько втянуто. Учитывая, что погружение апикального поля является одной из первых стадий ретракции (рис. 6В), можно предположить, что данная особь зафиксирована именно в момент начала ретракции вельюма. Другая исследованная особь (рис. 31Б) демонстрирует большую степень ретракции тканей вельюма, соответствуя стадиям Б/В, о чем свидетельствует как степень погружения тканей вельюма, так и крайне дорзальное залегание висцеральных масс. Максимальная - практически полная - из исследованных степень ретракции (рис. 31В) соответствуют стадиям Г/Д (рис. 6), и характеризуются лишь незначительным выступанием тканей вельюма за край раковины, и всё еще несомкнутыми створками раковины. Таким образом, все рассмотренные особи являются типичными по строению D-велигерами находящимися на различных стадиях ретракции вельюма во время фиксации. Все рассмотренные личинки имели неотличимые от нормально развивающихся прямозамковых велигеров строение, включая строение раковины, вельюма, пищеварительной системы и мускулатуры (сравнивая рис. 30 и 31).

Таким образом, выступающие ткани не являются аномально разросшимися тканями мантии, как предполагали ранее (His et al., 1999a), а являются вельюмом на разной стадии ретракции. Предположению Капсенберга с соавт. (Kapsenberg et al., 2018) о взаимосвязи наличия "выступающей мантии" и проблем с переходом от продиссоконха I к II, противоречит присутствие таких личинок в контроле на первые и вторые сутки отмывки. Более того, максимально высокие доли таких личинок наблюдаются на первые и вторые сутки отмывки от  $K_2Cr_2O_7$  в концентрации 20 мг/л (рис. 24), при которой идёт активное восстановление строения раковины. Другой важной особенностью строения личиночных раковин, формирующихся при угнетении процесса кальцификации, является наличие зоны деформации "точечной зоны" продиссоконха I (Kapsenberg et al., 2018) (рис. 19Б). Следует отметить, что в непосредственной близости находятся места прикрепления мускулов-ретракторов вельюма к раковине (рис 5). Возможно, что снижение жесткости раковины, ввиду угнетения процесса

кальцификации, в совокупности с меньшими размерами раковины замедляют процесс ретракции вельюма, делая возможным обнаружение зафиксированных личинок на разных стадиях ретракции.

### 3.2 "Седловидный замок"

Тонкое строение личинок с "седловидным замком" раковины (по классификации His, 1997) имеет общую отличительную черту строения, отличающую их от прямозамкового велигера: замковый край такой личинки, имеет крупные, не скреплённые лигаментом зияющие части по краям раковины (рис. 32Д, 33). Длина зияющих частей в среднем составляют около 18 мкм (рис. 33А). Зияющие части наблюдаются на поперечных срезах вплоть до мускулов аддукторов на проксимальной части личинки и анального отверстия на дистальной (рис 32А-В). Соотношение длины замкового края и линейных размеров личинок морфотипа "седловидный замок" всегда значимо меньше такого соотношения у типичных D-велигеров, тогда как линейные размеры участков, лишенных лигамента, наоборот – всегда больше (рис. 33). При визуальном подсчёте и классификации именно данные участки выступают за замковый край формируя "седло" (рис. 32В). Другой особенностью строения личинок данного морфотипа является то, что створки раковины остаются широко раскрытыми даже при полностью втянутом вельюме (рис. 32Г). Передние мускулы аддукторы при этом хорошо развиты (рис. 32В). Вместе с тем, личинки с "седловидным замком" раковины обладают некоторыми особенностями, позволяющих предположить о предпосылках формирования такого строения раковины, а именно:

1. Размеры таких личинок сравнимы, а иногда больше нежели у D-велигеров (например, при отмывке в течении 24 часов от токсического воздействия  $K_2Cr_2O_7$  в концентрации 20 мг/л средние размеры D-велигеров составляют  $93.22 \pm 1.37$  мкм, а личинок с "седловидным замком" раковины -  $94.5 \pm 1.91$  мкм, таблица П2 приложения).
2. Пиковое значение доли таких личинок можно наблюдать на первые сутки отмывки (рис 25), во время которых отмечен как максимальный прирост размеров D-велигеров из концентрации 10 мг/л, так и резкое увеличение доли D-велигеров при пересадке личинок из концентрации 20 мг/л (важно учитывать, что D-велигеры значительно крупнее асимметричных, рис. П1 приложения).

Следовательно, резкое увеличение доли личинок с "седловидным замком" совпадает с периодом пикового роста и восстановления велигеров (первые сутки отмывки). В то же время, обнаруженная Капсенбергом с соавторами (Kapsenberg et al., 2018) деформация раковины в "точечной зоне" продиссоконха I выдвигается как основная причина формирование личинок такого

морфотипа. Углубленная деформация раковины в зоне продиссоконха I обнаруживается авторами у особей, развивавшихся при pH=7.4 уже на стадии трохофоры возрастом 35 часов.

Возможно, что возрастание доли личинок с "седловидным замком" раковины связано именно с активным ростом раковин у личинок, имеющих похожую деформацию раковины (например, "асимметричных" личинок). Расположенные близко к краю створок органы, такие как мускулы-аддукторы, ввиду искривления линии замка оказались "вывешены" за пределы замочного края. Значительное изменение геометрии раковины и замка не позволяет при этом закрыть створки раковины полностью.

### 3.3 "Асимметрия"

"Асимметричные" личинки, описанные в данной работе, имеют ряд особенностей строения. Несмотря на меньшие линейные размеры, общая площадь тканей на срезе у личинок данного морфотипа значительно превосходит рассмотренные ранее, включая D-велигеры аналогичного возраста (напр., рис 30 и 34). Как и у велигеров с "выступающей мантией", вельюм на срезах личинок данного морфотипа выступает наружу и соответствует стадии ретракции Б/В по Краггу (Cragg, 1985). Створки раковины личинок данного морфотипа на срезах раскрыты, а вельюм выступает за края раковины, имея при этом явно углубленное апикальное поле, что дополнительно характеризует данную стадию как Б/В (рис. 6). Таким образом, можно принять, что личинка находится на самой ранней стадии ретракции. Важно, что поперечные срезы всех рассмотренных асимметричных личинок несут аналогичные черты, позволяющие определить их как велигеров, находящихся на самой ранней стадии ретракции, а личинок на стадиях Г-Е просто не обнаружено. Ткани частично ввернутого вельюма занимают всё свободное внутреннее пространство мантийной полости личинки и значительно выдаются наружу. Мускулатура вельюма при этом развита, о чём косвенно можно судить по ретракции апикального поля (рис. 34Б), так и по обнаруженным на срезах мышечным волокнам (рис 34А). Пищеварительная система личинки развита в соответствии с возрастом, имея крупный желудок с проксимальным и латеральными выростами, занимающем большую часть пространства между створками. Возможно, именно такое несоответствие развития висцеральной массы и раковины и приводит к формированию данного морфотипа личинок. Похожего мнения придерживаются и Капсенберг с соавторами (Kapsenberg et al., 2018), предполагая что задержка развития на стадии перехода продиссоконха I в II, и вызванное этим остановка роста раковины (которая выражается в меньших на 4-6% по сравнению с контрольными В-велигерами размерами), приводят к невозможности полной ретракции вельюма. Обнаруженные в данной работе "асимметричные" личинки имеют в среднем на 23-30 % меньшие линейные размеры раковин, по

сравнению с D-велигерами аналогичного возраста, а совокупность наблюдаемых черт строения свидетельствуют о невозможности полной ретракции велюма. Негативное воздействие бихромата калия, как было высказано и другими исследователями (Resgalla, 2016), во многом состоит в воздействии на формирование раковины, и вполне может вызывать ингибирование её роста. Возможно, что данный факт и является основной причиной формирования "асимметричных" личинок.

Таким образом, негативное кратковременное воздействие при низких и средних уровнях воздействия токсиканта приводит в основном к обратимым деформациям раковины, проявляющимися в той или иной степени. Именно деформации раковины являются основным обратимым эффектом, тогда как в пробах с высокой долей личинок, полностью лишенных раковины, характерна крайне высокая смертность личинок, которая продолжает возрастать на протяжении всего периода отмывки. Основным эффектом воздействия при низких концентрациях токсиканта является снижение линейных размеров D-велигеров, а после резкого возобновления роста, вероятно, и возникает деформация, связанная с "седловидным замком" раковины. Более сильное воздействие токсиканта вызывает появление личинок со значительной деформацией раковины – "асимметрией". Несмотря на регистрацию смертности при отмывке от данных концентраций, смертность крайне невелика, а высокая доля D-велигеров через сутки и двое отмывки свидетельствует об успешном восстановлении нормального строения даже после такой сильной деформации.

#### 4. Оценка критериев токсического воздействия и их пересмотр

Обнаруженная в данной работе способность личинок с морфологическими отклонениями к восстановлению нормального строения после непродолжительной отмывки может свидетельствовать о необходимости пересмотра понятия "аномальности" развития в применяемых критериях токсичности. Выявленные особенности анатомии личинок, имеющих морфологические отклонения в общем сводятся к деформациям раковины, тогда как строение мягких тканей таких личинок в целом соответствует описанному у D-велигеров. Некоторые из морфотипов, характеризующихся морфологическими отклонениями обнаружены и в контроле, например "выступающая мантия", при исследовании анатомии которого не было обнаружено значимых отклонений от D-велигера ни в строении раковины ни мягких тканей. Доли личинок с подтвержденными деформациями раковины достигают максимальных значений при определенных уровнях негативного воздействия (например, доля "асимметричных" личинок при 20 мг/л максимальна), что никак не отражается в классическом критерии токсичности.

Чтобы оценить степень необходимости учёта всех обнаруженных в данной работе морфотипов личинок для корректной оценки уровня воздействия, была построена модель логарифма отношения накопленных шансов (кумулятивного логита), опираясь на полученную градацию личиночных морфотипов в соответствии с уровнем негативного воздействия и возможности восстановления ( $D > PM > CH > A > T / ISH$ ). Согласно построенной модели (параметры модели представлены в таблице П4 приложения), при проведении ЭЛТ продолжительностью 48 часов с использованием  $K_2Cr_2O_7$  в качестве модельного токсиканта наиболее часто встречаемыми (с наивысшим шансом обнаружения) в ряду исследованных концентраций являются D-велигеры, асимметричные личинки ( $CH+PM$ ), а также трохофорные личинки (рис. 35). Расчётные вероятности обнаружения при проведении тестирования таких морфотипов как "седловидный замок" (до 2.98 %) или "выступающая мантия" (до 3.69 %) оказываются очень малы. Построенные обобщенные линейные модели для оценки ожидаемых концентраций  $K_2Cr_2O_7$  от количества обнаруженных личинок различных морфотипов также свидетельствуют об отсутствии необходимости самостоятельного (отдельного) учета долей морфотипов, отличных от D-велигеров и "асимметричных" личинок (рис. 29). Таким образом, учёт личинок морфотипов "выступающая мантия" и "седловидный замок" либо как нормы (смягченный критерий токсичности), либо как аномалии (строгий критерий) не будет оказывать существенного влияния на общую оценку токсичности. При этом, "асимметричных" личинок, ввиду отличного от D-велигеров уровня воздействия на ожидаемую концентрацию следует учитывать самостоятельно или с введением поправочных коэффициентов.

Для сравнения точности применяемых оценок токсического воздействия использован ROC-анализ, как в классическом варианте, так и при оценке многоуровневой классификации. В качестве классификаторов выбраны как строгий и смягченный критерий токсичности, используемый в литературе (ASTM, 2012a; Leverett and Thain, 2013), так и построенные в настоящей работе обобщенные линейные модели. Сравнительный анализ точности произведен между классификаторами в следующих комбинациях "строгий критерий/доля D-велигеров"; "смягченный критерий/доля D-велигеров"; "строгий критерий/GLM-модель"; "смягченный критерий/GLM-модель" (рис. 36).

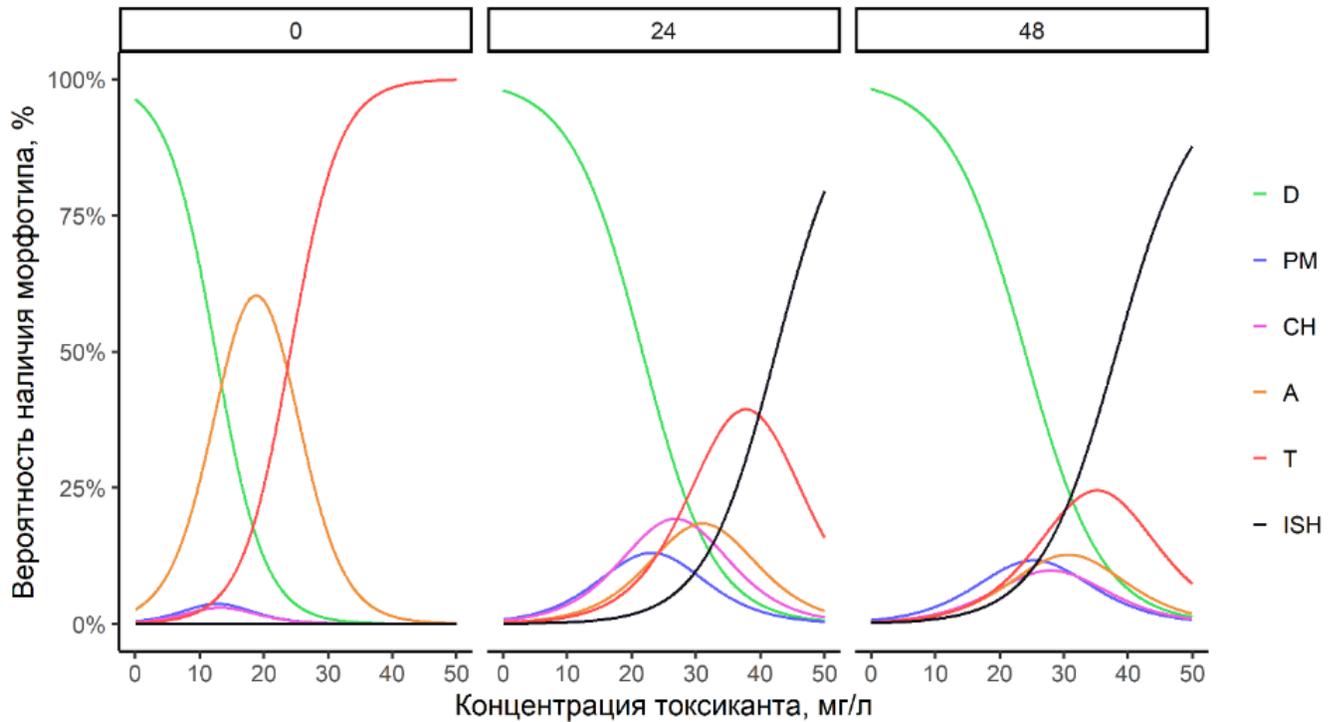


Рисунок 35. Вероятностные кривые наличия морфотипов личинок при различных соотношениях концентраций токсиканта и продолжительности отмывки, полученные согласно кумулятивной логистической модели (ordered logistic), опираясь на принятую градацию "аномальности" в ряду  $D > PM > CH > A > T / ISH$ . Вероятность нахождения морфотипа в пробе отмечена по оси ординат, концентрация токсиканта по оси абсцисс. Кривые разделены по продолжительностям отмывки, указанные в верхней части графика. Легенда отображенная справа отражает выбранную цветовую схему.

В соответствии с проведенным ROC-анализом, Доля D-велигеров является достаточно хорошим классификатором, показывая многоклассовый AUC на уровне 0.759. Наибольшую проблему при использовании доли D-велигеров в качестве классификатора представляет выделение среднего уровня воздействия токсиканта (AUC для выделения концентраций 20 и 30 мг/л составляет 0.356 и 0.378). Изменение критерия "нормальности" со строгого на смягченный увеличивает качество классификации для данных концентраций до 0.667 и 0.589 соответственно и общий мультиклассовый уровень до 0.833 (рис. 36). Использование в качестве критерия оценки токсичности обобщенной модели по сравнению с классическим способом (доля D-велигеров) повышает качество классификации (AUC) вплоть до 0.944. Переход на более мягкий критерий "нормальности" при использовании модели в качестве классификатора не приводит к значительному увеличению точности и повышает AUC лишь до 0.970. Таким образом, ключевую роль в повышении точности играет именно использование модели в качестве классификатора.

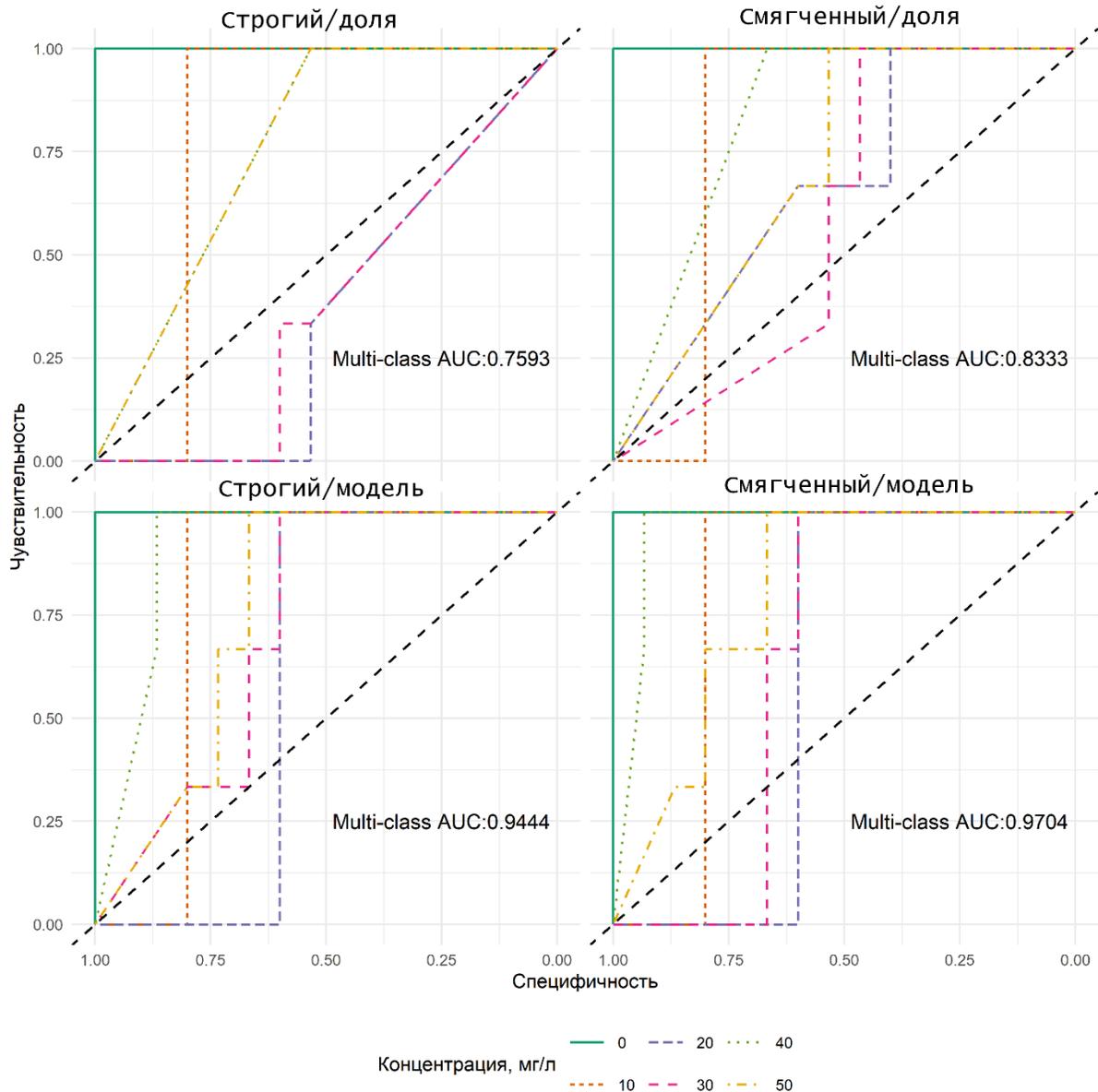


Рисунок 36. Проведенный ROC-анализ качества разделения уровней токсического эффекта (соответствующим концентрациям  $K_2Cr_2O_7$ ) с использованием различных критериев "нормальности" строения велигера и способов оценки токсического воздействия. Используемые комбинации указаны через дробь, в названии каждого графика. Для оценки качества классификации для каждой исследованной концентрации построена уникальная ROC-кривая (легенда в нижней части рисунка); для каждого выбранного способа классификации рассчитана площадь под мультиклассовой ROC-кривой (Multi-class AUC).

Ввиду того, что построение обобщенных линейных моделей не всегда является удобным, а также значимого вклада как доли D-велигеров, но и личинок с морфологическими отклонениями

("асимметричных" личинок) в общую оценку эффекта воздействия, можно предложить способ оценки токсичности, опираясь на индекс, схожий с предложенным Моррони с соавторами (Morroni et al., 2016):

$$D_{index} = \sum_{i=m}^n (\beta_i \times p_i) \quad (5)$$

Где:

$i$  – порядковый номер морфотипа личинок;

$n$  – общее количество обнаруженных морфотипов с деформациями раковины;

$\beta_i$  – коэффициент, рассчитываемый с учётом параметров модели;

$p_i$  - частота встречаемости данного морфотипа.

Принимая во внимание показанную высокую корреляцию между наличием у личинок сформированной раковины и низким уровнем смертности при проведении отмывки необходимо включить в данный индекс личинок с деформациями сформированной раковины, даже не обнаруженные в данном исследовании. Такой подход позволит экстраполировать данный метод на оценку воздействия, при котором могут наблюдаться отличные типы морфологических отклонений строения раковины.

Например, при расчёте D-индекса при оценке воздействия  $K_2Cr_2O_7$  ввиду отсутствие значимой зависимости ожидаемой концентрации токсиканта от долей личинок морфотипов "выступающая мантия" и "седловидный замок" в построенной обобщенной модели (рис. 29А) и большую точность при использовании смягченного критерия токсичности (рис. 3б), можно принять коэффициенты  $\beta$  для данных морфотипов равными единице. Поправочный коэффициент  $\beta$  для доли "асимметричных" личинок – 0.32 – прямо исходит из параметров модели, а именно – из соотношения краевого эффекта доли "асимметричных" личинок и "D-велигеров" на ожидаемую концентрацию (рис. 29Б). Тогда, способ расчёта D-индекса можно будет представить как:

$$D_{index} = 1 \times (p_{D\%} + p_{PM\%} + p_{CH\%}) + 0.32 \times p_{A\%}$$

Использование рассчитанного таким способом D-индекса в качестве классификатора уровней негативного воздействия  $K_2Cr_2O_7$ , можно достичь точности на уровне GLM-модели – 0.9625, что ощутимо выше по сравнению с использованием исключительно доли D-велигеров. Так,

сравнивая доли D-велигеров с D-индексом при оценке воздействия  $K_2Cr_2O_7$  в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л можно отметить что при использовании доли D-велигеров эффект воздействия от 20 до 50 мг/л неразличим. Использование D-индекса же позволяет в данном случае однозначно отделить 20 мг/л и отчасти разделить более высокие концентрации (рис 37). Важным плюсом использования предлагаемого индекса является сохранение привычных способов токсикометрических показателей, таких как  $EC_{50}$ , поскольку D-индекс, как и доля D-велигеров будет принимать значения от 0 до 1.

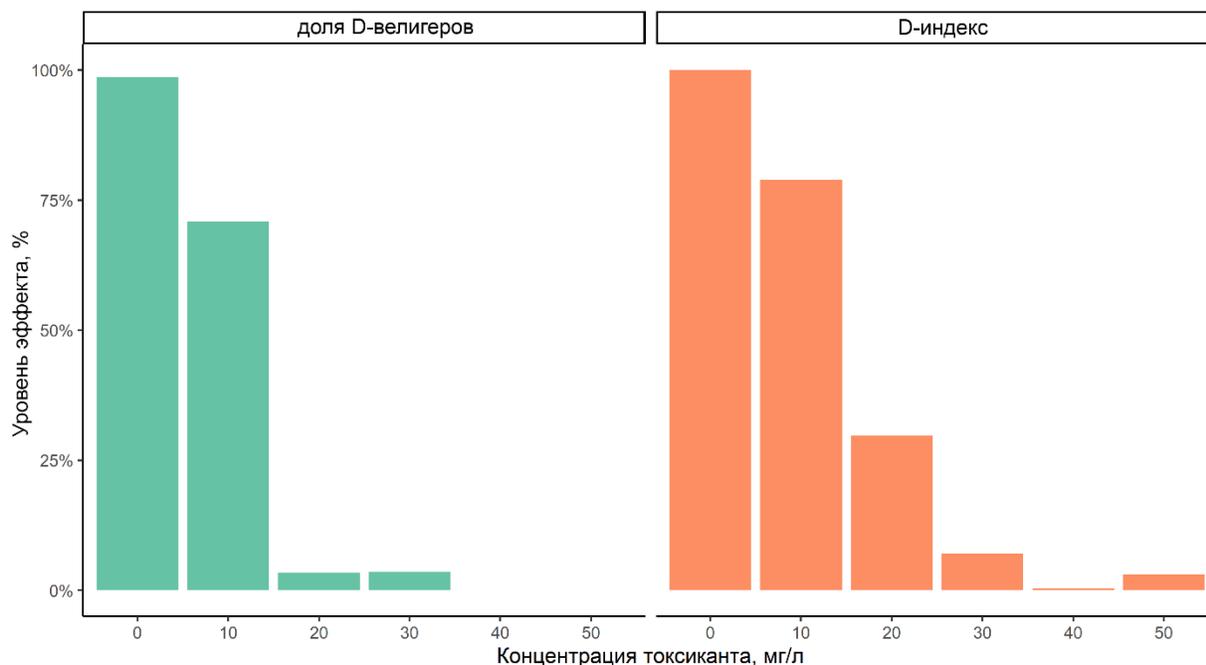


Рисунок 37. Сравнение оценки эффекта воздействия  $K_2Cr_2O_7$  в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л при использовании в качестве критерия токсичности ЭЛТ двустворчатых моллюсков доли "идеальных" D-велигеров и предложенного D-индекса.

Следовательно, можно утверждать, что использование в качестве оценки токсического воздействия как получаемой в ходе подсчёта доли D-велигеров, так и моделей, их учитывающих, качество классификации при использовании смягченного критерия (то есть, принятие за нормально развивающихся D-велигеров личинок с раковинной характерной формы, даже имеющих незначительные деформации) в целом выше. Использование при расчёте воздействия обобщенной линейной модели, или предложенного в данной работе D-индекса еще больше увеличивает качество оценки уровня воздействия, и может быть использовано в качестве критерия токсичности эмбрионально-личиночного тестирования двустворчатых моллюсков.



## Выводы

1. Бихромат калия ( $K_2Cr_2O_7$ ) оказывает значимое воздействие на раннее развитие *M. edulis*, вызывая развитие личинок с выраженными морфологическими отклонениями, доля которых при увеличении концентрации токсиканта растёт. При концентрациях токсиканта до 30 мг/л преобладают личинки с деформациями раковины; при более высоких концентрациях (более 30 мг/л) формирование раковины не происходит.
2. Показана принципиальная возможность восстановления нормального строения раковины личинками с деформациями раковины, полученными вследствие краткосрочного воздействия концентраций  $K_2Cr_2O_7$  вплоть до 20 мг/л. По ходу реабилитации негативный эффект воздействия токсиканта сохраняется в виде разницы в размерах личиночной раковины и/или темпов её роста.
3. Наличие сформированной раковины у личинок *M. edulis*, по завершении эмбрионально-личиночного тестирования, служит важным маркёром при оценке токсичности. Высокий уровень смертности (более 50%) во время отмывки характерен для проб из концентраций более 30 мг/л, при которых подавляющее большинство личинок не имели раковину после окончания эксперимента по оценке токсического воздействия.
4. Анализ строения личинок с отклонениями подтверждает, что негативное воздействие токсиканта выражается в нарушении развития раковин, что приводит к появлению морфологических деформаций:
  - а. Личинки с "выступающей мантией" представляют вариации нормальных прямозамковых велигеров, зафиксированных на различных стадиях ретракции вельюма;
  - б. Личинки с "седловидным замком" имеют значительные участки замкового края раковины, нескрепленные лигаментом, что и обуславливает выявляемую деформацию раковины;
  - в. Особенностью "асимметричных" личинок является несоответствие степени развития раковины и мягких тканей. Ввиду небольших размеров раковины объем мантийной полости оказывается недостаточным для полной ретракции вельюма.
5. Предложен критерий токсичности, учитывающий способность личинок к восстановлению, который позволяет с большей точностью разделять уровни негативного воздействия. Это возможно благодаря учёту всех личинок, развивших раковину по окончании эмбрионально-

личиночного тестирования, с введением поправочных коэффициентов в зависимости от типа деформации раковины.

### Список литературы

1. Малахов В., Медведева Л. Эмбриональное и раннее личиночное развитие двустворчатого моллюска *Mytilus edulis* (Mytilida, Mytilidae) // Зоологический журнал. 1985. Т. 19. № 12. С. 1808–1815.
2. Малахов В., Медведева Л. Эмбриональное развитие двустворчатых моллюсков в норме и при действии тяжелых металлов. Москва: Наука, 1991. 134 с.
3. Мостовщикова П. С., Саидов Д. М., Косевич И. А. Отклонения в строении эфир при химической индукции стробилиации у *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) // Онтогенез. 2022. Т. 53. № 2. С. 94–111.
4. Саидов Д., Саидов Г. Использование искусственной нейронной сети в анализе и количественной обработке данных биотестирования // Морские биологические исследования достижения и перспективы в 3-х т. сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции. 2016. С. 279–281.
5. Ярославцева Л., Сергеева Э. Влияние ионов меди на ранние стадии развития тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* (Bivalvia) // Биология моря. 2005. Т. 31. № 4. С. 267–273.
6. Aji L. P. Review: Spawning Induction in Bivalve // J. Penelit. Sains. 2011. V. 14. I. 2. pp. 33–36.
7. Allen S. K. J., Downing S. L., Chew K. K. Hatchery manual for producing triploid oysters. Seattle, Washington: University of Washington Press, 1988. 1–27 p.
8. Andersen S., Grefsrud E. S., Harboe T. Effect of increased pCO<sub>2</sub> level on early shell development in great scallop (*Pecten maximus* Lamarck) larvae // Biogeosciences. 2013. V. 10. pp. 6161–6184.
9. Arizza, V., Di Fazio, G., Celi, M., Parrinello, N., Vazzana, M.. Cadmium, Copper and Tributyltin effects on fertilization of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata) // Ital. J. Anim. Sci. 2009. V. 8. I. Supp. 2. pp. 839–841.
10. Armstrong D. A., Millemann R. E. Effects of the Insecticide Sevin and Its First Hydrolytic Product, 1-naphthol, on Some Early Developmental Stages of the Bay Mussel *Mytilus edulis* \* // 1974. V. 15. I. 3840. pp. 11–15.

11. ASTM. E724-98, Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs ASTM E724-98.: ASTM International, 2012a.
12. ASTM. E1563 - 98, Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos // Annual Book of ASTM Standards. : ASTM International, 2012b.
13. Baldwin B. S. Selective particle ingestion by oyster larvae (*Crassostrea virginica*) feeding on natural seston and cultured algae // Mar. Biol. 1995. V. 123. I 1. pp. 95–107.
14. Barnard, C., et al. Trophic position of zebra mussel veligers and their use of dissolved organic carbon // Limnol. Oceanogr. 2006. V. 51. I. 3. pp. 1473–1484.
15. Bayne B. L. The biology of mussel larvae // Mar. mussels their Ecol. Physiol. 1976. V. 10. pp. 81–120.
16. Beiras R., Albentosa M. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria // Aquaculture. 2004. V. 230. I. 1–4. pp. 205–213.
17. Beiras R., His E. Effects of dissolved mercury on embryogenesis survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1995. V. 126. pp. 185–189.
18. Bonaventura, R. et al. Development and validation of new analytical methods using sea urchin embryo bioassay to evaluate dredged marine sediments // J. Environ. Manage. 2021. V. 281. pp. 1-6.
19. Boukadida, K. et al. High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase // Mar. Environ. Res. 2016. V. 122. pp. 59–66.
20. Brenko M. H., Calabrese A. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis* // Mar. Biol. 1969. V. 4. I. 3. pp. 224–226.
21. Brenko M. H., Claus C., Bubic S. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Mar. Biol. 1977. V. 44. I. 2. pp. 109–115.
22. Bylenga C. H., Cummings V. J., Ryan K. G. High resolution microscopy reveals significant impacts of ocean acidification and warming on larval shell development in *Laternula elliptica* // PLoS One. 2017. V. 12. I. 4. pp. 1–13.

23. Calabrese A., Davis H. C. The pH Tolerance of Embryos and Larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* // *Biol. Bull.* 1966. V. 131. I. 3. pp. 427–436.
24. Calabrese A., Davis H. C. Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs // *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen.* 1970. V. 20. I. 1–4. pp. 553–564.
25. Carballeira, C. et al. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents // *Mar. Environ. Res.* 2012. V. 77. pp. 12–22.
26. Chiarelli R. et. al.. Toxic effects induced by vanadium on sea urchin embryos // *Chemosphere.* 2021. V. 274. pp. 129843.
27. Cognie B., Barillé L., Rincé Y. Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage // *Estuaries.* 2001. V. 24. I. 1. pp. 126–134.
28. Colas P., Dubé F. Meiotic maturation in mollusc oocytes // *Semin. Cell Dev. Biol.* 1998. V. 9. I 5. pp. 539–548.
29. Courtright R. C., Breese W. P., Krueger H. Formulation of a synthetic seawater for bioassays with *Mytilus edulis* embryos // *Water Res.* 1971. V. 5. pp. 877–888.
30. Cragg S. M. The adductor and retractor muscles of the veliger of *Pecten maximus* (L.) (Bivalvia) // *J. Molluscan Stud.* 1985. V. 51. pp. 276–283.
31. Cragg S. M. The ciliated rim of the velum of larvae of *Pecten maximus* (bivalvia: Pectinidae) // *J. Molluscan Stud.* 1989. V. 55. I 4. pp. 497–508.
32. Dyachuk V., Odintsova N. Development of the larval muscle system in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia): Original Article // *Dev. Growth Differ.* 2009. V. 51. I. 2. pp. 69–79.
33. Eyster L. S., Morse M. P. Early Shell Formation During Molluscan Embryogenesis , with New Studies on the Surf Clam , *Spisula solidissima* 1 // 1984. V. 882. pp. 871–882.
34. Fawcett T. An introduction to ROC analysis // *Pattern Recognit. Lett.* 2006. V. 27. I. 8. pp. 861–874.
35. Field I. A. Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis* // *Bull. Bur. Fish.* 1922. pp. 127–259.
36. Gazeau F. et al. Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification // *Geophys. Res. Lett.* 2007.

37. Gazeau F. et al. Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis* // *Biogeosciences*. 2010. V. 7. pp. 2051–2060.
38. Gazeau F. et al. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs // *Mar. Biol.* 2013. V. 160. № 8. pp. 2207–2245.
39. Giulia M. et. al. Carbonic Anhydrase and Heavy Metals // *Biochemistry*. 2012.
40. Granmo. Development and growth of eggs and larvae of *Mytilus edulis* exposed to a linear dodecylbenzenesulphonate LAS // *Mar. Biol.* 1972. V. 358. pp. 356–358.
41. Granmo A. et al. Effects of the planktonic flagellate *Chrysochromulina polylepis* Manton et Park on fertilization and early development of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.) and the blue mussel *Mytilus edulis* L. // *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 1988. V. 124. pp. 65–71.
42. Haruko Kurihara. Effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2008. V. 373. pp. 275–284.
43. Hattan S. J., Laue T. M., Chasteen N. D. Purification and Characterization of a Novel Calcium-binding Protein from the Extrapallial Fluid of the Mollusc, *Mytilus edulis* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. I. 6. pp. 4461–4468.
44. His E. et al. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies // *Water Res.* 1999. V. 33. I. 7. pp. 1706–1718.
45. His E., Beiras R., Seaman M. N. L. The Assessment of Marine Pollution-Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae. Seattle: University of Washington Press, 1999. 1–178 p.
46. His E., Seaman M. N. L., Beiras R. A simplification the Bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment // *Water Res.* 1997. V. 31. I. 2. pp. 351–355.
47. Honkoop P. J. C., Luttikhuisen P. C., Piersma T. Experimentally extending the spawning season of a marine bivalve using temperature change and fluoxetine as synergistic triggers // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999. V. 180. pp. 297–300.
48. Humphreys W. J. Initiation of shell formation in the bivalve, *Mytilus edulis* // *Proc. 27th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America (EMSA)*. , 1969. pp. 272–273.
49. Iwata K. S. Spawning of *Mytilus edulis*: discharge by KCL injection // *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 1951. V. 16. pp. 393–394.

50. Kakoi S. et al. Early Development of the Japanese Spiny Oyster (*Saccostrea kegaki*): Characterization of Some Genetic Markers // *Zoolog. Sci.* 2008. V. 25. pp. 455–464.
51. Kapsenberg L. et al.. Ocean pH fluctuations affect mussel larvae at key developmental transitions // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2018. V. 285: 20182381
52. Klöckner K., Rosenthal H., Willführ J. Invertebrate bioassays with North Sea water samples. I. Structural effects on embryos and larvae of serpulids, oysters and sea urchins Federal Republic of Germany // 2000. V. 19. I. 1985. pp. 1–19.
53. Kniprath E. *Roux's Archives of Developmental Biology* // 1980. V. 204. pp. 201–204.
54. Kniprath E. Ontogeny of the Molluscan Shell Field : a Review // *Zool. Scr.* 1981. V. 10. pp. 61–79.
55. Kobayashi N. Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Accuracy, II // *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 1985. V. 30. I. 4–6. pp. 213–226.
56. Kobayashi N. Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Sensitivity // *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 1990. V. 34. I. 4–6. pp. 225–237.
57. Kobayashi N., Okamura H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 1. Tracing the cause by the effects // *Chemosphere.* 2004. V. 55. I. 10. pp. 1403–1412.
58. Kobayashi N., Okamura H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 2. Interactive toxic effects of heavy metals in synthetic mine effluents // *Chemosphere.* 2005. V. 61. № 8. pp. 1198–1203.
59. Krassoi, R; Anderson, I; Everett D. Larval abnormalities in doughboy scallops *Chlamys (Mimachlamys) asperima* L. in response to test conditions and six reference toxicants // *Australas. J. Ecotoxicol.* ISSN 1323-3475. 1997. V. 3. I. 1. pp. 65–74.
60. Kurihara H. et al. Effects of elevated pCO<sub>2</sub> on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Aquat. Biol.* 2008. V. 4. pp. 225–233.
61. Kurihara H., Kato S., Ishimatsu A. Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas* // 2007. V. 1. pp. 91–98.
62. Leeper T. J. margins: Marginal Effects for Model Objects // 2021.

63. Lemos D., Jorge R. L. V., Phan V. N. Simultaneous measurements of oxygen consumption and ammonia-N excretion in embryos and larvae of marine invertebrates // *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 2003. V. 136. I. 2. pp. 321–328.
64. Leverett D., Thain J. Oyster embryo-larval bioassay ( revised ) // *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 2013. I 54.
65. Loosanoff V., Davis H. Rearing of bivalve mollusks // *Adv. Mar. Biol.* 1963. V. 1. pp. 1–136.
66. Manskikh V. N., Sheval E. V. An adaptation of Twort's method for polychromatic staining of epoxy-embedded semithin sections // *Histochem. Cell Biol.* 2020. V. 153. I. 2. pp. 121–127.
67. Martin M. et al. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae // *Mar. Pollut. Bull.* 1981. V. 12. I 9. pp. 305–308.
68. McCullagh P., Nelder J. Generalized linear models. Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC, 1989.
69. Medaković D. et al. X-ray diffraction study of the first larval shell of *Ostrea edulis* // *Mar. Biol.* 1989. V. 101. I. 2. pp. 205–209.
70. Medaković D. et al. X-ray diffraction study of calcification processes in embryos and larvae of the brooding oyster *Ostrea edulis* // *Mar. Biol.* 1997. V. 129. I 4. pp. 615–623.
71. Medaković D. Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L. // *Helgol. Mar. Res.* 2000. V. 54. I 1. pp. 1–6.
72. Meisenheimer J. Entwicklungsgeschichte von *Dreissensia polymorpha* Pall // *Zeitschrift für wissenschaftliche Zool.* 1901. V. 69. pp. 1–137.
73. Mendiburu F. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research* [Электронный ресурс]. URL: <https://cran.r-project.org/package=agricolae>.
74. Mollenhauer H. H. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy // *Stain Technol.* 1964. V. 39. pp. 111–114.
75. Moreira A. et al. Combined effects of arsenic, salinity and temperature on *Crassostrea gigas* embryotoxicity // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 147. pp. 251–259.
76. Morroni L. et al. Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2016. V. 123. pp. 2–7.

77. Morroni L. et al. Reversibility of trace metals effects on sea urchin embryonic development // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 148. pp. 923–929.
78. Nadella S. R. et al. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon // *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 2009. V. 149. pp. 340–348.
79. Odintsova N. A., Dyachuk V. A., Karpenko A. A. Development of the muscle system and contractile activity in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia) // *Russ. J. Dev. Biol.* 2007. V. 38. I. 3. pp. 190–196.
80. Peterson A. Finding Optimal Normalizing Transformations via bestNormalize // *R J.* 2021. T. 13. I. 1. pp. 310--329.
81. Pinsino A. et al. Sea urchin embryos as an in vivo model for the assessment of manganese toxicity: Developmental and stress response effects // *Ecotoxicology.* 2010. V. 19. I. 3. pp. 555–562.
82. R Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing.* Vienna, Austria: , 2022.
83. Resgalla C. Spawning and multiple endpoints of the embryo-larval bioassay of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) // *Ecotoxicology.* 2016. V. 25. I. 8. pp. 1609–1616.
84. Ritz C. et al. Dose-response analysis using R // *PLoS One.* 2015. V. 10. I. 12. pp. 1–13.
85. Robin X. et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves // *BMC Bioinformatics.* 2011. V. 8. pp. 12–77.
86. Saidov D. M., Kosevich I. A. Effect of Heavy Metals (Cu, Co, Cd) on the Early Development of *Mytilus edulis* (Mollusca; Bivalvia) // *Russ. J. Ecol.* 2019. V. 50. I. 1. pp. 58–64.
87. Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. I. 7. pp. 676–682.
88. Sung C.-G., Kim G.-B., Lee C.-H. Effect of Heavy Metals on Embryonic Development in the Mussel, *Mytilus galloprovincialis* // *Korean J. Malacol.* 2006. V. 22. I. 2. pp. 167–173.
89. Swalingam P. Aquaculture of the green mussel, *Mytilus viridis* Linnaeus, in Malaysia// *Aquaculture.* 1977. V. 11. pp. 297-312.

90. Szalaj D. et al. The effects of ocean acidification and a carbon dioxide capture and storage leak on the early life stages of the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) and metal bioavailability // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. V. 24. I. 1. pp. 765–781.
91. Thain J. E. Biological effects of contaminants: Oyster (*Crassostrea gigas*) embryo bioassay // *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 1991. V. 11. I 11. pp. 1–12.
92. USEPA. OCSPP 850.1055: Bivalve Acute Toxicity Test (Embryo-Larval). , 2016. 18 p.
93. Venables W. N., Ripley B. D. *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer-Verlag, 2002. var. 4. 501 p.
94. Voronezhskaya E. E. et al. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // *Zoomorphology*. 2008. V. 127. I. 2. pp. 97–110.
95. Wai H. W., Levinton J. S. Culture of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) fed both phytoplankton and zooplankton: A microcosm experiment // *Aquac. Res.* 2004. V. 35. I. 10. pp. 965–969.
96. Waldbusser G. G. et al. Ocean acidification has multiple modes of action on bivalve larvae // *PLoS One*. 2015. V. 10. I 6.
97. Waller T. R. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné // *Smithson. Contrib. to Zool.* 1981. I. 328. pp. 1–70.
98. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. : Springer-Verlag New York, 2016.
99. Xie J. et al. Combined toxicity of cadmium and lead on early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. , 2017. 210–220 p.
100. Yin Y. et al.. Structural Characterization of the Major Extrapallial Fluid Protein of the Mollusc *Mytilus edulis* : Implications for Function † // 2005. V. 44. pp. 10720–10731.

## Приложение

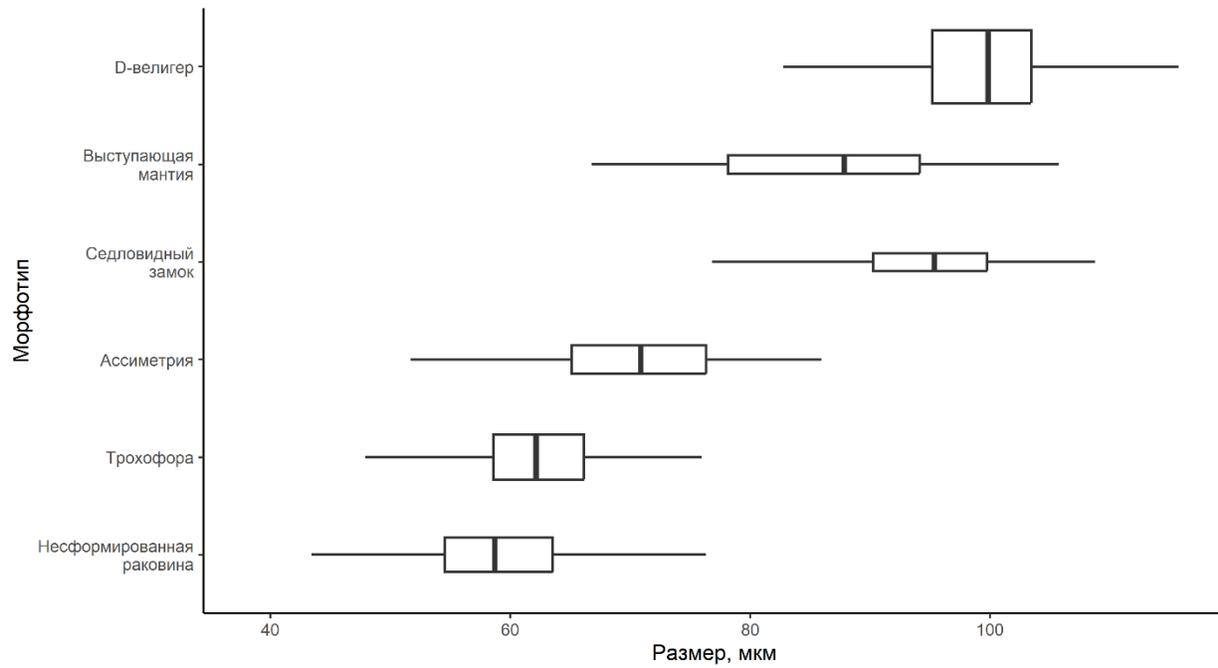


Рисунок П1. Размерные характеристики морфотипов личинок *Mytilus edulis*, полученных в экспериментах по воздействию ряда концентраций ряда концентраций  $K_2Cr_2O_7$ , и последующей отмывки продолжительностью 24 и 48 часов.

Таблица П1. Средние доли личиночных морфотипов, обнаруженных во время проведения как предварительного и основного экспериментов, полученные при различных комбинациях исходной концентрации токсиканта и продолжительности отмывки.

Конц. K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Прод. отмывки	D	PM	CH	A	T	ISH
0 мг/л	-	98.25± 4.79%	1.75± 4.26%	-	-	-	-
0 мг/л	24 ч	95.91± 5.95%	4.09± 6.22%	-	-	-	-
0 мг/л	48 ч	94.25± 7.36%	4.77± 6.82%	-	-	-	-
10 мг/л	-	69.4± 14.51%	-	-	21.11± 12.85%	6.68± 8.27%	-
10 мг/л	24 ч	90.58± 6.93%	2.81± 3.92%	5.98± 5.34%	-	-	-
10 мг/л	48 ч	95.05± 6.74%	-	4.95± 6.74%	-	-	-
20 мг/л	-	4.44± 10.64%	2.22± 7.61%	-	77.9± 16.49%	15.43± 14.35%	-
20 мг/л	24 ч	66± 13.92%	13.56± 9.73%	17.1± 11.06%	2.5± 4.94%	-	-
20 мг/л	48 ч	81.64± 12.56%	9.98± 9.73%	5.04± 6.56%	2.67± 4.56%	-	-
30 мг/л	-	4.76± 16.1%	-	-	8.27± 11.61%	85.93± 13.73%	-
30 мг/л	24 ч	8.81± 13.75%	2.38± 8.15%	-	22.86± 18.04%	32.57± 19.76%	31± 19.87%
30 мг/л	48 ч	18.86± 15.86%	7.68± 12.73%	-	7.02± 9.57%	22.81± 15.72%	43.64± 19.09%
40 мг/л	-	-	-	-	-	99.22± 3.63%	-
40 мг/л	24 ч	-	3.03± 10.34%	-	20.64± 18.57%	12.85± 15.35%	63.48± 22.09%
40 мг/л	48 ч	-	-	-	13.33± 17.55%	19.44± 21.54%	62.78± 24.69%
50 мг/л	-	-	-	-	5.59± 9.8%	92.18± 10.21%	-
50 мг/л	24 ч	-	-	-	-	63.54± 21.52%	33.68± 21.14%
50 мг/л	48 ч	-	-	-	-	30.76± 19.25%	67.28± 19.16%

Таблица П2. Средние размеры личиночных морфотипов (в мкм), обнаруженных во время проведения как предварительного и основного экспериментов, полученные при различных комбинациях исходной концентрации токсиканта и продолжительности отмывки.

Конц. K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Прод. отмывки	D	PM	CH	A	T	ISH
0 мг/л	-	95.52± 0.86	-	-	-	-	-
0 мг/л	24 ч	103.72± 0.69	98.11± 5.63	-	-	-	-
0 мг/л	48 ч	105.26± 0.6	99.68± 5.95	-	-	-	-
10 мг/л	-	88.02± 0.81	-	-	77.54± 2.33	60.01± 3.66	-
10 мг/л	24 ч	99.99± 0.48	89.79± 8.01	101.96±2.93	-	-	-
10 мг/л	48 ч	101.43± 0.65	-	100.4±2.51	-	-	-
20 мг/л	-	89.49± 13.52	-	-	68.49± 1.92	58.1± 3.95	-
20 мг/л	24 ч	93.22± 1.37	82.83± 3.83	94.5±1.91	73.89± 20.46	-	-
20 мг/л	48 ч	95.9± 1.48	83.75± 5.3	94.47±4.01	58.71± 12.04	-	-
30 мг/л	-	101.7± 4.51	-	-	68.85± 3.18	60.9± 1.14	-
30 мг/л	24 ч	88.33± 6.58	-	-	67.61± 2.76	65.33± 2.59	60.93± 2.76
30 мг/л	48 ч	-	79.23± 14.48	-	70.25± 5.59	64.89± 3.82	54.57± 2.27
40 мг/л	-	-	-	-	-	61.4± 1.47	-
40 мг/л	24 ч	-	-	-	74.61± 2.41	62.51± 3.29	61.24± 1.69
40 мг/л	48 ч	-	-	-	77.77± 3.4	68.18± 4.21	59.5± 2.25
50 мг/л	-	-	-	-	72.68± 8.14	61.82± 1.16	-
50 мг/л	24 ч	-	-	-	-	66.14± 2.01	61.42± 2.04
50 мг/л	48 ч	-	-	-	-	62.06± 4.73	57.63± 1.88

Таблица ПЗ. Общая выживаемость личинок *Mytilus edulis* после воздействия ряда концентраций  $K_2Cr_2O_7$ , и последующей отмывки продолжительностью 24 и 48 часов. Данные представлены в виде несмещенной доли выживших особей, так и с проведенной коррекцией Аббота. Средние доли представлены с указанием 95% доверительных интервалов.

Конц. $K_2Cr_2O_7$	Прод. отмывки	Выживаемость	Выживаемость с поправкой по Абботу	LC <sub>50</sub>
Контроль	24 часа	96.25±10.24%	-	43.93±8.12 мг/л
10 мг/л		96.25±6.97%	98.38±5.16%	
20 мг/л		87.92±13.06%	91.34±13.57%	
30 мг/л		59.25±15.44%	61.56±16.04%	
40 мг/л		54.25±25.59%	56.37±26.59%	
50 мг/л		47.67±28.76%	49.52±29.88%	
Контроль	48 часов	90±11.02%	-	35.47±6.64 мг/л
10 мг/л		93.5±7.06%	100±0%	
20 мг/л		89±18.47%	93.89±11.32%	
30 мг/л		47.5±32.29%	52.78±35.87%	
40 мг/л		33.5±16.51%	37.22±18.34%	
50 мг/л		50±17.43%	55.56±19.36%	

Таблица П4. Параметры модели логарифма отношения накопленных шансов (кумулятивного логита) для оценки вероятностей обнаружения в эксперименте по оценке воздействия ряда концентраций  $K_2Cr_2O_7$  при следующей градации морфотипов (D>PM>CH>A>T/ISH)

	Значение	ст. откл.	t-критерий
Коэффициенты			
Концентрация	-0.2622	0.01839	14.26
Св. член			
ISH T	-22.7085	12.8941	-1.7612
T A	-6.3281	0.4492	-14.0876
A CH	-3.5394	0.2943	-12.0261
CH PM	-3.4199	0.2888	-11.8425
PM D	-3.2722	0.282	-11.6029