

УДК 574.587+574.24+57.084.1

ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ РЕФЕРЕНТНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРЕСНОВОДНЫХ РАКОВ (Decapoda, Astacidae)

© 2023 г. Т. В. Кузнецова^а, *, В. А. Любимцев^а, С. В. Сладкова^а, С. В. Холодкевич^а

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

*e-mail: kuznetsova_tv@bk.ru

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 16.12.2022 г.

Предложены подходы и методы формирования референтных групп раков на основе мониторинга их кардиоритма в покое и при кратковременных стандартизированных нагрузочных тестах, позволяющих оценить функциональное состояние раков и их адаптационные возможности на примере речных раков *Pontastacus leptodactylus* Esch. Функциональные показатели объективно отражают состояние здоровья организма и могут служить эффективными вспомогательными критериями при определении качества окружающей среды. Однако значительная вариабельность физиологических и биохимических показателей у беспозвоночных животных, в частности у ракообразных, осложняет их использование в качестве биоиндикаторов. Описанные методы помогут преодолеть эти ограничения и повысить определенность в оценке биологических эффектов токсикантов.

Ключевые слова: речные раки *Pontastacus leptodactylus*, методы отбора животных, функциональные показатели, неинвазивная регистрация кардиоактивности, функциональные нагрузочные тесты, раки как биосенсоры, диагностика загрязнения окружающей среды

DOI: 10.31857/S0320965223050078, EDN: RZOFOL

ВВЕДЕНИЕ

В экологических исследованиях по оценке состояния водной среды или биологических эффектов конкретных загрязнителей часто используют стандартные тесты на токсичность с широко культивируемыми видами ракообразных (*Daphnia magna* (Straus), *D. pulex* (Leydig), *Ceriodaphnia* spp. и др.). Такие тесты имеют высокую воспроизводимость и приемлемость в экологических исследованиях. Однако остаются вопросы о значимости полученных результатов для оценки экологического состояния конкретной экосистемы, подверженной загрязнению (Gerhardt, 2000; Reynolds, Souty-Grosset, 2011). В последние десятилетия расширилось использование местных видов беспозвоночных, особенно ракообразных, собранных в полевых условиях и используемых в качестве биоиндикаторов экологического состояния среды их обитания (Березина и др., 2016; Kozák, Kuklina, 2016), в том числе в системах on-line мо-

нитинга качества воды (Kholodkevich et al., 2021; Kuklina et al., 2013). Однако часто исследователи сталкиваются со значительной вариабельностью получаемых показателей (Handy, Depledge, 1999), что может быть связано с различным функциональным состоянием животных и с особенностями биоценозов, в которых они обитают.

К настоящему времени наблюдается дефицит данных о физиологической норме для ключевых видов гидробионтов изучаемых водных экосистем. Показано, что на биохимические показатели для Decapoda, Astacidae значительное влияние оказывают сезонные процессы. Известно, что содержание глюкозы и липидов в гемолимфе раков сильно изменяется по сезонам года (в 2–3 раза), и еще сильнее зависит от условий питания раков в естественной среде или при экспериментальных исследованиях в условиях искусственного кормления (Dutra et al., 2008). Ранее нами обнаружено, что концентрация белка в гемолимфе раков *Pontastacus leptodactylus* варьирует в широких пределах (12–95 мг/мл) и зависит от времени года и фазы жизненного цикла (Kuznetsova et al., 2010).

Характерен также значительный диапазон сезонных флуктуаций в активности различных фер-

Сокращения: СКО – среднеквадратичное отклонение; ЧСС – частота сердечных сокращений, ЧССд – то же в дневной период, ЧССн – в ночной период, ЧССп – в покое, ЧССр – в реакции на соль, ЧССт – максимальная частота сердечных сокращений в тесте с подвесом.

ментов, в том числе и используемых в качестве показателей оксидативного стресса, рекомендованных как чувствительные показатели токсичности природных вод (Nies et al., 1991). Условия окружающей среды (например, температура воды, доступность пищи, содержание кислорода в воде), а также фазы жизненного цикла оказались основными факторами, влияющими на сезонные закономерности изменения энергетического обмена, модифицирующими сезонные вариации метаболического паттерна (Dutra et al., 2008).

Особенность жизненного цикла ракообразных – наличие линек. Линька – доминирующий процесс в течение всей их жизни, прямо или косвенно влияющий на обмен, поведение, размножение и сенсорное восприятие (Passano, 1960), и, как следствие, на их кардиоактивность (Сладкова и др., 2017). В эти периоды наблюдаются значительные вариации перечисленных выше показателей. Анализ приведенных в литературе данных, касающихся активности ферментов в период линек, показывает, что без учета этого цикла даже средние значения для группы раков могут изменяться в 2–4 раза (Nies et al., 1991).

В общепринятой процедуре отбора раков для исследований предложены стандартные методы, включающие отбор тест-организмов: одного вида; одного пола; одного или близких размерно-возрастного состава и массы; имеющих сходные морфометрические характеристики; без внешних повреждений; реже – животных одной генетической линии (для уменьшения вклада индивидуальных различий функционального состояния у исследуемой и контрольной групп животных). Однако даже при выполнении всех этих требований к отбору животных, функциональные показатели у разных экземпляров речных раков могут различаться на 40% (Kuznetsova et al., 2010).

Цель настоящей работы – опробировать методические подходы к определению функционального состояния раков *Pontastacus leptodactylus* на основе неинвазивной регистрации их кардиоритма в фоне и при функциональных нагрузочных тестах, позволяющих отобрать референтные группы раков с близкими показателями работы их основных физиологических систем, и, таким образом, выявить границы референтных значений функциональных и некоторых биохимических показателей, которые могут служить “стандартом”. Это позволит снизить вариабельность получаемых результатов и способствовать устранению неопределенности в оценке эффектов загрязнения при проведении исследований различными методами и подходами с использованием речных раков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали самцов речных раков *P. leptodactylus* Esch. из природных популяций р. Волга (около г. Самара) близких по размерно-массовым характеристикам: масса особи 27–32 г, длина от конца рострума до конца тельсона 105–110 мм. Эксперименты проводили в лаборатории при температуре 18–20°C и фоторежиме 12 ч свет : 12 ч темнота.

Общий белок в гемолимфе раков анализировали по методу Лоури. Забор гемолимфы и методика измерения белка приведены в работе (Kuznetsova et al., 2010).

Отобранным животным приклеивали на карапакс миниатюрный держатель для волоконно-оптического датчика, необходимого для регистрации кардиоактивности, и по одному экземпляру помещали в аквариумы, в которых обеспечивали циркуляцию воды на постоянном уровне с помощью помпы, находящейся в специальной резервной емкости.

Неинвазивную регистрацию кардиоактивности раков проводили непрерывно с помощью измерительной оптоволоконной системы (рис. 1), разработанной в Научно-исследовательском центре экологической безопасности РАН и позднее усовершенствованной (Kholodkevich et al., 2021). Система “БиоАргус” метрологически аттестована на тип.¹

Для усовершенствования процедуры отбора однородных (референтных) по функциональным характеристикам групп раков в работе применяли несколько функциональных нагрузочных тестов. В качестве нагрузок использовали следующие воздействия: для механического (хэндлинг), осмотического (изменение солености среды до 20 г/л NaCl) и теста с трехминутным подвешиванием рака в толще воды без возможности опоры конечностями на субстрат. Также применяли тесты с непродолжительной экспозицией раков на воздухе.

Процедуру тестирования (“подвес”) проводили следующим образом: непосредственно за оптический зонд рака осторожно извлекали из убежища и подвешивали на 3 мин за волокно в воде на 5 см выше дна, после этого опускали. Во всех случаях ЧСС у раков определяли как максимальное за первые 10 мин с момента подвеса.

В тестах с изменением солености воды обеспечивали одинаковую конечную концентрации соли по всему объему аквариума – 20 г/л (реже 30 г/л), достигаемую в результате быстрой подачи маточного раствора NaCl течение 1 мин при постоянном перемешивании воды с помощью аэратора. Такие высокие концентрации соли выбраны на-

¹ Приказ Росстандарта № 2702 от 27.10.2022 г. об утверждении типов средств измерений.

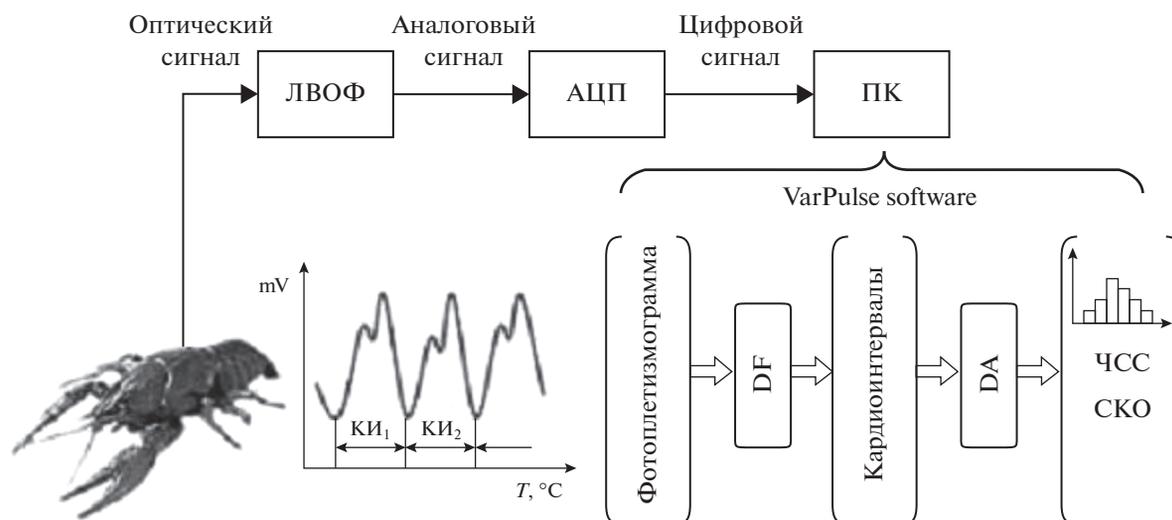


Рис. 1. Блок-схема установки по регистрации кардиоритма раков и основные этапы обработки сигналов. Основные этапы математической обработки выборки кардиоинтервалов (обычно ≥ 100) для получения характеристик вариационной пульсометрии. АЦП – аналого-цифровой преобразователь; КИ₁, КИ₂ – последовательные кардиоинтервалы; ЛВОФ – лазерный волоконно-оптический фотоплетизмограф; ПК – персональный компьютер; СКО – среднее квадратичное отклонение; DA – цифровой анализ; DF – цифровая фильтрация; mV – милливольт; T – длительность, с; VarPulse – оригинальная программа обработки кардиосигналов.

ми в соответствии с данными (Holdich et al., 1997) о возможности адаптации этого вида рака к высокой солености среды. Тест с изменением солености применяется нами для двустворчатых моллюсков (Холодкевич и др., 2021).

Для изучения изменения ЧСС при экспозиции рака на воздухе и минимизирования стресса, связанного с хэндлингом (при переносе рака из воды на воздух и обратно), его предварительно помещали в небольшой пластиковый бокс с отверстиями. Для повышения интенсивности метаболизма измерение динамики ЧСС у рака на воздухе проводили при температуре 24–25°C после предварительной температурной акклимации раков в воде. Продолжительность измерений на воздухе достигала 30–60 мин. Похожий прием для оценки максимальных значений аэробного энергообмена крабов *Carcinus maenas* (L.), применяли в работе (Rovero et al., 2000).

Для моделирования ухудшения функционального состояния раков в лабораторных условиях использовали длительное (30 сут) воздействие на них ионов меди в концентрации 1 мг/л.

В работе представлены результаты исследований, полученные в течение ряда лет, на группах животных (от 6 до 14 особей) для каждого из типов воздействий (общее количество особей – >100). Все данные анализировали с помощью программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., USA) и GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software, USA). Применяли *t*-критерий Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатель общего белка в гемолимфе ракообразных – один из основных индикаторов функционального состояния животных и его адаптивного потенциала (Depledge, Aagard, 2000), поэтому на предварительном этапе проводили определение общего белка в гемолимфе раков. Эта величина варьировала в достаточно широких пределах – от 20 до 90 мг/мл.

На первом этапе исследования выявлена различная динамика ЧСС в начальный период акклимации животных к лабораторным условиям, обозначенная на рис. 2 разными линиями. Зарегистрированы характерные этапы процесса адаптации: связанное со стрессом поддержание на неизменном уровне ЧСС в течение первых 12–24 ч предельно возможных при данной температуре воды значений (ЧСС_{ст}) для каждого из раков; уменьшение в течение последующих 1–2 сут ЧСС от этого максимального значения до регистрируемых в “дневной” период минимальных значений ЧСС_п, сопровождаемых также обратимым увеличением ЧСС в “ночной” период. При этом наблюдали изменения значений ЧСС_п от суток к суткам у одного и того же экземпляра, а также различия значений ЧСС_п для разных экземпляров, получаемых после определения ЧСС_п для нескольких суток подряд.

Показанные на рис. 3 значения ЧСС_п и ЧСС_{ст} в дальнейшем использовали в качестве индикативных показателей изменения функционального состояния *P. leptodactylus*. Эти данные учитывали при лабораторном моделировании хрониче-

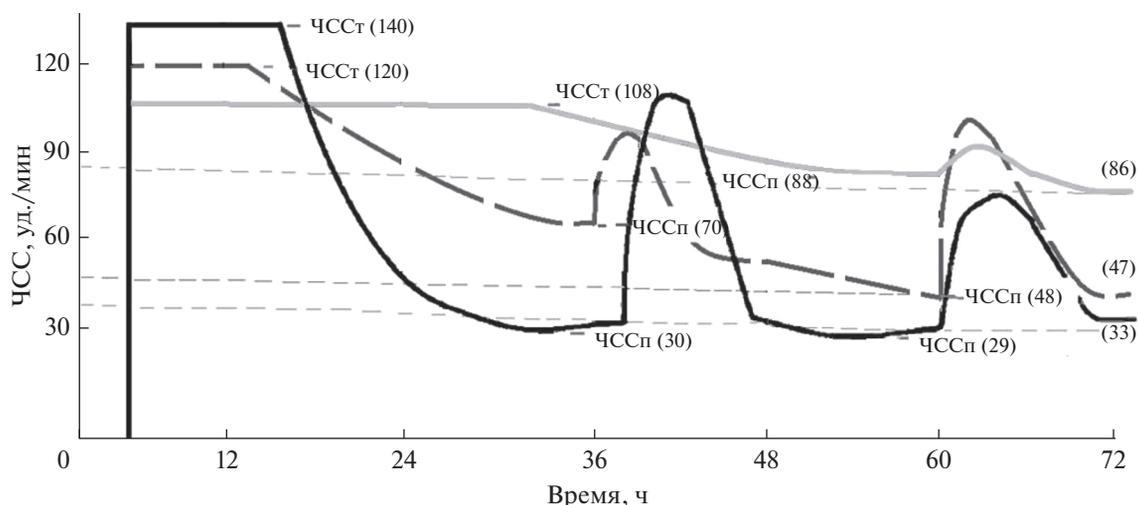


Рис. 2. Примеры трендов изменения ЧСС, характерные для раков *P. leptodactylus* в течение первых 3 сут их адаптации к лабораторным условиям содержания (вода, температура 18–20°C, освещение 12 ч свет : 12 ч темнота) после прикрепления волоконно-оптического кабеля к карапаку рака. По оси абсцисс: светлое время суток – светлая полоса, ночное – черная полоса. Пунктирные линии – асимптоты для ЧСС в тесте с подвесом – ЧССт и для ЧСС в покое – ЧССп.

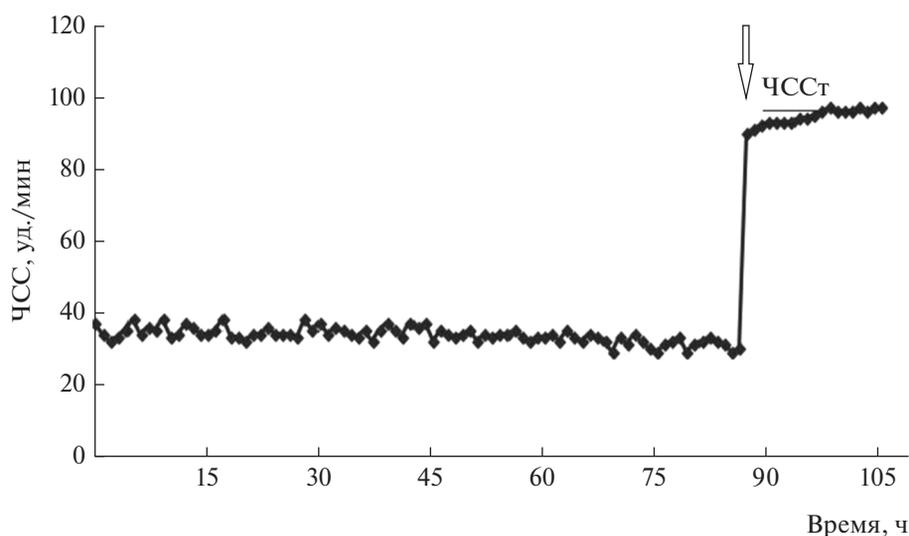


Рис. 3. Пример динамики ЧСС рака *P. leptodactylus* в тесте на подвес в течение 3 мин в толще воды. Здесь и на рис. 4 стрелкой указано начало воздействия.

ского действия ионов меди на группу раков ($n = 6$) на 2-е сутки эксперимента, т.е. после стабилизации величины ЧССп (табл. 1).

Анализ средних значений ЧССп и ЧССт раков в течение 22 сут воздействия 1 мг/л ионов меди (табл. 2) показал, что диапазон флуктуации ЧССп от суток к суткам в относительных единицах (26%) выше, чем для ЧССт (5%), как для “здорового” рака № 2, так и для “ослабленного” рака № 1. При этом всегда выполнялось условие ЧССт \geq 2 ЧССп, отмеченное нами ранее (Kuznetsova et al., 2010).

Значительные изменения ЧСС (повышение ЧССп и понижение ЧССт в конце наблюдаемого периода (табл. 2)) были выявлены только для рака № 1, который умер через двое суток после эксперимента.

Таким образом, на основании динамики кардиоритма в ходе длительной экспозиции раков в меди только рак № 1 был выделен как “ослабленный”, остальные 5 – “здоровые”.

При длительном воздействии (4 мес) на раков биологически очищенных бытовых сточных вод (Водоканал г. Санкт-Петербург) получено, что

ЧСС достоверно (t -критерий Стьюдента равен 4.07, $p < 0.05$) уменьшается – 91 ± 2 уд./мин вместо начальных 113 ± 5 уд./мин.

При использовании в качестве стрессового фактора изменения солености при быстрой подаче NaCl в воду аквариума до конечной концентрации 30 г/л с экспозицией 30 мин установлено, что максимальные значения ЧСС при изменении солености достигали значений ЧСС для этих же экземпляров раков (с точностью до 7%).

При воздействии NaCl в меньшей концентрации (20 г/л) характер ЧСС иной (рис. 4). У группы раков *P. leptodactylus* с близкими значениями ЧСС в состоянии покоя удалось зарегистрировать достоверное увеличение величины ЧСС, синхронное с моментом внесения соли с запаздыванием реакции в пределах 2 мин (ЧССр). Наблюдаемое при этом среднее по группе значение ЧСС до воздействия (30 ± 2 уд./мин), очень близкое к значению ЧСС для данной температуры, указывает на то, что все раки находились в состоянии покоя. Увеличение при этом ЧСС до 50 уд./мин в течение первых 2 мин воздействия и возврат ЧСС через 20 мин к исходному уровню (32 ± 2 уд./мин) согласуется с сенсорным характером реакции. Изменение ЧСС раков в ответ на быстрое (в течение 1 мин) повышение концентрации NaCl до 20 г/л может быть использовано в качестве теста на порог проявления сенсорной реакции.

Проведено тестирование раков с использованием предложенных выше показателей кардиоактивности (ЧССп, ЧССт, ЧССр), а также ЧССн и ЧССд. Поскольку система регистрации кардиоактивности рака “БиоАргус” позволяет одновременно регистрировать сердечный ритм только семи животных, то раков разделяли на четыре группы по семь раков в каждой (табл. 3).

Анализ изученных раков показал, что только у 50% особей выполняются все три критерия. Такая большая вариабельность согласуется, например, с ранее отмеченной 40%-ной вариабельностью функциональных показателей раков (Kuznetsova et al., 2010).

Другим видом функциональной нагрузки, предлагаемой нами для проведения отбора раков с различными функциональными возможностями, может быть гипоксия, возникающая у них при дыхании на воздухе, при котором снижается скорость поступления кислорода через жабры, по сравнению с дыханием в воде (Taylor, Wheatly, 1981). Такое воздействие в конечном итоге приводит к понижению ЧСС, как и в случае снижения концентрации кислорода в воде.

При температуре воды 25°C различия в динамике ЧСС раков с разными адаптивными способностями отчетливо видны (рис. 5). Сравнение динамики понижения ЧСС в течение такой экспозиции показывает, что у раков № 2 и 3 наблюдается

Таблица 1. Индивидуальные значения ЧССп и ЧССт для группы раков в начале эксперимента

Показатель	Номер особи						Среднее	СКО
	1	2	3	4	5	6		
ЧССп	42	36	28	28	31	30	32	5
ЧССт	105	110	87	90	92	90	95	9
ΔЧСС	63	74	59	62	61	60	63	5

Примечание. ΔЧСС = ЧССт – ЧССп, СКО – среднеквадратичное отклонение.

Таблица 2. Изменения ЧССп и ЧССт в ходе 22 суток экспозиции раков *Pontastacus leptodactylus* с различными адаптивными возможностями (рак № 1 и № 2) в воде с содержанием 1 мг/л ионов меди

Показатель	Время эксперимента, сут							
	1	2	19	20	21	22	Среднее	СКО
№ 1*								
ЧССп	51	42	37	48	51	59	48	7
ЧССт	110	105	60	55	57	63	75	25
ΔЧСС	59	63	23	7	6	4	27	37
№ 2								
ЧССп	37	36	36	33	38	43	37	3
ЧССт	110	110	104	101	99	100	104	5
ΔЧСС	73	74	68	68	61	57	67	6

Примечание. Рак № 1 умер на 24-е сут опыта; ΔЧСС = ЧССт – ЧССп, СКО – среднеквадратичное отклонение.

стабилизация ЧСС после 25–30 мин пребывания на воздухе, а у рака № 1 – непрерывное понижение ЧСС в течение всей экспозиции. При этом максимальные значения ЧСС после возврата раков № 3 (130 уд./мин) и № 2 (160 уд./мин) в воду

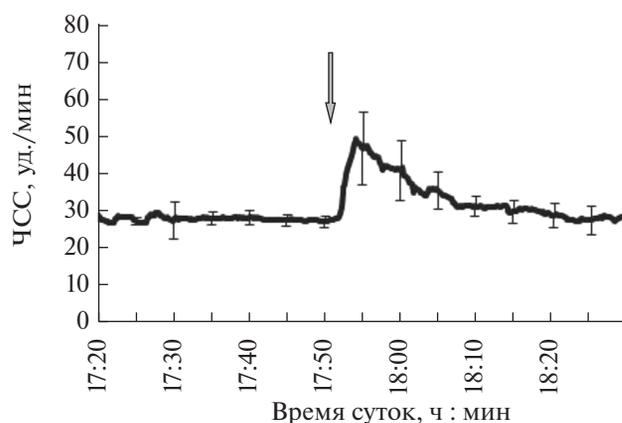


Рис. 4. Изменение ЧСС *P. leptodactylus* в состоянии покоя и после внесения 20 г/л NaCl для группы ($n = 6$) раков.

Таблица 3. Результаты тестирования раков *Pontastacus leptodactylus* на основе показателей ЧСС

№ особи	Суточный ритм ЧСС и ЧСС при тест-нагрузках		
	ЧСС _н ≥ ≥ 1.5 ЧСС _д	ЧСС _т ≥ ≥ 2 ЧСС _п	ЧСС _р ≥ ≥ 1.3 ЧСС _п
Группа I			
1	+	+	–
2	–	–	–
3	–	–	–
4	–	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
Группа II			
1	+	+	+
2	–	–	+
3	+	+	+
4	–	–	–
5	–	–	+
6	+	+	+
7	–	+	–
Группа III			
1	+	+	+
2	+	+	–
3	+	+	+
4	+	+	+
5	–	+	+
6	+	+	+
7	+	+	–
Группа IV			
1	+	+	+
2	–	+	–
3	+	+	–
4	–	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+

Примечание. Критерии отбора раков: ЧСС_н ≥ 1.5 ЧСС_д – суточный ритм; ЧСС_т ≥ 2 ЧСС_п – реакция на подвес в толще воды; ЧСС_р ≥ 1.3 ЧСС_п – реакция на увеличение солёности воды (20 г/л); “+” – выполняется; “–” – не выполняется. Группы I–IV выделены для удобства тестирования.

соответствуют диапазону ЧСС_т при 25°C. У рака № 1 такого подъема не наблюдали, хотя до начала экспозиции рака на воздухе его ЧСС_п была высокой (120 уд./мин). Различия ЧСС до начала экспозиции у рака № 3 (60–65 уд./мин) и № 2 (140–160 уд./мин) связаны с тем, что за 40 мин находясь

в боксе рак № 3 смог снизить ЧСС до уровня, близкого к значению ЧСС_п при данной температуре, а рак № 2 был в состоянии стресса.

Проведенные нагрузочные тесты активируют различные функциональные системы организма животных и приводят к изменениям в хронотропных характеристиках работы кардиосистемы как интегрирующей системы. Однако за счет кратковременного характера воздействий они не вызывают значительных сдвигов функционального состояния раков, и, следовательно, могут применяться неоднократно (например, через сутки) для контроля состояния животного.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время активно обсуждаются проблемы определения физиологической нормы для различных беспозвоночных и, в частности, ракообразных, активно используемых в мониторинге состояния окружающей среды. Так, Аджиев и др. (2018) отмечают, что при контроле здоровья раков в аквакультурных хозяйствах и использовании их как биоиндикаторов состояния природных водоемов, необходимо учитывать количественный и качественный состав клеточных элементов гемолимфы, реологические характеристики и биохимические показатели гемолимфы, такие как аспартаминотрансфераза, щелочная фосфатаза и др. Эти авторы приводят конкретные границы референтных значений перечисленных показателей, которые предлагают использовать в качестве “стандарта”.

Однако при решении задачи отбора раков для последующего использования в токсикологических исследованиях или в качестве биоиндикаторов в составе биоэлектронных систем обнаружения биологически значимых изменений качества водной среды необходимы неинвазивные методы, пригодные для оценки функционального состояния конкретных экземпляров животных. Предложенные виды тест-воздействий (кратковременный подвес в воде; реакция на кратковременное воздействие высокой (30 г/л) и промежуточной (20 г/л) концентраций NaCl; кратковременное (30–60 мин) нарушение режима дыхания, вызванного пребыванием рака на воздухе) показали значимые количественные различия у отдельных раков, уже прошедших предварительный отбор на основе стандартных методов. В то же время, отобранная группа раков, демонстрирующая однородную реакцию по этим тест-воздействиям, позволяет использовать такое воздействие в качестве критерия при анализе результатов экотоксикологических экспериментов. Кроме того, непродолжительное время тест-воздействий приводит к качественно однотипной реакции у всех протестированных раков: уже через 1 сут фоновые характеристики (ЧСС_п) и “мобилиза-

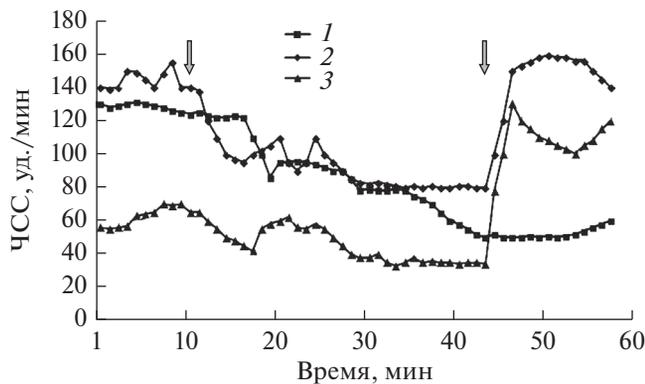


Рис. 5. Качественные различия динамики ЧСС раков с различным функциональным состоянием до начала экспозиции на воздухе (первая стрелка) и после возвращения в воду по окончании 35-минутной экспозиции (вторая стрелка) в условиях повышенной температуры воды (+25°C). 1–3 – номера раков.

ционные” возможности (ЧССт), определяемые в тесте, возвращаются к исходным значениям.

Тест с повышением солёности воды для раков *P. leptodactylus* относится к стрессовым, но обратимым воздействием, поскольку имеются сведения (Holdich et al., 1997), что длиннопалые речные раки способны выживать в морской воде солёностью до 21‰ в течение длительного времени. При этом возможность повторения такого теста через сутки очевидна, поскольку значение ЧСС возвращалось к ЧССп уже к моменту окончания воздействия этой концентрации соли.

Таким образом, предлагается проводить отбор животных (раков) по приведенной ниже схеме (рис. 6), учитывающий традиционные методы от-

бора (в том числе, показателя общего белка в гемолимфе раков) и предложенные авторами статьи новые методические подходы, основанные на использовании неинвазивного (оптического) метода измерения ЧСС и оценки текущего функционального состояния каждого рака на основе фоновых характеристик (ЧССп), а также изменений ЧСС в ходе функциональных нагрузок различной модальности. Последнее характеризует адаптивные возможности организма, т.е. меру его “здоровья”. Указанные выше конкретные условия использования таких нагрузок (концентрация соли, время действия и температура воды в условиях теста) подобраны нами с учетом особенностей раков *P. leptodactylus*. Исследования по предложенной в данной работе схеме могут быть в будущем рекомендованы для проведения исследований на других видах животных.

Такой отбор позволит значительно снизить вариабельность показателей и отбирать животных с близким функциональным состоянием и адаптивными возможностями организма по показателям работы сердечно-сосудистой системы и биохимическим показателям.

Выводы. На примере *P. leptodactylus* предложены конкретные приемы, отработаны различные модальности интенсивности и длительности воздействий (гипоксическое, осмотическое, хэндлинг и подвес рака в толще воды), определены конкретные показатели кардиоактивности, регистрируемой неинвазивным методом. Это позволило оценить функциональное состояние раков и выделить референтные группы раков с близкими функциональными показателями для дальнейшего проведения на них экологических наблюдений, а также для токсикологических эксперимен-

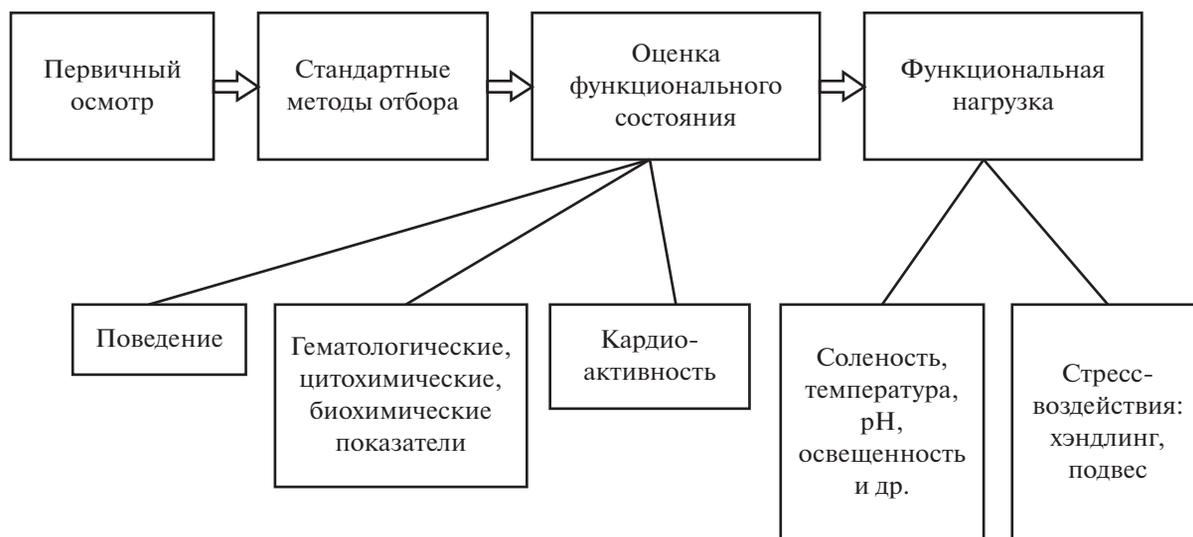


Рис. 6. Схема этапов отбора референтной группы животных, учитывающая традиционные методы и предложенные авторами статьи подходы.

тов. Отбор референтных групп раков позволит снизить вариабельность результатов исследований и способствовать более точной оценке биологических эффектов загрязнения при применении различных методов исследования, а также будет полезен при отборе здоровых животных для использования их в качестве биосенсоров в автоматизированных системах мониторинга острой токсичности качества природной и очищенной сточной воды – “БиоАргус”. Определение референтных значений интегральных показателей “здоровья” организмов-биоиндикаторов имеет принципиальное значение для установления региональных нормативов концентраций загрязняющих веществ различной природы или их смесей и для сравнительных оценок биологических эффектов загрязнения водоемов и водотоков при использовании аборигенных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания тема № АААА-А19-119020190122-6 “Научные основы оценки здоровья экосистем Северо-Запада России и предупреждения угроз экологической безопасности”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аджиев Д.Д., Пронина Г.И., Иванов А.А., Корягина Н.Ю. 2018. Функциональные показатели пойкилотермных гидробионтов из природных и искусственных водных биоценозов // Сельскохозяйств. биол. Т. 53(2). P. 337.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.2.337rus>
- Березина Н.А., Голубков С.М., Максимов А.А. 2016. Опыт использования нового биоиндикатора (*Gmelinoides fasciatus*) для оценки состояния донных местообитаний в Финском заливе // Вода: химия и экология. V. 4. P. 40.
- Сладкова С.В., Холодкевич С.В., Сафронова Д.В., Борисов Р.Р. 2017. Кардиоактивность раков *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868) в различных физиологических состояниях // Принципы экологии. Т. 3. С. 40.
<https://doi.org/10.15393/j1.art.2017.6442>
- Холодкевич С.В., Чуйко Г.М., Шаров А.Н. и др. 2021. Показатели кардиоактивности и оксидативного стресса моллюска *Anodonta cygnea* при краткосрочной соленосной тест-нагрузке как биомаркеры для оценки состояния организма и качества среды обитания // Биология внутр. вод. № 6. С. 599.
<https://doi.org/10.31857/S0320965221060085>
- Depledge M.H., Aagaard A., Gyorkis P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers // Mar. Pollut. Bull. V. 31. № 1–3. P. 9.
- Dutra K.B., Zank C., da Silva K.M. et al. 2008. Seasonal variations in the intermediate metabolism of the crayfish *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) in the natural environment and experimental condition // Iheringia Série Zoologia. V. 98(3). P. 355.
<https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000300010>
- Gerhardt A. 2000. Recent trends in online biomonitoring for water quality control. Biomonitoring of Polluted Water. Switzerland: Trans Tech Publ, Uetecon-Zuerich. P. 95.
- Handy R.D., Depledge M.H. 1999. Physiological Responses: Their Measurement and Use as Environmental Biomarkers in Ecotoxicology // Ecotoxicology. V. 8. P. 329.
- Holdich D.M., Harlioglu M.M., Firkins I. 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus* // Estuarine, Coastal and Shelf Science. V. 44. P. 147.
- Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Sladkova S.V. et al. 2021. Industrial Operation of the Biological Early Warning System BioArgus for Water Quality Control Using Crayfish as a Biosensor // Water Science and Sustainability. Sustainable Devel. Goals Ser. Cham: Springer. P. 127.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-57488-8_10
- Kozák P., Kuklina I. 2016. Crayfish as tools of water quality monitoring // Freshwater crayfish: A global overview. Boca Raton: CRS Press. P. 275.
- Kuklina I., Kouba A., Kozák P. 2013. Real-time monitoring of water quality using fish and crayfish as bioindicators: a review // Environ. Mon. Assess. V. 185. P. 5043.
- Kuznetsova T.V., Sladkova S.V., Kholodkevich S.V. 2010. Evaluation of functional state of crayfish *Pontastacus leptodactylus* in normal and toxic environment by characteristics of their cardiac activity and hemolymph biochemical parameters // J. Evol. Biochem. Physiol. V. 46(3). P. 241.
- Nies E., Almar M.M., Hermenegildo C. et al. 1991. The activity of glutathione S-transferase in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*: Seasonal variations and the influence of environmental pollutants // Comp. Biochem. and Physiol. Part C; Comp. Pharmacol. V. 100C. P. 65.
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90124-c](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90124-c)
- Passano L.M. 1960. Molting and its control // PhysiolCrustacea. V. 1. P. 473.
- Reynolds J., Souty-Grosset C. 2011. Management of freshwater biodiversity // Crayfish as bioindicators. Cambridge: Cambridge Univ. Press. V. 384. P. 45.
- Rovero F., Hughes R.N., Whiteley N.M., Chelazzi G. 2000. Estimating the energetic cost of fighting in shore crabs by noninvasive monitoring of heartbeat rate // Anim. Behav. V. 59(4). P. 705.
- Taylor E.W., Wheatly M.G. 1981. The effect of long-term aerial exposure on heart rate, ventilation, respiratory gas exchange and acid-base status in the crayfish *Austropotamobius pallipes* // Exp. Biol. V. 9a. P. 109.

Approaches to Determining Reference Values of Physiological Parameters of Freshwater Crayfish (Decapoda, Astacidae)

T. V. Kuznetsova¹, *, V. A. Ljubimtsev¹, S. V. Sladkova¹, and S. V. Kholodkevich¹

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

**e-mail: kuznetsova_tv@bk.ru*

Physiological parameters objectively reflect the health state of the organism and can serve as effective auxiliary criteria in determining the quality of the environment. However, significant variability of physiological and biochemical parameters is known in invertebrates, and, in particular, in crustaceans. In order to overcome these limitations and increase certainty in the assessment of the biological effects of toxicants, the authors proposed approaches and methods for the selection of reference groups of crayfish based on monitoring of their heart rate at rest and under the short-term standardized functional tests, allowing to assess the functional state of crayfish and their adaptive capabilities.

Keywords: freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*, methods of animal selection, functional parameters, non-invasive recording of cardiac activity, functional loading tests, crayfish as biosensors, diagnostics of environmental pollution