

Виявлено високу чутливість білкової системи сироватки крові коропа до підвищеного вмісту іонів важких металів у воді, яка проявляється у збільшенні сумарного вмісту білків та зростанні білкового коефіцієнту за дії всіх досліджених металів. На рівні фракційного складу білків сироватки крові помічено зростання вмісту альбумінів при обох вивчених концентраціях металів у воді та γ -глобулінів при їх рівні 5 ГДК. Відзначена тенденція до збільшення вмісту білків фракцій α_1 - та β -глобулінів при 2 ГДК металів у воді та зниження цих показників при 5 ГДК. Вміст білків у фракції α_2 -глобулінів, як правило, знижується, за винятком випадку впливу іонів міді та свинцю в кількості 5 ГДК.

Вплив підвищених концентрацій досліджених металів приводить до зростання кількості α -ліпопротеїдів в сироватці крові коропа та до зниження вмісту β -ліпопротеїдів, що свідчить про перебудову за інтоксикації механізмів гомеостатичної регуляції рівня ліпідів в крові риб та використання їх в адаптивних процесах.

Ключові слова: прісноводні риби, білки, нуклеїнові кислоти, важкі метали.

Надійшла 17.04.2019.

УДК: 577.352.38:577.64

doi: 10.25128/2078-2357.19.2.7

¹V. V. KHOMA, ^{1,2}L. L. GNATYSHYNA, ¹V. V. MARTINYUK, ¹YU. S. RAROK,
³D. OZOLIŅŠ, ³I. KOKORITE, ³A. SKUJA, ³G. H. SPRINĢE, ^{1*}O. B. STOLIAR

¹Volodymyr Hnatyuk Ternopil National Pedagogical University
M. Kryvonosa Str., 2, Ternopil, 46027, Ukraine

²I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University
Maidan Voli 1, Ternopil, 46001, Ukraine

³University of Latvia, Riga
e-mail: Oksana.Stolyar@tnpu.edu.ua

APPLICATION OF METAL-BINDING CHARACTERISTICS OF AQUATIC ANIMALS IN THE ASSESSMENT OF COMPLEX ENVIRONMENTAL POLLUTION

The present study aimed to compare the ability of bivalve mollusks and fish to accumulate some toxic metals in their tissues in the polluted environment. Populations of *Dreissena polymorpha*, *Unio tumidus* and *Carassius gibelio* in Latvia in Ukraine were investigated. In the mollusks from the polluted reservoirs, the accumulation of Zn, Cu, Cd in the tissues but decrease in metallothioneins concentration was detected, whereas the fish did not appropriate reflect the aquatic quality.

Key words: metallothioneins, bivalve mollusks, fish, copper, zinc, cadmium, bioindicator.

Freshwater mollusks are widely distributed in both natural and artificial aquatic bodies. They can serve as bio-indicators of aquatic pollution due to their ability to accumulate different substances from the environment [2]. Fish also is usually utilized as bioindicative species because of its major ecological role in the aquatic food-webs and sensitivity to stressful conditions [5]. The detection of the accumulation and compartmentalization of toxic metals in the tissues of the aquatic animals represents the valuable part of the exploring of these animals in the assessment of environmental health [2]. Metallothioneins are the ubiquitous cellular molecular targets for d-metals, mostly for cadmium (Cd), zinc (Zn) and copper (Cu). They serve as buffering proteins that keep these metals in the less toxic form (particularly Cd) and provide the distribution of essential metals Zn and Cu among the functional proteins of signaling and catalysis [1]. Therefore, the induction or increased levels of the metallothioneins in the organism or separated tissues are frequently using to justify metal exposure. However, according to the long-years' experience of the laboratory, the impact of complex pollution during life history can disturb the accumulative ability of the aquatic animals and their

metallothioneins towards the toxic metals or to activate their efflux from the organism [5, 6]. These circumstances can have the serious limitations for the biological monitoring of pollution by industrial metals in the aquatic environment.

The present study aimed to compare the ability of bivalve mollusks and cyprinid fish to accumulate in their tissues Zn, Cu, Cd as the compounds of the industrial pollution and to buffering them in the metallothioneins in the conditions of realistic environment. For this study, we selected the typical areas that are characterized by the complex agricultural and municipal pollution.

Materials and methods

The sites in Latvia were represented by the artificial reservoir of Riga hydropower plant (HPP) on the river Daugava (R-group) in two consequent years and the pristine lake Kanieris (KL, referent site, in one year). In Ukraine, the areas in the basin of the river Dniester were selected, namely Ternopil lake (T-group), the reservoir of small Kasperivtci HPP (before and downstream of the dam, Kb and Kd correspondingly) on the river Seret and the sites on the small tributary Zhvanchyk (before and downstream of the dam of micro HPP, Zhb, Zhd correspondingly). The R- and T-groups were represented by the bivalve mollusk, zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771, Bivalvia), Zh groups were comprised by the swollen river mussel *Unio tumidus* (Philipsson, 1788, Bivalvia), and the Kb and Kd groups included both *U. tumidus* (Kbm, Kdm groups) and fish prussian carp *Carassius gibelio* (Bloch, 1782, Cyprinidae) (Kbf, Kdf groups). Additionally, the fish from the Ternopil market was examined (Kf).

For the analysis of the metals in the tissues, the six individuals of *U. tumidus* or *C. auratus* or six pools of the soft tissues of *D. polymorpha* (from at least five specimens each) in each group were dissected. For the metallothionein chromatography, tissue samples from five individuals of experimental group were pooled in aliquot quantity. The concentration of Cu, Zn and Cd was measured in the samples of the tissues and pooled eluate of metallothionein-containing fractions after the size-exclusion chromatography. The metal concentration was analyzed by atomic absorption spectrophotometry against certified standards after the digesting of samples. Cu and Zn concentration was analysed on spectrometer C-115, ("Lomo", Russia) and Cd, on graphite furnace atomic absorption spectrometer S-600 ("Selmi", Ukraine). Quantification of metallothioneins associated thiols was accomplished spectrophotometrically after their ethanol/chloroform extraction and incubation with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). The detailed analysis of the applied methods is presenting in [3, 4].

Metallothionein analyses were carried out in triplicate for three independent samples, and metal measurements in the tissue were carried out in six specimens. Results were expressed as mean \pm SD. Shapiro-Wilk test was used for the assessment of normality. Data were analyzed with parametric Student's t-test significant at $p < 0.05$. Statistical calculations were performed with Statistica v 8.0 and Excel for Windows-2000.

Results and discussion

When the mussels from different sites and in two years were compared, the lesser level of Zn was found in the KL specimens, whereas the level of Zn in the gonads in the Kbm group and the level of Cu in the digestive gland in this group were greatest (Table 1, 2). The lower Cd concentration was found in the digestive gland in Kdm group. In all other groups levels of these metals were similar. In fish, the concentrations of metals in the tissues were not different between the sites, and only the level of Cd was lower in the Kdf group (Table 3).

Table 1

Concentration of metals in the total soft tissues of *D. polymorpha* from three reservoirs in Latvia and Ukraine

Metal / Groups	KL	R	T	R
	September, 2017 y		October, 2018 y	
	Zn, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	106.4 \pm 4.36 ^a	131.4 \pm 13.0 ^b	219,4 \pm 40.1 ^c
Cu, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	1.61 \pm 0.50 ^a	1.67 \pm 0.22 ^a	0.80 \pm 0.27 ^b	0.85 \pm 0.26 ^b
Cd, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	1.49 \pm 0.18 ^a	1.51 \pm 0.46 ^a	4.06 \pm 2.16 ^b	2.64 \pm 0.74 ^{a,b}

In Tables 1, 2, 3, data presented as mean ± SD (N=6). If the letters are the same, this indicates that the values do not differ significantly ($P > 0.05$)

Table 2

Concentration of metals in the tissues of *U. tumidus* from four sites in Ukraine in summer, 2017

Metal / Groups	Digestive gland			
	Znb	Zhd	Kbm	Kdm
Zn, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ DW	633.5±68.3 ^a	562.3±54.6 ^a	548.3±48.2 ^b	533.3±91.2 ^a
Cu, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ DW	13.83±2.40 ^a	12.13±4.00 ^a	20.23±2.46 ^b	20.04±2.33 ^b
Cd, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ DW	6.21±1.40 ^a	6.07±0.81 ^a	7.42±1.80 ^a	1.79±0.38 ^b
Gonads				
Zn, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	87.1±20.1 ^a	91.99±6.5 ^a	117.9±3.9 ^b	75.0±38.0 ^c
Cu, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	1.93±0.04 ^a	2.92±1.09 ^a	2.26±0.36 ^a	2.47±0.13 ^a
Cd, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	1.07±0.01 ^a	1.02±0.02 ^a	0.96±0.12 ^a	1.1±0.12 ^a

Table 3

Concentration of metals (M±SD, n=6), metallothionein-associated metals (M, % of total metal in the tissue) and thiols (M±SD, n=6) in the hepatopancreas of *C. auratus* from the Kasperivtci reservoir

Parameter / Groups	tissue			metallothioneins		
	Kf	Kbf	Kdf	Kf	Kbf	Kdf
Zn, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	387.0±37.6	369.5±47.9 ^a	352.3±29.7 ^a	63.3 (16.4%)	58.6 (15.9%)	55.6 (15.7%)
Cu, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	4.12±0.97	5.50±1.66 ^a	4.69±0.95 ^a	1.24 (30.1%)	1.19 (21.6%)	1.22 (26.0%)
Cd, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	2.46±0.57	2.44±0.54 ^a	1.40±0.18 ^b	0.06 (2.4%)	0.06 (2.5%)	0.07 (5%)
MT-SH, nmol SH groups×g-1 FW	-	-	-	449.4±111.1 ^a	494.5±70.9 ^a	221.5±85.7 ^b

The assessment of the chromatographic profiles and UV-spectra of the metallothioneins from all studied groups of animals demonstrated the similarity of their molecular weight and spectral features (Fig.). Among the metals in the composition of metallothioneins in the mollusks, the concentration of Zn was decreased in the order: Kb>R>KL>Kd groups (Tabl. 4). The concentrations of Cu and Cd in the metallothioneins of mollusks were similar in all groups. In the fish, we did not find differences between two groups for the level of metals in the metallothioneins (Tabl. 3). The level of metallothionein associated thiols (MT-SH) in the mussels was about 8 times higher in the swollen mussel than in the zebra mussel (probably due to the tissue specific location). In each group of comparison, the level of the SH groups in metallothioneins was lesser in the most polluted area: 1.9 and 3.4 times in T compare to R and Kbm compare to Kdm groups correspondingly. However, in the fish the opposite relation was shown: the level of MT-SH was 2.4 times greater in the Kbf than Kdf group.

Table 4

Metals and thiols in the metallothioneins of bivalve mollusks in September, 2017

Parameter / Groups	<i>D. polymorpha</i>		<i>U. tumidus</i>	
	KL	R	Kbm	Kdm
Zn, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	51.8±3.1 ^a	60.8±5.3 ^b	91.9±2.7 ^a	40.8±1.7 ^b
Cu, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	1.21±0.16 ^a	1.07±0.07 ^a	1.26±0.01 ^a	1.17±0.14 ^a
Cd, $\mu\text{g}\times\text{g}^{-1}$ FW	0.21±0.01 ^a	0.21±0.02 ^a	0.13±0.03 ^a	0.16±0.02 ^a
MT-SH, nmol SH groups×g-1 FW	25.6±9.8 ^a	34.9±14.2 ^a	209.6±37.6 ^a	713.2±74.7 ^b

Hence, the examined mollusks are more sensitive than the fish to metal accumulation in their tissues depending on the local site, even in the geographically close related areas. However, their metallothioneins are highly vulnerable to the oxidation reflecting the pressure of common mixed pollution in the artificial reservoirs. The participation of metallothioneins in the oxidative stress response can be the reason for their SH groups depletion and was demonstrated for the mollusks from the Ternopil lake earlier [3,6]. These data reflect that the bivalve mollusks can be valuable bioindicative organisms for the toxic metals and a total press of the mixed pollution, whereas the fish has not such properties.

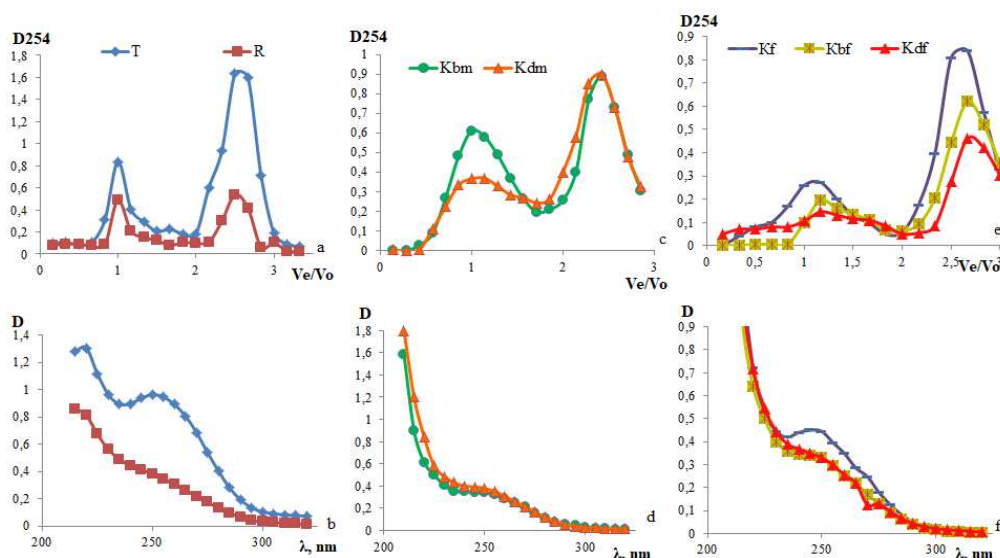


Fig. The elution profiles on Sephadex G-50 of thermostable extract (a,c,e) and UV-spectra of metallothionein-contained peak (b,d,f) from the soft tissues of *D. polymorpha* (A,B), digestive gland of *U. tumidus* (c,d) and hepatopancreas of *C. auratus* (e,f) from the different sites in Latvia and Ukraine.

This work has been granted by the Ministry of Education and Science of Ukraine to Oksana Stoliar (Projects M/70-2017; M/35-2018 and 132B) and State Education Development Agency of Latvia to Gunta Springe (Project LV-UA/2016/5). The authors are grateful to the Director of the National Nature Park Dniester Canyon Mr. Mykhaylo Shkilniuk for his assistance in the sampling in the Kasperivtcy area, and to PhD St Oksana Horyn for the technical assistance in the trial.

1. Молекулярні реакції водних тварин на вплив пошкоджувальних чинників середовища : [монографія] / О. Б. Столяр, Г. І. Фальфушинська, Л. Л. Гнатишина, В. Г. Юкало. Тернопіль: Вид-во ТНТУ імені Івана Пулюя, 2016. – 352 с.
2. Dailianis S. Environmental impact of anthropogenic activities: the use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. Mussels anatomy, habitat and environmental impact. New York: Nova Science Publisher. 2011. P. 43–72.
3. Khoma V. V. The content of metals in metallothioneins of the bivalve mollusk unio tumidus depending on the conditions of exposure in situ and eluent composition. *Biol. Stud.* 2019. Vol. 13(1). P. 61–70.
4. Mishchuk O. V. Stoliar O. B. Peculiarities of metallothioneins of the bivalve mollusc *Anodonta cygnea* L. in the natural and laboratory living conditions. *Hydrobiol. J.* 2009. Vol. 45. P. 63–71. DOI: <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v45.i5.70>.
5. Stoliar O. B., Lushchak V. I. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants.* 2012. P. 131–166. URL: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-environmental-induction-and-dietaryantioxidants/environmental-pollution-and-oxidative-stress-in-fish>
6. Stoliar O. B., Mykhayliv R. L., Mishchuk Y. V. Influence of the environmental conditions on binding of heavy metals and oxidative decomposition of biomolecules in tissues of *Anodonta cygnea* (Bivalvia). *Hydrobiol. J.* 2004. Vol. 40(2). P. 70–79.

References

1. Molekuliarni reaktsii vodnykh tvaryn na vplyv poskodzhuval'nykh chynnykiv seredovyscha : [monohrafiia] / O. B. Stoliar, H. I. Fal'fushyn's'ka, L. L. Hnatyshyna, V. H. Yukalo – Ternopil' : Vyd-vo TNTU imeni Ivana Puliuia, 2016. – 352 s. (in Ukrainian).
2. Dailianis S. Environmental impact of anthropogenic activities: the use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. Mussels anatomy, habitat and environmental impact. New York: Nova Science Publisher. 2011. P. 43–72.
3. Khoma V. V. The content of metals in metallothioneins of the bivalve mollusk *unio tumidus* depending on the conditions of exposure in situ and eluent composition. *Biol. Stud.* 2019. Vol. 13(1). P. 61–70.
4. Mishchuk O. V. Stoliar O. B. Peculiarities of metallothioneins of the bivalve mollusc *Anodonta cygnea* L. in the natural and laboratory living conditions. *Hydrobiol. J.* 2009. Vol. 45. P. 63–71. DOI: <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v45.i5.70>.
5. Stoliar O. B., Lushchak V. I. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants*. 2012. P. 131–166. URL: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-environmental-induction-and-dietaryantioxidants/environmental-pollution-and-oxidative-stress-in-fish>
6. Stoliar O. B., Mykhayliv R. L., Mishchuk Y. V. Influence of the environmental conditions on binding of heavy metals and oxidative decomposition of biomolecules in tissues of *Anodonta cygnea* (Bivalvia). *Hydrobiol. J.* 2004. Vol. 40(2). P. 70–79.

В. В. Хома, Л. Л. Гнатишина, В. В. Мартинюк, Ю. С. Рарок, Д. Озолінс, І. Кокоріте, А. Скуджа, Г. Х. Спринже, О. Б. Столяр

Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка, Тернопіль
Тернопільський національний медичний університет імені І. Горбачевського, Тернопіль
Латвійський університет, Рига

КОНЦЕНТРАЦІЯ МЕТАЛІВ У ТКАНИНАХ ТА МЕТАЛОТІОНЕЇНАХ ВОДНИХ ТВАРИН В ІНДИКАЦІЇ КОМПЛЕКСНОГО ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ

Прісноводні молюски та риби служать традиційними біоіндикаторами забруднення вод завдяки їх здатності накопичувати різні речовини та їх чутливості до стресу. Металотіонеїни є визнаними біомаркерами токсичності металів. Однак вплив комплексного забруднення може порушувати акумулювальну здатність водних тварин та їх металотіонеїнів. Мета цього дослідження – порівняти здатність двостулкових молюсків та коропових риб накопичувати у своїх тканинах деякі токсичні метали промислового походження та зв'язувати їх у металотіонеїнах за умов комплексного забруднення навколишнього середовища. Для цього було відібрано групи двостулкових молюсків *Dreissena polymorpha*, *Unio tumidus* та карася *Carassius gibelio* на ділянках, пов'язаних з діяльністю гідроелектростанцій (ГЕС) у Латвії та Україні. Досліджено у Латвії водосховище Ризької ГЕС (R-група), заповідне озеро Каньєріс (KL); в Україні Тернопільське озеро (Т-група), водосховище Касперівцівської ГЕС (вище і нижче за течією дамби, Kb та Kd відповідно) та ділянки на річці Жванчик (до і після греблі ГЕС за течією, Jb, Jd відповідно). R- і Т-групи були представлені *D. polymorpha*, групи Zn складалися з *U. tumidus*, а групи Kb і Kd включали як *U. tumidus* (групи Kbm, Kdm), так і *C. gibelio* (групи Kbf, Kdf). Обстеженню підлягав також карась, придбаний на ринку (Kf). Найменший вміст Zn виявлений у зразках KL, тоді як рівень Zn у гонадах та Cu в травній залозі у групі Kbm – найвищий. Найменша концентрація Cd виявлена у травній залозі групи Kdm. У рибі концентрація металів у тканинах була однаковою у всіх групах, за винятком рівня Cd. У складі металотіонеїнів молюсків концентрація Zn знижувалася у ряді: Kb > R > KL > Kd групи, а концентрації Cu та Cd були однаковими у всіх групах. Вміст –SH груп металотіонеїнів у молюсків кожного виду був найменшим у забрудненій місцевості (у 1,9– 3,4 рази). Для риб були отримані протилежні результати. Відтак, двостулкові молюски можуть бути цінними біоіндикаторами як підвищеного вмісту токсичних металів, так і впливу комплексного забруднення, тоді як риба не виявила таких ознак.

Ключові слова: металотіонеїни, двостулкові молюски; риба; купрум; цинк; кадмій; біоіндикація.

Надійшла 30.04.2019.