

Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря.
Материалы IX международной конференции
11-14 октября 2004 г., Петрозаводск, Карелия, Россия
Петрозаводск, 2005. С. 51-54.

ВЛИЯНИЕ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ БЕЛОГО МОРЯ НА ЛИПИДЫ ЛИТОРАЛЬНЫХ БОКОПЛАВОВ

В.В. БОГДАН¹, Г.А. ШКЛЯРЕВИЧ², Т.Р. РУОКОЛАЙНЕН¹

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

² Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

Исследовали влияние нефтяного загрязнения Белого моря на липидный состав литоральных бокоплавов. В мембранных липидах отмечено уменьшение уровня фосфолипидов при увеличении концентрации холестерина и отличия в соотношениях индивидуальных фосфолипидов по сравнению с нормой. Показана разная направленность в изменении уровня связанных полиеновых кислот при сильном и слабом нефтяном воздействии.

V.V. Bogdan, G.A. Shklyarevich & T.R. Ruokolainen. The effect of oil pollution of the White Sea on lipids of littoral *Gammarids* // The study, sustainable use and conservation of natural resources of the White Sea. Proceedings of the IXth International Conference, October, 11-14, 2004. Petrozavodsk, Karelia, Russia. Petrozavodsk, 2005. P. 51-54.

The effect of oil pollution of the White Sea on the lipid composition of littoral gammarids was studied. The decrease in the level of phospholipids, increase in cholesterol concentration and changes in the ratio of individual phospholipids compared to control was detected. Different directions in alteration of the level of binding polyunsaturated fatty acids under weak and strong oil effect was shown.

В последнее время проблема нефтяного загрязнения морских водоемов вызывает все больший интерес в связи с усиливающимся воздействием нефтяных компонентов на экосистемы морей. В морской воде происходит биодеградация и превращения нефти, приводящие к появлению широкого набора веществ с различными свойствами. Особая опасность для гидробионтов Северных водоемов связана с их низкой чувствительностью и высокой уязвимостью (Харламова, Новиков, 1997), а также особенностями воздействия токсикантов в условиях низких температур.

Нефтяное загрязнение Белого моря, при ежегодном сбрасывании в воду до 40 тонн нефтепродуктов, можно отнести к наиболее сильным антропогенным воздействиям, приводящим к наблюдаемой трансформации прибрежных морских экосистем. Исследование действия нефти на различных беспозвоночных и рыб достаточно обширно, однако проведены в основном в аквариальных условиях, что не позволяет объективно прогнозировать ее влияние на гидробионтов в хронически загрязненных акваториях. При высокой концентрации нефтяных компонентов в прибрежной зоне, обитающие здесь беспозвоночные, обладая коротким жизненным циклом, являются наиболее информативными объектами для оценки токсичности нефти на водные экосистемы. Наиболее перспективный и адекватный метод индикации состояния морских литоральных организмов и степени воздействия на них техногенного загрязнения – изучение биохимических показателей по сравнению с фоновыми значениями.

Цель настоящей работы – изучение липидного состава литоральных бокоплавов Кандалакшского залива Белого моря при хроническом действии нефтепродуктов.

Материал и методы

Объектом исследования служили литоральные бокоплавывы (*Amphipoda: Crustacea*), в видовом отношении представленные в основном (до 90%) *Lagunogammarus oceanicus* (Segehalstale, 1974), выловленными осенью в акватории Малого острова, сильно загрязненной преимущественно нефтепродуктами. Контролем служили особи из сравнительно чистой зоны Белого моря (Турий мыс).

Для анализа липидов сборные пробы амфипод (30 экз.) фиксировали 96%-ным этанолом и хранили при 4°C. Липиды экстрагировали смесью хлороформа с метанолом (2:1) (Кейтс, 1975). Фракционирование липидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» в системе растворителей: петролейный эфир - серный эфир - уксусная кислота (90:10:1). Количественно липидные фракции определяли гидроксаматным методом (Сидоров и др., 1972). Холестерин определяли по реакции с цветным реагентом (Engelbrecht, 1974). Разделение основных классов фосфолипидов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Arduini et al., 1996) на стальной колонке Nucleosil 100-7. Детектирование проводили по степени поглощения света при 206 нм.

Метилловые эфиры жирных кислот общих липидов получали прямым метилированием в абсолютном метаноле, содержащем 8% хлористого ацетила (Цыганов, 1971) и анализировали на газофазном хроматографе «Хром-41» на полярной фазе - 15%-ный Reoplex-400 на Хроматоне N-AW-DMCS в изотермическом режиме при 190°C. Идентификацию жирных кислот проводили сравнением со временами удерживания метчиков, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными (Jamieson, 1975). Относительное содержание отдельных кислот определяли по Бартлетту и Айверсону (Bartlett, Iverson, 1966) и рассчитывали в процентах от суммы всех жирных кислот.

Результаты

Результаты анализа липидов показали определенные изменения в содержании общих липидов и отдельных липидных фракций у бокоплавов под влиянием нефтяного загрязнения. Количество фосфолипидов при расчете от суммы практически не менялось, концентрация триацилглицеринов и холестерина увеличивалась, эфиров холестерина – снижалась. При расчете к сухой массе (Рис. 1) количество общих липидов у опытных бокоплавов уменьшилось относительно контрольных значений. Наибольшие отклонения от нормы обнаружены в содержании мембранных липидов. При этом концентрация фосфолипидов (ФЛ) снизилась до 85% при повышении в 2 раза уровня холестерина (Х), вследствие чего величина отношения Х/ФЛ увеличилась. Содержание запасных липидов - триацилглицеринов у опытных бокоплавов несколько повысилось, в то время как концентрация эфиров холестерина (ЭХ) уменьшилась на 30%. Величина отношения ЭХ/Х оказалась в 2,8 раза ниже контрольных величин.

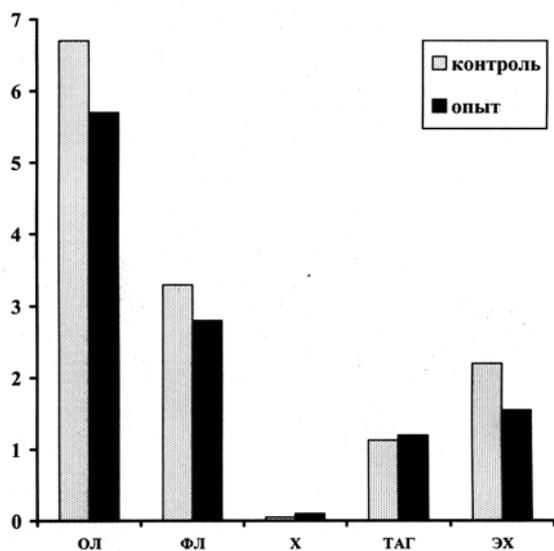


Рис. 1. Липидный состав бокоплавов в норме и при нефтяном воздействии (в % к сухой массе):

ОЛ- общие липиды, ФЛ- фосфолипиды, Х- холестерин, ТАГ- триацилглицерины, ЭХ- эфиры холестерина

Результаты количественного анализа индивидуальных фосфолипидов показаны изменения в соотношениях как доминирующих, так и минорных фракций при нефтяном воздействии по сравнению с чистой зоной (Рис. 2). Обнаружено значительное снижение (почти в 2 раза) относительного содержания фосфатидилэтаноламина от контрольных величин. На фоне некоторого уменьшения концентрации фосфатидилхолина отмечено также незначительное увеличение содержания его лизоформы. Уровень всех других фракций относительно контроля оказался повышенным. Наиболее значительно увеличилась концентрация фосфатидилинозитола (в 2,7 раза) и фосфатидилсерина (в 2,5 раз).

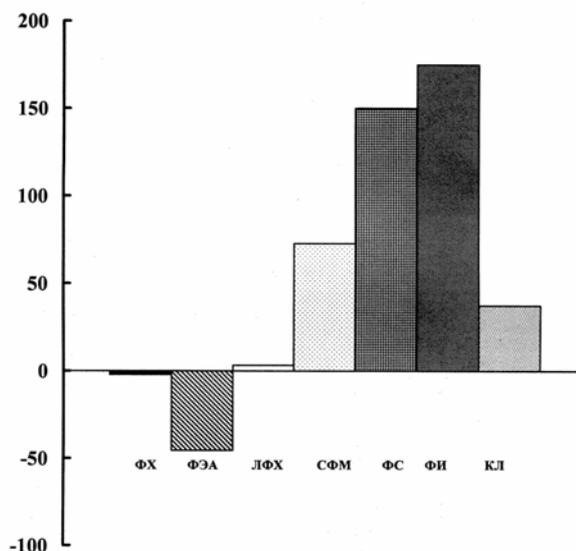


Рис. 2. Фосфолипидный состав бокоплавов при нефтяном воздействии (в % относительно контроля):

ФХ – фосфатидилхолин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозитол, КЛ – кардиолипин

Анализ жирнокислотных радикалов показал изменения в соотношении отдельных и сгруппированных по степени ненасыщенности кислот при воздействии нефтепродуктов. Уменьшилось содержание насыщенных кислот: пальмитиновой, стеариновой и арахидиновой кислот у опытных особей. Доля моноеновых кислот увеличилась за счет олеиновой кислоты, количественно преобладающей в липидах бокоплавов. Суммарное содержание полиеновых кислот оказалось несколько меньше, чем в контроле. Следует отметить, что альтерации в содержании отдельных тетра-, пента- и гексаеновых длинноцепочечных кислот были незначительны, составляя в среднем 2-4%.

Для сравнения биохимической реакции ракообразных на разную степень нефтяного загрязнения интересными представляются данные по жирнокислотным спектрам бокоплавов из района о. Ряшкова. Несмотря на то, что этот район считается чистой зоной, рядом проходит форватер и загрязнение неф-

тепродуктами имеет место. В липидах бокоплавов, выловленных летом в этом районе, наблюдалось некоторое увеличение доли полиеновых (в среднем на 4%) и насыщенных жирных кислот при снижении моноеновых по сравнению с контрольными величинами сезона. Коэффициент ненасыщенности при сильном нефтяном воздействии составил 3,8, при слабом – 4,5.

Обсуждение

Полученные результаты анализа липидов литоральных ракообразных - бокоплавов показали изменения в содержании мембранных и запасных липидов при действии нефтепродуктов. В частности, отмечено существенное снижение уровня фосфолипидов у опытных экземпляров по сравнению с контрольными. Ранее отмечалось, что изменения в фосфолипидно-белковом комплексе мембран относятся к числу характерных аномалий, возникающих в клетке под влиянием нефти (Патин, 1979). На уровне липидного обмена это может быть связано с уменьшением синтеза фосфолипидов.

Известно, что в морской воде происходит биодеградация и превращения нефти, приводящие к появлению широкого набора веществ с различными свойствами. При этом из компонентов нефти наибольшее токсическое действие на гидробионтов оказывают ароматические углеводороды, обладающие максимальной растворимостью, а среди них наиболее опасны соединения бензольного ряда и полициклические ароматические соединения (Миронов и др., 1990). Как показали экспериментальные исследования, при действии полиароматических углеводородов (ПАУ) происходило уменьшение линейных размеров амфипод (Михайлова, 2002). Отмечалось снижение темпов роста многих рыб и в природной среде, загрязненной углеводородами (Глубоков, 1990). Это может быть связано с дефицитом мембранных компонентов клеток. Приведенные выше данные показали уменьшение содержания фосфолипидов у опытных бокоплавов, следствием чего может быть снижение соматического роста особей при хроническом действии нефтепродуктов. Снижение темпов роста морских беспозвоночных считается важным показателем нарушения функционирования морских экосистем в условиях нефтяного загрязнения.

Что касается запасных липидов, то у опытных бокоплавов было обнаружено значительное снижение уровня эфиров холестерина. Уменьшение количества запасных липидов могло происходить вследствие снижения пищевой мотивации, отмеченной у гидробионтов в среде, загрязненной углеводородами нефти (Moles et al., 1981). В то же время, гидролиз эфиров холестерина создает резерв холестерина, необходимого при стрессе для перестройки мембран и обмена веществ в целом (Сидоров, 1983), увеличение уровня которого отмечено у амфипод при нефтяном загрязнении.

В мембранных липидах отмечены перестройки, связанные с изменениями в соотношениях индиви-

дуальных фосфолипидов при токсическом воздействии. Вследствие значительного снижения концентрации доминирующего в количественном отношении фосфолипида: фосфатидилэтоноламина, величина ФХ/ФЭА у опытных бокоплавов составила 3,2 по сравнению с 2,9 у контрольных. Существенные отличия обнаружены и в концентрациях всех других фосфолипидных компонентов. Известно, что отдельные фосфолипиды, как количественно доминирующие, так и минорные, могут выступать в качестве эффекторов и кофакторов различных метаболических процессов (Бурлакова, 1977). Поэтому отклонения их уровня от нормы отражают специфические изменения в различных звеньях метаболизма в клетках при токсическом воздействии. Так, кислые фосфолипиды, к которым относятся фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин, участвуют в регуляции водно-солевого обмена за счет изменения активности Na,K-АТФазы. Значительное повышение концентрации этих фосфолипидов у бокоплавов при хроническом действии нефтепродуктов может свидетельствовать об усилении активного транспорта ионов. В экспериментах на беспозвоночных обнаружено резкое нарушение водно-солевого обмена при критических концентрациях нефти (Михайлова, 2002).

В липидах амфипод обнаружено также некоторое снижение уровня длинноцепочечных ненасыщенных кислот при сильном хроническом воздействии нефти. Их важная адаптивная роль заключается в способности к изменению степени насыщенности, и следовательно, физико-химических свойств фосфолипидов и условий функционирования мембранных белков. Уменьшение концентрации полиеновых кислот в липидах наряду с отмеченным выше увеличением отношения Х/ФЛ при нефтяном воздействии может приводить к повышению вязкостных свойств мембран, снижению их функциональной активности и адаптивных возможностей организма в целом.

В результате уменьшения высоконенасыщенных фосфолипидов у бокоплавов при нефтяном воздействии может быть снижена двигательная активность, взаимосвязь которой с уровнем полиеновых жирных кислот в липидах рыб была ранее установлена исследованиями Г.Е. Шульмана с соавторами (1990). Подтверждением этому служит малая подвижность амфипод, которая отмечалась при действии нефтепродуктов в остром и хроническом эксперименте (Лаптева, 1995) и в природных условиях (Миронов, 1976). Угнетение двигательной активности на фоне ухудшения биохимических параметров тканей отмечалось и у молоди рыб при воздействии водорастворимых фракций нефти. Сходное действие на рыб оказывали водорастворимые фракции из разных месторождений (Folmar et al., 1981).

При меньшей интенсивности нефтяного воздействия у бокоплавов наблюдалась другая направленность в изменении жирнокислотных соотношений, чем при сильной интоксикации, при этом отмечена тенденция к увеличению доли полиеновых

жирных кислот в липидах. Учитывая их важную биоэффекторную роль, такие изменения можно считать адаптивно-компенсаторной реакцией на незначительное по силе стрессовое воздействие, повышающей резистентность организма. Следует отметить, что реакция амфипод Белого моря на другие типы загрязнителей также характеризовалась более высокой ненасыщенностью липидов, чем при сильном нефтяном воздействии (Богдан и др., 2003).

Таким образом, проведенные исследования показали изменения в составе липидов у литоральных бокоплавов при действии нефтепродуктов, связанные, главным образом, с уменьшением фосфолипидов при повышении уровня холестерина, а также изменениями в соотношениях индивидуальных фосфолипидных фракций. Обнаруженные альтерации в липидной компоненте мембран могут вызывать нарушение проницаемости, изменение транспорта ионов, модуляцию активности мембраносвязанных ферментов и другие негативные эффекты, приводящие к снижению устойчивости организма. Результатом фосфолипидного дефицита может быть снижение соматического роста литоральных ракообразных в условиях загрязнения, считающегося важным показателем функционирования морских экосистем. Показана разная направленность в изменении уровня связанных полиеновых кислот при сильном и слабом нефтяном воздействии.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-894.2003.4).

Литература

- Богдан В.В., Руоколайнен Т.Р., Шкляревич Г.А. 2003. Влияние антропогенного воздействия на липидный состав амфипод Белого моря // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. Тез. межд. конф. Сыктывкар. Стр. 114.
- Бурлакова Е.Б. 1977. Влияние липидов мембран на ферментативную активность // Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М.: Наука. С. 16-27.
- Глубоков А.И. 1990. Рост трех видов рыб в ранние периоды онтогенеза в норме и в условиях токсического воздействия // Вопр. ихтиологии. Т. 3, вып. 1. С. 137-143.
- Кейтс М. 1975. Техника липидологии. М.: Мир. 322 с.
- Лантева А.М. 1995. Закономерности реагирования бокоплавов на изменение химического состава воды // Проблемы рыбохозяйственной науки в творчестве молодых. Мурманск. Изд-во ПИНРО. С. 197-206.
- Миронов О.Г. 1976. Загрязнение нефтью. Общая экология. Биоценология. Гидробиология // М.: ВИНТИ. Т.3. С. 81-104.
- Миронов О.Г., Писарева Н.А., Щекатурина Т.Л., Латин Б.П. 1990. Исследование состава аренов в черноморских мидиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) // Гидробиол. журн. Т.26, № 4. С. 59-62.
- Михайлова Л.В. 2002. Регламентация нефти в донных отложениях пресноводных водоемов // Совр. проблемы водной токсикологии. Борок. С. 117.
- Патин С.А. 1979. Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность Мирового океана. М. Пищ. пром-сть. 304 с.
- Сидоров В.С. 1983. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука, 240 с.
- Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова З.А. 1972. Липиды рыб. I. Методы анализа // Лососевые (Salmonidae) Карелии. Петрозаводск. С. 152-163.
- Харламова М.А., Новиков М.А. 1997. К вопросу об уточнении понятий чувствительности, устойчивости и стабильности экосистем // Биоиндикация и оценка повреждения организмов и экосистем. Петрозаводск. Стр. 163-167.
- Цыганов Э.П. 1971. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лабораторное дело. №8. С. 490-493.
- Шульман Г.Е., Юнева Т.В. 1990. Роль докозагексаеновой кислоты в адаптациях рыб (Обзор) // Гидробиол. журн. Т. 26, № 4. С. 43-51.
- Arduini A., A. Peschiera, S. Dottori, A. Sciarroni, F. Serafini, M. 1996. Calvani. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. of Lipid Research. V.37. P. 684-689.
- Bartlett J., Iverson J.L. 1966. Estimation of fatty acid composition by gas chromatography using peak heights and retention time // J. Assoc. Office Analytical Chem. V. 49, № 1. P. 21-27.
- Engelbrecht F.M., Mori F., Anderson I.T. 1974. Cholesterol determination in serum/A rapid direct method // S. A. Med. J. V. 48. P. 250-256.
- Jamieson G.R. 1975. GLC-identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr. Sci., V. 13, № 10. P. 491-497.
- Folmar L.C., Claddock D.R., Blackwell J.W. 1981. Effects of petroleum exposure on predatory behavior of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. V. 27. P. 458-462.
- Moles A., Bates S.D., Korn S. 1981. Reduced of growth of coho salmon fry exposed to two petroleum compounds toluene and naphthalene in fresh water // Trans. Amer. Fish. Soc. V. 110. P. 430.