

The Estimation of Impact of Water-soluble Fraction Crude Oil to Deep-water Baikal Amphipod *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus*

Madyarova E.V.^{1,2}, Shatilina Z.M.^{1,2*}, Shirokova Y.A.¹,
Rzhechitskiy Y.A.¹, Vasilyeva U.A.¹, Lozovoy D.V.¹, Axenov-
Gribanov D.V.^{1,2}, Timofeyev M.A.¹

¹ Institute of Biology at Irkutsk State University, Irkutsk, 3 Lenin str., Russia

² Baikal Research Centre, Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

*E-Mail: zhshatilina@gmail.com

Received December 15, 2018

The purpose of current work was to assess the effect of water-soluble oil fractions on survival, lactate content and heat shock proteins HSP70 in the deep-water Baikal amphipod - *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus*. Amphipods were exposed for two days in solutions of water-soluble oil fractions at a concentration of 50 µg/L. During exposition time mortality of amphipods was not observed. Significant deviations from the control values for the studied biochemical parameters of *O. carneolus melanophthalmus*, were not detected. It can be explained by reduction of activity of stress-response mechanisms in deep-water amphipods due to adaptation to stable environmental conditions.

Key words: Baikal, deep-water amphipods, HSP70, lactate, oil toxicity, Ommatogammarus carneolus melanophthalmus

Нефть является одним из наиболее распространенных и опасных видов загрязнения экосистем, особенно водных. Поступление нефти и нефтепродуктов в среду может происходить как из мест ее естественного выхода на поверхность, так и в результате деятельности человека - в местах добычи нефти, при ее транспортировке, от транспорта и т.д. (Dussauze *et al.*, 2018).

При попадании нефти в водоем часть ее остается в виде пленки на поверхности воды, что препятствует проникновению кислорода в толщу воды и вызывает гибель планктонных организмов, а так же представляет опасность при непосредственном контакте. Часть нефти оседает на дно, где накапливается в донных отложениях и наносит вред бентосным организмам (Томилина и др., 2009). Не менее опасны и водорастворимые фракции нефти, которые поступают в водную толщу. Известно, что водорастворимые фракции нефти могут содержать до 90% токсичных ароматических соединений (Воробьев, 2006).

Нефтепродукты обладают тератогенным и канцерогенным действием, а большие концентрации нефти снижают выживаемость организмов (Frometa *et al.*, 2017; Dussauze *et al.*, 2018). В результате влияния нефтепродуктов на животных происходят нарушения их развития и воспроизводства, снижение численности, изменение путей миграции и т.д. (Colavecchia *et al.*, 2004; Wake, 2005; Черкашин, 2005).

Известно, что гидробионты различаются по своей устойчивости к воздействию токсических веществ, в том числе и нефтепродуктам. Поэтому необходимо проводить оценку их влияния на различные виды организмов, особенно на высокочувствительные эндемичные виды, так как негативное воздействие может привести к их полному исчезновению.

Озеро Байкал известно высоким уровнем эндемизма флоры и фауны. К примеру, среди фауны бокоплавов Байкала практически 100% эндемиков (Тахтеев, Дидоренко, 2015). Ранее нами было проведено исследование влияния водорастворимых фракций нефти на представителей двух литоральных видов озера – *Eulimnogammarus*

verrucosus и *E. cyaneus* (Shchapova *et al.*, 2018). В работе показано, что экспозиция животных в растворах водорастворимых фракций нефти с концентрациями от 50 до 1000 мкг/л не вела к их гибели. Вместе с тем, экспозиция рачков в растворах с концентрацией 50 мкг/л (ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения) вызывала изменения показателей таких широко используемых стресс-маркеров, как содержание БТШ70, уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов (пероксидазы, каталазы, глутатион S-трансферазы). Известно, что представители глубоководной фауны амфипод являются менее устойчивыми к воздействию абиотических факторов среды (Тимофеев, 2010) и, возможно, отличаются от изученных литоральных отношением к воздействию водорастворимых фракций нефти.

Целью данной работы являлась оценка воздействия водорастворимых фракций нефти на выживаемость, содержание лактата и БТШ70 у представителя глубоководной фауны озера Байкал - *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus*.

MATERIALS AND METHODS

Объектом исследования являлся глубоководный эндемичный байкальский вид амфипод *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus* Bazikalova, 1945. Амфиподы этого вида имеют темно-оранжевый окрас (Рис. 1), глаза фиксированных особей темные, а их нижний край широкий и вогнутый (Тахтеев и др., 2015). Известно, что размножение у видов рода *Ommatogammarus* протекает круглый год, но с наибольшей интенсивностью их спаривание происходит в июне (Базикалова, 1941). *O. carneolus melanophthalmus* – активные пловцы, являющиеся бентопелагическими стервятниками. Массово встречается в ловушках на глубине 200-300 м (сборы А.В. Кондратьевой и М.А. Тимофеева, 1998-2000 гг.) (Тахтеев, 2000).

Для экспериментальной работы амфипод отбирали в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал) с помощью ловушек. Ловушки, представляющие собой пластиковые емкости, в

которые помещали приманку (испорченную рыбу), погружали в озеро на глубину 300 м и оставляли на 5 дней. После поднятия, ловушки сразу помещали в контейнер с водой при температуре около 3,5°C и освобождали животных. После вылова амфипод в термостатируемых контейнерах доставляли в лабораторию, где содержали в аэрируемых термостатах при температуре 4°C (среднегодовая температура оз. Байкал на глубине ниже 100 м) в течение 7 суток. В ходе акклимации у амфипод отмечали высокую двигательную активность. Животных кормили свежемороженой байкальской рыбой, смену воды проводили раз в два дня.

Экспозицию амфипод проводили в байкальской воде с содержанием привнесенных ГСО водорастворимых фракций нефти (ООО «Экротим», ГСО 8654-2005) в концентрации 50 мкг/л (ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения). В данных условиях оценивали выживаемость амфипод, динамику содержания лактата и белков теплового шока семейства БТШ70. Длительность экспозиции составила 48 часов.

Для оценки выживаемости 10 особей амфипод помещали в аквариумы с 1 л раствора водорастворимых фракций нефти. Для биохимического анализа образцов производили фиксацию живых амфипод в жидком азоте через 1, 6, 12, 24 и 48 часов экспозиции в растворах нефтепродуктов. Амфипод контрольной группы содержали в условиях, аналогичных экспериментальным, без добавления водорастворимой фракции нефти. Фиксацию контрольных образцов производили непосредственно перед началом и после завершения экспериментов.

Содержание лактата определяли энзиматическим спектрофотометрическим методом при длине волны 505 нм с помощью стандарт-набора Лактат-Витал, согласно протоколу фирмы производителя (Vital diagnostic, СПб) с модификациями (Павличенко и др., 2009). Набор реагентов относится к серии «Витал-Европа», скомпанованный в соответствии с международными требованиями (DGKC). Концентрацию лактата определяли с помощью

калибровочной прямой, построенной с использованием стандартного раствора лактата фирмы производителя.

Содержание БТШ70 определяли с помощью одномерного денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле и последующим вестерн-блоттингом по методике, описанной у Bedulina et al. (2013). Для проведения электрофореза использовали по 50 мкг общего белка каждой пробы. Вестерн-блоттинг осуществляли методом полусухого переноса на мембрану Immobilon-P. После переноса белков мембрану окрашивали красителем Ponseau S (0,5% Ponseau S, 1% CH₃COOH) для нормализации уровня содержания БТШ70 и сканировали при высоком разрешении. После отмывки от красителя, мембрану по очереди инкубировали в растворах первичных (monoclonal anti-heat shock protein 70, produced in mouse, Sigma Chemical Co, No H5147) и вторичных антител (Anti-Mouse IgG:AP Conj (Stressgen, No SAB-101)) в течение 3-4 часов. Для визуализации результатов мембрану заливали раствором красителя BCIP и NBT.

Статистическую значимость отличий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни R (R Core Team, 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

В ходе работы установлено, что используемая концентрация раствора водорастворимых фракций нефти при экспозиции в течении 2 дней не оказывает значимого влияния на выживаемость амфипод *O. carneolus melanophthalmus*.

Содержание лактата у особей контрольной группы составило 0,75±0,68 мкМ/г сырого веса. Экспозиция амфипод *O. carneolus melanophthalmus* в растворах нефтепродуктов не вызвала значимых изменений содержания лактата на протяжении всей экспозиции. Отсутствие изменения содержания лактата при экспозиции амфипод в растворах водорастворимых фракций нефти может быть связано с тем, что у данного вида у особей контрольной группы содержание лактата изначально очень высокое. Ранее мы исследовали другой вид из рода *Ommatogammarus* – *Ommatogammarus flavus* (Axenov-Gribanov et al., 2016). Содержание лактата у

особей контрольной группы этого вида составило $0,08 \pm 0,02$ мкМ/г сырого веса, что значительно ниже установленного нами для *O. carneolus melanophthalmus*. Стрессовое воздействие (постепенное изменение температуры среды на 1°C в час) вело к изменению содержания лактата у *O. flavus*, максимальный уровень отмечали при достижении 22°C ($0,25 \pm 0,09$ мкМ/г сырого веса), но и

в этом случае содержание лактата у *O. carneolus melanophthalmus* в контрольной группе в нашем исследовании выше.

Наличия БТШ70 у особей контрольной группы в детектируемом количестве не зафиксировано. В ходе экспериментальной экспозиции изменения содержания БТШ70 у амфипод не отмечали (Рис. 2).



Figure 1. Объект исследования - глубоководный вид амфипод *O. carneolus melanophthalmus*, длина тела около 1,5 см (фото Дроздовой П.Б.)

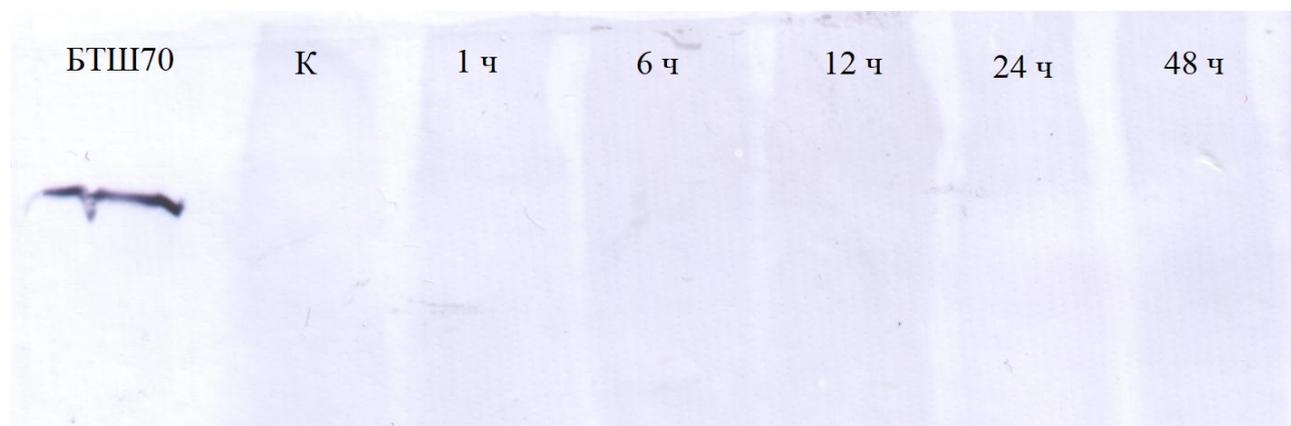


Figure 2. Содержание БТШ70 у *O. carneolus melanophthalmus* в контрольных условиях (К) и при экспозиции в растворах водорастворимых фракций нефти (ООО «Экротхим», ГСО 8654-2005) в концентрации 50 мкг/л в течение 48 часов. Слева нанесен позитивный контроль БТШ70 40 мкг.

Низкое содержание БТШ70 у представителей рода *Ommatogammarus* – *O. flavus* – так же отмечено ранее в работе (Axenov-Gribanov et al., 2016). В упомянутой работе было показано, что у представителей данного вида низкое содержание БТШ70 у особей в нестрессовых условиях по сравнению с таковым у литоральных видов амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* и *Gammarus lacustris*. При воздействии температурного стресса у особей *O. flavus* отмечали увеличение содержания БТШ70. Исследуемый в нашей работе *O. carneolus melanophthalmus* продемонстрировал отсутствие отклика БТШ70 на токсическое воздействие водорастворимых фракций нефти. Вероятно, используемые нами концентрации растворов для экспозиции амфипод, были малы для активации синтеза данного белка. Известно, что основной функцией БТШ70 является функция молекулярных шаперонов, они необходимы клетке для поддержания необходимой структуры белков (Mauger, Goloubinoff, 2017), что особенно актуально при стрессовых воздействиях различной природы (Morimoto, Nollen, 2009; Baby et al., 2012; Подлипаева и др., 2016). Отсутствие увеличения содержания БТШ70 может свидетельствовать как о том, что при исследуемом воздействии у *O. carneolus melanophthalmus* не происходит повреждений клеточных белков, так и о низкой лабильности данного механизма стрессовой защиты. Похожие случаи были описаны и ранее. Так, например у *Hydra oligactis*, обитающей в стабильных холодных условиях, не было обнаружено увеличения экспрессии каких-либо БТШ70 в ответ на тепловой шок. В то время как у родственного вида *H. vulgaris* происходила индукция синтеза БТШ70 (Bosch et al., 1988). Для антарктических рыб *Trematomus bernacchii* так же описано отсутствие увеличения содержания БТШ70 в ответ на температурный и токсический стрессы. Исследователи в качестве основной гипотезы, объясняющей данный факт, обсуждают влияние длительной эволюции в стабильных условиях на функциональную активность БТШ70 (Carpenter, Hofmann, 2000; Clark, Peck, 2009).

Таким образом, значимых отклонений от

контрольных значений по исследованным физиологическим и биохимическим показателям у представителей *O. carneolus melanophthalmus*, экспонированных в растворах водорастворимых фракций нефти, не обнаружено. Данное исследование еще раз подтверждает сформулированную ранее гипотезу о том, что у глубоководных амфипод возможно в ходе эволюции выработалась адаптация к стабильным условиям обитания и снижение активности механизмов ответа на стресс-факторы.

ACKNOWLEDGEMENTS

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области, проект №17-44-388067 р_а, а так же частичной финансовой поддержке гранта РНФ 17-14-01063, темы ГЗ 6.1387.2017/4.6, гранта Президента РФ МК-6804.2018.4. Авторы выражают благодарность Дроздовой П.Б. за предоставленную фотографию.

REFERENCES

- Воробьев Д. С. (2006) Влияние нефти и нефтепродуктов на макрозообентос // *Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов*, **309 (3)**, 42-45.
- Подлипаева Ю. И., Гудков А. В., Бергер В. Я. (2016) Изменение содержания стрессового белка 70 кДа в процессе акклимации моллюсков *Mytilus edulis* L. к пониженной солености. *Цитология*, **58(7)**, 562-566.
- Тахтеев В. В. (2000) Очерки о бокоплавах озера Байкал: Систематика, сравнительная экология, эволюция. Издательство Иркутского университета, 355 с.
- Тахтеев В.В., Дидоренко С.И. (2015) Фауна и экология бокоплавов озера Байкал: Учебное пособие. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 115 с.
- Тимофеев М.А. (2010) Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод.

- Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. Томск, 2010. 44 с.
- Томилина И.И., Михайлова Л.В., Рыбина Г.Е., Акатьева Т.Г. (2009) Влияние загрязненных нефтепродуктами донных отложений на планктонных и бентосных ракообразных. *Токсикологический вестник*, **2**, 28-32.
- Черкашин С. А. (2005) Отдельные аспекты влияния углеводов нефти на рыб и ракообразных. *Вестник ДВО РАН*, **3**, 124-128.
- Axenov-Gribanov, D., Bedulina, D., Shatilina, Z., Jakob, L., Vereshchagina, K., Lubyaga, Y., Gurkov A., Shchapova E., Luckenbach T., Lucassen M., Sartoris, F. J., Portner H.-O., Timofeyev M. (2016). Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and Holarctic amphipods. *PLoS one*, **11(10)**, e0164226.
- Baby J., Jency G., Jeevitha M. V. (2012) Impact of heavy metals and Hsp response. *International Journal of Biosciences*, **2(9)**, 51-64.
- Carpenter C.M., Hofmann G.E. (2000) Expression of 70 kDa heat shock proteins in Antarctic and New Zealand notothenioid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **125(2)**, 229-238.
- Clark M.S., Peck L.S. (2009) HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. *Marine genomics*, **2(1)**, 11-18.
- Colavecchia M.V., Backus, S.M., Hodson, P.V., & Parrott, J.L. et al. (2004) Toxicity of oil sands to early life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23(7)**, 1709-1718.
- Dussauze M., Le Floch S., & Lelchat F. (2018). Extreme Environments: The New Exploration/Production Oil Area Problem. *Oil Spill Studies*. Elsevier, 2018. 83-121.
- Frometa J., DeLorenzo M.E., Pisarski E.C., Etnoyer P.J. (2017). Toxicity of oil and dispersant on the deep water gorgonian octocoral *Swiftia exserta*, with implications for the effects of the Deepwater Horizon oil spill. *Marine pollution bulletin*, **122(1-2)**, 91-99.
- Mayer M.P., Goloubinoff P., eds. (2017) The HSP70 molecular chaperone machines. Lausanne: Frontiers Media, 69 p.
- Morimoto R.I., Nollen E.A.A. (2009) The heat shock response and the stress of misfolded proteins. In: *Handbook of Cell Signaling*. 267–274.
- Shchapova E.P., Axenov-Gribanov D.V., Lubyaga Y.A., Shatilina Z.M., Vereshchagina K.P., Madyarova E.V., Protasov E.S., Timofeyev M.A. (2018) Crude oil at concentrations considered safe promotes rapid stress-response in Lake Baikal endemic amphipods. *Hydrobiologia*, **805 (1)**, 189-201.
- Wake H. (2005) Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **62(1-2)**, 131-140.

