

УДК 574.2:574.64

Е. В. Журавель¹, О. В. Подгурская²

**ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ ВОДОРАСТВОРИМОЙ
ФРАКЦИИ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА РАННЕЕ
РАЗВИТИЕ ПЛОСКОГО МОРСКОГО ЕЖА
SCAPHESCHINUS MIRABILIS***

Вычислены эффективные концентрации ЕС₅₀ углеводородов водорастворимой фракции дизельного топлива, нарушающие раннее развитие плоского морского ежа *S. mirabilis*. Оценена потенциальная опасность загрязнения вод зал. Петра Великого нефтяными углеводородами для его воспроизводства.

Ключевые слова: нефтяные углеводороды, дизельное топливо, эмбриотест, токсичность, эмбрионы, личинки, морские ежи.

Среди компонентов антропогенного загрязнения водной среды важное место занимают нефтяные углеводороды, выявляемые во всех районах Мирового океана. Известно, что одним из основных источников их поступления в прибрежные воды является морской транспорт, работающий преимущественно на дизельном топливе и мазуте. Например, в прибрежные воды США 45% указанных веществ попадает от дизельного топлива [6].

Дальневосточные моря России, в том числе и Японское, в последние десятилетия подвержены существенному нефтяному загрязнению. Наибольшую антропогенную нагрузку в акватории зал. Петра Великого испытывают Амурский зал. и бух. Золотой Рог [8], на берегах которых расположен крупный город-порт Владивосток. По литературным данным [17], средняя концентрация нефтяных углеводородов в толще вод Амурского зал. составляет 0,05 мг/дм³, что не превышает принятых в России ПДК, но в некоторых районах она значительно выше, например в бух. Золотой Рог — до 1 мг/дм³.

В связи с возрастанием уровня нефтяного загрязнения все большее значение приобретает изучение влияния углеводородов нефти на жизнедеятельность морских организмов. В первую очередь внимание исследователей привлекает оценка токсичности сырой нефти и ее компонентов для различных тест-организмов — икры и мальков рыб, эмбрионов и личинок морских ежей [7, 12], проводящаяся в рамках изучения последствий разливов нефти.

* Исследование выполнено в рамках гранта Правительства Российской Федерации, договор № 11.Г34.31, а также при поддержке Научного фонда ДВФУ.

© Е. В. Журавель, О. В. Подгурская, 2013

Влияние углеводородов дизельного топлива на воспроизводство морских ежей оценено недостаточно, в хроническом эксперименте подробно рассмотрено лишь в работах [1, 2]. Целью нашего исследования было выявление токсичности дизельного топлива для эмбрионов и личинок плоского морского ежа *S. mirabilis* (Agassiz, 1863), массово встречающегося на песчаных грунтах в зал. Петра Великого Японского моря.

Материал и методика исследований.** Морских ежей *S. mirabilis* в преднерестовом состоянии собирали в фоновом районе на глубине 4,0—4,5 м. В работе использовали методику эмбриотеста [4]. Нерест взятых в опыт животных стимулировали введением в перивисцеральную полость 0,2 мл 0,5 М раствора хлорида калия. В стеклянный сосуд с 50 мл тестируемого раствора помещали промытые стерильной морской водой яйцеклетки так, чтобы они располагались на дне монослоем. Затем сюда же добавляли 0,1 мл разбавленной и предварительно проэкспонированной в течение 1 ч в испытуемых растворах спермы, осуществляя оплодотворение. Качество половых клеток предварительно проверяли с помощью оплодотворения и последующего определения доли нормальных зигот. Яйцеклетки с уровнем оплодотворения ниже 95% не использовали.

Подсчет нормальных и аномальных эмбрионов и личинок проводили на основных индикаторных стадиях: образование оболочки оплодотворения (30 с), первое деление дробления (90 мин), средняя бластула (8 ч), гастрюла (16 ч), ранний плутеус I стадии (24 ч), средний плутеус I стадии (48 ч). Влияние токсикантов оценивали визуально по количеству аномалий (степени отставания развития и выживания личинок) на каждой стадии. Для фотографирования развития и подсчёта часть зигот, эмбрионов и личинок фиксировали 0,02%-ным раствором глутаральдегида. Фотографии сделаны с помощью микроскопа с фотокамерой Aksio Imager A1 (Karl Zeiss).

Для исследований использовали морскую воду из зал. Восток (район Морской биологической станции), которую отбирали с глубины 6 м через систему аквариальной. Воду фильтровали через трехфракционный гравийный фильтр и стерилизовали ультрафиолетом. Температуру во время опытов поддерживали на уровне 18—19°C.

Для выделения водорастворимой фракции дизельного топлива марки «Л-0,5-40» использовали методику, применявшуюся Н. Фернандес и А. Сезаром [12]. Полученный экстракт разводили подготовленной морской водой в соотношении 12,5, 25, 50, 75 и 100% (неразбавленный экстракт). Содержание углеводородов, измеренное методом ИК-спектрометрии, составило в полученных растворах соответственно 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 и 0,81 мг/дм³. Для установления пригодности *S. mirabilis* как тест-объекта и сравнения его чувствительности с другими видами морских ежей, широко применяющимися в экотоксикологических исследованиях, выявляли реакцию гамет, эмбрионов и личинок *S. mirabilis* на стандартный токсикант бихромат калия, определяя

** В исследованиях принимали участие сотрудники ИБМ ДВО РАН к. б. н. С. Д. Кашенко и ТИНРО-Центра к. б. н. А. П. Черняев.

их выживаемость в растворах с концентрацией 1,5, 3,0, 6,0, 12,0, 25,0 и 50,0 мг Сг/дм³.

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью пакетов программ Excel и Statistica: рассчитывали среднее арифметическое, стандартное отклонение и достоверность различий между выборками по критерию Стьюдента. Эффективную концентрацию токсикантов ЕС₅₀ для эмбрионов и личинок морского ежа *S. mirabilis* определяли с помощью пробит-метода [9].

Результаты исследований и их обсуждение

Прежде чем приступить к процедуре биотестирования, необходимо было определить чувствительность выбранного тест-объекта к стандартному токсиканту (бихромату калия). Существуют многочисленные данные о чувствительности гамет, эмбрионов и личинок различных видов морских ежей к этому веществу (таблица), однако сопоставлять их довольно сложно, так как результаты экспериментов зависят от видовой специфичности используемых тест-объектов и различий в используемых методиках.

Вычисленная эффективная концентрация бихромата калия для морского ежа *S. mirabilis* варьирует от 83,2 мг/дм³ на стадии образования оболочки оплодотворения до 4,6 мг/дм³ при продлении эксперимента до формирования среднего плутеуса (48 ч). Увеличивающиеся углы наклона прямых трендов доли аномальных эмбрионов и личинок указывают, что с увеличением экспозиции количество аномалий развития еще больше возрастает (рис. 1, а). Это согласуется с выводами Н. Кобаяси [13] о том, что действие тяжелых металлов и бихромат-ионов более выражено при формировании плутеусов, чем на ранних стадиях. Таким образом, чувствительность *S. mirabilis* к стандартному токсиканту сравнима с таковой морских ежей, широко используемых в токсикологических исследованиях.

Под воздействием даже минимальной из тестируемых концентраций водорастворимой фракции дизельного топлива (0,1 мг/дм³) доля оплодотворённых яйцеклеток достоверно снижалась. Более высокие концентрации вызывали торможение развития эмбрионов и личинок и формирование различных аномалий (рис. 2).

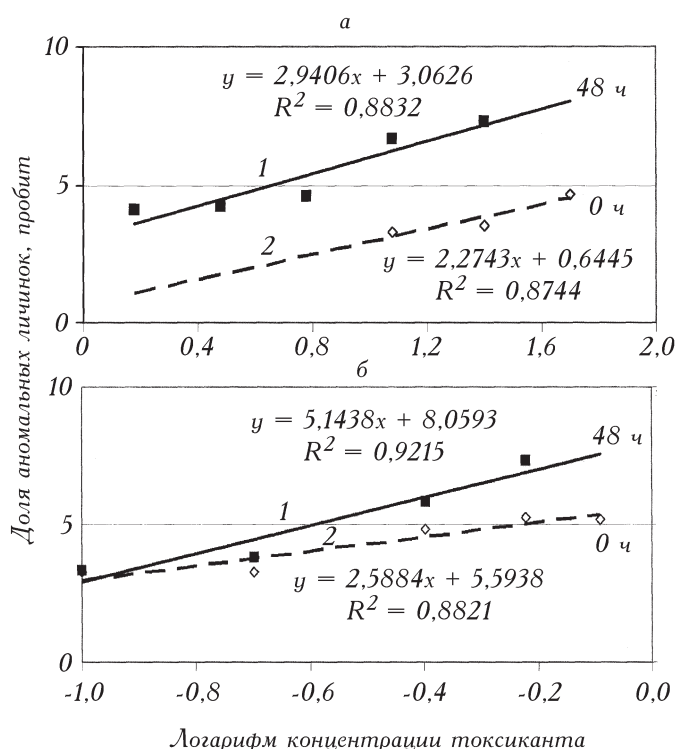
Эффективные концентрации бихромата калия (ЕС₅₀), подавляющие раннее развитие морских ежей

Виды морских ежей	Концентрация, мг/дм ³	Продолжительность эксперимента	Литературные источники
<i>Paracentrotus lividus</i>	3,50—4,62	48 ч	[15]
	0,52—5,20	48 ч	[16]
<i>Arbacia punctulata</i>	341,80 ± 53,01	10 мин	[11]
<i>Scaphechinus mirabilis</i>	83,20	10 мин	Оригинальные данные
	4,60	48 ч	

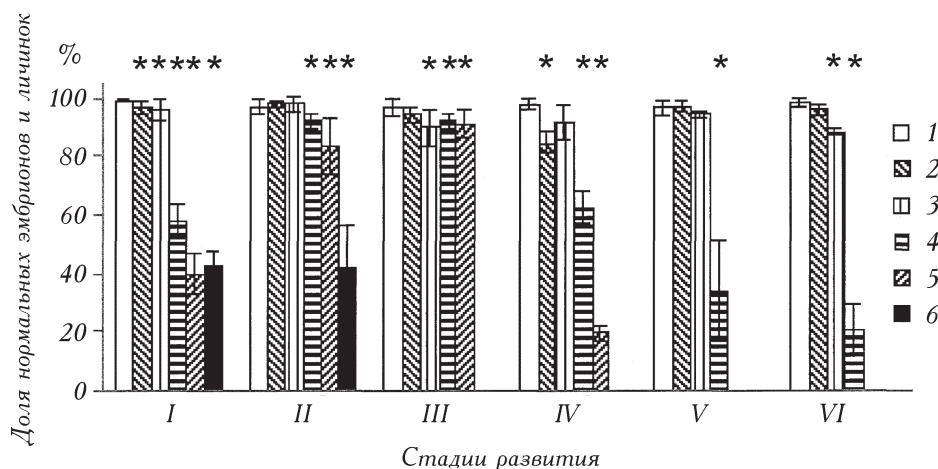
Так, в растворах с концентрацией углеводородов 0,2 и 0,4 мг/дм³ у зигот формировались оболочки оплодотворения с узким перивителлиновым пространством (рис. 3, з), при более высокой — доля оплодотворённых яйцеклеток достоверно снижалась. После начала дробления формировались вытянутые и различающиеся по размерам бластомеры (см. рис. 3, д).

В растворах с концентрацией углеводородов 0,40—0,81 мг/дм³ формирование бластул (см. рис. 3, е) и гаструл запаздывало, у большинства опытных личинок по сравнению с контрольными архентерон был укорочен. В растворе с концентрацией 0,6 мг/дм³ бластулы не вышли из оболочек, у немногих личинок, продолжающих развиваться, гастрюляция происходила внутри оболочки. У большей части эмбрионов, находившихся в растворах с концентрацией 0,60—0,81 мг/дм³ развитие остановилось на стадии бластулы (см. рис. 3, к). До контрольного этапа среднего плутеуса I стадии в растворах с концентрацией 0,1, 0,2 и 0,4 мг/дм³ нормально развились соответственно 95, 88 и 21% личинок, у большей их части нарушалось формирование личиночного скелета и пищеварительной системы (см. рис. 3, л, м).

Таким образом, практически без отличия от контроля эмбрионы и личинки развивались лишь в растворе с наименьшей из исследованных концентраций водорастворимой фракции дизельного топлива, в остальных вариантах раннее развитие *S. mirabilis* нарушалось вплоть до его полного прекращения. Расчетная эффективная концентрация ЕС₅₀ дизельного топлива для *S. mirabilis* составила 0,59 мг/дм³ при подсчёте неоплодотворённых яйцеклеток через 10 мин после оплодотворения и 0,25 мг/дм³ при продлении эксперимента до 48 ч (см. рис. 1, б).



1. Зависимость количества аномальных личинок от концентрации бихромата калия (а) и углеводородов водорастворимой фракции дизельного топлива (б): 1 — 0 ч (оплодотворение); 2 — 48 ч (средний плутеус).

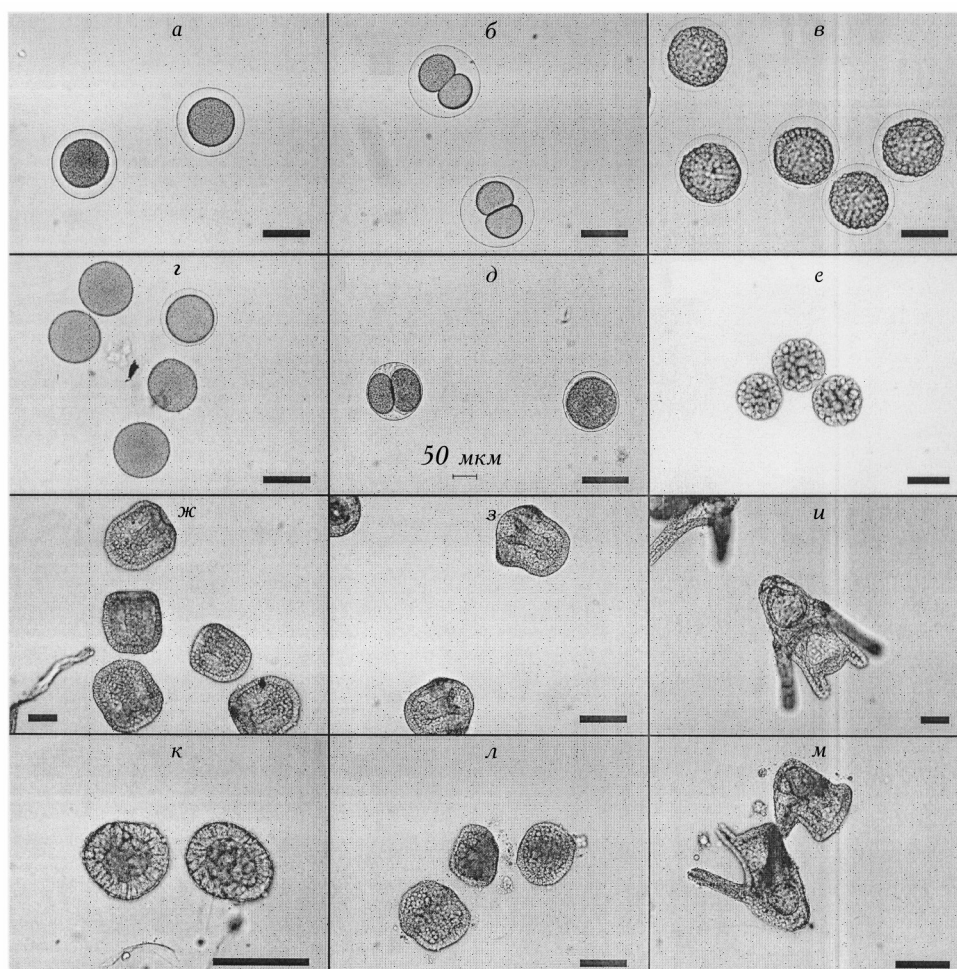


2. Доля нормальных эмбрионов и личинок *S. mirabilis* под воздействием углеводородов водорастворимой фракции дизельного топлива ($M \pm m, n = 8$). Стадии развития: I — образование оболочки оплодотворения; II — первое деление дробления; III — бластула; IV — гастрюла; V — ранний плутеус; VI — средний плутеус. Концентрация: 1 — контроль; 2 — 0,10 мг/м²; 3 — 0,20 мг/м²; 4 — 0,40 мг/м²; 5 — 0,60 мг/м²; 6 — 0,81 мг/м². * Отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Ранее для определения токсичности углеводородов дизельного топлива для морских ежей использовались как хронические, так и острые эксперименты. В хроническом эксперименте было показано, что выдерживание родительских особей морского ежа *Strongylocentrotus nudus* в течение длительного времени в среде, содержащей углеводороды лёгкого дизельного топлива в концентрации 0,04—0,30 мг/дм³, приводило к серьёзным нарушениям в развитии потомства на ранних стадиях эмбриогенеза и, особенно, в процессе метаморфоза [1, 3]. Воздействие токсиканта вызывало нарушение синтеза РНК и белка в растущем ооците, в результате чего у потомства экспериментальных животных нарушалась дифференцировка личиночных органов и тормозились процессы образования первичной мезенхимы и инвагинации. Это приводило к появлению личинок с укороченными руками и недоразвитым кишечником. Определенная в 48- и 72-часовом остром эксперименте EC_{50} водорастворимой фракции дизельного топлива для *Hemicentrotus pulcherrimus* составила соответственно 3,39 и 1,87 мг/дм³ [14]. Скорее всего, некоторая разница в значениях эффективной концентрации углеводородов дизельного топлива обусловлена разными подходами к процедуре биотеста, различной чувствительностью исследованных видов морских ежей и спецификой химического состава используемого дизельного топлива.

Заключение

В настоящее время концентрация нефтяных углеводородов в воде из различных акваторий зал. Петра Великого сильно варьирует: в Уссурийском зал. она составляет 0,01—1,5 мг/дм³, в Амурском — 0,03—0,58, в зал. Находка — 0,07—0,92 мг/дм³ [3, 5, 10]. Некоторая доля углеводородов в природных водах приходится на малотоксичные биогенные соединения, но в целом их содержание превосходит не только ПДК для рыбохозяйственных водоёмов (0,05 мг/дм³), но



3. Эмбриональное и личиночное развитие плоского морского ежа *S. mirabilis* под действием углеводородов водорастворимой фракции дизельного топлива: а, г — оплодотворение; б, д — первое деление дробления; в, е — средняя бластула; ж — гастрюла; з, л — ранний плутеус I стадии; и, м — средний плутеус I стадии; к — перманентная бластула; а—в, ж—и — контроль; г, д, м — 0,4 мг/дм³; л — 0,6 мг/дм³; е, к — 0,81 мг/дм³. Масштаб 100 мкм.

и рассчитанные нами эффективные концентрации, нарушающие раннее развитие *S. mirabilis* (0,25—0,59 мг/дм³). Таким образом, в большинстве прибрежных районов зал. Петра Великого нарушение эмбрионального развития морских ежей может быть вызвано именно загрязнением нефтью и нефтепродуктами.

**

Встановлено високу чутливість ембріонів і личинок морських їжаків *Scaphechinus mirabilis* до біхромату калію, що дозволяє використовувати їх як тест-об'єкти в екотоксикологічних дослідженнях. Проведено оцінку впливу вуглеводнів водорозчинної фракції дизельного пального на ранній розвиток *S. mirabilis* методом ембріотесту, розраховано ефективні концентрації, що викликають появу аномалій розвитку. Показано, що сучасний рівень забруднення прибережних вод зат. Петра

Великого Японського моря нафтовими вуглеводнями може бути небезпечним для відтворення морських їжаків.

**

*A high sensitivity of the sea urchin *Scaphechinus mirabilis* embryos and larvae to sodium dichromate was revealed. This fact allows to use them as test-objects in the bioassay of the marine water pollution. Impact of the water-soluble fraction of the diesel fuel hydrocarbons on embryogenesis of the *S. mirabilis* was assessed. The effective concentrations which cause disturbances in embryos and larvae were calculated. Actual state of the Peter the Great Bay water pollution by petroleum hydrocarbons can potentially disturb reproduction of the sea urchins.*

**

1. Ващенко М.А. Авторадиографическое исследование влияния водорастворимых углеводородов легкого дизельного топлива на синтез РНК и белка в овоцитах морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биология моря. — 1983. — № 1. — С. 47—51.
2. Ващенко М.А. Влияние водорастворимых углеводородов легкого дизельного топлива на развитие половых клеток и качество потомства морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Там же. — 1980. — № 4. — С. 68—73.
3. Журавель Е.В., Маркина Ж.В., Погурская О.А. Оценка загрязнения поверхностных вод залива Находка (залив Петра Великого, Японское море) методом биотестирования // Проблемы региональной экологии. — 2009. — № 2. — С. 117—122.
4. Кобаяси Н., Найденко Т.Х., Ващенко М.А. Стандартизация биотеста с использованием зародышей морского ежа // Биология моря. — 1994. — Т. 20, № 6. — С. 457—464.
5. Лукьянова О.Н., Черкашин С.А., Нигматулина Л.В. и др. Комплексная химико-экологическая оценка состояния Уссурийского залива (Японское море) // Вод. ресурсы. — 2009. — Т. 36, № 5. — С. 615—622.
6. Патин С.А. Нефть и экология континентального шельфа. — М.: ВНИРО, 2001. — 247 с.
7. Пряжевская Т.С., Черкашин С.А. Влияние нефтеуглеводородов на ранний онтогенез рыб // Изв. ТИНРО. — 2007. — № 149. — С. 359—365.
8. Романкевич Е.А., Айбулатов Н.А. Геохимическое состояние морей России и здоровье человека // Электр. науч.-информ. журн. «Вестн. отделения наук о Земле РАН». — 2004. — №1 (22). — С. 1—17.
9. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. — М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002. — 118 с.
10. Черняев А.П. Распределение нефтяных углеводородов в воде и донных отложениях Амурского залива (Японское море) // Изв. ТИНРО. — 2005. — № 140. — С. 240—244.
11. Adams J.A., Slaughter-Williams S. The effects of PCB's (Aroclors 1254 and 1016) on fertilization and morphology in *Arbacia punctulata* // Water, Air and Soil Pollut. — 1988. — N 38. — P. 299—310.

12. *Fernandez N., Cesar A.* Toxicological characterization of the aqueous soluble phase of the *Prestige* fuel-oil using the sea-urchin embryo bioassay // *Ecotoxicology*. — 2006. — N 15. — P. 593—599.
13. *Kobayashi N.* Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay // *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* — 1977. — Vol. 24, N 1—3. — P. 9—21.
14. *Lu F.-R., Xiong D.-Q., Ding S.-Q., Gong W.-M.* Acute toxic effects of petroleum hydrocarbons water-accommodated fractions on larvae development of *Hemicentrotus pulcherrimus* // *J. Dalian Maritime Univ.* — 2008. — Vol. 34, N 2. — P. 24—27.
15. *Manzo S.* Sea urchin embryotoxicity test: proposal for a simplified bioassay // *Ecotox. Env. Safety*. — 2004. — N 57. — P. 123—128.
16. *Pagano G., Esposito A., Bove P. et al.* The effects of hexavalent and trivalent chromium on fertilization and development in sea urchin // *Env. Res.* — 1983. — N 30. — P. 442—452.
17. *Tkalin A.V.* Chemical pollution of the north-west Pacific // *Mar. Pollut. Bull.* — 1991. — Vol. 22, N 9. — P. 455—457.

¹Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток, РФ

²Институт биологии моря ДВО РАН,
Владивосток, РФ

Поступила 05.11.12