

Физиологические и репродуктивные нарушения у балтийских амфипод *Gmelinoides fasciatus* при экспериментальном воздействии 4-трет-октилфенола

Н. А. БЕРЕЗИНА¹, Н. М. СУХИХ¹, А. В. ЕГОРОВА², З. А. ЖАКОВСКАЯ²

¹Зоологический институт РАН
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 1
E-mail: nadezhda.berezina@zin.ru

²Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр РАН
199178, Санкт-Петербург, 14-я линия Васильевского острова, 39

Статья поступила 26.06.2023

После доработки 28.07.2023

Принята к печати 28.07.2023

АННОТАЦИЯ

Промышленные химикаты, алкилфенолы, относятся к ксеноэстрогенам, однако до сих пор сублетальные эффекты этих веществ на физиологические показатели водных животных мало изучены. Целью данной работы явилось изучение возможных метаболических и репродуктивных нарушений у амфипод (на примере вида *Gmelinoides fasciatus* из Финского залива Балтийского моря) после воздействия в эксперименте 4-трет-октилфенола (4t-ОП) из группы алкилфенолов. Смертность амфипод *G. fasciatus* в диапазоне концентраций 4t-ОП от 0,5 до 1000 мкг/л через 96 ч и 7 сут возрастала с увеличением концентрации 4t-ОП. При концентрации 20 мкг/л через 7 сут смертность рачков составила 20 %, а при его концентрации 100 мкг/л – 60 %. 100%-я выживаемость рачков была при его концентрациях 0,5 и 5 мкг/л. При длительном воздействии нелетальных концентраций 4t-ОП (0,5 мкг/л) на этих амфипод отмечено снижение их половой активности через одну неделю: только 25 % амфипод сохраняли прекопуляторные пары, в то время как их было 100 % в контроле. При хроническом воздействии (28 сут) наименьших концентраций выявлены признаки демаскулинизации самцов (уменьшение ширины гнатопод и увеличение глубины коксальных пластин), снижение общей плодовитости самок и необратимые нарушения в развитии эмбрионов, а именно высокая доля (>50 %) эмбрионов, остановивших развитие на разных стадиях органогенеза. Проведенное исследование показывает значительные функциональные нарушения метаболических процессов и репродукции у рачков даже при воздействии нелетальных концентраций октилфенола. Эти результаты подтверждают высокую токсичность этого промышленного загрязнителя, присутствие которого в водной среде может привести к необратимым изменениям биоты.

Ключевые слова: амфиподы, скорость потребления кислорода, плодовитость, состояние эмбрионов, морфологические признаки, гнатоподы, алкилфенолы, ксеноэстрогены, Финский залив.

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение опасными веществами является одной из острых экологических проблем. Загрязнение водных экосистем Северо-Запада России и Европы, включая восточную часть Финского залива и Балтийского моря [Kuprijanov et al., 2024].

Загрязнение водных экосистем Северо-Запада России и Европы, включая восточную часть Финского залива и Балтийского моря [Kuprijanov et al., 2024].

al., 2021]. Соединения, которые ведут себя как эндогенные эстрогены, называемые экологическими эстрогенами или ксеноэстрогенами, привлекли наибольшее внимание в последние десятилетия. Ксеноэстрогены могут оказывать свое действие путем связывания с рецептором эстрогена [Nimrod, Benson, 1996]. К ним относятся некоторые фармацевтические препараты (например, 17 α -этинилэстрадиол), пестициды (например, линдан, эндосульфат) и промышленные химикаты (алкилфенолы, бисфенол-А, 12-фталаты, полихлорированные бифенилы, органические соединения олова).

Алкилированные фенолы – это группа неионогенных поверхностно-активных стойких веществ, обычно встречающихся в сточных водах, которые могут накапливаться в живых организмах при попадании в пресные и морские водоемы. Октилфенол содержится в промышленных сточных водах предприятий, где он используется в производстве фенолоформальдегидных смол (98 % от всех источников), этоксилатов октилфенола и эфирсульфатов (2 %). Эти смолы, этоксилаты и сложные эфиры сульфатов используются для повышения клейкости резины шин, в производстве красок на водной основе и пестицидов (в качестве диспергатора). Также октилфенол присутствует в виде примеси в нонилфеноле промышленного производства. Октильная группа в структуре октилфенола может быть линейной или располагаться во втором, третьем или четвертом положении бензольного кольца. Из этих изомеров 4-*tert*-октилфенол (4t-OP) является наиболее важным для промышленного использования [Miyagawa et al., 2021]. Он токсичен для водных организмов, в сублетальных концентрациях может вызывать значительные эндокринные нарушения и аномалии развития у рыб [Kinnberg et al., 2003; Madsen et al., 2003; Lee, 2006]. До сих пор мало изучены эффекты 4t-OP и механизмы его воздействия на водных животных.

Настоящее исследование посвящено изучению влияния алкилфенолов на физиологические и репродуктивные нарушения амфипод *Gmelinoides fasciatus* [Stebbing, 1899] из Финского залива Балтийского моря. Ракообразные амфиподы являются важными компонентами морских экосистем, в частности Балтийского моря. В настоящее время разные виды амфипод широко используются в качестве тестовых

для оценки загрязнения окружающей среды. Амфипода *G. fasciatus* обитает в эстуарной части Финского залива. Биология этого рачка хорошо изучена, выяснена его чувствительность к разного рода техногенным воздействиям, поэтому *G. fasciatus* считается перспективным видом для использования в биотестировании [Berezina et al., 2013, 2019]. Настоящее исследование было направлено на определение влияния острого и хронического воздействия 4t-OP на выживаемость амфипод, их метаболическую активность и репродуктивное здоровье. В частности, через 96 ч и 7 сут определяли смертность амфипод *G. fasciatus* в диапазоне концентраций 4t-OP от 0,5 до 1000 мкг/л и скорость потребления кислорода при концентрациях от 0,5 до 20 мкг/л. В долговременном эксперименте изучали влияние нелетальных концентраций 4t-OP на успех образования прекопуляторных пар, морфологические особенности самцов, качество эмбрионов и плодовитость самок под влиянием нелетальных концентраций 4t-OP.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Схема эксперимента. Отлов рачков, амфипод *Gmelinoides fasciatus*, был проведен в чистом местообитании Финского залива (г. Сестрорецк, парк Дубки) в июне 2020 г. при температуре воды 12 °С. В течение недели их адаптировали к лабораторному содержанию при следующих условиях: постоянная температура воды 12 °С, соленость 100 мг/л, pH 7,6, фотопериод 12 ч день: 12 ч ночь. Воду для содержания рачков набирали в месте обитания и смешивали с отстоянной водопроводной водой в соотношении 1:3. Амфипод ежедневно кормили смесью животного корма для рыб и сухих водорослей в соотношении 1:2 (TetraMin®). На весь период лабораторного содержания амфиподам обеспечивали укрытия в виде камней и искусственных водорослей, аэрацию воды в аквариумах осуществляли с помощью компрессора через пипетки, расположенные на расстоянии 5 см от дна. Аквариумы накрывали стеклом во избежание испарения воды.

В дальнейшем из этой лабораторной группы амфипод спонтанно отбирали по 40 экз. рачков и содержали их в сходных условиях в течение 7 сут при действии 4t-OP в семи

концентрациях (0,5; 5; 20; 100; 200; 500 и 1000 мкг/л) и в контроле (при отсутствии этого вещества). Смертность (доля от начального количества рачков, %) была определена через 96 ч и 7 сут во всех вариантах. Скорость потребления кислорода (интенсивность дыхания) амфипод *G. fasciatus* определяли через 7 сут содержания рачков в трех вариантах концентраций 4t-OP (0,5, 5 и 20 мкг/л) и в контроле.

Длительное (28 сут) время амфиподы содержались в контроле и варианте с наименьшей концентрацией 4t-OP (0,5 мкг/л). Для этого из контрольной партии отбирали 120 пар амфипод (самец + самка) на прекопуляторной стадии и помещали их в каждый из вариантов в трех повторах. После экспозиции измеряли длину тела и головной капсулы амфипод, оценивали плодовитость и состояние эмбрионов у беременных самок, измеряли ширину гнатопод I (правой и левой) и глубину коксальных пластин IV самцов. Эти морфологические признаки наиболее изменчивы в случае эндокринных нарушений и ранее использовались в качестве одного из морфологических критериев для разделения нормальных и интерсексуальных самцов амфипод [Ford et al., 2004]. Интерсексуальные самцы различались по размерам ногочелюстей первой пары переопод (гнатопод I), которые значительно крупнее у нормальных самцов, чем у интерсекс-самцов и самок. Увеличенная глубина коксальных пластин переоподов VI у интерсекс-самцов может быть больше, чем у нормальных самцов.

Определение алкилфенолов в воде. В опытах использовали химически чистый 4-*трет*-октилфенол 97 %, $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ фирмы Aldrich, который растворяли в аце-

тоне и затем в воде до уровней расчетных концентраций, соответствующих вариантам эксперимента (табл. 1). Использовали отстоянную водопроводную воду (минерализация 0,7 г/л). Пробы воды (0,5 л) для определения фактических концентраций вещества отбирали из каждого варианта эксперимента и контроля в начале и конце опыта. Образцы воды хранили при температуре -20°C до анализа.

Для подготовки к анализу проб воды (500 мл) применяли жидкость-жидкостную экстракцию (трижды по 15 мл гексана) при нейтральном значении показателя кислотности среды. Полученные экстракты суммировали, сушили над безводным сульфатом натрия, пробы упаривали на ротормном испарителе, экстракт переносили в коническую пробирку и упаривали досуха под током азота. После чего к высушенным экстрактам добавляли 50 мкл дериватизирующего агента N, O-бис(триметил)-трифторацетамида и помещали в термостат на 30 мин при 60°C .

Количественное содержание обнаруженных соединений оценивалось методом “внутреннего стандарта” (2-фторнафталин), который вводился в пробу непосредственно перед процедурой экстракции. Массовую долю для каждого соединения рассчитывали методом внутреннего стандарта с использованием коэффициентов пересчета в паре алкилфенол и 2-фторнафталин.

Анализ алкилфенолов проводился в целевом режиме SIM (Selection Ion Monitoring) на хромато-масс-спектрометре (ГХ/МС) единичного разрешения QP 2010 (Shimadzu). Параметры ГХ/МС съемки были следующие: температура ионного источника – 200°C , интерфейса – 270°C , инжектора – 250°C ,

Т а б л и ц а 1

Расчетные и фактические уровни содержания 4t-OP (мкг/л) в пробах воды в начале эксперимента и в конце (7 сут)

Вариант	Расчетные	Фактические в начале	Фактические в конце
Контроль	0	<0,01	<0,01
I	0,5	0,48±0,01	0,48±0,01
II	5	4,98±0,02	4,99±0,01
III	20	20,1±0,02	20,0±0,01
IV	100	101,1±0,01	101±0,01
V	200	198,9±0,01	199±0,01
VI	500	500,9±0,01	501±0,01
VII	1000	1000,1±0,01	1000±0,02

режим с постоянной скоростью потока газа-носителя (гелий) – 1,0 мл/мин, энергия ионизации – 70 эВ. При анализе использовалась капиллярная колонка средней полярности TR-5MS (60 × 0,25 × 0,25 мм). Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Термостат колонки нагревали по следующей программе: начальная температура 60 °С выдерживалась в течение 1 мин, затем колонку нагревали со скоростью 15 °С/мин до 280 °С (с 5-минутным выдерживанием). Общее время хроматографирования составило 31 мин. Предел количественного измерения 4t-ОР составил 0,01 мкг/л.

Биологические показатели. Скорость потребления кислорода (СПК) амфиподами в спокойном состоянии (обычное поведение без активного передвижения или охоты) определяли в закрытых респирометрах объемом 100 мл с фильтрованной водой. СПК рассчитывали по разнице между уровнями кислорода в опыте (с амфиподами) и контроле (без животных) после экспозиции 4 ч. Растворенный кислород измеряли с помощью оксиметра HANNA HI 9142 (Германия), откалиброванного перед началом измерений по стандарту. В одном измерении, которое для каждого варианта опыта повторяли по пять раз, участвовало от трех до пяти взрослых особей (длина тела от 6 до 9 мм). Сырую массу животных определяли на аналитических весах с точностью до 0,01 мг. Затем для сравнения СПК пересчитывалась на особь средней сырой массы (55 мг) за 1 ч.

Плодовитость, или количество яиц, откладываемых самкой *G. fasciatus* в природе, варьируется от 8 до 45, будучи связано степенной функцией с длиной тела самки [Panov, Berezina, 2002]. Измеряли длину тела самок (мм) и определяли индивидуальную плодовитость самок как общее число эмбрионов в марзупиуме. Затем рассчитывали средние величины плодовитости по всей выборке самок при n не менее 20 и приводили к одной длине для сравнения.

Частота эмбриональных нарушений. У разных видов амфипод описано семь [Pöckl, 1993] или девять [Sundelin et al., 2008] стадий развития яйца/эмбриона. У *G. fasciatus* развитие яиц длится 3–4 недели при температуре воды 12 °С; мы выделяли девять стадий согласно ранее приведенной классификации [Berezina et al., 2019]. Подробное описание эм-

бриональных стадий дано для амфипод *Gammarus fossarum* [Arambourou et al., 2017]; его также можно использовать для других видов гаммаридных амфипод, включая *G. fasciatus*. Новорожденные рачки остаются в марзупиуме (выводковой камере) самки в течение нескольких дней. Эмбрионы на IV–VIII стадиях органогенеза были осторожно изъяты из камеры и тщательно исследованы на наличие пороков развития. Для препарирования эмбрионов использовались тонкие иглы и пипетки.

Качество, смертность и количество аномалий эмбрионов *G. fasciatus* оценивали с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург), оснащенного дополнительными увеличительными линзами. Для подсчета и фотографирования фиксировали часть эмбрионов 0,02%-м раствором глутаральдегида. Фотографии сделаны с помощью фотокамеры Nikon.

Выявлено четыре основных типа аберрантных эмбрионов амфипод, которые легко поддаются количественной оценке [Sundelin, Eriksson, 1998; Sundelin et al., 2008]: 1) уродливые, 2) недифференцированные (когда стадия развития не ясна, поскольку они прекратили развитие), 3) с поврежденной мембраной и 4) мертвые эмбрионы. Эмбрионы классифицируются как уродливые, когда у них проявляются различные морфологические нарушения. Например, появляются сложные глаза, похожие на запятую; укорачиваются зачаточные конечности и средняя кишка, приобретая неправильную булавовидную форму. Также были описаны различные типы разрушений мембран [Sundelin et al., 2008]. Наиболее серьезные изменения отмечаются, когда липиды через нарушенные мембраны просачиваются через внутреннюю оболочку эмбриона. Незначительные дисфункции мембран могут привести к нарушению осмотической регуляции и накоплению воды внутри эмбриона, что приводит к отекам и увеличению размера эмбриона. Все перечисленные выше пороки развития, за исключением тех, которые описаны как “увеличенные эмбрионы” без каких-либо других отклонений, считаются летальными [Sundelin et al., 2008].

Частоту аберрантных эмбрионов (недифференцированных и с пороками развития) определяли как среднее процентное отношение числа аберрантных эмбрионов к общему

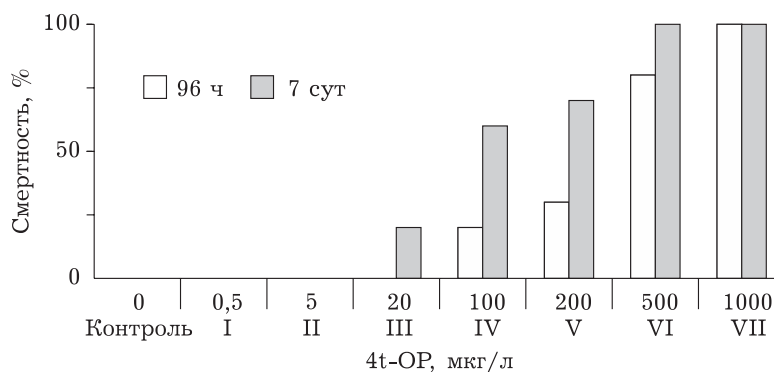


Рис. 1. Смертность рачков-амфипод *Gmelinoides fasciatus* при воздействии алкилфенола 4t-ОР в семи вариантах концентраций в воде и контроле (в отсутствие вещества)

числу эмбрионов в марзупиуме всех исследованных самок, пересчитывая на одну самку среднего размера.

Самцов обследовали через 28 сут содержания при концентрации 0,5 мкг/л 4t-ОР и в контроле. Проводили измерения длины тела, ширины головной капсулы, длины гнатопод I, глубины коксальных пластин IV под стереоскопическим микроскопом Olympus SZX2 с окулярами 10×, разрешением 5 мкм при увеличении 20×.

Статистика. Результаты экспериментов обрабатывали с помощью пакетов программ Excel и Statistica: определяли среднее арифметическое измерений, стандартное отклонение, значимость различий между вариантами оценивали по медианам с помощью непараметрического критерия Краскела – Уолли-

са с последующим парным сравнением по U-критерию Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. В случае данных, распределенных нормально, как при сравнении плодовитости самок и морфометрических показателей самцов, применялся однофакторный дисперсионный анализ с последующим парным сравнением выборок по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрации алкилфенола. Фактическое содержание 4t-ОР в воде вариантов опыта (I по VII) совпадало с расчетными величинами (см. табл. 1). Значимых различий между содержанием вещества в начале и конце эксперимента (7 сут) не обнаружено. В контроле содержание было ниже пределов обна-

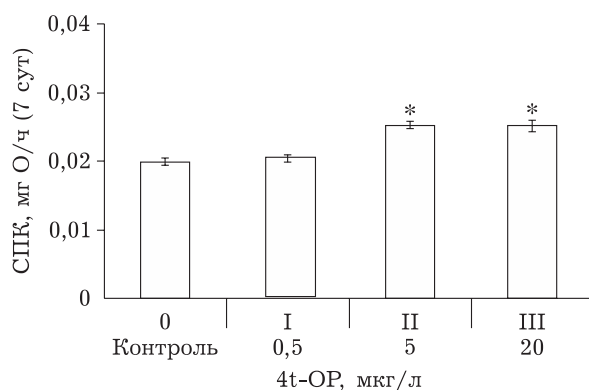


Рис. 2. Скорость потребления кислорода (среднее и стандартное отклонение) в контроле и после воздействия алкилфенола 4t-ОР в вариантах I, II и III. Звездочкой помечены величины, статистически отличные от контроля

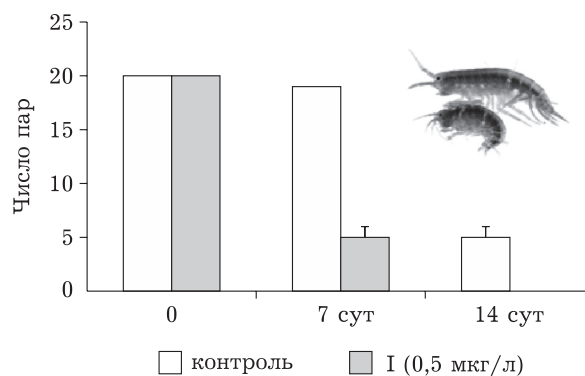


Рис. 3. Количество пар рачков-амфипод *Gmelinoides fasciatus* (среднее и стандартное отклонение) в контроле и при воздействии 0,5 мкг/л алкилфенола 4t-ОР (вариант I)

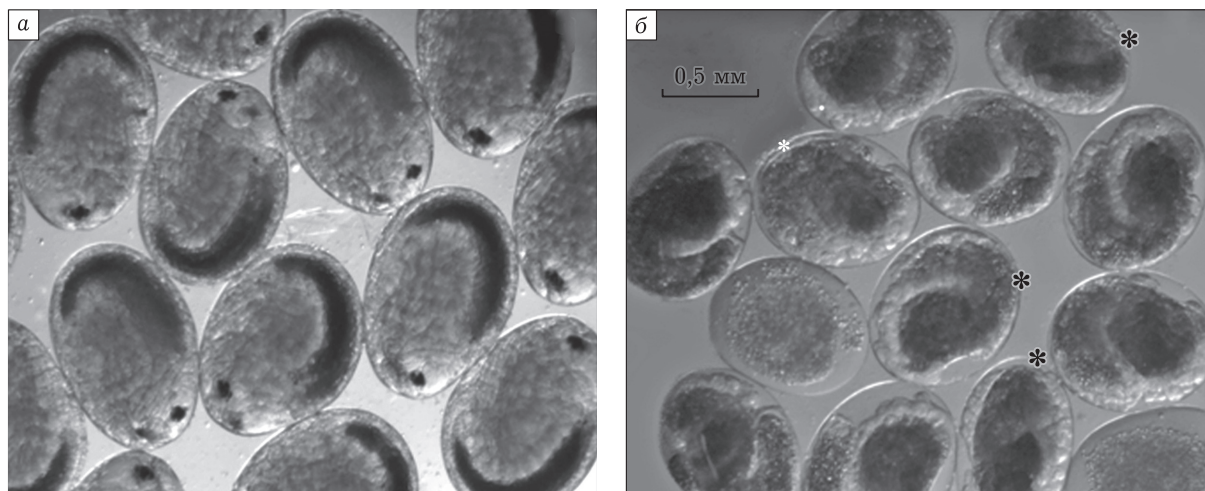


Рис. 4. Фото эмбрионов амфипод *Gmelinoides fasciatus*: нормальные (а) и с aberrациями развития (помечены звездочками, б)

ружения метода, т. е. вещество здесь не обнаружено.

Биологические показатели. Смертность была высокой при концентрациях 4t-OP > 200 мкг/л (рис. 1). Отсутствие смертности через 96 ч и 7 сут отмечали при концентрации 4t-OP 5 мкг/л и ниже.

Наименьшая концентрация 4t-OP (0,5 мкг/л, вариант I) не оказывала заметного эффекта на метаболическую активность рачков, оцениваемую по скорости потребления кислорода (рис. 2). При концентрациях 4t-OP 5 и 20 мг/л скорость потребления кислорода рачками средней сырой массы тела 55 мг статистически значимо выше (на 26–27 %), чем в контроле (тест Краскела – Уоллиса, $H = 5,33$, $p = 0,021$) с достоверной разницей между контролем и вариантами II и III (Манна – Уитни, $p < 0,05$).

Прекопуляторных пар амфипод при воздействии 4t-OP (0,5 мкг/л) было существенно меньше (25 % от начального количества) на 7-е сутки эксперимента, несмотря на их равное количество в начале эксперимента (рис. 3). В случае отсутствия влияния вещества (контроль) заметное снижение в количестве копулирующих пар отмечено только через 14 сут, что является естественным процессом – линькой и успешным оплодотворением.

Эмбрионы в марзупиумах (выводковых сумках) у самок, исследованные через 28 сут, были в плохом состоянии. Около 70 % из эмбрионов оказались нежизнеспособными и часть яиц неоплодотворена. В большинстве

своем эмбрионы остановили свое развитие на разных стадиях эмбриогенеза, они были нежизнеспособны (рис. 4).

Также часть погибших эмбрионов абортровалась, что привело к снижению общей плодовитости по сравнению с контролем (рис. 5). Вместе с тем доля эмбрионов с такими

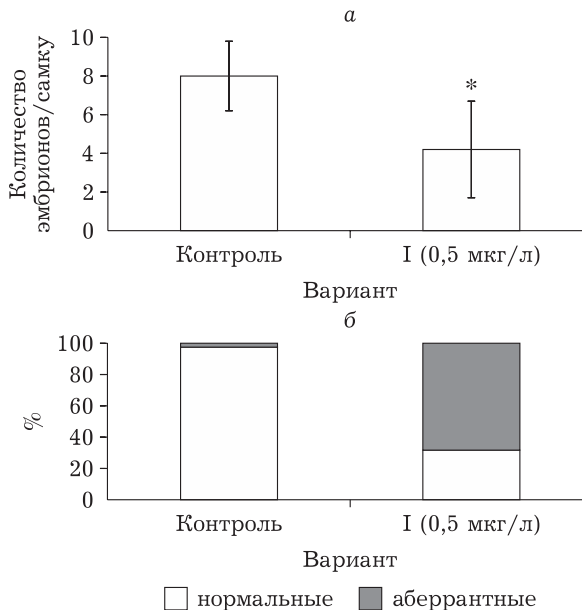


Рис. 5. Показатели плодовитости и качества эмбрионов амфипод *Gmelinoides fasciatus* в контроле и после 28 сут воздействия алкилфенола 4t-OP в концентрации 0,5 мкг/л (вариант I).

а – средняя величина плодовитости (и стандартное отклонение), различия значимы согласно $F_{(1, 28)} = 22,56$, $p < 0,0001$, $t_{stat} = 4,75$ ($t_{crit} = 1,71$), $p < 0,0001$; б – доля нормальных и аберрантных эмбрионов

Статистические показатели для шести переменных, измеренных у самцов амфипод *Gmelinoides fasciatus*, в контроле (К) и опыте (I)

	BL		HL		GRL		GLL		CoxD		CoxW	
	К	I	К	I	К	I	К	I	К	I	К	I
Mean	7,67	7,09	0,41	0,31	0,42	0,33	0,74	0,67	0,42	0,45	1,02	1,00
StE	0,14	0,25	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01
Median	7,54	7,38	0,42	0,33	0,42	0,36	0,71	0,66	0,42	0,44	1,02	1,01
StD	0,64	1,15	0,03	0,10	0,03	0,10	0,08	0,09	0,04	0,07	0,08	0,05
Min	6,46	4,77	0,38	0,16	0,35	0,20	0,59	0,52	0,35	0,35	0,89	0,89
Max	8,92	8,86	0,47	0,46	0,47	0,47	0,87	0,82	0,47	0,56	1,11	1,08
n	21	21	21	21	21	21	21	21	12	12	12	12
t stat	1,82		2,83		4,83		3,95		-3,54		0,06	
p	0,0841		0,0104		0,0001		0,0008		0,0046		0,9514	

П р и м е ч а н и е . BL – длина тела, мм; HL – длина головы, мм; GRL – длина правой гнатоподы I, мм; GLL – длина левой гнатоподы, мм; CoxD – глубина коксальной пластины IV, мм; CoxW – ширина коксальной пластины IV, мм. Значения p, при которых получены статистически значимые различия в показателях между двумя вариантами, выделены жирным шрифтом.

аберрациями, как мембранные дисфункции – разрушение мембран с утечкой липидов через внутреннюю оболочку яйца, была низка (3–5 %) как в контроле, так и в опыте (см. рис. 5).

Морфометрические показатели самцов амфипод при длительном содержании под дей-

ствием алкилфенолов приведены в табл. 2. Они были по большинству переменных различными между контролем и опытом (0,5 мкг/л 4t-OP) при $p < 0,05$. Однако по длине тела самцы обоих вариантов существенно не различались. При этом длина гнатопод I самцов опытного варианта примерно на 20 % меньше, а глубина коксальной пластины IV существенно больше, чем в контроле (рис. 6, см. табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Алкилфенолы группы неионогенных поверхностно-активных веществ представляют собой промышленные загрязнители, обычно встречающиеся в сточных водах, трудно разлагающиеся в окружающей среде. Они склонны к деградации в ксеноэстрогенные метаболиты, загрязняющие различные среды (в том числе воду и донные отложения), и могут вызывать эндокринные нарушения у водных животных, поскольку проявляют эстрогеноподобное действие [Soto et al., 1991; Gray et al., 1999]. Токсическое действие октилфенолов связано с их способностью имитировать естественные гормоны, нарушая функционирование эндокринной системы живых организмов [Soares et al., 2008]. Среди октилфенолов 4t-OP обладает наивысшей эстрогенной активностью [Sheikh et al., 2017].

В рассматриваемом случае действия 4t-OP выявлены значительные изменения в энерге-

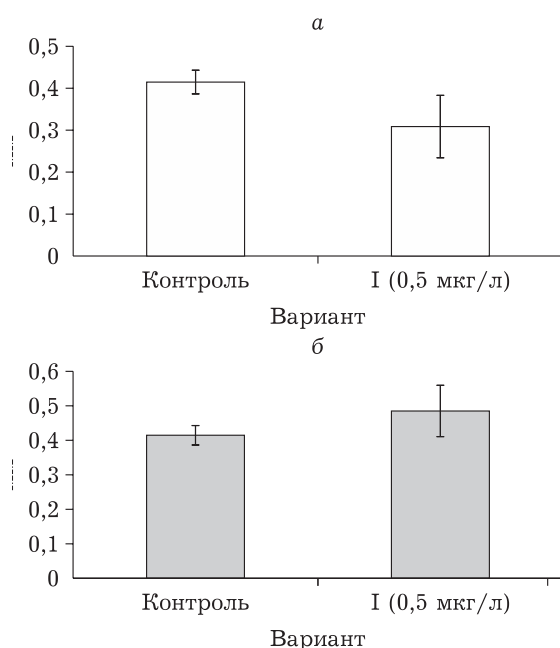


Рис. 6. Средние величины (и стандартное отклонение) длины правой гнатоподы I (a) и глубины коксальной пластины IV (б) самцов *Gmelinoides fasciatus* в контроле и опыте (вариант I). Статистические показатели см. в табл. 2

тическом обмене амфипод при концентрации 5 мкг/л, а репродуктивные нарушения, такие как снижение плодовитости и качества эмбрионов, нарушения в половом поведении (распад прекопуляторных пар), – при концентрации 0,5 мкг/л. К летальному исходу приводили концентрации 20 мкг/л и выше. В других случаях обнаружено неблагоприятное воздействие октилфенолов на молочные железы морских животных при концентрациях 6,1 мкг/л и выше, эти нарушения выражались в пролиферации опухолевых клеток железы [Soto et al., 1995]. Показано, что формирование биссусных нитей мидией Грея (*Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853)) ингибирует концентрация 4t-OP 1 мкг/л в морской воде [Кондакова, Черняев, 2018]. Принято, что октилфенол оказывает неблагоприятное воздействие на водных животных в концентрациях, превышающих 6 мкг/л [Environmental risk..., 2005]. Такие уровни отмечены в природных водоемах. Например, измеренная концентрация октилфенола достигала 13 мкг/л в воде в эстуарии р. Тиса [Blackburn, Waldock, 1995]. Данных о содержании этих веществ в природных водоемах немного, хотя известно, что октилфенолы обнаруживаются не только в воде, но накапливаются в биоте и в донных отложениях [Staniszewska et al., 2016; Зайцева, Медведева, 2019]. В пробах донных отложений, отобранных нами в 2018 г. в пяти точках восточной части Финского залива, измеренные уровни содержания октилфенола и этоксилатов были низки, ниже предела обнаружения – 3 мкг/кг сухого вещества. В других районах Балтийского моря измеренная концентрация октилфенола в донных отложениях достигала 100 мкг/кг массы сухого вещества [HELCOM, 2019]. Уровни безопасного воздействия (УБВ) 4t-OP, содержащегося в воде и биоте, не определены, при этом расчетные уровни УБВ для октилфенолов в донных отложениях (илах), рассчитанные Международной организацией по защите Балтийского моря, составляют 17 мкг/кг массы сухого вещества [HELCOM, 2019], что требует экспериментальной проверки.

Пороговые уровни для 4t-OP в воде, которые служат своего рода ориентиром “хорошего качества поверхностных водоемов”, до сих пор не определены. Настоящим исследованием показано, что концентрации около 0,5 мкг/л при воздействии воды вызывают ре-

акции эндокринного типа, тогда как смерть рачков наступает при концентрациях в воде в 40 раз выше. По-видимому, концентрации 4t-OP 0,5 мкг/л и, тем более, выше следует считать потенциально опасными для организмов в Балтийском море и других водоемах. Воздействие концентраций октилфенола при этой концентрации приводило к увеличению затрат организмов на энергетический обмен, снижению успеха оплодотворения яиц (из-за антиандрогенного эффекта у самцов), ухудшению качества и количества эмбрионов. Последствием всех этих нарушений стала низкая плодовитость популяции, что в последующем приведет к снижению и численности вида, и возможному сокращению биоразнообразия. Таким образом, текущие методологии скрининга и мониторинговой оценки биологических эффектов загрязнений должны идентифицировать 4t-OP как опасное вещество с высоким экологическим риском, которое может вызывать необратимые нарушения у водных животных.

У амфипод разных видов (включая *G. fasciatus*) есть прекопуляторная стадия, протекающая в период до линьки, предшествующей откладыванию яиц. В процессе этой стадии самцы амфипод удерживают половозрелых самок гнатоподами, хватаясь за первую стернитную область карапакса, тем самым повышая возможность оплодотворения яиц. Уменьшенный размер гнатопод самцов *G. fasciatus* при воздействии 4t-OP может уменьшить шансы “удерживания” самок, это подтверждается низкой долей спаривающихся особей через 7 сут воздействия, а также наличием неоплодотворенных яиц у самок.

Изучению репродуктивных нарушений амфипод разных видов под влиянием загрязнения водной среды в природе и в эксперименте посвящено множество работ [Sundelin, Eriksson, 1998; Camus, Olsen, 2008; Mann, Hyne, 2008; Arambourou et al., 2017; Berezina et al., 2019]. В настоящее время рассматривается возможность использования нового биомаркера – “частота эмбрионов с нарушениями развития”, для оценки неблагополучного состояния биотопы [HELCOM, 2023]. Например, в Ботническом заливе (северная часть Балтийского моря) наблюдалась корреляция между расстоянием до промышленного предприятия и частотой выявления аберрантных эмбрионов

амфипод [Sundelin et al., 2008; Reutgard et al., 2014]. В лабораторных исследованиях замечено, что самки *M. affinis* производят повышенное количество эмбрионов с уродствами в результате воздействия отложений, насыщенных определенными химическими веществами [Eriksson et al., 1996; Jacobson, Sundelin, 2006]. В Финском заливе частота эмбрионов с уродствами в полевых популяциях амфипод *G. fasciatus* и других видов (*Gammarus tigrinus* Sexton, 1939 и *Pontogammarus robustoides* (Sars, 1894)) использовались в комплексной оценке окружающей среды при комбинированном воздействии химического загрязнения (металлов и полициклических ароматических углеводородов) и эвтрофикации (высокого уровня растворенного фосфора и низкого уровня кислорода в воде; см. [Berezina et al., 2017]).

В рассматриваемом случае изучения действия алкилфенола (4t-OP) в концентрации 0,5 мкг/л мы не обнаружили существенного увеличения уродств развития (тератогенный эффект), вместе с тем выявлены существенные репродуктивные нарушения (снижение прекопуляторной активности, т. е. способности к образованию пар), признаки демаскулинизации самцов, высокая смертность эмбрионов и снижение общей плодовитости самок. Плодовитость, выживаемость яиц и количество новорожденных определяют репродуктивный успех популяции и зависят от размера самки (видовой принадлежности) и всех условий окружающей среды, которые прямо или косвенно могут повлиять на период эмбриогенеза. В естественных условиях в отсутствие загрязнения уровень abortируемых амфиподами яиц, т. е. разница между средним количеством отложенных яиц (стадии эмбриогенеза 1–2) и неонатов (новорожденных) может составлять 25–36 % [Röckl, 1993; Berezina, 2011]. В этом эксперименте плодовитость (количество эмбрионов на одну самку) при химическом загрязнении воды почти в 2 раза ниже, чем в контроле. При этом количестве эмбрионов более 70 % из них имели серьезные нарушения и остановили развитие, они нежизнеспособны. Таким образом, выживаемость эмбрионов очень низка – менее 10 % по сравнению с контролем.

Количество пар амфипод резко снизилось при воздействии 4t-OP в концентрации 0,5 мкг/л. Считается, что OP обладает ан-

тиандрогенной активностью, которая влияет на активность ароматазы и функцию рецептора арильных углеводов рыб [Bonefeld-Jorgensen et al., 2007]. При долговременном воздействии этих концентраций 4t-OP на самцов в проведенном эксперименте выявлен эффект демаскулинизации – уменьшение размера гнатопод, важного органа удержания самок на стадии прекопуляции, что важно для успеха оплодотворения яиц. В частности, для самцов одного размера тела получены значимые различия между контролем и опытом в размерных характеристиках гнатопод I, имеющих первостепенное значение для успешности спаривания, и увеличения глубины коксальных пластин IV (признак самки). Ранее в природных условиях показано, что морфологические аномалии, наблюдаемые у интерсексуальных особей амфипод, могут привести к снижению успешности спаривания [Ford et al., 2003].

Снижение плодовитости *G. fasciatus* возможно связано с эндокринными нарушениями, хотя в рамках проведенной работы эта гипотеза не проверялась. Сравнение плодовитости нормальных и интерсексуальных самок в природной популяции *Echinogammarus marinus* [Leach, 1816] показало снижение плодовитости (т. е. производство меньшего количества яиц) и фертильности у последних [Ford et al., 2003]. Нормальные самки давали примерно на 20 % больше отпрысков, чем интерсексуальные. Было высказано предположение, что причины снижения плодовитости связаны с включением тестикулярной ткани в яичник самки и пассивной потерей эмбрионов из выводковой сумки (марзупиума) через деформированные коксальные пластинки или активным выбросом нежизнеспособных эмбрионов [Ford et al., 2003].

К причинам появления особей с признаками самца и самки (интерсексов) относятся: паразитизм [Bulnheim, 1977], бактериальная инфекция [Rigaud, Juchault, 2011], протандрический гермафродитизм [Yaldwyn, 1966] и загрязнение [Moore, Stevenson, 1991; Ford et al., 2003]. Интерсексуальные самцы сформировали промежуточную группу, основанную на размере гнатопод, между нормальными самцами с более крупными гнатоподами и нормальными самками, у которых гнатоподы мельче по природе [Ford et al., 2004]. Поэтому размеры гнатопод амфипод были предложены

как маркеры для оценки количества интерсексов в популяции и качества окружающей среды [Ford et al., 2006]. При отсутствии загрязнения количество интерсексов у амфипод многих видов составило 5–8 %, а при наличии загрязнения оно выше 14–15 % [Ford et al., 2004]. Несмотря на то что базовый уровень интерсексуальности может проявляться естественным образом в некоторых популяциях беспозвоночных, причины его возникновения многогранны и в основном связаны с загрязнением окружающей среды эстрогенными и оловоорганическими веществами, разрушающими эндокринную систему организмов, и некоторыми другими причинами (паразитизмом, генетическими аномалиями определения пола) [Grilo, Rosa, 2017].

Проведенное исследование подтверждает высокую токсичность октилфенола даже при воздействии его нелетальных концентраций, что приводит к необратимым нарушениям функционирования водных организмов, в том числе к нарушениям метаболических процессов и репродукции. Такие реакции в отдаленном периоде могут влиять на численность и существование биотических популяций и видовое разнообразие биоты.

Работа выполнена по госзаданиям № 122031 100274-7 и № 122041100086-5 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и при поддержке Программы российско-эстонского приграничного сотрудничества (грант ER90 HAZLESS, 2019–2022 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

- Зайцева Т. Б., Медведева Н. Г. Молекулярные механизмы стрессового ответа цианобактерии *Planktothrix agardhii* на воздействие 4-трет-октилфенола // Микробиология. 2019. Т. 88, № 4. С. 417–425.
- Кондакова А. С., Черняев А. П. Влияние алкилфенолов на процесс биссуообразования у мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) // Достижения науки и образования. 2018. № 13 (35). С. 4–8.
- Arambourou H., Decamps A., Quéau H., Dabrin A., Neuzeret D., Chaumot A. Use of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) embryo for toxicity testing: a case study with cadmium // Environ. Toxicol. Chem. 2017. Vol. 36, N 9. P. 2436–2443.
- Berezina N. A. Perch-mediated shifts in reproductive variables of *Gammarus lacustris* (Amphipoda, Gammaridae) in lakes of northern Russia // Crustaceana. 2011. Vol. 84, N 5-6. P. 523–542.
- Berezina N. A., Gubelit Y. I., Polyak Y. M., Sharov A. N., Kudryavtseva V. A., Lubimtsev V. A., Petukhov V. A., Shigaeva T. D. An integrated approach to the assessment of the eastern Gulf of Finland health: A case study of coastal habitats // J. Mar. Syst. 2017. Vol. 171. P. 159–171.
- Berezina N. A., Lehtonen K. K., Ahvo A. Coupled application of antioxidant defense response and embryo development in amphipod crustaceans in the assessment of sediment toxicity // Environ. Toxicol. and Chem. 2019. Vol. 38 (9). P. 2020–2031.
- Berezina N., Strode E., Lehtonen K., Balode M., Golubkov S. Sediment quality assessment using *Gmelinoides fasciatus* and *Monoporeia affinis* (Amphipoda, Gammaridae) in the northeastern Baltic Sea // Crustaceana. 2013. Vol. 86 (7-8). P. 780–801.
- Blackburn M. A., Waldock M. J. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales // J. Water Resources. 1995. Vol. 2. P. 1623–1629.
- Bonefeld-Jorgensen E. C., Long M., Hofmeister M. V., Vinggaard A. M. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review // Environmental Health Perspective. 2007. Vol. 115. P. 69–76.
- Bulnheim H.-P. Sexual transformation in *Gammarus duebeni* (Crustacea, Amphipoda) under the influence of hormonal and parasitic factors // Biologisches Zentralblatt. 1977. Vol. 96. P. 61–78.
- Camus L., Olsen G. H. Embryo aberrations in sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* exposed to water soluble fraction of oil // Mar. Environ. Res. 2008. Vol. 66, N 1. P. 221–222.
- Environmental risk evaluation report. 4-tertOctylphenol. Environmental Agency, 2005. 218 p. <https://www.gov.uk/government/publications/environmental-risk-evaluation-reports>.
- Eriksson A.-K., Sundelin B., Broman D., Näf C. Effects on *Monoporeia affinis* of HPLC-fractionated extracts of bottom sediments from a pulp mill recipient // Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents / Eds.: M. R. Servos, K. R. Munkittrich, J. H. Carey, G. J. Kraak van der. Florida: St Lucie Press, 1996. P. 69–78.
- Ford A. T., Fernandes T. F., Rider S. A., Read P. A., Robinson C. D., Davies I. M. Reproduction in the amphipod, *Echinogammarus marinus*: a comparison between normal and intersex specimens // J. Mar. Biol. Associat. UK. 2003. Vol. 83. P. 937–940.
- Ford A. T., Fernandes T. F., Robinson C. D., Davies I. M., Read P. A. Can industrial pollution cause intersexuality in the amphipod, *Echinogammarus marinus*? // Mar. Pollut. Bull. 2006. Vol. 53, N 1-4. P. 100–106.
- Ford A. T., Fernandes T., Rider S., Read P., Robinson C., Davies I. Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of intersexuality and de-masculinisation // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58, N 2-5. P. 169–173.
- Gray M. A., Teather K. L., Metcalfe C. D. Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol // Environ. Toxicol. Chem. 1999. Vol. 18. P. 2587–2594.
- Grilo T. F., Rosa R. Intersexuality in aquatic invertebrates: Prevalence and causes // Sci. Total Environ. 2017. Vol. 592. P. 714–728.
- HELCOM. Hazardous substances of specific concern to the Baltic Sea. Final report of the HAZARDOUS project // Baltic Sea Environ. Proc. 2019. N 119. <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2019/08/BSEP119.pdf>.

- HELCOM. Reproductive disorders: malformed embryos of amphipods. HELCOM supplementary indicator report. 2023. <https://indicators.helcom.fi>.
- Jacobson T., Sundelin B. Reproductive effects of the endocrine disruptor fenarimol on a Baltic amphipod *Monoporeia affinis* // Environ. Toxicol. Chem. 2006. Vol. 25. P. 1126–1131.
- Kinnberg K., Korsgaard B., Bjerregaard P. Effects of octylphenol and 17 β -estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother // Comparat. Biochem. Physiol. Part C. Toxicol. and Pharmacol. 2003. Vol. 134. P. 45–55.
- Kuprijanov I., Väli G., Sharov A., Berezina N., Liblik T., Lips U., Kolesova N., Maanio J., Junttila V., Lips I. Hazardous substances in the sediments and their pathways from potential sources in the eastern Gulf of Finland // Mar. Pollut. Bull. 2021. Vol. 170. 112642. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112642>
- Lee Y. M., Seo J. S., Kim I. C., Yoon Y. D., Lee J. S. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 345 (2). P. 894–903.
- Madsen L. L., Korsgaard B., Bjerregaard P. Estrogenic effects in flounder *Platichthys flesus* orally exposed to 4-tert-octylphenol // Aquat. Toxicol. 2003. Vol. 64. P. 393–405.
- Mann R., Hyne R. Embryological development of the Australian amphipod, *Melita plumosa* Zeidler, 1989 (Amphipoda, Gammaridea, Melitidae) // Crustaceana. 2008. Vol. 81 (1). P. 57–66.
- Miyagawa S., T. Sato, Iguchi T. Subchapter 129B – Octylphenol // Handbook of Hormones. Ando H., Ukena K., Nagata S. (eds.). Cambridge: Academic Press, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820649-2.00276-X>.
- Moore C. G., Stevenson J. M. The occurrence of intersexuality in harpacticoid copepods and its relationship with pollution // Mar. Pollut. Bull. 1991. Vol. 22. P. 72–74.
- Nimrod A. C., Benson W. H. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates // Critical Rev. Toxicol. 1996. Vol. 26 (3). P. 335–364. <https://doi.org/10.3109/10408449609012527>
- Panov V. E., Berezina N. A. Invasion history, biology and impacts of the Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) // Invasive Aquatic Species of Europe / Eds.: E. Leppäkoski, S. Olenin, S. Gollasch. Dordrecht: Kluwer Publisher, 2002. P. 96–103.
- Pöckl M. Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers // Freshwater Biol. 1993. Vol. 30. P. 73–91.
- Reutgard M., Eriksson Wiklund A.-K., Breitholtz M., Sundelin B. Embryo development of the benthic amphipod *Monoporeia affinis* as a tool for monitoring and assessment of biological effects of contaminants in the field: A meta-analysis // Ecol. Indicat. 2014. Vol. 36. P. 483–490.
- Rigaud T., Juchault P. Sterile intersexuality in an isopod induced by the interaction between a bacterium (*Wolbachia*) and the environment // Can. J. Zool. 2011. Vol. 76, N 3. P. 493–499.
- Sheikh I. F., Tayubi I. A., Ahmad E., Ganaie M. A., Bajjouh O. S., AlBasri S. F., Abdulkarim I. M. J., Beg M. A. Computational insights into the molecular interactions of environmental xenoestrogens 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol, bisphenol A (BPA), and BPA metabolite, 4-methyl-2, 4-bis(4-hydroxyphenyl) pent-1-ene (MBP) with human sex hormone-binding globulin // Ecotoxicol. Environmen. Safety. 2017. Vol. 135. P. 284–291.
- Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J. N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters // Environ. International. 2008. Vol. 34 (7). P. 1033–1049. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.01.004>
- Soto A. M., Justicia H., Wray J. W., Sonnenschein C. p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene // Environ. Health Perspectives. 1991. Vol. 92. P. 167–173.
- Soto A. M., Sonnenschein C., Chung K. L., Fernandez M. F., Olea N., Serrano F. O. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants // Environ. Health Perspective. 1995. Vol. 103. Suppl. 7. P. 113–122.
- Staniszewska M., Nehring I., Mudrak-Cegiółka S. Changes of concentrations and possibility of accumulation of bisphenol A and alkylphenols, depending on biomass and composition, in zooplankton of the Southern Baltic (Gulf of Gdansk) // Environm. Pollut. 2016. Vol. 213. P. 489–501.
- Sundelin B., Eriksson A.-K. Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea // Mar. Ecol. Progr. Ser. 1998. Vol. 171. P. 165–180.
- Sundelin B., Eriksson Wiklund A.-K., Ford A. T. Biological effects of contaminants: the use of embryo aberrations in amphipod crustaceans for measuring effects of environmental stressors // ICES Techniq. Mar. Environ. Sci. 2008. N 41.
- Yaldwyn J. C. Protandrous hermaphroditism in decapod prawns of the families Hippolytidae and Campylonotidae. London: Nature, 1966. Vol. 209. P. 1366.

Physiological and reproductive disorders of the Baltic amphipods *Gmelinoides fasciatus* exposed to 4-*tert*-Octylphenol

N. A. BEREZINA¹, N. M. SUKHIKH¹, A. V. EGOROVA², Z. A. ZHAKOVSKAYA²

¹ Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences
199034, St. Petersburg, Universitetskaya emb., 1

² St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences
199178, St. Petersburg, 14th line of Vasilyevsky Island, 39

The industrial chemicals alkylphenols are xenoestrogens, but the sublethal effects of these substances on aquatic animals are poorly studied. The aim of this work was to study possible metabolic and reproductive disorders in amphipods, on the example of the species *Gmelinoides fasciatus* from the Gulf of Finland of the Baltic Sea, after experimental exposure to 4-*tert*-octylphenol (4t-OP) from the group of alkylphenols. The mortality of *G. fasciatus* amphipods in the 4t-OP concentration range from 0.5 to 1000 µg/L after 96 hours and 7 days increased with increasing concentration. It was absent at 4t-OP concentrations of 0.5 and 5 µg/L. At a concentration of 4t-OP of 20 µg/L, after 7 days, the mortality of crustaceans was 20 %, and at its concentration of 100 µg/L, it was 60 %. When exposed to sublethal concentrations of 4t-OP (0.5 µg/L), these amphipods showed a decrease in sexual activity after one week of amphipods: only 25 % of amphipods retained precopulatory pairs versus 100 % in control. Under chronic exposure (28 days) to the lowest concentration, males showed signs of demasculinization (decrease in the width of the gnathopods and an increase in the depth of the coxal plates); females showed a decrease in the overall fecundity and irreversible disturbances in state of embryos, namely, a high proportion (>50 %) of embryos that stopped their development at different stages of organogenesis. The conducted study shows significant functional disorders of metabolic processes and reproduction in crustaceans even when exposed to non-lethal concentrations of octylphenol. These results confirm the high toxicity of this industrial pollutant, the presence of which in the aquatic environment can lead to irreversible changes in the biota.

Key words: amphipods, rate of oxygen consumption, reproduction, state of embryos, morphological structures, gnathopods, alkylphenols, xenoestrogens, Gulf of Finland.