

На правах рукописи

МАРКИНА Жанна Васильевна

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
МОРСКОЙ ВОДЫ И ДЕЙСТВИЯ ДЕТЕРГЕНТОВ**

03.00.18 – гидробиология

03.00.16 – экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



Владивосток - 2008

Работа выполнена в Лаборатории физиологии
Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Научный руководитель кандидат биологических наук, доцент Айздайчер
Нина Александровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Бузолева Любовь Степановна

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Латыпов Юрий Яковлевич

Ведущая организация Московский государственный университет им.
М.В. Ломоносова

Защита состоится 17 октября 2008 г. в 12 часов на заседании
диссертационного совета Д 005.008.02 при Институте биологии моря им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН по адресу:

690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17, факс (4232) 310900.
Электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Автореферат разослан “10” сентября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Костина Е.Е.

Актуальность работы

Одноклеточные водоросли – важный компонент морских экосистем. Они одни из первых страдают от воздействия токсических веществ, что приводит к нарушению функционирования всей экосистемы (Патин, 1979; Эколого-токсикологические..., 1985; Blasco et al., 2003). В морскую среду попадают различные токсиканты, в том числе детергенты и их основной компонент – поверхностно-активные вещества (ПАВ). Действие этих веществ на микроводоросли является многофакторным, что выражается в изменении функционирования клеток и их гибели. С другой стороны, наличие в составе детергентов фосфорных компонентов способствует евтрофикации, последствия которой ведут к увеличению числа клеток отдельных видов водорослей при одновременном снижении видового разнообразия (Lewis, Hamm, 1986; Брагинский и др., 1987; Паршикова, Негруцкий, 1988; Belanger et al., 2002; Lizotte et al., 2002; Wong et al., 2003).

В настоящее время в исследованиях с микроводорослями оценивается только влияние ПАВ, а не детергентов в целом (Aidar et al., 1997; Utsunomia et al., 1997a,b; Hampel et al., 2001; Morgeno-Garrido et al., 2001; Sun et al., 2004 и др.). В связи с этим, наряду с изучением воздействия отдельных ПАВ необходимо оценивать воздействие детергентов (Патин, 1979; Lewis, 1992; Жмур, 1997; Pettersson et al., 2000; Остроумов, 2001). При этом важно исследовать действие токсических агентов как на рост, так и на физиологическое состояние одноклеточных водорослей.

Среди огромного разнообразия микроводорослей наиболее часто для оценки действия веществ применяются обитающие в планктоне водоросли отдела Chlorophyta, в то время как представители других отделов остаются малоизученными (Lewis et al., 1990a, Hampel et al., 2001), что особенно касается бентосных микроводорослей (Morgeno-Garrido et al., 2003a,b).

Загрязнение морской воды является комплексным и, следовательно, оценку его характера и действия можно провести только с помощью биотестирования, которое средством получения принципиально новой информации о загрязнении (Флеров, 1983; Крайнюкова, 1988; Жмур, 1997; Черкашин, 2001; Терехова, 2003). Одноклеточные водоросли, вследствие круглогодичной доступности и высокой

чувствительности, широко применяются в качестве тест-объектов при биотестировании (Walsh, Garnes, 1983; Крайнюкова, 1988; Lewis, 1995; Жмур, 1997; Руководство, 2002). В то же время микроводоросли для биотестирования вод зал. Петра Великого Японского моря до настоящего времени не использовали.

В связи с вышеизложенным очевидна актуальность исследования влияния ПАВ и детергентов на микроводоросли, а также возможность применения данных организмов в качестве тест-объектов для биотестирования прибрежных морских вод.

Цель работы заключалась в изучении действия детергентов и прибрежных вод зал. Петра Великого Японского моря на микроводоросли разных систематических групп.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

1. Исследовать чувствительность микроводорослей *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta), *Plagioselmis prolunga* Butch. (Cryptophyta), *Attheya ussurensis* Stonik, Orlova & Crawford (Bacillariophyta) к модельному токсиканту бихромату калия.
2. Выявить, используя в качестве модельного объекта *D. salina*, оптимальные условия опыта (возраст, численность клеток, время введения токсиканта) для изучения влияния ПАВ и детергентов и оценки качества вод.
3. Исследовать действие поверхностно-активного вещества и детергентов на динамику численности клеток, скорость их роста, изменение pH культуральной среды, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов и кислородную продуктивность микроводорослей *D. salina*, *A. ussurensis*, *P. prolunga*.
4. Исследовать действие поверхностно-активного вещества и детергентов на подвижность клеток *P. prolunga* и скорость их движения.
5. Показать возможность биотестирования прибрежных вод зал. Петра Великого с помощью микроводорослей *D. salina* и *P. prolunga*.

Личное участие в получении научных результатов. Личное участие заключается в планировании и проведении экспериментальной работы.

Самостоятельно осуществляла микроскопические и химические методы исследования, интерпретацию полученных данных и формулирование научных выводов. Все заимствованные данные, использованные в работе, имеют ссылки на их источники.

Научная новизна: впервые оценена степень чувствительности микроводорослей *D. salina*, *P. prolonga* и *A. ussurensis* по их реакции на модельный токсикант бихромат калия. Исследовано применение новых тест-объектов: микроводорослей *P. prolonga* и *A. ussurensis* при изучении действия ПАВ и детергентов, а также качества морских вод на примере зал. Петра Великого Японского моря. Установлено, что подвижность клеток *P. prolonga* – наиболее чувствительный показатель к действию ПАВ и детергентов, который может быть использован для тестирования морской воды.

Практическая значимость: полученные сведения пополняют знания о действии ПАВ и детергентов на микроводоросли. Эти данные могут быть использованы при разработке систем оценки действия ПАВ и детергентов. Данные, полученные в ходе биотестирования прибрежных вод зал. Петра Великого с помощью микроводорослей, дают дополнительную информацию о свойствах загрязнения прибрежных вод залива и их действия на морскую биоту. Они могут быть использованы при проведении мониторинга качества морских вод и при оценке среды в районах развития марикультурных хозяйств. Разработанные методики по определению действия ПАВ и детергентов применяли на практических работах в курсе “Большой практикум” для студентов-экологов.

Защищаемые положения:

1. ПАВ и детергенты оказывают влияние на *D. salina*, *A. ussurensis* и *P. prolonga* в концентрациях 0.1, 1 и 10 мг/л. Воздействие токсикантов усиливается с возрастанием их концентраций.
2. Наиболее чувствительным показателем действия ПАВ и детергентов является подвижность клеток *P. prolonga*, что позволяет использовать ее для оценки качества морских вод.

Апробация работы. Результаты и основные положения работы докладывались на V, VI, VII Региональных конференциях по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии (Владивосток, 2002;

2003; 2004), VII и IX международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2004, 2005), Международной конференции “Bridges of science between north America and the Russian Far East: past, present and future” (Владивосток, 2004), IX и X дальневосточных молодежных школах-конференциях по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2005; 2006), II Международной конференции “Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов” (Петрозаводск, 2007) и ежегодных конференциях ИБМ ДВО РАН (2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Фонда содействия отечественной науке (2007; 2008 гг.).

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 122 страницах и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы (191 источник, из них 87 иностранных). Работа включает 6 таблиц и 23 рисунка.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Н.А. Айздайчер за помощь на всех этапах планирования и выполнения работы. Особую признательность выражаю доценту Е.В. Журавель за интерес к работе и участие в обсуждении результатов исследования, д.б.н. В.П. Челомину, к.б.н. Л.Т. Ковековдой и к.б.н. Г.М. Каменеву за критические замечания и ценные советы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обобщены литературные сведения о составе детергентов, рассмотрена классификация ПАВ. Представлены сведения об источниках и объемах содержания ПАВ в морских водах. Проанализированы данные о микроводорослях как объектах экотоксикологических исследований. Рассмотрено влияние анионных ПАВ и детергентов на динамику численности, физиологическое состояние и биохимический состав микроводорослей.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и условия эксперимента

Оценку действия ПАВ и детергентов проводили на *D. salina* (Chlorophyta), *P. prolonga* (Cryptophyta) и *A. ussurensis* (Bacillariophyta).

D. salina – планктонная подвижная водоросль. Выбор в качестве объекта исследования обусловлен широким применением ее для оценки токсичности веществ и качества вод. *P. prolonga* также планктонный активно подвижный вид. Преимуществом этой водоросли является способность оставаться подвижной при пересеве в свежую среду в отличие от *D. salina*, которая кратковременно утрачивает подвижность в данных условиях. Необходимость исследования *P. prolonga* связана с широким распространением криптофитовых в прибрежных водах дальневосточных морей, ее подвижностью, значительной ролью в экосистемах, способностью вызывать “красные приливы”, в том числе и в Амурском заливе Японского моря (Коновалова, 1999; Бегун, 2006). *A. ussurensis* является бентосным видом, обитающим в зал. Петра Великого (Stonik et al., 2006); необходимость исследования данной водоросли связана, прежде всего с тем, что количество работ по бентосным микроводорослям ограничено. Сходство исследованных водорослей заключается в наличии основного пигмента – хлорофилла *a*. Кроме того, все виды микроводорослей соответствуют одному из важных требований к тест-объектам – они легко и в течение длительного времени поддерживаются в лабораторной культуре.

Тест-объектами для биотестирования вод зал. Петра Великого служили *D. salina* как часто применяемая для данных целей водоросль (Стом и др., 1984; Балаян, Стом, 1988; Рудик и др., 1995) и *P. prolonga* – организм, предложенный нами в качестве нового тест-объекта, дающий оперативный отклик на загрязнение и обладающий чувствительным показателем – подвижностью клеток (Айздайчер, Маркина, 2006; Маркина, 2008).

Альгологически чистую культуру микроводоросли *D. salina* выращивали на среде Гольдберга (Кабанова, 1961), *P. prolonga* и *A. ussurensis* – на среде *f* (Guillard, Ryther, 1962). Водоросли культивировали при температуре $20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ и светотемновом периоде 12 ч свет: 12 ч темнота.

Для проверки чувствительности культур микроводорослей оценивали действие модельного токсиканта бихромата калия производства фирмы “Sigma” в

концентрациях 1 до 10 мг/л (Руководство..., 2002). Среднюю эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) для бихромата калия устанавливали графическим способом, применяя пробит-анализ (Руководство, 2002).

В опытах исследовали влияние додецилсульфата натрия (ДСН) производства фирмы “Serva” (Германия) и используемых в быту детергентов “Обычный порошок” (Байкальская косметика) и “Ariel” (Procter & Gamble) в концентрациях 0.1; 1 и 10 мг/л. Уровень содержания 0.1 мг/л ПАВ соответствует ПДК для рыбохозяйственных водоемов в России (Перечень..., 1995). Концентрации до 1 мг/л токсикантов отмечены в морских водах (Остроумов, 2001), а в некоторых случаях уровень их содержания может достигать до 97 мг/л (Наумов, 2006), поэтому нами также исследована концентрация 10 мг/л токсикантов.

Продолжительность опытов – 4 сут при выяснении действия модельного токсиканта (бихромата калия), 14 сут при оценке влияния ПАВ и детергентов на микроводоросли, для биотестирования морской воды – 7 сут (Руководство..., 2002).

Для оценки действия загрязняющих агентов использовали численность клеток, скорость их роста – показатели часто применяемые для оценки токсического действия. Как указывает Брагинский с соавторами (1987), содержание фотосинтетических пигментов и кислородная продуктивность – также интегральные показатели действия токсикантов на микроводоросль, отражающие изменение всей совокупности метаболических процессов организма.

Подсчет численности клеток. В настоящей работе для определения интенсивности роста культур водорослей использовали подсчет численности клеток. В связи с этим термин “рост” означает увеличение численности клеток в единице объема. Численность клеток *D. salina* и *P. prolonga* считали в камере Горяева; клетки *A. ussurensis* – в счетной камере типа Ножотта объемом 0.044 мл под микроскопом “Jenamed 2” на 1, 2, 3, 4, 7, 10 и 14 сут экспериментов (Методы..., 1975; Методические..., 1998).

Скорость роста рассчитывали в начале и в конце экспоненциальной фазы (на 1 и 4 сут эксперимента) по стандартной формуле (Guillard, Ryther, 1962).

Измерение рН культуральной среды проводили с помощью рН-метра HI 8314 фирмы “Hanna” с точностью до 0.01 через 1, 2, 3, 4, 7, 10 и 14 сут опытов.

Определение содержания хлорофилла *a* и суммарной концентрации каротиноидов у микроводорослей проводили по стандартной методике (Lorenzen, 1967; Jeffrey, Humphrey, 1975; Вода, 1990). Отбор проб для определения концентрации фотосинтетических пигментов производили на 2, 4, 7, 10 и 14 сут опытов.

Кислородную продуктивность микроводорослей определяли йодометрическим методом (Методы..., 1975) на 2, 4, 7, 10 и 14-е сут.

Определение **скорости движения клеток** производили в счетной камере Горяева путем подсчета количества клеток, проходящих через заданную поверхность за 60 сек, и вычисляли скорость движения клеток, используя формулу (Ojakian, Katz, 1973)

Краткая характеристика района работ. Тестируемая вода отбиралась из акваторий с разной степенью антропогенной нагрузки: Амурский залив, на берегах которого расположен крупный город-порт Владивосток, зал. Восток, испытывающий сезонное влияние отдыхающих, и юго-западной части зал. Петра Великого вблизи устья р. Туманной, поставляющей широкий спектр загрязняющих веществ (Ващенко, 2000; Наумов, 2006). Воду для биотестирования отбирали на 10 станциях в августе – сентябре 2003 и 2006 гг. (глубина отбора воды 0.5 – 1 м) (рис. 1).



Рис. 1. Расположение станций отбора проб воды.

Все эксперименты, представленные в работе, проведены в трех повторностях. На графиках средние арифметические значения и стандартные отклонения рассчитаны с помощью программы Excel.

Всего обработано 1473 пробы.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка токсичности веществ и качества среды с помощью лабораторных тест-объектов предполагает не только точное следование методике и условиям, при которых проводится биотестирование, но и проверку тест-функций самих культур. Использование бихромата калия наиболее подходит для этих целей (Жмур, 1997; Петросян, 2000; Руководство..., 2002). Нами показано, что *D. salina* оказалась гораздо устойчивее к действию бихромата калия по сравнению с остальными микроводорослями, в то время как *P. prolunga* и *A. ussurensis* незначительно отличались друг от друга по чувствительности (см. таблицу).

ЭК₅₀⁹⁶ бихромата калия (мг/л) для микроводорослей

Микроводоросль	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Plagioselmis prolunga</i>	<i>Attheya ussurensis</i>
ЭК ₅₀ ⁹⁶ бихромата калия (мг/л)	> 10	6.3	2.8

Следовательно, *A. ussurensis* и *P. prolunga* являются потенциальными тест-объектами, так как они чувствительны к бихромату калия.

Действие любого загрязняющего агента на микроводоросли зависит не только от уровня его содержания и условий, при которых проводится биотестирование, но и от самой культуры микроводорослей (возраста маточной культуры, начальной концентрации клеток и времени введения токсиканта). В связи с этим нами были проведены исследования по выяснению действия ПАВ на модельный объект *D. salina* в зависимости от этих условий. Наши исследования показали, что культура *D. salina*, выращенная из маточной в экспоненциальной фазе роста, оказалась наиболее чувствительной к воздействию ДСН. Это, вероятно, связано с тем, что на разных стадиях роста культуры клетки отличаются особенностями ультраструктуры и функциональной активностью органоидов (Селях и др., 1984; Walsh, 1988). В результате экспериментов показано, что культура с меньшей исходной плотностью клеток чувствительнее к влиянию токсиканта, чем с большей. Это, вероятно, связано с тем, что в растворах с одинаковым содержанием токсиканта при более высокой начальной концентрации

клеток на каждую особь приходится меньшее содержание токсиканта, вследствие этого такая популяция устойчивее, чем с меньшим количеством клеток. Реакция водорослей на токсикант зависит также от времени его внесения в среду. Возможно, что более слабый отклик микроводоросли на внесение токсиканта не в самом начале опыта, а через несколько дней, связан с тем, что популяция к этому времени является уже сформированной (Fogg, 1966), и ее устойчивость к действию токсикантов повышается в 10 – 100 раз и не происходит массовой гибели клеток, как в молодой культуре (Corre et al., 1996; Гапочка, Шавырина, 1999).

Таким образом, наиболее чувствительной к действию ДСН оказалась культура, отобранная из маточной в экспоненциальной фазе роста. При исходном количестве клеток 4×10^4 кл/мл восстановление культуры при токсическом действии происходит быстрее, чем при 12×10^4 кл/мл. Добавление ДСН в день постановки опыта вызывало большее угнетение роста популяции микроводоросли, что не отмечено при внесении токсиканта на 4-е сут опыта.

Dunaliella salina

ДСН в концентрации 0.1 мг/л оказал слабое стимулирующее действие на динамику численности (рис. 2а) и физиологические процессы *D. salina* (синтез хлорофилла *a* и каротиноидов и кислородную продуктивность), рН культуральной среды также возрастала. Внесение 1 мг/л токсиканта приводило к небольшому ингибированию роста, уменьшению содержания хлорофилла *a* и каротиноидов, снижению кислородной продуктивности. Увеличение содержания вещества в среде до 10 мг/л вызывало подавление роста и физиологических процессов водоросли, однако они восстанавливались до контрольного уровня.

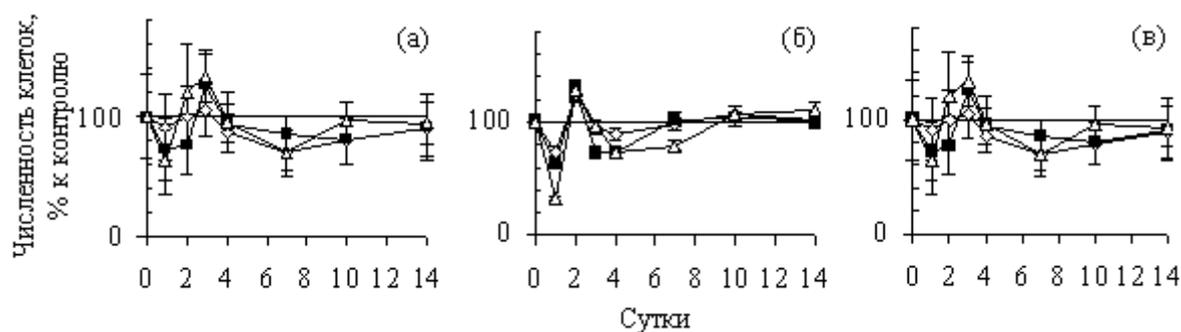


Рис. 2. Действие додецилсульфата натрия (а), детергентов “Обычный порошок” (б) и “Ariel” (в) на динамику численности клеток *Dunaliella salina*.

При добавлении детергентов “Обычный порошок” и “Ariel” во всех концентрациях численность клеток (рис. 2б,в), рН культуральной среды, содержание фотосинтетических пигментов и содержание кислорода в среде снижались в начале опыта, однако все показатели восстанавливались до уровня контроля к его завершению. Степень изменений возрастала с увеличением уровня содержания загрязняющего агента.

Attheya ussurensis

ДСН в концентрациях 0.1 и 1 мг/л вызывал снижение числа клеток (рис 3а) и подавление физиологических процессов, особенно выраженных к концу опыта. Добавление 10 мг/л вещества приводило к ингибированию роста, снижению рН культуральной среды, синтеза пигментов, процессов выработки кислорода уже на вторые сутки опыта, с увеличением экспозиции все процессы восстанавливались, однако не достигали контрольного уровня.

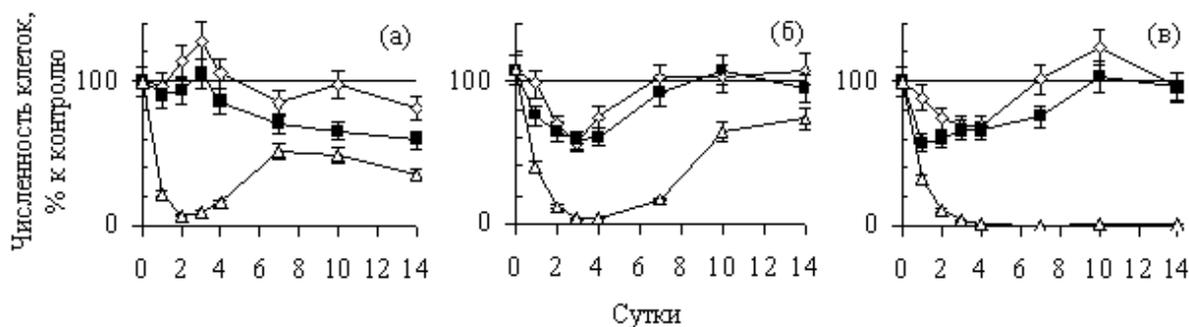


Рис. 3. Действие додецилсульфата натрия (а), детергентов “Обычный порошок” (б) и “Ariel” (в) на динамику численности клеток *Attheya ussurensis*.

Детергенты “Обычный порошок” и “Ariel” в концентрациях 0.1 и 1 мг/л вызывали сходные изменения числа клеток (рис. 3б,в), рН культуральной среды, содержания фотосинтетических пигментов и кислородной продуктивности *A. ussurensis*: в начале опыта происходило снижение числа клеток, замедление физиологических процессов, но к 14-м сут они восстанавливались. В тоже время содержание кислорода в среде при данных концентрациях детергента “Обычный порошок” на всем протяжении экспозиции превышало таковое в контроле, а в опыте с детергентом “Ariel” незначительно отличалось от контрольного. Увеличение концентрации детергентов до 10 мг/л приводило к более существенным нарушениям. В целом, детергент “Ariel” оказал более негативное

воздействие на микроводоросль: даже к завершению эксперимента ее популяция не восстанавливалась.

Plagioselmis prolonga

Концентрации 0.1 и 1 мг/л ДСН вызывали увеличение численности клеток *P. prolonga* (рис. 4а), особенно на десятые сутки экспозиции, остальные показатели отличались менее значительно от таковых в контроле.

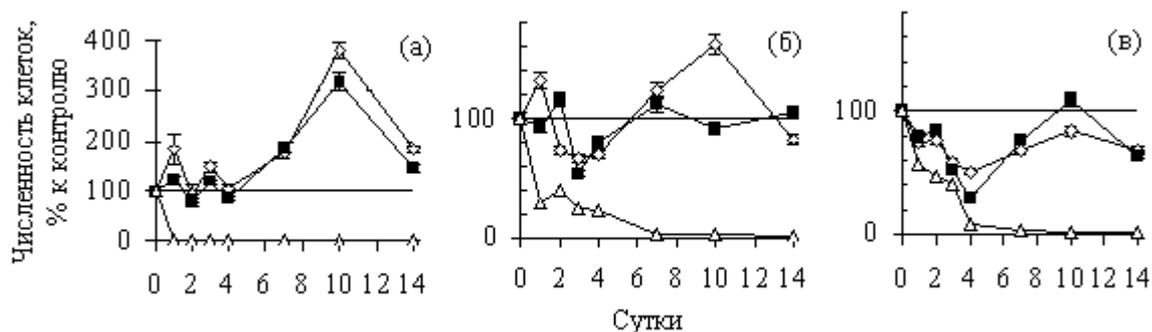


Рис. 4. Действие додецилсульфата натрия (а), детергентов “Обычный порошок” (б) и “Ariel” (в) на динамику численности клеток *Plagioselmis prolonga*.

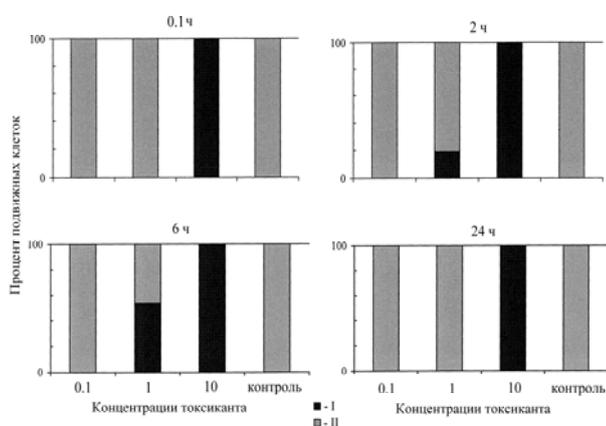


Рис. 5. Процент подвижных клеток *Plagioselmis prolonga* при добавлении поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия (мг/л): (I) – неподвижные клетки, (II) – подвижные клетки.

Через 2 – 6 ч при данных концентрациях отмечено появление неподвижных клеток, изменение скорости движения происходили уже через 0.1 ч (рис. 5). Содержание 10 мг/л вещества вызывало гибель популяции через сутки опыта, потеря подвижности всеми клетками отмечена через 0.1 ч эксперимента.

Под воздействием 0.1 и 1 мг/л детергентов “Обычный порошок” и “Ariel” численность клеток (рис. 4б,в) и показатели физиологического состояния *P. prolonga* в начале эксперимента снижались, а к его завершению не отличались от контрольных, кроме содержания каротиноидов, которое достоверно превышало таковое в контроле. Добавление 10 мг/л детергентов ингибировало рост и

физиологические процессы водоросли, особенно к концу опыта. Детергент “Обычный порошок” в концентрациях 0.1 и 1 мг/л не оказал влияния на подвижность клеток микроводоросли, а при внесении 10 мг/л токсиканта все клетки обездвиживались через 0.1 ч (рис. 6.).

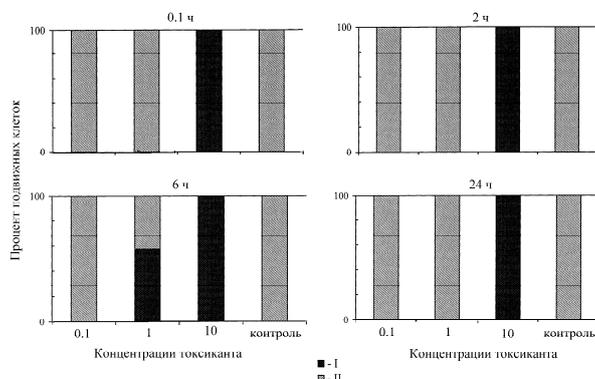


Рис. 6. Процент подвижных клеток *Plagioselmis prolonga* при добавлении детергента “Обычный порошок” (мг/л): (I) – неподвижные клетки, (II) – подвижные клетки.

При этом детергент “Ariel” оказал более негативное воздействие на *P. prolonga*, чем “Обычный порошок”. Кроме того, детергент “Ariel” оказал существенное отрицательное воздействие и на подвижность клеток и скорость их движения: утрату подвижности у клеток наблюдали при всех уровнях содержания токсиканта через 0.1 ч опыта (рис. 7), количество неподвижных клеток возрастало с увеличением уровня содержания токсиканта в среде.

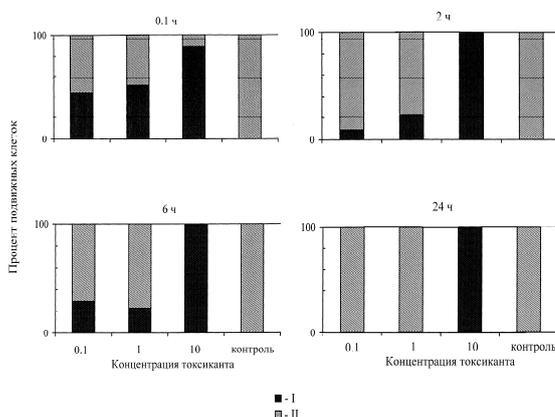


Рис. 7. Процент подвижных клеток *Plagioselmis prolonga* при добавлении детергента “Ariel” (мг/л): (I) – неподвижные клетки, (II) – подвижные клетки.

В наших экспериментах показано, что действие детергентов на водоросли носит незакономерный, фазный характер, такое же явление наблюдал и Л.П. Брагинский с соавторами (1987) в своих исследованиях.

Таким образом, наиболее чувствительными к действию ПАВ и детергентов оказались *P. prolonga* и *A. ussurensis*, наименее – *D. salina*. Такие эксперименты являются модельными, позволяющими выявить отклик организма на исследуемый

загрязняющий агент. Однако в реальных условиях в морской воде содержится огромное количество токсикантов. На основе полученных данных мы предположили, что микроводоросли, проявив чувствительность к отдельным токсическим агентам, могут дать отклик и на комплекс загрязняющих веществ, содержащихся в морской воде. С этой целью мы предприняли попытку биотестирования морской воды из районов зал. Петра Великого с разной антропогенной нагрузкой: восточной части Амурского залива, где расположен крупный город-порт Владивосток; зал. Восток, испытывающего сезонное влияние отдыхающих, и юго-западной части зал. Петра Великого, куда впадает р. Туманная, поставляющая широкий спектр загрязняющих веществ. Необходимо отметить, при биотестировании отклонение от контроля как в сторону уменьшения численности клеток, так и в сторону увеличения несет негативное последствие для экосистем и сигнализирует о неблагополучном состоянии среды.

Ранее сотрудники ТИПРО-Центра для биотестирования вод Амурского залива и зал. Находка использовали мизид и предличинок анчоуса (Черкашин и др., 2004; Черкашин, Щеглов, 2004; Черкашин, Вейдеман, 2005), а данные по биотестированию вод с помощью микроводорослей отсутствуют.

В 2003 году качество вод из зал. Петра Великого оценивали с помощью *D. salina*. Показано, что в течение трех суток опыта численность клеток в воде, отобранной в акватории Амурского залива, была значительно выше такового в контроле (рис. 8а).

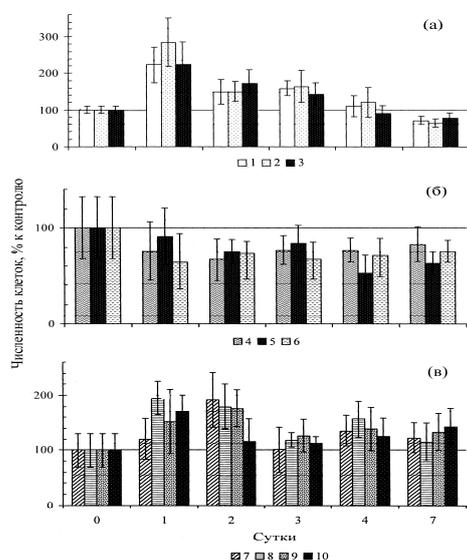


Рис. 8. Динамика численности клеток *Dunaliella salina* (% к контролю) в воде из зал. Петра Великого в 2003 г. (а) – Амурский залив, (б) – зал. Восток, (в) – юго-западная часть зал. Петра Великого. Номера станций соответствуют приведенным на рис. 1.

С увеличением экспозиции происходило существенное отставание роста культуры микроводоросли в тестируемой воде по сравнению с контрольной, особенно ярко выраженное к концу опыта.

В воде со всех станций зал. Восток (4 – 6) число клеток в течение опыта было ниже такового в контроле (рис. 8б).

Численность клеток в воде со всех станций юго-западной части зал. Петра Великого (станции 7 – 10) в течение 2-х сут была выше контрольной (рис. 8в). К концу опыта увеличение числа клеток становилось менее интенсивным, и их количество в воде со станций 8 и 10 сравнивалось с таковым в контроле, а в воде со станций 7 и 9 отмечено отставание в росте.

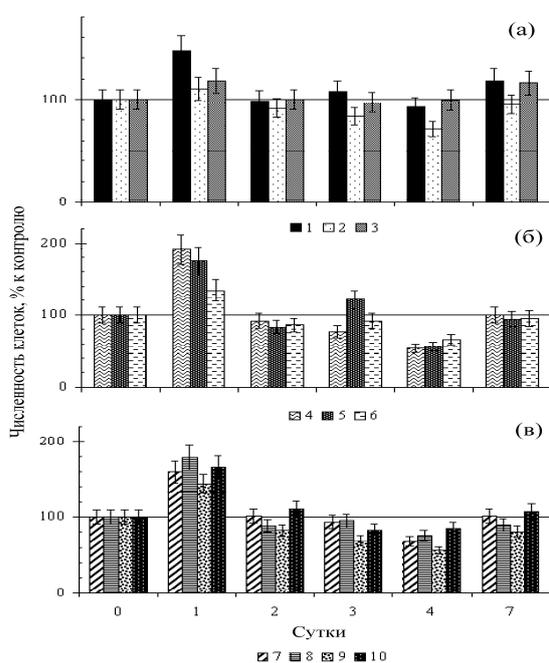


Рис. 9. Динамика численности клеток *Dunaliella salina* (% к контролю) в воде из зал. Петра Великого в 2006 г. (а) – Амурский залив, (б) – зал. Восток, (в) – юго-западная часть зал. Петра Великого. Номера станций соответствуют приведенным на рис. 1.

В 2006 году проводили биотестирование воды из зал. Петра Великого с применением *D. salina* и *P. prolunga*. В воде со всех станций в Амурском заливе через сутки после начала опыта наблюдали существенное увеличение количества клеток *D. salina* (рис. 9а), а на станциях 1 и 3 численность клеток практически не отличалась от контрольной на протяжении экспозиции. Иную картину наблюдали в воде со станции 2: через двое суток после начала эксперимента отмечено ингибирование роста *D. salina* и только к концу экспозиции численность клеток достигала контрольной.

В воде со всех станций из зал. Восток отмечено выраженное увеличение количества клеток микроводоросли в первые сутки опыта (рис. 9б). В

последующие дни эксперимента численность клеток снижалась, и к концу опыта стабилизировалась, достоверно не отличаясь от контрольной.

В воде со всех станций в юго-западной части зал. Петра Великого через сутки отмечали стимуляцию роста *D. salina* (рис. 9в) также как при тестировании воды из Амурского залива и зал. Восток. Со второго дня экспозиции интенсивность роста микроводоросли снижалась. Однако начиная с 7-х сут численность клеток во всех вариантах опыта не значительно отличалась от контрольной.

Число клеток *P. prolonga* снижалось уже в первые сутки в воде со всех станций в Амурском заливе по сравнению с таковым в контроле (рис.10).

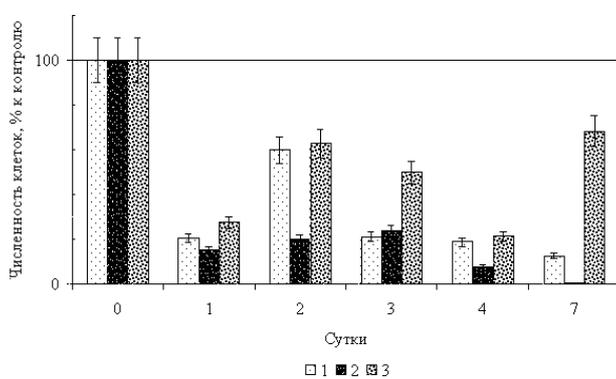


Рис. 10. Динамика численности клеток *Plagioselmis prolonga* (% к контролю) в воде из Амурского залива. Номера станций соответствуют приведенным на рис. 1.

Динамика численности популяций была одинаковой в воде со станций 1 и 3 в течение четырех суток опыта, к 7-м сут в воде со станции 3 количество клеток восстанавливалось, но не достигало такового в контроле. В воде со станции 2 рост популяции был самым слабым и концу опыта число клеток составляло 0.6% от контроля. Тестируемая вода оказывала выраженное отрицательное воздействие также и на подвижность клеток *P. prolonga*: обездвиженные клетки обнаруживались уже после 0.1 ч опыта. С увеличением экспозиции их процент возрастал и через 24 ч все клетки обездвиживались. Скорость движения клеток в воде со всех станций через 0.1 ч не отличалась от таковой в контроле, но уже через 2 ч скорость движения клеток снижалась. К концу опыта клетки в воде со всех станций были неподвижными.

Таким образом, проведенное биотестирование с применением микроводорослей подтверждает сведения о значительном загрязнении воды из районов зал. Петра Великого с разной антропогенной нагрузкой (Ващенко, 2000; Христофорова и др., 2002; Бабич, Бузолева, 2006; Лукьянова, 2006). Обращает на

себя внимание, что отклик *P. prolonga* и *D. salina* на тестируемую воду был неодинаков, что согласуется с полученными данными при определении степени чувствительности организмов с применением бихромата калия.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что по убыванию чувствительности к бихромату калия исследованные одноклеточные водоросли можно расположить в следующий ряд *Attheya ussurensis*>*Plagioselmis prolonga*>*Dunaliella salina*.
2. Установлено, что проведение оценки токсичности ПАВ и детергентов должно проводиться с использованием маточной культуры водоросли в экспоненциальной фазе роста в засевной концентрации клеток 4×10^4 кл/мл; с введением токсиканта в день постановки опыта.
3. Наиболее негативное воздействие ПАВ и детергенты в опытах с *D. salina* и *P. prolonga* оказывают на содержание хлорофилла *a* и каротиноидов и кислородную продуктивность, наименее – на изменение pH культуральной среды, численность клеток и скорость роста популяции. Подвижность клеток *P. prolonga* и скорость их движения под действием токсикантов изменялась уже в начале опыта.
4. Наиболее отрицательное воздействие ПАВ и детергенты в опытах с *A. ussurensis* оказывают на численность клеток, скорость их роста и кислородную продуктивность микроводоросли, наименее – на изменение pH культуральной среды и содержание фотосинтетических пигментов.
5. ПАВ и детергенты оказывают влияние на *D. salina*, *A. ussurensis* и *P. prolonga* при всех исследованных концентрациях. Воздействие токсикантов усиливается с увеличением уровня их содержания в среде.
6. Тестируемая вода из зал. Петра Великого во всех случаях вызывала отклонение числа клеток *D. salina* от контрольного, что подтверждает факт неблагоприятного состояния акваторий залива.
7. В воде из Амурского залива наблюдали выраженное ингибирование популяции *P. prolonga*. Подвижность клеток – наиболее чувствительна к действию

тестируемой воды. *P. prolonga* является перспективным тест-объектом для оценки качества среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах

Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) как тест-объект для оценки загрязнения морской среды детергентами // Биология моря. 2005. Т. 31, № 4. С. С. 274 – 279.

Айздайчер Н.А., Маркина Ж.В. Токсическое действие детергентов на водоросль *Plagioselmis prolonga* (Cryptophyta) // Биология моря. 2006. Т. 32, № 1. С. 50 – 54.

Журавель Е.В., Маркина Ж.В., Христофорова Н.К., Айздайчер Н.А. Использование микроводоросли *Dunaliella salina*, эмбрионов и личинок плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* как тест-организмов для оценки качества воды в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2006. Т. 32, № 3. С. 188 – 196.

Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Влияние детергентов на динамику численности и физиологическое состояние бентосной микроводоросли *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) в лабораторной культуре // Биология моря. 2007. Т. 33, № 6. С. 432 – 439.

Маркина Ж.В. Использование микроводоросли *Plagioselmis prolonga* для оценки качества воды из Амурского залива и залива Находка (Японское море) // Биология моря. 2008. Т. 34, № 1. С. 35 – 41.

Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Биотестирование воды из зал. Петра Великого (Японское море) с помощью микроводоросли *Dunaliella salina* // Экология. 2008. № 3. С. 196 – 200.

Работы, опубликованные в материалах региональных, всероссийских и международных конференций

Воробьева Ж.В., Айздайчер Н.А., Журавель Е.В. Зависимость действия детергента на микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta) от возраста маточной культуры // V Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов и молодых ученых Дальнего

Востока России (г. Владивосток, 21-24 ноября 2002 г.). Тез. докл. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2002. С. 28-29.

Воробьева Ж.В. Влияние додецилсульфата натрия на кислородную продуктивность микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta) // Тез. докл. 7-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых (г. Пущино, 14-18 апреля 2003 г.) "Биология - наука XXI века". Пущино: Пущинский научный центр РАН. 2003. С. 160-161.

Маркина Ж.В. Анализ влияния детергента на различные виды микроводорослей // VII Дальневосточная молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС ТИБОХ, 15-22 сентября 2003 г.). Тез. докл. Владивосток: ДВО РАН. 2003. С. 35-36.

Маркина Ж.В. Действие додецилсульфата натрия на микроводоросли *Dunaliella salina* (Chlorophyta) и *Gymnodinium kovalevskii* (Dinophyta) // Тез. докл. VI Региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов и молодых ученых Дальнего Востока России (г. Владивосток, 20-22 ноября 2003 г.). Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2003. С. 61-62.

Маркина Ж.В. Влияние синтетического моющего средства "Ariel" на рост микроводоросли *Dunaliella salina* // Тез. докл. Биология наука XXI века: 8-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (г. Пущино, 17-21 мая 2004 г.). Пущино: Пущинский научный центр РАН. 2004. С. 214.

Маркина Ж.В. Влияние прибрежных вод г. Владивостока на микроводоросль *Dunaliella salina* (Chlorophyta) // Научные труды международного биотехнологического центра МГУ: тез. докл. 2-ой международной научной конференции "Биотехнология – охране окружающей среды" и 3-ей школы-конференции молодых ученых и студентов "Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов" (г. Москва, 25-27 мая 2004 г.). М.: Спорт и культура. 2004. С. 125.

Markina Zh.V. Evaluation of water quality from the south-west part of Peter the Great Bay (Near The Tumen river mouth using *Dinaliella salina* Teod. (Chlorophyta) // "Bridges of science between north America and the Russian Far East: past, present and future". Proceedings of an international conference on the Arctic and North Pacific (Vladivostok, 14th-16th September of 2004). Vladivostok: Dalnauka, 2004. P. 54

Маркина Ж.В. Оценка влияния синтетического моющего средства "Ariel" на микроводоросль *Plagioselmis prolunga* (Cryptophyta) // Тез. докл. VII Региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников ВУЗов и научных организаций Дальнего Востока России. (г. Владивосток, 18-20 ноября 2004) г. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2004. С. 83-84.

Маркина Ж.В. Оценка подвижности клеток микроводоросли как экспресс-метод определения степени токсического воздействия // Тез. докл. IX Молодежной школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС ТИБОХ, 16-23 сентября 2005 г.). Владивосток: ДВО РАН. 2005. С. 37.

Маркина Ж.В. Воздействие детергента «Ariel» на бентосную морскую микроводоросль *Attheya ussurenis* (Bacillariophyta) // X Международная молодежная Школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, (МЭС ТИБОХ, 12-19 сентября 2006 г.) Тез. докл. Владивосток: ДВО РАН. 2006. С. 29.

Маркина Ж.В., Журавель Е.В. Биотестирование вод залива Находка (Японское море) // “Экологические проблемы использования прибрежных морских акваторий”. Материалы междунар. научно-практич. конференции. (г. Владивосток, 26 – 28 октября 2006 г.) Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. С. 136 – 139.

Маркина Ж.В. Влияние детергента на физиологическое состояние планктонной и бентосной микроводорослей // “Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов”. Материалы 2-ой научной конференции с участием стран СНГ (г. Петрозаводск, 11-14 сентября 2007 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. С. 87-88.

Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А., Журавель Е.В. Биотестирование воды из Амурского залива с помощью культуры микроводоросли *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (Bacillariophyta) // Материалы междунар. научно-практич. конференции “Морская экология-2007” (г. Владивосток, 2007, 3-5 октября 2007). Владивосток: МГУ им. Невельского. 2007. С. 152 – 156.