

УДК 574.632

Ю.А. РЕУНОВА, Н.А. АЙЗДАЙЧЕР

Ин-т биологии моря ДВО РАН,

Россия, 690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

**ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТА НА СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА *a*
И ДИНАМИКУ ЧИСЛЕННОСТИ У МИКРОВОДОРОСЛИ
CHROOMONAS SALINA (WILS.) BUTCH. (*CRYPTOPHYTA*)**

Исследовано влияние бытового синтетического моющего средства (СМС) «Тихо» на характеристики роста, изменение концентрации хлорофилла *a* криптофитовой водоросли *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (*Cryptophyta*). Показано, что низкие концентрации СМС (0,05; 0,1 и 1,0 мг/л) стимулируют рост водоросли и не влияют на содержание хлорофилла *a* в клетках. При концентрации 10 мг/л отмечено ингибирование роста и деления клеток, а также морфологические изменения и блокирование синтеза хлорофилла *a*.

Ключевые слова: криптофитовая водоросль, детергент, хлорофилл *a*.

Введение

В связи с развитием хозяйственной деятельности на побережье зал. Петра Великого (Японское море) за последние 20-30 лет наблюдается ухудшение экологической ситуации в отдельных его районах (Огородникова и др., 1997). Серьезную экологическую опасность среди большого разнообразия загрязнителей представляют синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ). Высокие концентрации СПАВ обнаружены в б. Находка (до 5,20 мг/л), Врангеля (до 2,08 мг/л), Козьмино (до 1,87 мг/л) Японского моря (Вашенко, 2000). Их содержание, превышающее ПДК (0,15-0,25 мг/л), периодически отмечалось в прибрежной зоне Амурского залива и в б. Золотой рог Японского моря (Tkalin et al., 1993).

Одним из основных источников СПАВ являются синтетические моющие средства (СМС), поступающие в водоемы с бытовыми стоками. В больших дозах данные вещества чрезвычайно токсичны, ухудшают физико-химические показатели качества воды, слабо подвергаются биохимическому распаду, вызывают пенообразование, препятствуя аэрации водных масс, что в конечном итоге приводит к катастрофическому загрязнению водоемов (Драчев и др., 1964; Гусев, 1968; Vatyuk, 1973). Считается, что в дозах, соответствующих ПДК, синтетические моющие средства не оказывают существенного воздействия на жизнедеятельность водоемов. Влияние близких к ПДК доз СМС изучен слабо и нуждается в достоверных фактах для конкретных гидробионтов. Одноклеточные водоросли, играющие первостепенную роль в функционировании прибрежных экосистем и в силу своего положения в трофической цепи определяющие биопродукционные характеристики водоемов (Эколого-токсикологические ..., 1985), представляют собой весьма удачный объект для экспериментального исследования влияния различных доз загрязняющих веществ. Наиболее многочисленная группа среди мелких жгутиковых водорослей в Японском море – криптофитовые водоросли (Коновалова и др., 1989), являющиеся в силу своей широкой распространенности

©Ю.А. Реунова, Н.А. Айздайчер, 2004

наиболее актуальным объектом исследований. Особенности воздействия различных доз СМС на криптофитовые и другие одноклеточные водоросли изучены недостаточно. Это затрудняет прогнозирование изменений в альгоценозах при попадании определенных доз детергентов в морскую среду (Липницкая, Паршикова, 1992). До сих пор остаются не изученными особенности воздействия детергентов в различных дозах на поведение клеток, их размеры, динамику численности популяций водорослей, относящихся к разным таксонам.

Цель данной работы – исследовать влияние различных доз детергента СМС «Тіх» на изменение содержания хлорофилла *a* и динамику численности представителя морских криптофитовых микроводорослей *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (*Cryptophyta*).

Материалы и методы

Объектом исследования служила морская одноклеточная водоросль *Chroomonas salina*. Данный вид обычно встречается в прибрежных районах зал. Петра Великого Японского моря (Коновалова и др., 1989).

Альгологически чистую культуру *Ch. salina* выращивали в жидкой питательной среде (Guillard, Ryther, 1962), которую готовили на основе фильтрованной и пастеризованной морской воды (32 ‰). Водоросли культивировали при температуре 20±2 °С. Освещение люминесцентными лампами составляло 3000-3500 лк на поверхности колб при светотемновом периоде 12 ч свет:12 ч темнота. В качестве детергента использовали синтетическое анионное моющее средство «Тіх». Опыты проводили в два этапа, для выполнения которых СМС «Тіх» применяли в концентрациях (0,05; 0,1; 1,0 и 10 мг/л), близких к содержанию СПАВ, наиболее часто отмечаемого в водах залива Петра Великого Японского моря (Ващенко, 2000; Айздайчер, Реунова, 2002). Концентрация СМС 0,1 мг/л соответствовала ПДК для рыбохозяйственных водоемов (Обобщающий ..., 1990).

На первом этапе изучали влияние СМС «Тіх» в указанных концентрациях на изменение численности клеток водорослей. Для засева использовали культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста. Начальная плотность клеток *Ch. salina* составляла 30 тыс. кл/мл. Культуры перемешивали один-два раза в сутки. Образцы для подсчета клеток отбирали после тщательного перемешивания в одно и то же время суток через 3-4 ч после окончания темнового периода.

Численность клеток определяли путем их подсчета в каждой повторности в 4-6 камерах Горяева. Перед подсчетом клетки фиксировали раствором Утермеля. Контролем в опытах служила суспензия водорослей, выращенная в питательной среде без добавок СМС. Эксперименты проводили в конических колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл. Время экспозиции составляло 14 суток.

На втором этапе исследовали влияние СМС «Тіх» в указанных выше концентрациях на изменение содержания хлорофилла *a* в клетках. Количество хлорофилла *a* определяли через 1 ч после внесения в суспензию детергента, через 2, 4 и 10 сут (Чербаджи, 1979; Вода ..., 1990). Полученные данные обрабатывали с использованием программы STATISTICA 5 для Windows.

Результаты и обсуждение

Внесение в культуральную среду СМС «Тіх» оказывало влияние на рост микроводоросли. Степень этого влияния зависела от концентрации СМС. При низких

концентрациях (0,05; 0,1; 1,0 мг/л) СМС «Тих» численность клеток в течение 7 сут была сравнима с таковой в контроле. С увеличением времени экспозиции такие концентрации СМС стимулировали рост клеток микроводоросли (табл. 1). Численность клеток в опытных вариантах к концу эксперимента была выше, чем в контроле.

Таблица 1. Динамика численности клеток ($n \times 10^4$) в 1 мл *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. в зависимости от концентрации СМС «Тих» в среде

Время экспозиции, сут	Концентрация СМС, мг/л				
	Контроль	0,05	0,1	1,0	10
Через 1 ч	9,8±4,9	11,5±1,2	13,1±3,1	11,8±3,4	9,1±0,9
1	15,5±2,3	18,0±4,7	18,0±3,4	16,2±4,1	0,7±0,5
2	26,0±4,8	18,6±3,9	18,3±2,7	16,5±3,7	0,4±0,2
3	36,5±5,4	29,6±5,8	31,0±3,1	33,6±5,4	0
4	41,2±0,9	37,5±2,5	32,2±0,9	33,2±1,7	1,5±1,7
7	66,7±1,2	74,0±1,6	70,2±8,1	77,0±4,6	5,2±0,9
10	84,2±1,5	118,5±1,2	101,5±1,2	119,2±0,9	18,6±10,7
14	160,7±20,5	215,2±1,7	212,2±1,7	213,2±2,5	80,0±5,8

Возможной причиной стимуляции роста водорослей при данных концентрациях детергента могло быть, с одной стороны, изменение физико-химических свойств раствора, вызванное добавкой СМС. Вероятно, свойства чистого питательного раствора не оптимальны для роста *Ch. salina* и упомянутые дозы детергента, по-видимому, способны благоприятно влиять на состав воды. С другой стороны, увеличение роста водорослей может быть связано с поступлением фосфатов, присутствующих в составе СМС и являющихся дополнительной пищевой добавкой для микроводорослей. Особенностью вида *Ch. salina*, на наш взгляд, является способность использовать выше перечисленные концентрации детергента как среды, благоприятной для нормальной жизнедеятельности.

Иной эффект таких же доз СМС «Тих» и других детергентов для диатомовой водоросли *Pseudonitzschia pungens* (Grun.) Hasle, исследованной ранее (Айздайчер, 2000). Для *P. pungens* предельно допустимая доза 0,1 мг/л является нейтральной и не влияет на жизнедеятельность, тогда как при концентрации 1 мг/л было отмечено уменьшение скорости роста численности и изменение морфологии отдельных особей.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что при попадании в морскую среду СМС «Тих» даже в концентрациях, близких к ПДК, способно оказывать эвтрофирующий эффект и вызвать размножение микроводорослей, по своим свойствам близким к *Ch. salina*, тогда как жизнедеятельность видов, сравнимых с *P. pungens*, будет подавлена. Преобладающее развитие одних видов водорослей по сравнению с другими в естественных условиях вызывает «цветение» воды (Senborn et al., 1975). Примером может служить развитие *Skeletonema costatum* (Grev.) Cl. в Амурском заливе и зал. Находка в 1991-1995 гг., когда этот вид составлял 90-95 % общей плотности фитопланктона (Orlova et al., 1996). Особую тревогу вызывают случаи интенсивного развития потенциально токсичных динофитовых и рафидофитовых водорослей в Амурском заливе и в б. Золотой Рог Японского моря (Селина и др., 1992; Стоник, 1994). В силу того, что доминирующее развитие

небольшого числа видов микроводорослей приводит к последствиям, негативным для водных экосистем в целом (Симм, 1981), попадание СМС в морскую среду в концентрациях, провоцирующих данное развитие должно рассматриваться как экологически агрессивное. СМС даже в предельно допустимой концентрации, по-видимому, представляет опасность для нормального функционирования водной среды.

При увеличении содержания СМС до 10 мг/л через 1 ч после внесения детергента в среду численность клеток *Ch. salina* сравнима с таковой в контроле. В течение 3 сут отмечено резкое уменьшение числа клеток в результате их распада, сопровождаемого разрушением клеточных мембран, которое является типичным для одноклеточных организмов при воздействии детергентов (Assa et al., 1975; Nyberg, 1985; Lewis, 1990). Несмотря на то, что популяция *Ch. salina* значительно сократилась, некоторая часть особей осталась жизнеспособной. Лаг-фаза продолжалась в течение 9 суток. На 10-е сутки численность клеток начала увеличиваться, однако через 14 сут она была все еще ниже, чем в контроле. Подобная реакция на присутствие в среде СМС «Тіх» в концентрации 10 мг/л была отмечена у диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal (Айздайчер, Реунова, 2002).

Таким образом, одноразовое воздействие концентрации СМС «Тіх», в 100 раз превышающей ПДК для СПАВ, являясь летальным для подавляющего большинства особей вида *Ch. salina*, не приводит к гибели всей клеточной популяции. Причины выживания данной группы клеток не ясны и могут быть предметом дискуссии.

С одной стороны, можно предположить, что некоторые особи популяции случайно выживают даже при столь высокой концентрации и через некоторое время приступают к делению. Альтернативной является версия о способности части клеточной популяции к физиологической адаптации, предохраняющей ее от полной гибели даже при использовании очень высоких доз детергента. На сегодняшний день точная причина выживания не ясна в силу отсутствия достаточного количества экспериментальных данных. Необходимо провести эксперименты со вторичным применением концентрации СМС 10 мг/л к части популяции, выжившей после первого эксперимента.

Возникновение устойчивости к действию токсических веществ часто сопровождается повышением их содержания в клетках. Водоросли обладают ярко выраженной способностью аккумулировать многие химические вещества в количестве, превышающем их содержание в окружающей среде в десятки и сотни раз. Это может привести к нарушению экологического равновесия, т.к. при аккумуляции токсикантов в теле гидробионтов концентрация этих веществ возрастает в среднем на один порядок в каждой трофической ступени (Веселаго и др., 1987).

Во второй серии опытов изучали влияние детергента в тех же концентрациях на изменение содержания хлорофилла *a* в клетках *Ch. salina*.

Как известно, показатель содержания хлорофилла *a* в единице объема воды позволяет судить о физиологическом состоянии водорослей (Изматьева и др., 1990; Елизарова, 1993; Курейшевич и др., 1999). От количественного содержания и функционирования фотосинтетических пигментов зависят рост, развитие растений и накопление их биомассы (Ткаченко, Коваль, 1983). Стабильное повышение хлорофиллового показателя в водосе или его отдельных участках свидетельствует о степени его эвтрофирования и позволяет дифференцировать зоны наиболее интенсивного протекания этого процесса (например, вследствие поступления азота, фосфора, органических соединений в результате сброса сточных вод, поверхностного и животноводческого стока) (Сиренко, 1988).

При наличии в воде СМС «Тих» в концентрации 0,05, 0,1 и 1 мг/л содержание хлорофилла *a* в клетках хроомонаса сравнимо с таковым в контроле (табл. 2).

Таблица 2. Содержание хлорофилла *a* (мкг/л) в клетках *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. в зависимости от концентрации СМС «Тих» в среде

Время экспозиции, сут	Концентрация СМС, мг/л				
	Контроль	0,05	0,1	1,0	10
0	98±0,5	107,2±0	95,3±3,8	107,6±2,5	90,05±4,8
2	189,0±10,4	206,8±15,1	194,7±0	196,5±0,6	19,8±4,2
4	343,3±0	336,5±43,1	347,6±4,7	323,4±24,8	21,6±14,4
10	865,5±0	915,5±8,0	851,2±3,6	835,3±41,0	181,1±114,7

Иную картину наблюдали при увеличении концентрации СМС до 10 мг/л. Через двое суток концентрация хлорофилла *a* значительно снижалась и оставалась без существенных изменений до 4 суток. Хлоропласты в клетках *Ch. salina* обесцвечивались и суспензия становилась бесцветной. Только на 10-е сутки у хроомонаса концентрация хлорофилла *a* стала заметно увеличиваться. К этому времени, вероятно, восстанавливалась способность к синтезу пигментов, и суспензия вновь приобрела красно-бурую окраску.

Полученные нами результаты, касающиеся отрицательного действия высоких концентраций детергентов на содержание хлорофилла *a* у криптофитовой водоросли *Ch. salina*, согласуются с литературными данными. Так, исследования, проведенные на зеленых и синезеленых водорослях, показали, что наиболее уязвимой к действию детергентов является фотосинтетическая система клеток (Абдурашитова и др., 1984; Тхукрал и др., 1988; Паршикова и др., 1994). Загрязнение среды детергентами приводит к нарушению нормальной синтетической деятельности растительных клеток, что, вероятно, обусловлено блокированием синтеза пигментов, сопровождающегося фотовыцветанием (Игнатъевская и др., 1988; Тхукрал и др., 1988). Это закономерная обратная реакция микроводорослей на неблагоприятные условия среды (Ткаченко, Коваль, 1983).

Выводы

1. Проведенные исследования показали, что низкие концентрации СМС (0,05; 0,1 и 1,0 мг/л) обладают эвтрофирующим эффектом, стимулируют рост водоросли *Ch. salina* и не влияют на содержание хлорофилла *a* в клетках.
2. Близкие к ПДК концентрации СМС, обладая эвтрофирующим эффектом, способны вызвать вспышку численности *Ch. salina* в естественных условиях и должны считаться экологически небезопасными.
3. Увеличение содержания СМС до 10 мг/л путем однократного применения данной концентрации вызывает ингибирование роста численности микроводоросли, снижение содержания хлорофилла *a* в их клетках и гибель большей части клеточной популяции. Через 10 суток в группе выживших клеток наступает процесс их деления, а через 14 суток количественный состав популяции увеличивается, но этот показатель значительно ниже контрольного.

4. Устойчивость клоток, выживших в эксперименте с применением СМС в концентрации 10 мг/л, является либо случайной, либо является результатом активизации адапционных механизмов. Дальнейшая аргументация обеих версий возможна только при проведении эксперимента с вторичным применением концентрации 10 мг/л к группе клеток, выживших после первого эксперимента.

Yu. A. Reunova, N.A. Aizdaicher

Institute of Marine Biology, Far East Branch of Russian Academy of Sciences,
17, Palchevskogo St., 690041 Vladivostok, Russia

THE EFFECT OF DETERGENT ON CHLOROPHYLL A CONTENT IN MICROALGA
CHROOMONAS SALINA (WILS.) BUTCH. (CRYPTOPHYTA) AND DYNAMICS OF ITS NUMBER

The effect of household synthetic detergent (HSD) "Tix" on growth and concentration of chlorophyll *a* in cryptophyte *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. has been studied. It was shown that low concentration of HSD (0.05; 0.1 and 1.0 mg/L) stimulates growth of alga and has no influence on chlorophyll *a* content in the cells. At concentration 10 mg/L inhibition of growth and fission of cells is recorded, as well as morphological changes and blocking of chlorophyll *a* synthesis.

Key words: Cryptophyta, detergent, chlorophyll *a*.

- Абдурашитова Ф.А., Барский Е.А., Гусев М.В. и др. Действие сапонина и фосфолипидов на состояние хлорофилла в мембранах и пигмент-белковых комплексах цианобактерии *Anabaena variabilis* // Биохимия. – 1984. – 49, вып. 4. – С. 644-650.
- Айздайчер Н.А. Влияние детергентов и совместное действие детергентов и опреснения на диатомовую водоросль *Pseudonitzschia pungens* // Альгология. – 2000. – 10, № 2. – С. 139-145.
- Айздайчер Н.А., Реунова Ю.А. Влияние детергентов на рост диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* в культуре // Биол. моря. – 2002. – 28, № 5. – С. 362-365.
- Ващенко М.А. Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия // Там же. – 2000. – 26, № 3. – С. 149-159.
- Веселого И.А., Гапочка Л.Д., Левина М.З. Системно-функциональный анализ адаптивных возможностей популяции водорослей в условиях токсического воздействия // Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол. – 1987. – № 1. – С. 61-65.
- Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла *a* // Гос. стандарт СССР. Гос. ком. СССР по охране природы. – М.: Изд-во стандартов, 1990. – 15 с.
- Гусев А.Г. Влияние поверхностно-активных веществ на водоемы и водные организмы // Санитарная гидробиология и водная токсикология (Рига). – 1968. – 2. – С. 33-38.
- Драчев С.М., Былинкина А.А., Гаршиени В.Ф. Поверхностно-активные вещества в водоемах и их значение // Сб. химико-технол. ин-та (Прага). Технол. воды. – 1964. – 8, № 1. – С. 161-166.
- Елизарова В.П. Хлорофилл как показатель биомассы фитопланктона // Изучение первичной продукции планктона внутренних водоемов. – СПб: Гидрометеоиздат, 1993. – С. 158-166.
- Ивантеевская М.А., Тхурал А.К., Бурдин К.С. Влияние сапонина на физиологические характеристики *Spirulina platensis* // Физиол. раст. – 1988. – 35, вып. 2. – С. 385-392.
- Изметьева Л.Р., Кожова О.М., Усенко Н.Б. Динамика хлорофилла *a* в сестоне иркутского водохранилища // Гидробиол. журн. – 1990. – 26, № 1. – С. 7-14.
- Коновалова Г.В., Орлова Т.Ю., Паутова Л.А. Атлас фитопланктона Японского моря. – Л.: Наука, 1989. – 160 с.

- Курейшевич А.В., Сиренко Л.А., Медведь В.А. Многолетняя динамика содержания хлорофилла *a* и особенности развития фитопланктона в Днепродзержинском водохранилище // Гидробиол. журн. – 1999. – 35, № 2. – С. 49-62.
- Лытцакя Г.П., Паршикова Т.В. Изменения в прочности связи хлорофилл-белково-липидного комплекса водорослей под влиянием поверхностно-активных веществ // Там же. – 1992. – 28, № 6. – С. 60-67.
- Огородникова А.А., Вейдеман Е.Л., Силина Э.И., Низматулина Л.В. Воздействие береговых источников загрязнения на биоресурсы залива Петра Великого (Японское море) // Изв. ТИНРО. – 1997. – 122. – С. 430-450.
- Обобщающий перечень предельно-допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочных безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов. – М.: Мин-во рыб. хоз-ва СССР. Главрыбвод. 1990. – С. 1-20.
- Паршикова Т.В., Веселовский В.В., Веселова Т.В., Дмитриева А.Г. Влияние поверхностно-активных веществ на функционирование фотосинтетического аппарата хлореллы // Альгология. – 1994. – 4, № 1. – С. 38-46.
- Селвина М.С., Симакоев Н.К., Яснецкая Л.В. *Cyrtodinium nagasakiense* Takayama et Adachi (*Dinophyta*) в заливе Петра Великого (Японское море) // Там же. – 1992. – 2, № 1. – С. 51-55.
- Симм Х.А. Проблемы антропогенного эвтрофирования водоемов Сов. Союза // Проблемы качества природных вод. – Черноголовка: Изд-во МГУ, 1981. – С. 96-103.
- Сиренко Л.А. Информационное значение хлорофилльного показателя // Гидробиол. журн. – 1988. – 24, № 4. – С. 49-53.
- Стоник И.В. Потенциально токсичная динофитовая водоросль *Procentrum minimum* в Амурском заливе Японского моря // Биол. моря. – 1994. – 20, № 6. – С. 419-425.
- Ткаченко Ф.П., Коваль В.Т. Содержание фотосинтетических пигментов и накопление биомассы у кладофор северо-западной части черного моря // Гидробиол. журн. – 1983. – 19, № 6. – С. 53-57.
- Тхужрал А.К., Игнатъевская М.А., Бурдин К.С. Действие салонина на пигментную систему фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis* // Физиол. раст. – 1988. – 35, вып. 1. – С. 144-149.
- Чербаджи И.И. Определение фотосинтетических пигментов // Методы химического анализа в гидробиологических исследованиях. АН СССР ДВНЦ. – Владивосток: Дальнаука, 1979. – 131 с.
- Эколого-токсикологические аспекты загрязнения морской среды. – Л.: Гидрометеоиздат, 1985. – Т. 5. – 116 с.
- Assa Y. et al. The effect of alfalfa saponins on the growth and lysis of *Physarum polycephalum* // Arch. Microbiol. – 1975. – 103, N 1. – P. 77-83.
- Batyuk V.P. The effects of surface-active agents on the quantum requirement of photosynthesis determined by the thermodynamic method // Biol. Plant. Acad. Sci. Bohem. – 1973. – 15, N 3. – P. 163-165.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // Can. J. Microbiol. – 1962. – 8. – P. 229-239.
- Lewis M.A. Chronic Toxicities of Surfactants and Detergent Builders to Algae: A Review and Risk Assessment // Ecol. Environ. Saf. – 1990. – 20. – P. 123-140.
- Nyberg H. The influence of ionic detergents on the phospholipid fatty acid composition of *Porphyridium purpureum* // Phytochemistry. – 1985. – 24. – P. 435-440.
- Orlova T.Yu., Selina M.S., Stonik I.V. Phytoplankton of Peter Great Bay in eutrophic environment // Abstrs. Int. Conf. on the Sustainability of Coastal Ecosystem in the Russian Far East. – Vladivostok: Dalnauka, 1996. – P. 55-56.
- Senborn J.R., Metcalf R.L., Yu Ching-Chien et al. Plasticizers in the environment: the fate of di-N-octyl-phthalate (DOP) in two model ecosystems and uptake and metabolism of DOP by aquatic organisms // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 1975. – 3. – P. 244-255.
- Tkalin A.V., Belan T.A., Shapovalov E.N. The state of the marine environment near Vladivostok, Russia // Mar. Pollut. Bull. – 1993. – 26, N 8. – P. 418-422.