

УДК 574 : (582.255 + 582.264)

Ж. В. Маркина, Н. А. Айздайчер

**ДЕЙСТВИЕ ДЕТЕРГЕНТА ARIEL НА РОСТ И  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ  
ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ *DUNALIELLA  
SALINA* (CHLOROPHYTA) И *PLAGIOSELMIS  
PROLONGA* (CRYPTOPHYTA)<sup>1</sup>**

Исследовано влияние детергента Ariel в концентрациях 0,1, 1 и 10 мг/л на динамику численности, содержание хлорофилла *a*, каротиноидов и кислородную продуктивность микроводорослей *Dunaliella salina* Theod. (Chlorophyta) и *Plagioselmis prolonga* Batch. (Cryptophyta). Показано, что *P. prolonga* оказался более чувствительным к действию детергента видом, чем *D. salina*. Степень действия токсиканта возрастала с увеличением уровня его содержания в среде.

**Ключевые слова:** *Dunaliella salina*, *Plagioselmis prolonga*, детергент, численность клеток, хлорофилл *a*, каротиноиды, кислородная продуктивность.

Одноклеточные водоросли — важный компонент морских экосистем. Они одни из первых страдают от воздействия токсических веществ, что приводит к нарушению функционирования всей экосистемы [14, 19, 20]. В морской среде присутствуют различные токсиканты, в том числе детергенты, поступающие в воду с бытовыми стоками, большой объем которых значительно усугубляет проблему ее загрязнения этими отравляющими веществами [16]. Действие этих загрязняющих агентов на микроводоросли может привести к изменению функционирования клеток и их гибели. С другой стороны, наличие в составе детергентов фосфорных компонентов способствует евтрофикации, последствия которой могут вызвать увеличение числа клеток отдельных видов водорослей при одновременном снижении видового разнообразия [4, 13]. В связи с этим необходимо оценивать влияние детергентов как на рост, так и на физиологическое состояние одноклеточных водорослей.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании действия применяемого в быту детергента Ariel на динамику численности клеток, содержание хлорофилла *a*, каротиноидов и кислородную продуктивность микроводорос-

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Фонда содействия отечественной науке.

© Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А., 2009

лей *Dunaliella salina* Theod. (Chlorophyta) и *Plagioselmis prolonga* Batch. (Cryptophyta).

**Материал и методика исследований.** В качестве объектов исследования использовали альгологически чистые культуры микроводорослей *D. salina* и *P. prolonga* из коллекции Института биологии моря ДВО РАН [2].

*D. salina* — планктонная подвижная водоросль, занимающая особое положение в пределах порядка Volvocales из-за отсутствия дифференцированной клеточной оболочки, окруженная лишь протоплазматической мембраной [10]. Несмотря на то, что вид не обнаружен в дальневосточных морях России, выбор этой водоросли в качестве объекта исследования обусловлен широким применением представителей этого рода для оценки токсичности веществ и качества вод [3]. Наиболее характерной особенностью *D. salina* является способность к коренной перестройке пигментной системы с преимущественным накоплением каротиноидов, выполняющих защитную функцию в экстремальных условиях [10].

Другим объектом исследования служила криптофитовая водоросль *P. prolonga*. Криптофитовые водоросли играют существенную роль в продуктивности прибрежных акваторий и питании зоопланктонных организмов [27], но, в целом, виды этого отдела слабо изучены в экологическом плане. *P. prolonga* — постоянный представитель прибрежного фитопланктона залива Петра Великого Японского моря. Известна также ее способность вызывать «красные приливы» [9]. *P. prolonga* также планктонный активно подвижный организм, имеющий клеточный покров в виде перипласта, включающий белковый компонент [6, 22].

Сходство исследованных водорослей заключается в наличии основного пигмента хлорофилла *a*, а также, то, что оба вида соответствуют одному из важных требований к тест-объектам — они способны в течение длительного времени поддерживаться в лабораторной культуре.

Культуру микроводоросли *D. salina* выращивали на среде Гольдберга, в состав которой входят  $\text{KNO}_3$  — 10,1 мг/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 1,421 мг/л,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 27,03 мкг/л;  $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  мкг мг/л;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 23,79 мкг/л [7], *P. prolonga* — на среде *f* [25]. Состав среды *f* включает в себя  $\text{NaNO}_3$  — 150 мг/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  — 10 мг/л,  $\text{FeCl}_3$  — 3,6 мг/л, ЭДТА — 6,4 мг/л,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  — 30 мг/л,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  — 0,0196 мг/л,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,044 мг/л,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 0,02 мг/л,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,36 мг/л,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,0126 мг/л, витамины  $\text{B}_1$  — 0,2 мг/л,  $\text{B}_7$  — 0,001 мг/л,  $\text{B}_{12}$  — 0,001 мг/л.

Культивирование проводили при освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с) с фотопериодом 12 ч свет : 12 ч темнота при температуре 20 ± 2°С. Культуры для посева использовали в экспоненциальной фазе роста. Численность клеток микроводорослей считали в камере Горяева. Образцы для подсчета фиксировали раствором Утермея.

Уровень содержания хлорофилла *a* и суммарного содержания каротиноидов определяли в ацетоновом экстракте на спектрофотометре СФ-46 фир-

мы ЛОМО (Россия). Расчет концентраций фотосинтетических пигментов проводили по стандартным формулам [5]. Кислородную продуктивность микроводорослей определяли йодометрическим методом [11]. Численность клеток, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов, кислородную продуктивность в контроле принимали за 100 %.

Продолжительность опытов — 14 сут. В опытах исследовали влияние детергента Agiel (Procter & Gamble), в состав которого входят катионные и неионогенные поверхностно-активные вещества (ПАВ) — 29%, цеолиты, поликарбоксилаты, фосфонаты, анионные ПАВ, отбеливатели, фосфаты — 2,2%, ферменты. Концентрации токсиканта составляли 0,1, 1,0 и 10 мг/л. Все эксперименты, представленные в работе, проведены в трех повторностях<sup>2</sup>. На графиках представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения, рассчитанные с помощью программы Excel.

### ***Результаты исследований и их обсуждение***

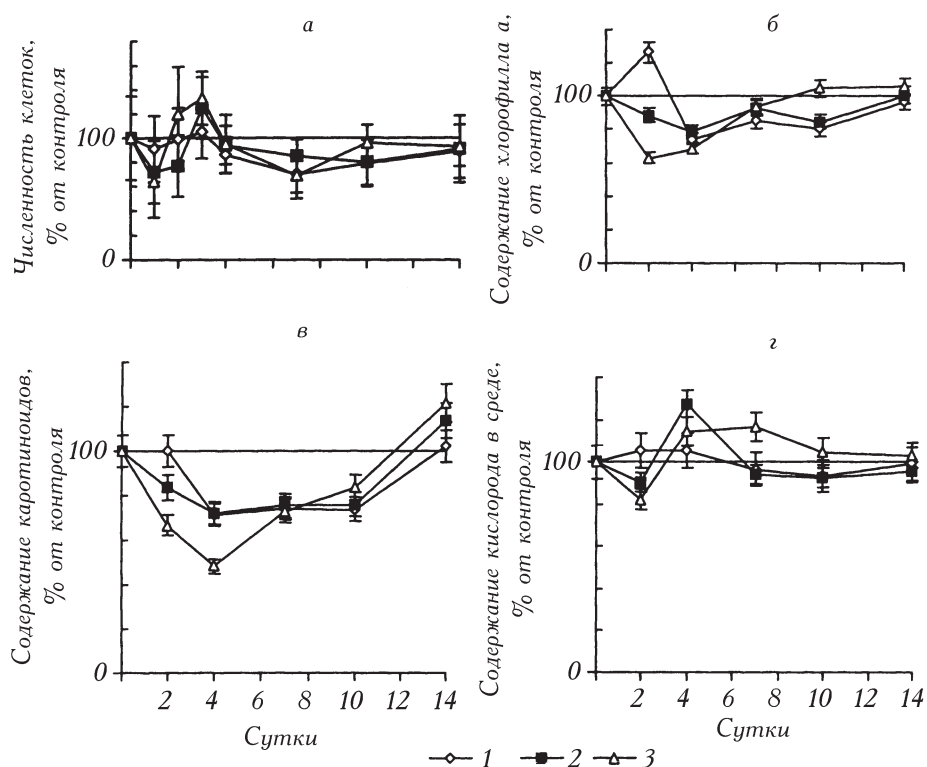
Динамика численности клеток *D. salina* была сходной на протяжении экспозиции при всех исследуемых концентрациях детергента: она изменялась по синусоиде на протяжении четырех суток опыта (рис. 1, *a*). В дальнейшем число клеток уменьшалось до уровня 80—90% от контроля.

Количество клеток *P. prolonga* в растворах с 0,1 и 1,0 мг/л детергента постепенно снижалось к четвертым суткам экспозиции, а к десятым возрастало, но к концу опыта оставалось меньше контрольного (рис. 2, *a*). Таким образом, в наших опытах отмечено, что действие детергента на динамику численности клеток исследуемых водорослей при данных концентрациях носит незакономерный, фазный характер. Аналогичное явление наблюдал ранее Л. П. Брагинский с соавторами [4] в экспериментах с природным фитопланктоном. Добавка 10 мг/л токсиканта вызывала более сильные изменения: число клеток резко уменьшалось и к 14-м суткам составляло только 2% от контроля.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что разные концентрации детергента в среде оказывают угнетающее действие на рост *D. salina* и *P. prolonga*. Этот факт находит подтверждение исследованиями ряда авторов на других микроводорослях [12, 26, 28]. Ингибирование роста микроводорослей под влиянием детергентов может быть следствием ряда нарушений клеточных структур и метаболизма. Клеточные покровы, их химические и физические свойства играют значительную роль в защите организмов от воздействия токсикантов. Известно, что детергенты обладают мембранотропным действием, выражающимся, прежде всего, в изменении заряда клеточной стенки [29]. Клеточная стенка *D. salina* отрицательно заряжена [10] и, возможно, поэтому водоросль более устойчива к действию детергента Agiel, в состав которого входит большое количество анионных ПАВ. Кроме того, *D. salina* обладает развитой системой экскреторных вакуолей, способных выводить токсикант за пределы клетки [15]. Особенно сильному действию детергентов подвергаются мембранные липиды и белки [17, 30].

---

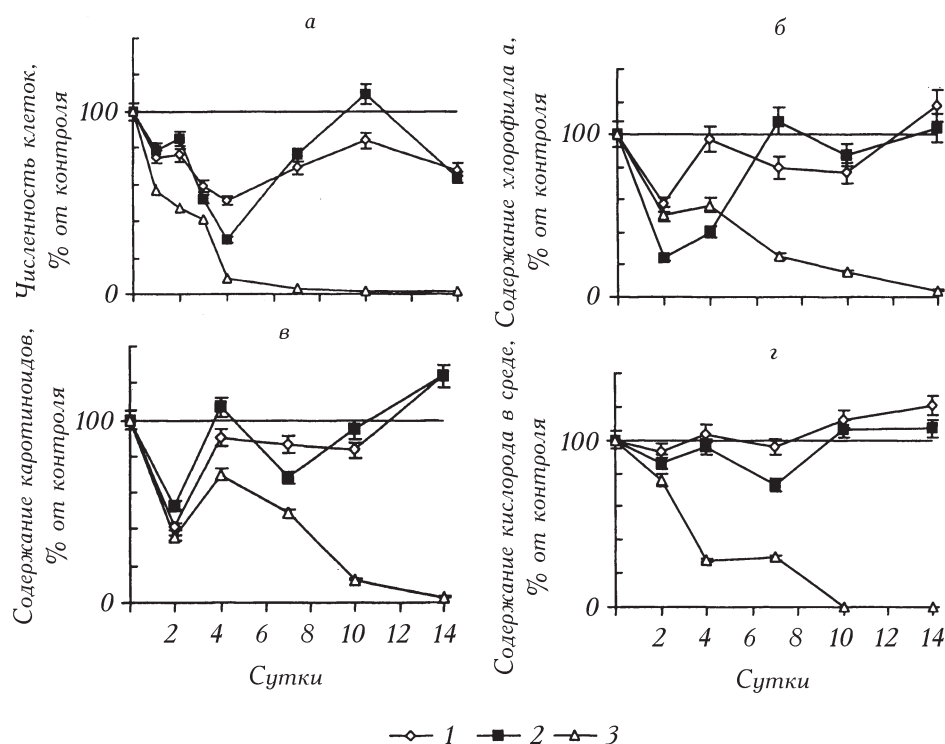
<sup>2</sup> Содержание анионных ПАВ и фосфатов определил Е. В. Журавель.



1. Влияние детергента Ariel на *Dunaliella salina*: а — динамика численности клеток; б — содержание хлорофилла а, в — содержание каротиноидов; г — кислородная продуктивность. Здесь и на рис. 2: 1 — 0,1 мг/л; 2 — 1 мг/л; 3 — 10 мг/л.

Учитывая, что перипласт криптофитовых водорослей включает внутренний белковый компонент, можно предположить, что под действием детергентов он в клеточной оболочке *P. prolonga* разрушается и клетки становятся более уязвимыми. Ранее показано, что в результате разрушения мембраны в клетках происходит как накопление посторонних химических соединений, так и выход содержимого клетки во внешнюю среду [13, 29]. Возможно, поэтому при содержании 10 мг/л детергента Ariel отмечали появление разрушенных клеток *P. prolonga*.

Для наиболее полной оценки токсичности веществ параллельно с учетом численности клеток микроводорослей необходимо определять содержание фотосинтетических пигментов [8]. Содержание хлорофилла а у *D. salina* при концентрации 0,1 мг/л токсиканта увеличивалось на вторые сутки экспозиции, затем снижалось, но к концу эксперимента достигало уровня контроля (рис. 1, б). Добавление 1 мг/л детергента способствовало нарушению процессов синтеза пигмента на вторые сутки экспозиции. Сходную тенденцию наблюдали и при внесении 10 мг/л, однако в этом случае зафиксированы более глубокие изменения. Содержание каротиноидов при всех концентрациях токсиканта было меньше, чем в контроле на протяжении десяти суток опыта, а к его окончанию — возросло (рис. 1, в).



2. Влияние детергента Ariel (мг/л) на *Plagioselmis prolonga*: а — динамика численности клеток, б — содержание хлорофилла а, в — содержание каротиноидов; г — кислородная продуктивность (% от контроля).

Содержание хлорофилла а у *P. prolonga* снижалось в первые сутки опыта при всех концентрациях токсиканта, в последующие дни оно возрастало до уровня контрольного при концентрациях 0,1 и 1,0 мг/л (рис. 2, б). Добавление 10 мг/л вызывало ингибирование синтеза пигмента и в дальнейшем он не восстанавливался. Динамика содержания каротиноидов была сходна с наблюдаемой для хлорофилла а, однако к концу эксперимента содержание каротиноидов в присутствии 0,1 и 1,0 мг/л существенно превышало таковое в контроле при внесении 0,1 и 1,0 мг/л детергента. При концентрации 10 мг/л токсиканта синтез каротиноидов подавлялся в начале опыта и в дальнейшем не восстанавливался (рис. 2, в).

Следовательно, с возрастанием содержания токсиканта усиливалось его действие на синтез пигментов у исследованных микроводорослей. Такая закономерность отмечена и ранее в работах других исследователей [23, 24]. Известно, что влияние детергентов на фотосинтетический аппарат водорослей может осуществляться, например, вследствие разрыхления липидного слоя мембраны тилакоидов токсикантами. При низких концентрациях детергентов происходит дезорганизация пигмент-белковых комплексов, а с увеличением концентрации токсиканта — их разрушение и необратимое окисление хлорофилла а на свету, что усугубляется образованием свободных радикалов [1]. К концу опыта синтез хлорофилла а и каротиноидов восстанавливался, по-видимому, вследствие адаптации микроводорослей к но-

вым условиям. Вероятно, это объясняется тем, что в адаптационных процессах большое значение имеют изменения в световых реакциях фотосинтеза, направленных на оптимизацию электронного транспорта и энергетического баланса [18]. Необходимо отметить, что *D. salina* является одной из самых богатых каротиноидами микроводорослей [21], а данные пигменты выполняют защитную функцию, в том числе и при токсических воздействиях на клетку и, возможно, поэтому *D. salina* более устойчива к детергенту, чем *P. prolunga*. В целом, у *D. salina* отмечен более интенсивный синтез каротиноидов, чем у *P. prolunga*.

О степени действия детергентов может свидетельствовать также и кислородная продуктивность микроводорослей [13]. Фотосинтетическое выделение кислорода является чувствительным показателем и позволяет четко оценивать токсическое действие на функциональную активность водорослей [4]. Важность использования данного показателя обусловлена тем, что нарушения комплекса метаболических реакций, связанных с запасанием и использованием энергии, выражаются в изменениях интенсивности выработки кислорода.

Кислородная продуктивность *D. salina* незначительно отличалась от контрольной при внесении в среду 0,1 мг/л детергента (рис. 1, г). Уровень содержания кислорода при добавлении 1,0 и 10 мг/л токсиканта изменялся по синусоиде, однако отклонения от контроля были несущественными.

Процессы выработки кислорода *P. prolunga* при добавлении 0,1 и 1,0 мг/л токсиканта незначительно изменялись по сравнению с контрольными (рис. 2, г), а концентрация 10 мг/л приводила к полному ингибированию кислородной продуктивности к десятым суткам опыта.

Снижение содержания кислорода в среде, как и ингибирование синтеза фотосинтетических пигментов, по-видимому, обусловлено повреждением пигмент-белковых комплексов, нарушением миграции электронного возбуждения в светособирающей антенне и инактивацией катион-радикала хлорофилла [1]. Этот процесс усугубляется тем, что входящие в состав детергентов ПАВ вызывают выход ионов марганца и цинка из клеток микроводорослей [23], необходимых для выработки кислорода [18]. Важно отметить, что снижение интенсивности фотосинтеза — одно из следствий интоксикации, под влиянием которой подавляются другие жизненно важные процессы в клетках водорослей. При этом угнетение фотосинтеза и возникающие нарушения метаболизма микроводорослей могут привести к замедлению темпов клеточного деления [4].

### Заключение

Таким образом, впервые изучено действие детергента Ariel в концентрациях 0,1, 1,0 и 10 мг/л на *D. salina* и *P. prolunga*. *D. salina* испытывала слабое ингибирующее действие детергента во всех исследованных концентрациях. Численность клеток и кислородная продуктивность незначительно отличались от контрольных значений. Синтез пигментов подвергался наиболее негативному действию. *P. prolunga* оказался менее устойчив к присутствию в среде детергента. При

концентрациях 0,1 и 1,0 мг/л происходило более существенное снижение числа клеток, содержания пигментов и кислорода в среде по сравнению с указанными показателями *D. salina*. Внесение 10 мг/л токсиканта в среду вызывало гибель почти всей популяции к концу опыта.

\*\*

*Досліджено вплив детергенту Ariel у концентраціях 0,1, 1,0 і 10 мг/л на динаміку чисельності, вміст хлорофілу а та каротиноїдів і кисневої продуктивності мікродоростей Dunaliella salina Theod. (Chlorophyta) і Plagioselmis prolonga Batch. (Cryptophyta). Показано, що P. prolonga виявився більш чутливим до дії детергенту видом, ніж D. salina. Ступінь дії токсиканту зростає зі збільшенням рівня його вмісту в середовищі.*

\*\*

*Detergent Ariel influence in concentrations 0,1; 1 and 10 mg/l on cell number, chlorophyll a and carotenoid contents and oxygen productivity of microalgae Dunaliella salina (Chlorophyta) and Plagioselmis prolonga (Cryptophyta) are studied. It was shown, that P. prolonga was more sensitive to detergent influence, than D. salina. Toxicant effect increased with its concentration raised.*

\*\*

1. Абдурашитова Ф.Д., Барский Е.Л., Гусев М.В. и др. Действие детергентов и фосфолипидов на состояние хлорофилла в мембранах и пигмент-белковых комплексах цианобактерии *Anabaena variabilis* // Биохимия. — 1984. — Т. 49, вып. 4. — С. 644—650.
2. Айзгайчер Н.А. Коллекция культур морских микроводорослей Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН // Биология моря. — 2008. — Т. 34, № 2. — С. 152—155.
3. Балаян А.Е., Стом Д.И. Метод биотестирования по обездвиживанию клеток водорослей дуналиеллы // Методы биотестирования вод. — Черноголовка, 1988. — С. 26—30.
4. Брагинский Л.П., Величко И.М., Щербань Э.П. Пресноводный планктон в токсической среде. — Киев: Наук. думка, 1987. — 180 с.
5. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла а // Гос. стандарт СССР. Гос. ком. СССР по охране природы. — М.: Изд-во стандартов. 1990. — 15 с.
6. Водоросли. Справочник. — Киев: Наук. думка, 1989. — 608 с.
7. Кабанова Ю.Г. О культивировании в лабораторных условиях морских планктонных диатомовых и перидиниевых водорослей // Тр. Ин-та океанологии АН СССР. — 1961. — Т. 47. — С. 203—216.
8. Капков В.И. Метод определения хронической токсичности сточных вод с использованием зеленых водорослей // Методы биотестирования вод. — Черноголовка, 1988. — С. 89—94.
9. Коновалова Г.В. «Красные приливы» и «цветение» воды в дальневосточных морях России и прилегающих акваториях // Биология моря. — 1999. — Т. 25, № 4. — С. 263—273.
10. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. — Киев: Наук. думка, 1973. — 241 с.

11. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидро-биологической практике* / Под ред. А. В. Топачевского. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
12. *Остроумов С.А., Борисова Е.В., Ленова Л.И., Максимов В.Н.* Воздействие сульфанола на культуру водоросли *Dunaliella asymmetrica* и на проростки *Fagopyrum esculentum* // Гидробиол. журн. — 1990. — Т. 26, № 2. — С. 96—98.
13. *Паршикова Т.В., Негруцкий С.Ф.* Влияние поверхностно-активных веществ на водоросли (обзор) // Там же. — 1988. — Т. 24, № 6. — С. 46—58.
14. *Патин С.А.* Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность мирового океана. — М.: Пищ. пром-сть, 1979. — 303 с.
15. *Реунова Ю.А.* Влияние селена на морфо-функциональные характеристики морской одноклеточной водоросли *Dunaliella salina* (Chlorophyta): Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. — Владивосток, 2007. — 22 с.
16. *Ставская С.С.* Биологическое разрушения анионных ПАВ. — Киев: Наук. думка, 1981. — 226 с.
17. *Ткаченко Ф.П., Куцын Е.Б.* Влияние детергентов на аминокислотный состав белка зеленой водоросли *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek // Гидробиол. журн. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 94—98.
18. *Хит О.* Фотосинтез (физиологические аспекты). — М.: Мир, 1972. — 314 с.
19. *Эколого-токсикологические аспекты загрязнения морской среды* / Под ред. С. А. Патина — Л.: Гидрометеиздат, 1985. — 116 с.
20. *Blasco J., Hampel M., Moreno-Garrido I.* Toxicity of surfactants for aquatic life // Analysis and Fate of Surfactants in the Aquatic Environments / Ed. by T. P. Knepper, D. Barcelo, P. de Voogt. — Amsterdam: Elsevier, 2003. — P. 827—867.
21. *Borowitzka M.A., Borowitzka L.J.* Dunaliella // Microalgal biotechnology / Ed. by M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka. — Cambridge: Cambridge univ. press, 1988. — P. 27—58.
22. *Butcher R.W.* An introductory account of the smaller algae of British Coastal Waters. Part IV: Cryptophyceae // Fishery Investigat. — Ser. IV. — London, 1967. — P. 18—36.
23. *Chawla G., Viswanathan P.N., Devi S.* Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture // Environ. Exp. Botany. — 1987. — Vol. 27. — P. 311—323.
24. *Diequez-Rojo E., Gonzalez L.* Effects of allelochemical 2-benzoxazolinone on growth, pigment content and cell appearance of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. // Thalassas. — 2003. — Vol. 19. — P. 13—22.
25. *Guillard R.R.L. Ryther J.H.* Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt. and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // Canad. J. Microbiol. — 1962. — Vol. 8, N 2. — P. 229—239.
26. *Hampel M., Moreno-Garrido I., Sorbino C. et al.* Acute toxicity of LAS homologues in marine microalgae: esterase activity and inhibition growth as endpoints of toxicity // Ecotoxicol. Environ. Safety. — 2001. — Vol. 48. — P. 287—292.



27. *Klaveness D.* Studies on the morphology, food selection and growth of two planktonic freshwater strains of *Coleps* sp. // *Protistologica*. — 1984. — Vol. 20. — P. 335—349.
28. *Moreno-Garrido I., Hampel M., Lubian L.M., Blasco J.* Marine microalgae toxicity test for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and alkylphenol ethoxylate (APEO) // *Fresenius J. Anal. Chem.* — 2001. — Vol. 371. — P. 474—478.
29. *Müller M., Zehnder A.J.B., Escher B.I.* Membrane toxicity of linear alcohol ethoxylates // *Environ. Toxicol. Chem.* — 1999. — Vol. 18. — P. 2767—2774.
30. *Nyberg H., Koskimies-Soininen K.* The phospholipid fatty acids of porphyridium purpureum cultured in the presence of triton X-100 and sodium desoxycholate // *Phytochemistry*. — 1984. — Vol. 23. — P. 2489—2495.

Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток

Поступила 13.05.09