

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 581.1: 582.26

СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И РОСТ МИКРОВОДОРОСЛИ *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS* (*VACILLARIOPHYTA*) В ПРИСУТСТВИИ БИХРОМАТА КАЛИЯ

Ж.В. Маркина,
Н.А. Айздайчер

Институт биологии моря
им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения
Российской академии наук,
Владивосток, 690041,
г. Владивосток, Российская
Федерация

Прису́тствие в среде бихромата калия в концентрациях 2, 4, 7 и 10 мг/л подавляло рост у диатомовой микроводоросли *Pseudo-nitzschia pungens* (штаммы PP-07 и PP-08) и приводило к снижению содержания хлорофилла *a* и каротиноидов. Все показатели уменьшались по сравнению с контрольными уже на первые сутки опыта, особенно при концентрациях 7 и 10 мг/л вещества. К четвертым суткам негативное действие токсиканта усиливалось. Через семь суток в присутствии 2 мг/л вещества численность клеток, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов у обоих штаммов увеличивались, однако показатели не достигали контрольного уровня. Популяции исследованных штаммов микроводоросли оставались угнетенными при более высоких уровнях содержания бихромата калия. Штамм PP-07 оказался более чувствительным к веществу по сравнению с PP-08.

Ключевые слова: бихромат калия, загрязнение, одноклеточные водоросли, рост, фотосинтетические пигменты.

Введение. Растительные организмы в прибрежных акваториях пребывают в условиях все увеличивающегося поступления загрязняющих веществ, особенно тяжелых металлов. Один из наиболее токсичных их представителей – хром. Его соединение, бихромат калия, попадает в прибрежные акватории морей со сточными водами предприятий [1,2]. Учитывая первостепенную роль растений в экосистемах, как продуцентов кислорода, особенно важно изучение действия данного токсиканта на их физиологическое состояние. Хлорофилл *a* и каротиноиды – важнейшие показатели, дающие интегральную оценку состояния растительного организма. Известно, что хром вызы-

вает разрушение хлорофиллов *a* и *b*, изменение активности ферментов и подавление скорости фотосинтеза [1]. В связи с этим содержание фотосинтетических пигментов активно изучается при оценке действия бихромата калия, наряду с численностью клеток [3, 4]. Диатомовая микроводоросль *Pseudo-nitzschia pungens* привлекает внимание исследователей как продуцент нейротоксичной домоевой кислоты. Накапливаясь в тканях моллюсков-фильтраторов, кислота передается по пищевым цепям и вызывает отравление, даже гибель людей, а также теплокровных животных, что подтверждается многочисленными зарегистрированными фактами [5,6]. Проблема усугубляется тем, что

Маркина Жанна Васильевна (Markina Zhanna Vasil'evna), кандидат биологических наук, научный сотрудник Лаборатории физиологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690041, г. Владивосток, Российская Федерация, zhanpav@mail.ru

Айздайчер Нина Александровна (Ayzdaycher Nina Aleksandrovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории физиологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690041, г. Владивосток, Российская Федерация

«цветение» *P. pungens* в водах морей постоянно учащается [7,8].

Цель настоящей работы заключалась в оценке изменения роста, содержания хлорофилла *a* и каротиноидов у штаммов PP-07 и PP-08 микроводоросли *P. pungens* в присутствии бихромата калия.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили штаммы микроводоросли *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex. P.T. Cleve) Hasle (Bacillariophyta) PP-07 и PP-08. Штамм PP-07 выделен из прибрежных вод зал. Восток (Японское море) в декабре 2007 года, штамм PP-08 выделен там же в сентябре 2008 г.

Лабораторные культуры выращивали на питательной среде *f* [9] при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещении люминесцентными лампами со свето-темновым периодом 12 ч свет: 12 ч темнота, общей освещенностью $70 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. Питательную среду готовили на основе стерилизованной морской воды соленостью 32%. В экспериментах исследовали действие соли шестивалентного хрома в виде бихромата калия в концентрациях 2, 4, 7 и 10 мг/л, который вносили в культуральную среду однократно в день постановки опыта.

Количество клеток водорослей подсчитывали под микроскопом Janamed 2 в счетной камере типа Ножотта объемом 0.044 мл. Скорость роста штаммов водорослей определяли по стандартной формуле: $v = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$, где v – скорость роста, N_1 – численность клеток в культуре в момент времени t_1 , N_2 – численность клеток в культуре в момент времени t_2 , Δt – промежуток времени между t_1 и t_2 [9].

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли стандартным методом экстракции из клеток ацетоном с последующим измерением на спектрофотометре Shimadzu-UV 2550. Расчет концентраций данных пигментов производили по стандартным формулам [10].

Образцы для подсчета численности клеток и определения содержания пигментов отбирали после тщательного перемешивания суспензии в одно и то же время спустя 2 ч после окончания темного периода на 1, 4 и 7 сут опыта. Продолжительность экспериментов – 7 сут. Все опыты проводили в трех повторностях. Эффективные и летальные концентрации вычисляли методом пробит-анализа [11]. На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение. Внесение 2 мг/л бихромата калия не оказывало существенного влияния на численность клеток через сутки эксперимента; ингибирование возросло с увеличением содержания вещества в среде и продолжительностью экспозиции (рис. 1а).

К концу опыта популяция водоросли при содержании 2 мг/л токсиканта восстанавливалась, концентрации вещества 4–10 мг/л продолжали оказывать ингибирующий эффект на рост популяции. Скорость роста популяции данного штамма снижалась через сутки при добавлении бихромата калия во всех концентрациях (табл. 1). В последующие дни скорость роста в присутствии токсиканта увеличивалась, что связано с адаптацией водоросли к негативному фактору и ее восстановлением. В то время как контрольная популяция к этому времени находилась в стационарной фазе роста и темпы ее прироста замедлялись.

Уменьшение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов у штамма PP-07 отмечено через сутки при всех уровнях содержания бихромата калия (рис. 1б, 1в). Так как изменение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов носило сходный характер на всем протяжении опыта, мы будем обозначать их как фотосинтетические пигменты (ФП). К седьмым суткам содержание ФП возросло при 2 мг/л токсиканта. Более высокое количество вещества продолжало негативно сказываться на данных показателях.

Изменения динамики численности клеток и содержания ФП в токсической среде у штамма PP-08 носило иной характер. Число клеток достоверно не отличалось от контрольного при внесении 2 мг/л бихромата калия на первые сутки опыта, а концентрации токсиканта 4–10 мг/л приводили к ингибированию роста (рис. 2а). На четвертые сутки количество клеток сократилось при всех уровнях содержания токсиканта, однако изменения были менее выраженными, чем у штамма PP-07. С увеличением экспозиции до семи суток число клеток в присутствии 2 мг/л бихромата калия возрастало, в то время как при более высоких концентрациях продолжало снижаться. Скорость роста водоросли также изменялась в токсической среде (табл. 1). Содержание ФП через сутки опыта не отличалось от контрольного при внесении 2 мг/л токсиканта (рис. 2б, 2в), а при более высоких его концентрациях отмечено снижение данных показателей.

Штаммы *P. pungens* неодинаково реагировали на присутствие бихромата калия в среде: штамм PP-07 был более чувствителен к токсиканту, чем PP-08, что подтверждают также различные для обоих штаммов летальные и эффективные концентрации (табл. 2). Разный отклик на данное вещество описан ранее у трех штаммов вида *Scenedesmus obliquus* [2]. Вследствие того, что исследованные нами штаммы росли при одинаковых стандартных условиях, можно предположить, что нео-

Таблица 1

Скорость роста (делений/сутки) популяций штаммов PP-07 и PP-08 *Pseudo-nitzschia pungens* в присутствии бихромата калия (мг/л)

Продолжительность эксперимента, сутки	Концентрация бихромата калия (мг/л)				
	Контроль	2	4	7	10
Штамм PP-07					
1	0,27	0,15	-0,12	-0,31	-0,81
4	1,81	1,03	0,35	0,38	-0,48
7	0,20	0,76	0,29	0,34	0,44
Штамм PP-08					
1	0,01	0,04	-0,39	-0,75	0,02
4	0,58	0,20	0,12	0,28	-0,06
7	0,55	0,69	0,36	0,03	-0,23

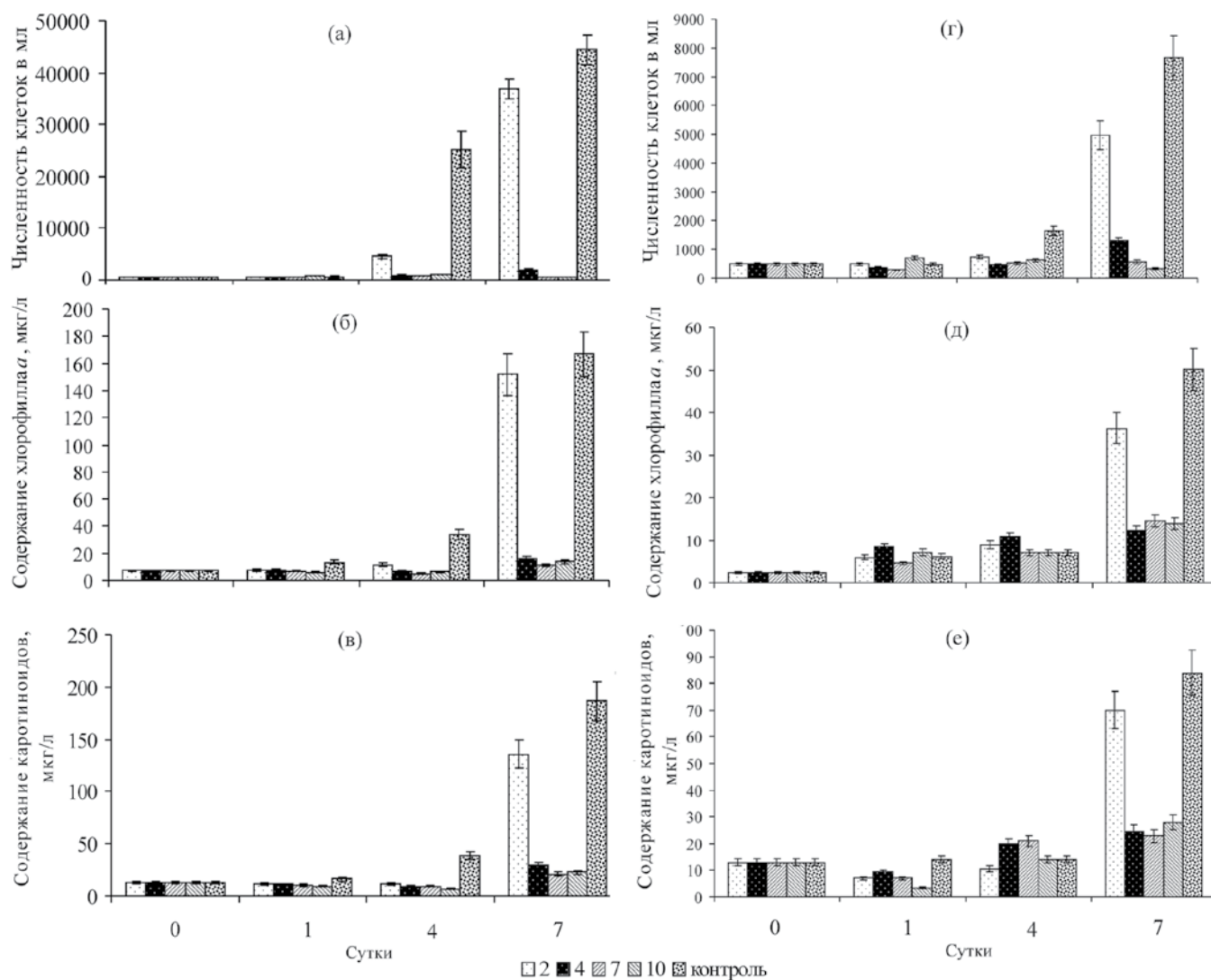


Рис. 1. Рост культуры (а), содержание хлорофилла (б) и каротиноидов (в) штамма PP-07 *Pseudo-nitzschia pungens*; рост культуры (г), содержание хлорофилла (д) и каротиноидов (е) штамма PP-08 *Pseudo-nitzschia pungens* в зависимости от содержания бихромата калия в среде.

ЛК₅₀²⁴ и ЭК₅₀²⁴ бихромата калия (мг/л) для штаммов PP-07 и PP-08 *Pseudo-nitzschia pungens*

Штамм <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	ЛК5024 и ЭК5024 бихромата калия (мг/л) для показателей жизнедеятельности <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>		
	Численность клеток	Содержание хлорофилла а	Содержание каротиноидов
PP-07	7,3	7,8	8,2
PP-08	9,6	8,1	9,6

динаковый отклик водорослей обусловлен их физиолого-биохимическими особенностями.

Таким образом, бихромат калия во всех концентрациях оказывал негативное действие на содержание ФП, рост обоих штаммов *P. pungens* и на морфологию клеток.

Отмеченное в наших опытах при концентрациях 4–10 мг/л большее снижение числа клеток водоросли, чем уменьшение уровня ФП, по-видимому, связано с тем, что главная цель организма микроводоросли в неблагоприятных условиях – накопление фотосинтетических пигментов, особенно при отсутствии клеточного деления [12]. Такое явление описано ранее при воздействии бихромата калия на других представителей микроводорослей [3,4]. Негативное

действие хрома обусловлено, возможно, тем, что он, не являясь жизненно необходимым для растений, не имеет специального механизма детоксикации, что увеличивает токсическую нагрузку на клетку, приводя к нарушению процессов потребления минеральных веществ [1].

Заключение. Таким образом, бихромат калия во всех случаях оказал негативное действие на содержание ФП, а также рост штаммов PP-07 и PP-08 *P. pungens*. В целом, при 2 мг/л отмечено уменьшение числа клеток и содержания ФП, с последующим восстановлением культуры. При 4, 7 и 10 мг/л подавлялось деление клеток и снижалось содержание ФП на всем протяжении опыта. Штамм PP-07 *P. pungens* более чувствителен к токсиканту, чем PP-08.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Envir. Int.* 2005; 31: 739–753.
2. Pribyl P., Cepák V. Chromium influences growth and cell morphology but itself does not induce gametogenesis in three *Scenedesmus obliquus* strains. *Czech Phycol.* 2005; 5: 91–100.
3. Новикова И.П., Паршикова Т.В., Власенко В.В. Изменение функционального состояния клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. в присутствии бихромата калия в среде. *Альгология.* 2008; 18: 113–122.
4. Айздайчер Н.А., Маркина Ж.В. Влияние соли шестивалентного хрома на рост попу-

ляции, морфологию клеток и физиологические показатели бентосной микроводоросли *Attheya ussuriensis* Stonik, Orlova et Crawford, 2006 (Bacillariophyta) в культуре. *Биол. моря.* 2011; 37: 455–460.

5. Villac M.C., Roelke D.L., Chavez F.P., Cifuentes L.A., Fryxell G.A. *Pseudo-nitzschia pungens*, *P. australis* Frenguelli and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production // *J. Shellfish Res.* 1993; 12: 457–465.
6. Trainer V.L., Wekell J.C., Horner R.A., Hatfield C.L., Stein J.E. Domoic acid production in *Pseudo-nitzschia pungens* // *Harmful Algae. Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae,*

25–29 June 1997, Vigo Spain / Eds. Requena B., Blanco J., Fernandez M., Wyatt. Santiago de Compostela, Spain: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998; 337–340.

7. Hasle G.R. Are the most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae.* 2002; 1: 137–146.
8. Стоник И.В., Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А. О морфологии диатомовых водорослей рода *Pseudo-nitzschia* из Дальневосточных морей России. *Вестн. РФФИ;* 2011; 1(69): 103–106.
9. 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: 229–239.

10. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла а. Гос. стандарт СССР. Гос. ном. СССР по охране природы. М.: Изд-во стандартов; 1990. 15 с.
11. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: РЭФИА, НИИ – Природа; 2002.
12. Брагинский Л.П., Величко И.М., Щербань Э.П. Пресноводный планктон в токсической среде. Киев: Наукова думка; 1987.

REFERENCES:

1. Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Envir. Int.* 2005; 31: 739–753.
2. Pribyl P., Cepák V. Chromium influences growth and cell morphology but itself does not induce gametogenesis in three *Scenedesmus obliquus* strains. *Czech Phycol.* 2005; 5: 91–100.
3. Novikova I.P., Parshikova T.V., Vlasenko V.V., Zubenko I.B. Change of functional state of *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. Cells at the presence of K₂Cr₂O₇ in the environment. *Al'gologiya.* 2008; 18: 113–122 (in Russian).
4. Ayzdaycher N.A., Markina Zh. Influence of changes in salinity of sea water on the

growth, photosynthetic pigment content and cell size of the benthic alga *Attheya ussuriensis* Stonik, Orlova et Crawford, 2006 (Bacillariophyta). *Biologiya morya.* 2011; 6: 455–460 (in Russian).

5. Trainer V.L., Wekell J.C., Horner R.A., Hatfield C.L., Stein J.E. Domoic acid production in *Pseudo-nitzschia pungens* // *Harmful Algae. Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae,* 25–29 June 1997, Vigo Spain / Eds. Requena B., Blanco J., Fernandez M., Wyatt. Santiago de Compostela, Spain: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998; 337–340.
6. Villac M.C., Roelke D.L., Chavez F.P.,

Cifuentes L.A., Fryxell G.A. Pseudo-nitzschia pungens, *P. australis* Frenguelli and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production // *J. Shellfish Res.* 1993; 12: 457–465.
- 7. Hasle G.R. Are the most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae.* 2002; 1: 137–146.
- 8. Stonik I.V., Orlova T.Yu., Ayzdaycher N.A. Morphology of diatom algae, genus *Pseudo-nitzschia* from Russian Far East seas. *Vestn. RFFI;* 2011; 1(69): 103–106 (In Russian).
- 9. 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: 229–239.

10. State Standard 17.1.04.02–90. Water. Spectrophotometric determination of chlorophyll a. Moscow: Standartinform Publ., 1990 (In Russian).
11. Manual on the determination of the toxicity of water, bottom sediments, pollutants and boring solutions. Moscow: REFA, NIA-Prroda 2002; (In Russian).
12. Braginskiy L.P., Velichko I.M., Shcherban' E.P. Freshwater plankton in toxic environment. Kiev: Naukova dumka; 1987 (In Russian).