

Оценка качества вод Амурского залива Японского моря на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

Ж. В. МАРКИНА, Н. А. АЙЗДАЙЧЕР

Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17
E-mail: zhannav@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Проведено в 2007 и 2008 гг. биотестирование воды из Амурского залива Японского моря с применением одноклеточной водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Выявлено, что показатели численности клеток, содержания хлорофилла *a* и каротиноидов микроводоросли, выращенной в тестируемой воде, отклонялись от таковых в контроле во все сезоны исследований. Наши результаты подтверждают полученные ранее сведения о неблагоприятной экологической обстановке в заливе и негативном действии его вод на гидробионтов.

Ключевые слова: биотестирование, загрязнение, Японское море, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

Загрязнение Мирового океана, несмотря на принимаемые меры, постоянно возрастает, особенно в районах расположения крупных городов и в местах впадения крупных рек. На российском побережье Японского моря примером такой акватории является Амурский залив, в который попадают как неочищенные стоки г. Владивостока, так и воды крупнейшей на юге Приморского края р. Раздольная. Только в г. Владивостоке население составляет более 600 тыс. чел., а если учитывать расположенные на берегах залива поселки и воздействие других населенных пунктов через р. Раздольная, то суммарно на данный залив оказывает антропогенный прессинг около 1 млн чел. [1]. Кроме того, бурное развитие г. Владивостока не сопровождалось строительством эффективных очистных сооружений. В результате, как показывают многолетние наблюдения, наибо-

лее загрязненными являются внутренняя и прилегающая к г. Владивостоку части залива [2].

Использование различных методов для анализа качества среды залива, таких как определение гидрохимических показателей [3], содержания нефтяных углеводородов, тяжелых металлов, пестицидов в воде, грунтах и гидробионтах [4–7], дало возможность выявить лишь определенный вид загрязнения, но не комплексно оценить состояние залива. Поскольку гидробионты отражают малейшие изменения среды обитания, то для таких целей рационально использовать биотестирование. Известно много случаев, когда содержание токсикантов было ниже ПДК, а вода проявляла значительную токсичность вследствие их взаимодействия или наличия неучтенных веществ [8, 9]. Помимо метода исследований необходимо также правильно подобрать тест-объект. Перспективными тест-организмами вследствие своей чувствительности, круглогодичной доступности и

Маркина Жанна Васильевна
Айздайчер Нина Александровна

репрезентативности результатов [10, 11] являются одноклеточные водоросли.

Цель настоящей работы – оценка методом биотестирования с использованием микроводоросли *Phaeodactylum tricornerutum* качества среды Амурского залива Японского моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы воды отбирали в Амурском заливе в мае, августе и октябре 2007 и 2008 гг. (рис. 1). Названия станций и характеристика солености воды приведены в таблице. Соленость морской воды измеряли на электросолемере ГМ-65М.

В качестве тест-объекта использовали альгологически чистую культуру микроводоросли *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyta), рекомендованную для тестирования морских вод [12]. Данная водоросль отличается высокой устойчивостью к изменению со-

Соленость воды на станциях отбора проб для биотестирования в Амурском заливе

Сезон	Соленость, ‰	
	Ст 1. – Спортивная гавань	Ст 2. – п-ов Де-Фриза
2007:		
май	29,0	22,8
август	27,8	23,7
октябрь	31,2	28,2
2008:		
май	30,2	24,8
август	25,8	20,4
октябрь	22,8	32,7

П р и м е ч а н и е. Соленость на контрольной станции постоянная – 32,0 ‰.

лености, выдерживая ее понижения до 10–15 ‰, что является важным свойством для тест-организма, так как он при биотестировании реагирует только на присутствующие в воде загрязняющие вещества [13]. Микроводоросль выращивали в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл в культуральной среде Гольдберга, приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды. Биотестирование проводили в стандартных условиях при освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкмоль/(м² · с) с периодичностью 12 ч свет: 12 ч темнота при температуре (20 ± 2) °С.

Качество природной морской воды оценивали по изменению численности клеток в единице объема суспензии, содержания хлорофилла *a* и каротиноидов. В качестве контроля служили водоросли, выращенные на морской воде из условно чистого района (см. рис. 1).

Образцы для определения численности клеток и содержания фотосинтетических пигментов отбирали после тщательного перемешивания в одно и то же время через 1–2 ч после окончания темного периода. Пробы для подсчета клеток фиксировали раствором Утермея, их численность определяли путем подсчета в 4–6 камерах Горяева. Уровень содержания фотосинтетических пигментов определяли стандартным методом экстракции из клеток. Для этого аликвоту объемом 20 мл по четыре повторности отбирали на 4, 7, 10 и 14-е сут эксперимента и фильтровали через мембранные фильтры Владипор типа

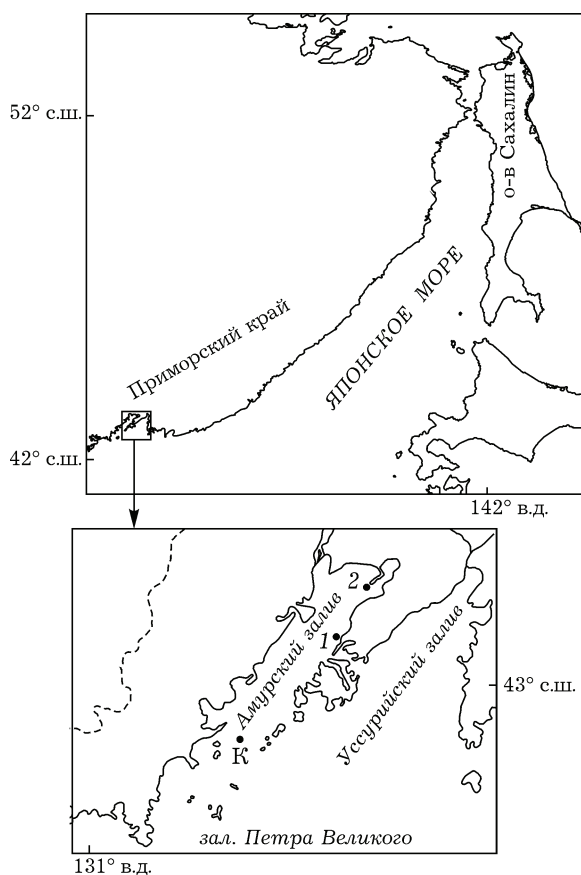


Рис. 1. Расположение станций отбора проб воды. 1 – Спортивная гавань, 2 – п-ов Де-Фриза, к – контроль

МФАС-ОС-2, фильтры с осадком заливали 90%-м ацетоном и центрифугировали 20 мин при 5000 оборотов/мин. Оптические плотности измеряли на спектрофотометре Shimadzu-UV 2550 при длинах волн 664, 647 и 630 для хлорофилла *a* и на 480 нм для каротиноидов. Расчет концентраций пигментов производили по формулам, рекомендованным рабочей группой № 17 при ЮНЕСКО [14]. Продолжительность опытов составляла 7 сут [12]. Опыты проводили в трех повторностях. Результаты выражали в процентах к контролю [15]. За контроль принимали число клеток, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в чистой воде. Статистическую обработку данных (средние значения, стандартные отклонения) проводили с помощью пакета программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В мае 2007 г. численность клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* в воде с обеих станций в начале опыта снижалась, а к завершению данный показатель не отличался от контрольного (рис. 2, *a*). Так как динамика содержания хлорофилла *a* и каротиноидов была сходной на протяжении всего опыта, то мы будем обозначать их как фотосинтетические пигменты (ФП). Содержание ФП у микроводоросли, выращенной в воде со всех станций, носило пульсирующий характер, понижаясь в начале опыта и увеличиваясь к его окончанию (рис. 3, *a*, 4, *a*).

В августе 2007 г. зарегистрировали увеличение роста водоросли в воде со ст. 1 со 2-х по 4-е сут, однако различия были хоро-

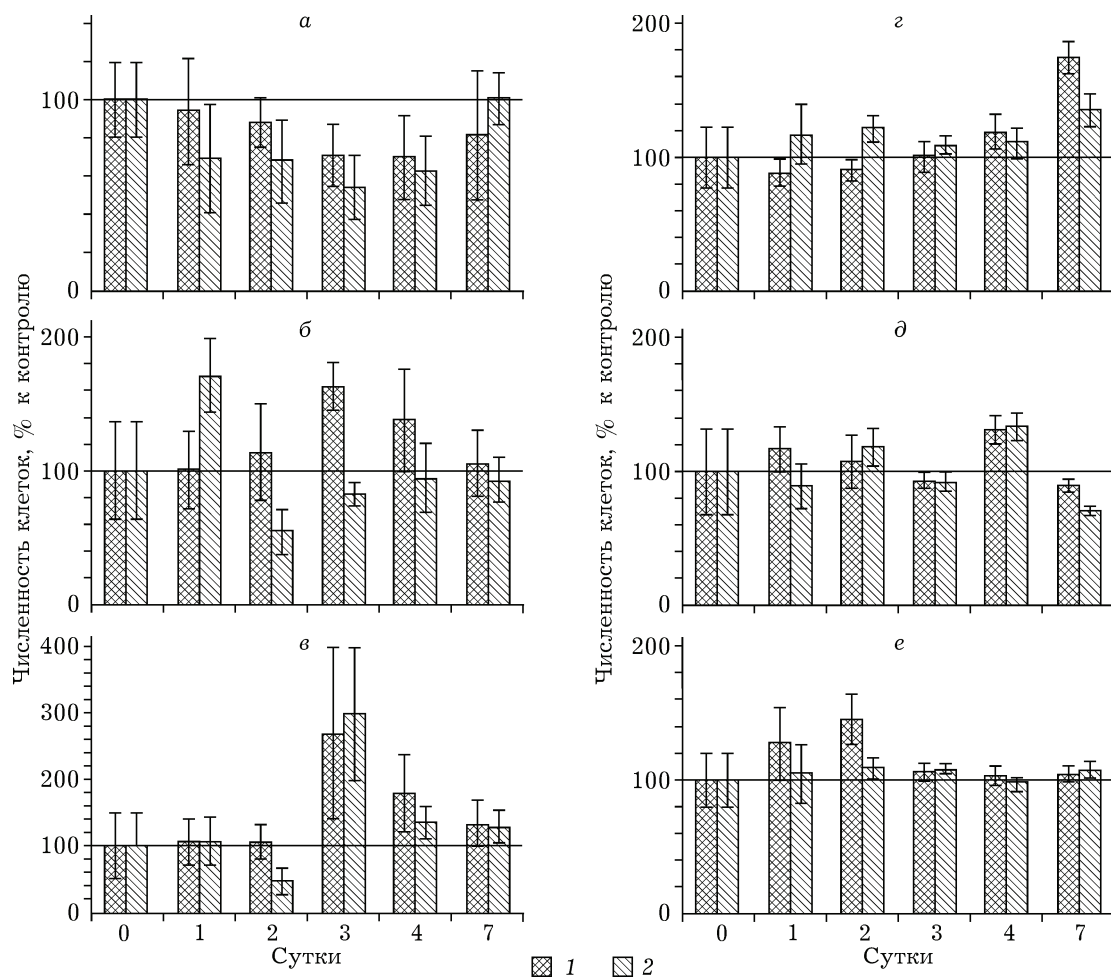


Рис. 2. Численность клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* (% к контролю) в воде, отобранной в Амурском заливе. 1 – станция 1; 2 – станция 2. *a* – май 2007 г., *б* – август 2007 г., *в* – октябрь 2007 г., *г* – май 2008 г., *д* – август 2008 г., *е* – октябрь 2008 г.

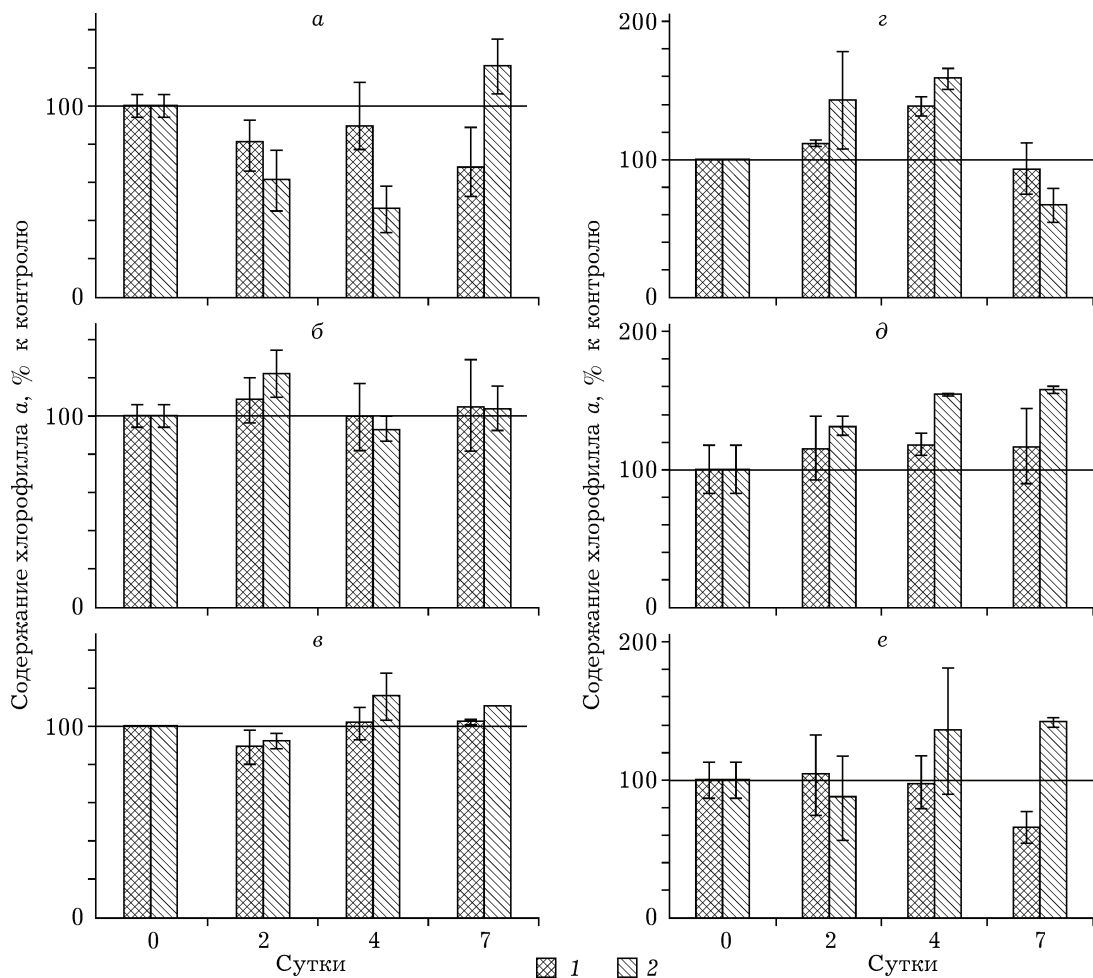


Рис. 3. Содержание хлорофилла *a* у микроводоросли *Phaeodactylum tricornerutum* (% к контролю) в воде, отобранной в Амурском заливе. Обозначения станций и дат как на рис. 2

шо выражены только на 2-е сут; к концу экспозиции численность клеток не отличалась от таковой в контроле (см. рис. 2, б). В воде со ст. 2 в 1-е сут также наблюдали бурный рост *P. tricornerutum*, а в последующие дни он был менее интенсивным. Содержание ФП у микроводоросли, выращенной в воде с обеих станций, практически не отличалось от контрольного, кроме содержания каротиноидов на 4-е сут опыта (см. рис. 3, б, 4, б).

В октябре 2007 г. динамика численности клеток в воде с обеих станций была сходной: на 3-и сут опыта рост водоросли увеличивался, а впоследствии число клеток уменьшалось (см. рис. 2, в). Содержание ФП также существенно не отличалось от такового в контроле во время всего эксперимента (см. рис. 3 в, 4 в).

В мае 2008 г. численность клеток в обоих случаях практически не отличалась от тако-

вой в контроле до 4-х сут опыта, впоследствии она возрастала (см. рис. 2, г). Содержание хлорофилла *a* превышало таковое в контроле на 2-е сут опыта на всех станциях, в то время как содержание каротиноидов снижалось. В последующие дни опыта динамика содержания ФП совпадала (см. рис. 3, г, 4, г).

В августе 2008 г. число клеток в воде со станций существенно не отличалось от контрольного в течение 3-х сут, увеличиваясь на 4-е и значительно уменьшаясь на 7-е сут (см. рис. 2, д). Содержание ФП в течение всего эксперимента превышало таковое в контроле (см. рис. 3, д, 4, д).

В октябре 2008 г. численность клеток в воде со ст. 1 была выше таковой в контроле только в течение 2-х сут, а впоследствии значительно не отклонялось от него. В воде со ст. 2 количество клеток оставалось сход-

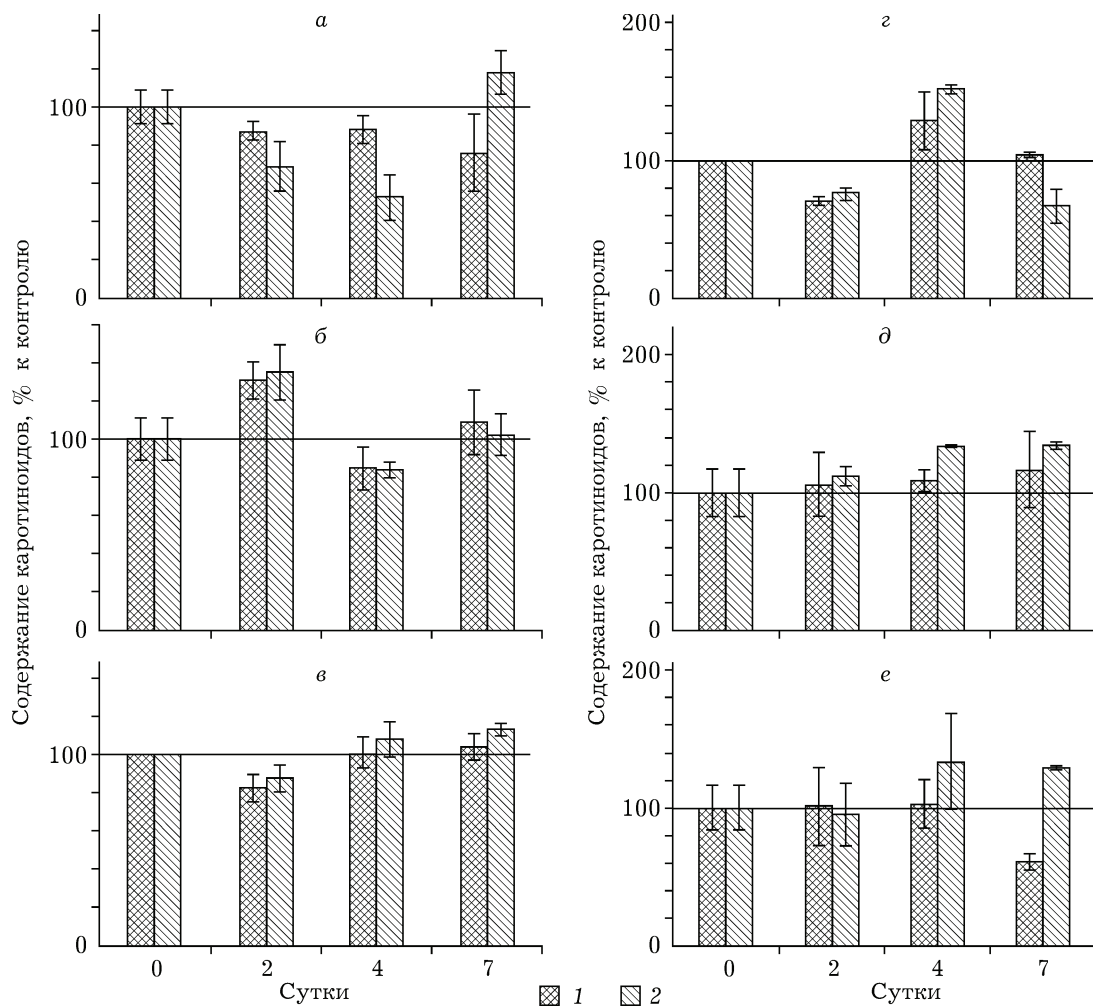


Рис. 4. Содержание каротиноидов у микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* (% к контролю) в воде, отобранной в Амурском заливе. Номера станций соответствуют таковым на рисунке. Обозначения станций и дат как на рис. 2

ным с контрольным на протяжении опыта (см. рис. 2, e). Содержание ФП не отличалось от контрольного в течение 4-х сут опыта в воде с обеих станций, а на 7-е сут у микроводоросли, выращенной в воде со ст. 1, оно снижалось (см. рис. 3, e, 4, e).

Таким образом, наибольшее ингибирование роста микроводоросли в воде с обеих станций отмечено в мае 2007 г., максимальная стимуляция – в октябре 2007 г. В остальные сезоны изменение численности клеток носило пульсирующий характер. В целом в 2007 г. наблюдали более значительные отклонения роста водоросли от контрольных в тестируемой воде по сравнению с 2008 г.

Содержание ФП в подавляющем большинстве экспериментов носило слабовыраженный колебательный характер, за исключени-

ем опыта в мае 2007 г., когда отмечено максимальное снижение исследуемых показателей. Следовательно, можно предположить, что рост популяции давал более четкий отклик на тестируемые образцы воды, чем содержание ФП.

Таким образом, при тестировании воды из Амурского залива происходили отклонения роста и содержания ФП у *P. tricornutum* по сравнению с таковыми у водоросли, выращенной в воде из контрольного района. Так как соленость воды на исследованных станциях не опускалась ниже 20 ‰ (см. таблицу), то мы полагаем, что наблюдаемые различия исследованных показателей вызваны содержанием в воде Амурского залива загрязняющих веществ.

Анализ литературных данных показал, что в настоящее время растительные сообщества

в этом районе деградируют: число видов в сообществах уменьшилось в 1,5 раза по сравнению с 1970–1980 гг., усилилась ценогическая роль зеленых водорослей, сократились заросли водорослей и морских трав [16].

Продуктивность фитопланктона в результате евтрофикации увеличилась в период с 2000–2004 гг. по сравнению с 1982–1985 гг.; изменения коснулись и комплекса доминирующих видов, наметилась тенденция к их обеднению [17, 18]. Загрязнение Амурского залива способствовало интенсивному развитию потенциально токсичных видов фитопланктонных водорослей, например *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi, *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller [19–21].

В сообществах животных также уже на протяжении многих лет отмечены снижение видового разнообразия и преобладание видов положительных индикаторов загрязнения [22, 23].

Серьезные изменения зарегистрированы не только в видовом разнообразии донных животных, но в их состоянии, которое оценивается как критическое. Например, у морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1863) обнаружены гистопатологические нарушения в гонадах и отклонения процессов гаметогенеза. В эмбриональном и личиночном развитии таких животных отмечено большое количество аномалий, особенно в популяции ежей из Спортивной гавани [24]. У мидий *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и мохнаторукого краба, обитающих вблизи п-ова Де-Фриза, выявлены подавление энергетических процессов в гепатопанкреасе, изменение активности ферментов, усиление перекисного окисления липидов по сравнению с животными из фонового района [25]. В тканях обитающих в данном районе камбал выявлены высокие концентрации хлороорганических пестицидов [5].

Очевидно, что отмеченные нами отклонения динамики численности и содержания ФП у *P. tricorntutum*, а также описанные в литературе нарушения в сообществах и изменения в организмах животных связаны с присутствием в Амурском заливе загрязняющих веществ. Это одна из наиболее загрязненных акваторий российского побережья Японского моря вследствие сброса большого количества сточных вод (до 76,6 %) г. Владивос-

тока [26]. В водной толще и донных осадках исследуемого района неоднократно зарегистрированы концентрации тяжелых металлов, поверхностно-активных веществ, пестицидов, фенолов, существенно превышающие фоновые, что свидетельствует о хроническом загрязнении [1, 3, 6, 7, 26]. Данные химического анализа подтверждаются и микробной индикацией: в воде, отобранной из Спортивной гавани и у п-ова Де-Фриза, отмечена высокая численность нефте-, фенолоксиляющих и металлрезистентных бактерий [27].

Таким образом, проведенное нами биотестирование позволяет подтвердить полученные ранее сведения о негативном действии воды Амурского залива на гидробионтов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Наумов Ю. А. Антропогенез и экологическое состояние геосистемы прибрежно-шельфовой зоны залива Петра Великого Японского моря. Владивосток: Дальнаука, 2006. 300 с.
2. Нигматулина Л. В. Оценка антропогенной нагрузки береговых источников на Амурский залив (Японское море) // Вестн. ДВО РАН. 2007. № 1. С. 73–77.
3. Tkalin A. V., Belan T. A., Shapovalov E. N. The State of the Marine Environment near Vladivostok, Russia // Mar. Pollut. Bull. 1993. Vol. 26. P. 418–422.
4. Христофорова Н. К., Коженкова С. И. Изменение уровней тяжелых металлов в морской среде // ДАН. 2000. Т. 374, № 1. С. 136–138.
5. Боярова М. Д., Сяпина И. Г., Приходько Ю. В., Лукьянова О. Н. Хлорированные углеводороды в гидробионтах залива Петра Великого Японского моря // Экологическая химия. 2004. Т. 13, № 2. С. 117–124.
6. Ковековдова Л. Т., Симоконь М. Н. Тенденции изменения химико-экологической ситуации в прибрежных акваториях Приморья. Токсичные элементы в донных отложениях и гидробионтах // Изв. ТИНРО. 2004. Т. 137. С. 310–320.
7. Черняев А. П., Лукьянова О. Н., Черкашин С. А. Распределение нефтяных углеводородов и оценка состояния биоты в Амурском заливе (Японское море) // Экологическая химия. 2006. Т. 15, № 1. С. 28–38.
8. Флеров Б. А. Биотестирование: терминология, задачи, перспективы // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград: АН СССР, Институт биологии внутренних вод, 1983. С. 13–20.
9. Крайнюкова А. Н. Биотестирование в охране вод от загрязнения // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 4–21.
10. Lewis M. A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review // Envir. Pollut. 1995. Vol. 87. P. 319–336.
11. Blasco J., Hampel M., Moreno-Garrido I. Toxicity of surfactants for aquatic life // Analysis and Fate of Surfactants in the Aquatic Environments / eds. T. P. Knepner, D. Barcelo, P. de Voogt. Amsterdam: The Netherlands: Elsevier, 2003. P. 827–867.

12. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: РЭФИА, НИИ – Природа, 2002. 118 с.
13. Дятлов С. Е., Петросян А. Г. *Phaeodactylum tricornerutum* Bohl. (Chrysophyta) как тест-объект. Диапазон соленостной резистенции // Альгология. 2001. Т. 11, № 2. С. 259–264.
14. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 247 с.
15. Жмур Н. С., Орлова Т. Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. М.: Акварос, 2001. 44 с.
16. Levenets I. R., Skriptsova A. V. Benthic flora of the inner part of Amursky Bay (Sea of. Japan) // Ecological studies and state of the ecosystem of Amursky bay and estuarine zone of the Razdolnaya river (Sea of Japan). Vol. 1, Vladivostok: Dalnauka, 2008. P. 284–301.
17. Стоник И. В., Селина М. С. Фитопланктон как показатель трофности вод залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 1995. Т. 21, № 6. С. 403–406.
18. Стоник И. В., Орлова Т. Ю. Летне-осенний фитопланктон в Амурском заливе Японского моря // Там же. 1998. Т. 24, № 4. С. 205–211.
19. Симакова Н. К., Орлова Т. Ю., Селина М. С. “Красный прилив”, вызванный рафидофитовой водорослью *Chattonella* sp., в Амурском заливе Японского моря // Там же. 1990. № 5. С. 77–78.
20. Селина М. С., Симакова Н. К., Яснецкая Л. В. *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi (Dinophyta) в заливе Петра Великого (Японское море) // Альгология. 1992. Т. 2, № 1. С. 51–55.
21. Стоник И. В. Потенциально токсичная динофитовая водоросль *Prorocentrum minimum* в Амурском заливе Японского моря // Биол. моря. 1994. Т. 20, № 6. С. 419–425.
22. Belan T. A. Benthos abundance pattern and species composition in conditions of pollution in Amursky bay (the Peter the Great Bay, the Sea of Japan) // Mar. Pollut. Bull. 2003. Vol. 46. P. 1111–1119.
23. Pavlyuk O. N., Trebukhova J. A. Composition and distribution of meiobenthos in Amursky bay (Peter the Great Bay, the East Sea) // Ocean Science Journal. 2005. Vol. 40. P. 119–125.
24. Ващенко М. А., Жадан П. М., Альмяшова Т. Н. Экологические проблемы использования прибрежных морских акваторий, Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. С. 36–40.
25. Лукьянова О. Н. Молекулярные биомаркеры энергетического метаболизма мидий при антропогенном загрязнении зал. Петра Великого Японского моря // Экология. 2006. № 3. С. 227–231.
26. Доклад о состоянии окружающей природной среды Приморского края в 2002 году. Владивосток: Министерство природных ресурсов РФ, Главное управление природных ресурсов и охраны окружающей среды МПР России по Приморскому краю (ГУПР по Приморскому краю), 2003. 162 с.
27. Бойченко Т. В., Христофорова Н. К., Бузолева Л. С. Микробиологическая индикация прибрежных вод Амурского залива // Современное состояние водных биоресурсов: материалы научной конференции, посвященной 70-летию С. М. Коновалова. Владивосток: ТИНРО-центр, 2008. С. 438–442.

Evaluation of Water Quality in the Amur Bay of the Japanese Sea on the Basis of Biotesting Using Protophyte Algae *Phaeodactylum tricornerutum* Bohl.

Zh. V. MARKINA, N. A. AIZDAICHER

A. V. Zhirmunsky Institute of Sea Biology FEB RAS
690041, Vladivostok, Pal'chevsky str., 17
E-mail: zhannav@mail.ru

Water biotesting in the Amur Bay of the Japanese sea was performed using protophyte algae *Phaeodactylum tricornerutum* Bohl. during the years 2007 and 2008. It was revealed that the number of cells, content of chlorophyll *a* and carotenoids of the microalga grown in the water under test deviated from those in the reference samples during all the seasons of investigation. Our results confirm previously obtained data on the unfavorable ecological situation in the bay and the negative action of its water on hydrocoles.

Key words: biotesting, pollution, Japanese sea, *Phaeodactylum tricornerutum* Bohl.