

УДК 574.64:582.261.1

## ОЦЕНКА НЕОДНОРОДНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ С КЛОНЫМИ КУЛЬТУРАМИ БЕНТОСНЫХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

© 2020 г. А. Н. Петров, Е. Л. Неврова

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
Севастополь, Российская Федерация  
E-mail: [alexpet-14@mail.ru](mailto:alexpet-14@mail.ru)

Поступила в редакцию 17.09.2019; после доработки 23.04.2020;  
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Увеличение антропогенной нагрузки на прибрежные акватории требует постоянного отслеживания состояния их экосистем. Удобными биоиндикаторами для опосредованной оценки качества морской среды служат донные диатомовые водоросли, являющиеся ключевым звеном морских прибрежных сообществ и обладающие высокой чувствительностью к влиянию экологических факторов. Изменение показателей развития микроводорослей под воздействием различных токсикантов может быть подходящим инструментом при мониторинге качества морской среды, однако научно-методические подходы использования бентосных диатомовых как тест-объектов остаются недостаточно разработанными. Одной из важных проблем является оценка достоверности выборок при подсчёте обилия клеток в сосудах на разных этапах токсикологического эксперимента. Цель работы — провести статистическую оценку достоверности равенства среднего исходного числа клеток инокулята клоновой культуры, вносимого в каждую из повторностей, а также достоверности равномерного распределения клеток по всей площади дна чашек Петри. Используются клоновые культуры трёх видов бентосных диатомовых водорослей — *Thalassiosira excentrica* Cleve, 1903 (Coscinodiscophyceae), *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Fragilariophyceae) и *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. in Kütz.) W. Smith, 1853 (Bacillariophyceae). Эти виды относятся к разным классам Bacillariophyta и значительно различаются по морфологии панциря и образу жизни (парящие в водной массе, прикрепленные, подвижные). Статистическое сравнение вариативности числа клеток в эксперименте подтвердило отсутствие достоверных различий между средними значениями исследуемого параметра у всех видов при стандартном уровне значимости (0,05). Показано, что, несмотря на видоспецифические отличия в темпе приращения числа клеток, вариативность числа клеток в полях зрения микроскопа в ходе эксперимента меняется незакономерно. Наибольшая вариативность отмечена на 5-е сутки у мелкоразмерного вида *T. excentrica* ( $Cv = 42...55\%$ ), а наименьшая — у крупноклеточного вида *A. crystallina* ( $Cv = 27...31\%$ ). Установлено отсутствие достоверных различий в численности клеток между тремя повторностями (для каждого из видов) как при исходном внесении инокулята в чашки, так и в последующие дни опыта. Вывод справедлив для каждого из изученных видов диатомовых, что позволяет рассматривать все повторности как выборки одной совокупности и осреднять результаты, полученные на разных стадиях токсикологического эксперимента. Статистически доказана равномерность распределения клеток по дну экспериментальных чашек, которая не зависит от видовой принадлежности клеток и их абсолютной численности. Результаты позволяют надёжно оценивать изменения численности клеток тестируемых видов диатомовых водорослей на разных этапах эксперимента по выборкам, полученным на основе подсчёта клеток в ограниченном числе полей зрения.

**Ключевые слова:** токсикологический эксперимент, методика, статистическая оценка, Bacillariophyta, *Thalassiosira excentrica*, *Ardissonea crystallina*, *Pleurosigma aestuarii*, Чёрное море

В связи со значительной антропогенной нагрузкой на Чёрное море, особенно проявляющейся в прибрежных акваториях у берегов Крыма, необходимо отслеживать изменения состояния планктонных и бентосных сообществ. В качестве одного из наиболее подходящих объектов для биотестирования и биоиндикации широко применяют микроводоросли, в частности планктонные, по использованию которых имеются многочисленные методические разработки [3 ; 8 ; 12 ; 19].

Обширные литературные данные по изучению воздействия различных токсикантов на развитие микроводорослей преимущественно посвящены представителям Chlorophyta [10] и Cryptophyta [17 ; 25]. Между тем вклад данных отделов (23 и 2 вида соответственно) в донные микроальгоценозы Чёрного моря совсем незначителен, в отличие от вклада отдела Bacillariophyta (1094 вида и внутривидовых таксона) [13], представители которого составляют до 99 % численности и биомассы в микрофитобентосных сообществах Мирового океана [29]. Упомянутый факт указывает на недостаточный уровень знаний для получения всеобъемлющей картины воздействия токсикантов на сообщества микрофитобентоса.

Многие массовые виды донных диатомовых (Bacillariophyta), являясь важными структурными компонентами морских экосистем, характеризуются приуроченностью к определённым микробиотопам и высокой чувствительностью к влиянию неблагоприятных экологических факторов [14]. Это позволяет использовать диатомовые водоросли бентоса в качестве перспективных тест-объектов, параметры изменения физиологических показателей которых (удельная скорость роста, смертность, состояние хлоропластов) под воздействием различных поллютантов служат удобным инструментом при опосредованной оценке качества среды [3 ; 10 ; 12 ; 18 ; 24 ; 25 ; 27].

В рамках задач гидробиологического мониторинга прибрежных акваторий использование бентосных диатомовых в качестве тест-объектов является мало разработанной научно-методической проблемой [9 ; 23]. Её решение позволит получить новые экспериментальные данные о диапазонах толерантности разных видов морских диатомовых водорослей при воздействии модельных токсикантов (медный купорос, синтетические поверхностно-активные вещества, пестициды и пр.) в ходе подострых и хронических опытов [1 ; 10 ; 11 ; 24 ; 25]. Также возникнет возможность решения ряда вопросов методического характера, от чего зависит надёжность выводов по итогам токсикологических тестов [19].

Одной из основных методических проблем является проверка достоверности выборочных оценок при подсчёте обилия клеток в экспериментальных сосудах (чашки Петри в нашем случае) на разных этапах многодневного токсикологического эксперимента. На точность результатов могут влиять неодинаковое число клеток, которые исходно содержатся в дозированном объёме инокулята (1 мл), вводимого в начале каждого эксперимента в чашки Петри, а также вероятная неравномерность распределения клеток по дну чашек в последующие дни экспозиции.

Вследствие малых размеров и высокой численности диатомовых водорослей прямой тотальный учёт клеток в каждой чашке на разных этапах эксперимента нереален. Именно поэтому подсчёт числа клеток ведётся под микроскопом в конечном числе дискретных полей зрения известной площади, а затем полученные данные пересчитываются на всю площадь дна экспериментального сосуда. В случае такого непрямого подсчёта общей численности клеток в чашках итоговые результаты могут сильно варьировать, что способно привести к искажению выводов о степени воздействия токсиканта на изменение численности клеток. Указанные сложности определили необходимость проведения специального методического исследования, результаты которого могут быть использованы для оптимизации постановки токсикологических экспериментов с донными диатомовыми и обеспечить большую надёжность выводов при интерпретации полученных количественных данных.

Цель работы, проведённой с использованием клоновых культур трёх разных видов донных диатомовых водорослей, — проверить справедливость следующих методических гипотез на основе статистической оценки достоверности полученных результатов:

- 1) среднее число клеток инокулята клоновой культуры, вносимое в каждую чашку Петри в начале эксперимента, должно быть примерно равным, то есть исходные числа клеток в каждой из трёх повторностей, которые закладываются в каждой линии, не должны статистически различаться между собой;
- 2) распределение клеток в каждой чашке, контролируемое в ходе многократного подсчёта в полях зрения по всей площади дна, является сравнительно равномерным, то есть отсутствует статистически значимая пространственная неоднородность по численности клеток *in vitro*.

Возможная агрегированность распределения клеток при подсчёте определённого числа полей зрения (их суммарная площадь составляет не более 4–5 % всей площади дна чашки Петри) при пересчёте на общую площадь дна экспериментального сосуда может приводить к значительной переоценке (или недооценке) общего числа клеток и, соответственно, влиять на выводы о степени воздействия разных концентраций токсикантов и сроков экспозиции на итоговые изменения численности.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Объекты исследований.** Для оценки распределения клеток в экспериментальных сосудах использованы три вида бентосных диатомовых водорослей: *Thalassiosira excentrica* Cleve, 1903 (Coscinodiscophyceae), *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Fragilariophyceae) и *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. in Kütz.) W. Smith, 1853 (Bacillariophyceae). Выбор видов обусловлен следующими причинами: 1) значительные различия морфологии панциря (дисковидные, палочковидные, сигмоидные); 2) разный образ жизни (планктонные — парящие в водной массе, бентосные — прикрепленные к субстрату, подвижные — передвигающиеся по субстрату); 3) наличие или отсутствие способности образовывать колонии; 4) видоспецифическая скорость размножения, а следовательно, и предположительно разные характер распределения клеток по дну чашек и темп прироста численности в ходе длительного эксперимента; 5) принадлежность к трём разным таксономическим классам Bacillariophyta (в соответствии с использованной нами системой [28]). Сравнительная статистическая оценка характера распределения клеток, имеющих кардинальные различия в образе жизни, позволяет проверить объективность результатов при проведении в дальнейшем токсикологических экспериментов с использованием представителей разных классов Bacillariophyta.

По результатам молекулярно-генетических исследований и экспериментов по половому воспроизведению, систематическое положение вида *A. crystallina*, ранее перемещённого из класса Fragilariophyceae в класс Coscinodiscophyceae, поставлено под сомнение. Высказано предположение, что *Ardissonea* (и иные представители Toxariales) могут представлять уникальную эволюционную группу, обособленную от пеннатных диатомовых водорослей [22]. Учитывая то обстоятельство, что по форме панциря и способности к образованию пучковидных колоний, прикрепленных к субстрату, данный вид более схож с представителями Fragilariophyceae (к которым он и относился до недавнего времени), в целях нашего эксперимента мы рассматриваем *A. crystallina* именно в составе этого класса.

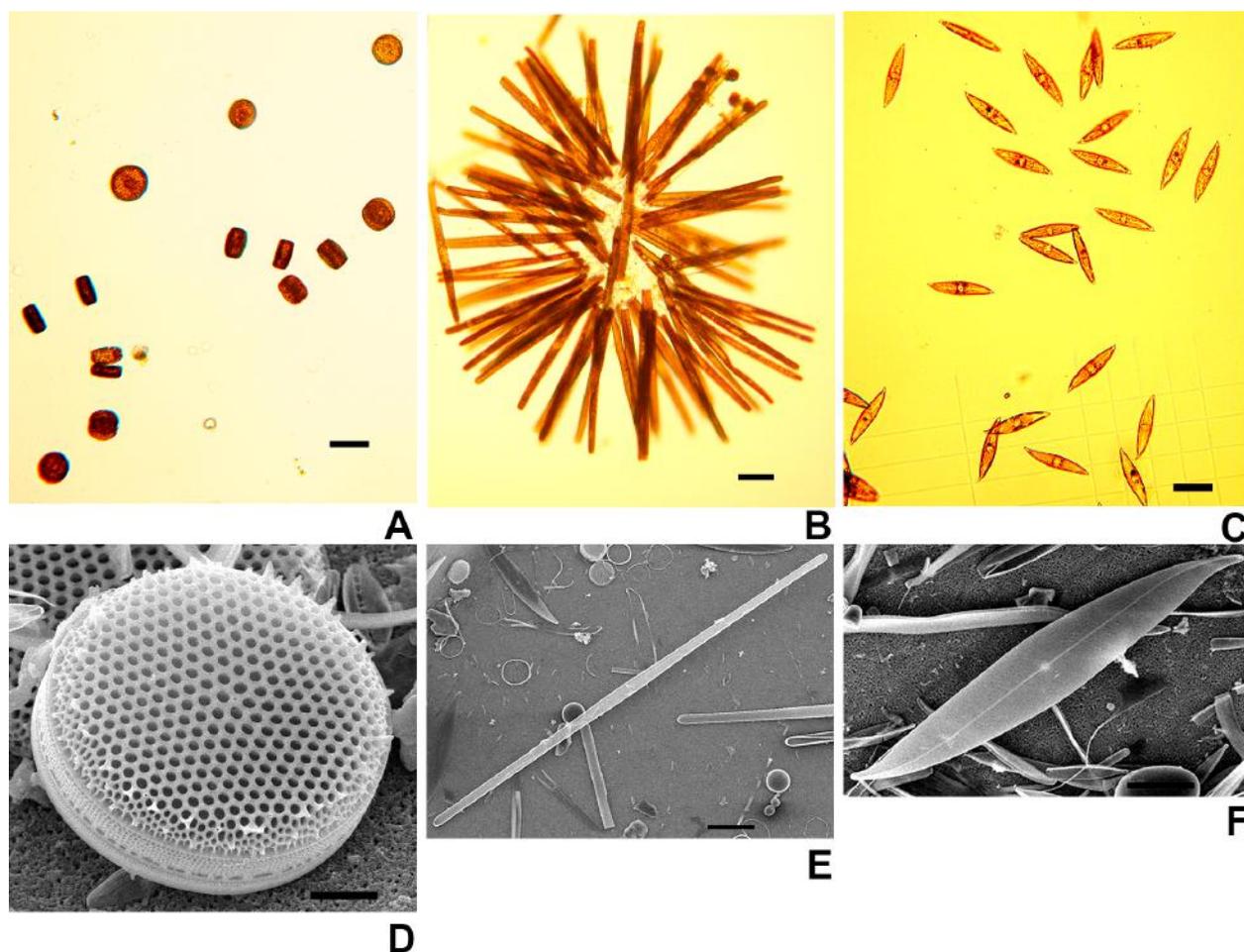
Выбранные виды диатомовых водорослей выделены в клоновые линии путём изолирования с помощью микропипетки и семикратной промывки одиночной клетки под бинокуляром МБС-10 при увеличении  $\times 40$  [2 ; 5 ; 18].

*Thalassiosira excentrica* выделен из состава микрофитобентоса рыхлого субстрата, отобранного в бух. Ласпи в сентябре 2017 г. на глубине 9 м. Вид морской, бенто-планктонный, способен парить в толще воды или опускаться на дно, характеризуется массовой встречаемостью в сублитеральной зоне Чёрного моря; клетки образуют цепочковидные колонии из 4–6 особей, соединённых тонким прозрачным тяжем [13 ; 15]. Створки плоскоцилиндрические, диаметр диска 25 мкм\*, высота 3 мкм (рис. 1А, D).

\*Здесь и далее размеры клеток указаны на момент начала эксперимента.

*Ardissonea crystallina* выделен из состава фитоперифитона искусственного субстрата, отобранного в бух. Казачья в апреле 2018 г. на глубине 5 м. Вид морской, бентосный, часто встречается в прибрежных районах; клетки прикрепляются к поверхности субстрата, образуя пучковидные колонии из 4–30 особей [4 ; 13]. Створки узколинейные, длина 410 мкм, ширина 18 мкм (рис. 1В, Е).

*Pleurosigma aestuarii* выделен из состава микрофитобентоса каменистого субстрата, отобранного у мыса Айя в июле 2018 г. на глубине 3 м. Вид морской, бентосный, встречается в массе в черноморской сублиторали; клетки одиночные, подвижные, быстро перемещаются по поверхности субстрата [13 ; 16]. Створки узколанцетные, сигмовидно изогнутые на концах, длина 135 мкм, ширина 22,5 мкм (рис. 1С, F).



**Рис. 1.** Используемые в эксперименте виды бентосных диатомовых водорослей: А, D — *Thalassiosira excentrica*; В, Е — *Ardissonea crystallina*; С, F — *Pleurosigma aestuarii*. Световой микроскоп — А, В, С (масштабная линейка — 10 мкм); сканирующий электронный микроскоп — D (масштабная линейка — 5 мкм), Е (масштабная линейка — 50 мкм), F (масштабная линейка — 20 мкм)

**Fig. 1.** Benthic diatoms used in experiment: А, D – *Thalassiosira excentrica*; В, Е – *Ardissonea crystallina*; С, F – *Pleurosigma aestuarii*. Light microscope – А, В, С (scale bar = 10 μm); scanning electronic microscope – D (scale bar = 5 μm), Е (scale bar = 50 μm), F (scale bar = 20 μm)

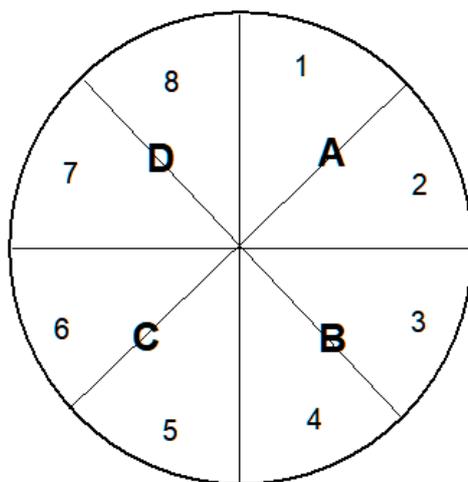
**Содержание культур.** Клоновые культуры содержали на питательной среде Гольдберг [7 ; 21], модифицированной для культивирования морских бентосных диатомовых, при постоянной температуре ( $22 \pm 2$ ) °С при рассеянном естественном освещении на северном окне лаборатории ФИЦ ИнБЮМ. Морскую воду для приготовления среды отбирали в 12-мильной зоне и фильтровали через фильтр 0,45 мкм, затем трижды пастеризовали при температуре +75 °С; далее в неё добавляли питательные вещества в соответствии с протоколом (табл. 1).

**Таблица 1.** Состав модифицированной среды Гольдберг на морской воде**Table 1.** Recipes for modified natural seawater media by Goldberg

| № раствора | Вещество   | Количество вещества на 100 мл дистиллированной воды | Количество раствора на 1 л морской воды, мл |
|------------|--|---|---|
| 1          | $KNO_3$  | 10,1 г  | 2,0   |
| 2          | $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$                         | 1,421 г   | 0,5   |
| 3          | $MnCl_2 \times 4H_2O$<br>$CoCl_2 \times 6H_2O$   | 0,01979 г<br>0,02379 г                              | 1,0   |
| 4          | $Na_2ЭДТА \times 2H_2O$<br>$FeCl_3 \times 6H_2O$ | 0,244 г<br>0,144 г                                  | 1,0   |
| 5          | FeNH <sub>4</sub> -цитрат                        | 0,072 г   | 0,5   |
| 6          | $Na_2SiO_3 \times 5H_2O$                         | 1,5 г   | 2,0   |
| 7          | Тиамин (витамин В <sub>1</sub> )                 | 0,05 мг   | 0,5   |
| 8          | Цианкобаламин (витамин В <sub>12</sub> )         | 0,5 мг  | 5,0   |

**Схема эксперимента.** В опыте с клоновыми культурами трёх видов диатомовых водорослей оценены возможные расхождения между тремя повторностями по среднему числу клеток в каждой чашке Петри через одни и пять суток экспозиции. Для каждого вида опыт проводили с использованием модифицированной питательной среды Гольдберг, без добавления токсиканта. В каждую из чашек (внутренний диаметр — 85 мм, площадь дна — около 5700 мм<sup>2</sup>) внесено по 30 мл питательной среды и по 1 мл инокулята клоновой культуры, после чего содержимое тщательно перемешано. Затем чашка загерметизирована пленкой Parafilm во избежание испарения жидкости.

Для контроля равномерности распределения случайных полей просмотра по всей площади дна чашки разделено линиями на 8 равных частей (рис. 2). В границах каждого сектора проведена фотофиксация 8–9 полей зрения, рандомизированно выбранных по площади дна, то есть в каждой чашке учтено по 64–72 поля. Микрофотографирование осуществлено под световым микроскопом Carl Zeiss Axiostar Plus с объективом Achroplan  $\times 10$  с помощью цифровой камеры Canon PowerShot A640 (ФИЦ ИнБЮМ, г. Севастополь), а также под сканирующим электронным микроскопом JEOL JSM-6390LA (ЦКП Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург). Таксономическая идентификация видов проведена по определителям [6 ; 15 ; 16 ; 26].

**Рис. 2.** Оценка неравномерности распределения случайных полей просмотра по всей площади дна чашки Петри в эксперименте**Fig. 2.** Estimation of distribution heterogeneity of random viewing fields over the entire Petri dish bottom area in the experiment

Подсчёт клеток проводили по фотографиям каждого сектора. Площадь одного поля зрения составила около  $4,0 \text{ мм}^2$ , то есть в ходе просмотров суммарно просчитывали 4,5–4,9 % площади дна каждой чашки. При оценке равномерности распределения клеток диатомовых водорослей по дну чашек на разных этапах эксперимента сравнивали средние значения числа клеток в полях просмотра в 4 секторах дна чашек (А, В, С, D), при этом полученные ранее данные расчётов для полей зрения из восьми смежных частей объединяли попарно: 1 + 2, 3 + 4, 5 + 6 и 7 + 8. Указанные методические особенности связаны с тем, что абсолютная вариативность числа клеток при сравнении отдельных полей просмотра даже в пределах одного из восьми секторов могла быть значительной, особенно на 5-е сутки экспозиции. Так, например, для *A. crystallina* размах вариации составил от 16 до 41 клетки, для *T. excentrica* —  $11 \div 48$ , для *P. aestuarii* —  $36 \div 91$ . Коэффициент вариации при расчётах количества клеток в отдельных секторах, разделённых линиями, также мог достигать 70–78 %. При сравнительных расчётах по четырём секторам (А–D) с учётом объединённых данных из смежных частей дна чашек показатели вариативности числа клеток (дисперсия и стандартная ошибка) становились заметно ниже из-за учёта удвоенного числа измерений по каждой выборке. Для оценки степени расхождения между повторностями (чашками) рассчитывали статистическую достоверность парных различий средней численности клеток как между четырьмя секторами из одной чашки (то есть оценивали степень агрегированности клеток в пределах дна одной чашки), так и между секторами, относящимися к разным чашкам.

Поскольку исследованные виды диатомовых характеризуются разными темпами прироста числа клеток в ходе эксперимента, для корректной оценки статистических различий по средней численности рассчитывали скорость относительного приращения численности клеток ( $V$ ) для всех исследованных видов по формуле [19 ; 20]:

$$V = (N_{(t+\Delta t)} - N_t) / (\Delta t \cdot N_t),$$

где  $N_t$  — средняя численность клеток в культуре в чашке Петри в момент времени  $t$  (1-е сутки эксперимента);

$N_{(t+\Delta t)}$  — средняя численность клеток в культуре в момент времени  $t+\Delta t$  (5-е сутки);

$\Delta t$  — период экспозиции (4 суток).

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка результатов экспериментов проведена с применением стандартных алгоритмов вариационного параметрического и рангового анализов, входящих в пакет статистических программ SigmaPlot 12.5 [30].

Нормальность распределения вариантов в выборке (число клеток в 64–72 полях просмотра в каждой чашке Петри) оценивали по критериям Шапиро — Уилка или Колмогорова — Смирнова с предварительным тестированием данных и исключением из расчётов резко выделяющихся значений (выбросов) в каждой выборке по методу квантилей. Такие агрегации с аномально высоким обилием клеток не являются итогом естественного нарастания их количества в ходе эксперимента, но иногда возникают либо вследствие исходного внесения дозатором в чашку Петри инокулята, в котором уже присутствуют соединённые полисахаридами агрегации клеток, либо в результате колебания содержимого чашки в ходе манипуляций при фотографировании.

Сравнение дисперсий трёх и более независимых выборок проведено по критерию Фишера (ANOVA), а также по ранговому критерию Краскела — Уоллеса (при отсутствии нормальности в распределении вариантов) для уровня значимости  $P = 0,05$ . Последующее сравнение у трёх видов диатомовых достоверности различий средних значений признака (среднее число клеток в случайных полях просмотра по четырём секторам чашек с учётом различных периодов экспозиции) выполнено на основе  $t$ -критерия Стьюдента (в случае нормальности распределения вариантов в выборках и равенства дисперсий). Для сравнения независимых выборок, в которых распределение вариантов отличалось от нормального, применены непараметрические критерии Холма — Шидака (для равных по объёму выборок) и Данна (при сравнении разноразмерных выборок) [30].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа показали, что вариативность данных при подсчёте числа клеток в полях зрения может заметно различаться как при сравнении разных видов, так и у одного вида, но в разные периоды экспозиции (табл. 2).

**Таблица 2.** Вариационные характеристики для трёх видов донных диатомовых водорослей, отражающие особенности изменения средней численности клеток в чашках Петри (три повторности) на 1-е и 5-е сутки эксперимента

**Table 2.** Variation characteristics for three benthic diatom species reflecting the changes in mean cell number in Petri dishes (3 replicates) on the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> days of the experiment

| Вид                             | Повторность | 1-е сутки |                  |          | 5-е сутки |                  |          |
|---------------------------------|-------------|-----------|------------------|----------|-----------|------------------|----------|
|                                 |             | n         | $N \pm SE$       | $Cv, \%$ | n         | $N \pm SE$       | $Cv, \%$ |
| <i>Ardissonea crystallina</i>   | I           | 65        | $6,16 \pm 0,41$  | 51,3     | 63        | $22,70 \pm 0,82$ | 31,4     |
|                                 | II          | 63        | $6,82 \pm 0,41$  | 44,8     | 62        | $24,71 \pm 0,90$ | 32,2     |
|                                 | III         | 62        | $6,79 \pm 0,42$  | 46,2     | 68        | $24,65 \pm 0,76$ | 26,7     |
| <i>Thalassiosira excentrica</i> | I           | 63        | $9,19 \pm 0,39$  | 34,1     | 63        | $20,68 \pm 1,42$ | 54,6     |
|                                 | II          | 64        | $9,67 \pm 0,44$  | 37,3     | 63        | $20,91 \pm 1,21$ | 46,1     |
|                                 | III         | 62        | $11,45 \pm 0,41$ | 28,3     | 62        | $24,00 \pm 1,26$ | 41,6     |
| <i>Pleurosigma aestuarii</i>    | I           | 65        | $17,37 \pm 0,38$ | 29,6     | 72        | $63,44 \pm 1,37$ | 22,3     |
|                                 | II          | 67        | $18,55 \pm 0,54$ | 24,0     | 72        | $60,78 \pm 1,71$ | 23,9     |
|                                 | III         | 72        | $19,79 \pm 0,52$ | 22,8     | 72        | $61,83 \pm 1,80$ | 24,7     |

**Примечание:** n — суммарное число просмотренных полей зрения в каждой чашке Петри за вычетом резко выделяющихся вариантов (выбросы);  $N \pm SE$  — среднее число клеток  $\pm$  стандартная ошибка по выборке;  $Cv$  — коэффициент вариации.

**Note:** n — total number of examined viewing fields in each Petri dish minus the sharply distinguished values (statistical outliers);  $N \pm SE$  — mean cells number  $\pm$  sampling standard error;  $Cv$  — coefficient of variation.

Возможные статистические различия в характере распределения диатомовых по дну чашки в разные периоды эксперимента могли быть вызваны тем, что в 1-е сутки распределение клеток в основном определялось тщательным механическим перемешиванием инокулята до и после его внесения в чашку, что теоретически обуславливало более равномерное распределение клеток в полях зрения. На 5-е сутки экспозиции характер распределения по дну чашки клеток диатомовых водорослей в основном определяется их индивидуальной двигательной активностью и склонностью к прикреплению и образованию агрегаций либо к пассивному парению в толще питательной среды. Перечисленные факторы могли оказывать влияние на неравномерность значений при учёте численности клеток в случайных полях зрения.

Наибольший коэффициент вариации отмечен в выборках *A. crystallina* в 1-е сутки эксперимента (45–51 %), а также в выборках *T. excentrica* на 5-е сутки (42–55 %). Следует учесть, что среднее число клеток в полях зрения у этих видов различалось в 3,5 раза. Высокая вариативность данных могла быть вызвана неравномерностью распределения клеток этих видов, когда наряду с одиночно расположенными клетками в полях зрения присутствуют и их агрегации, в которых клетки соединяются полисахаридными выделениями (*T. excentrica*) либо образуют пучковидные колонии (*A. crystallina*), прикреплённые к дну чашки в одной точке. В свою очередь, выборки клеток *P. aestuarii* в полях зрения характеризуются минимальной вариативностью (23–29 %) по параметру численности относительно периода экспозиции, что объясняется подвижностью клеток данного вида, свободно перемещающихся в ходе опыта по всему дну чашки, не концентрируясь в одной точке.

Результаты дисперсионного анализа для исследованных видов диатомовых показали, что дисперсии выборок при сравнении трёх повторностей не различаются: вероятность ( $P$ ) принятия нуль-гипотезы много выше критической (0,05) и составляет 0,27–0,49 в 1-е сутки и 0,16–0,47 на 5-е сутки. Результаты попарного сравнения средних значений числа клеток в каждой чашке Петри (сравнение между повторностями) на разных стадиях эксперимента приведены в табл. 3.

**Таблица 3.** Результаты тестирования различий между средними значениями численности клеток в чашках Петри при попарном сравнении трёх повторностей для изученных видов диатомовых водорослей на разных этапах эксперимента

**Table 3.** Results of testing the differences between the mean cell numbers in Petri dishes under pairwise comparison of three replicates for diatom species at different stages of experiment

| Вид                             | Пара повторностей | Среднее значение (1-е сутки) |       | <i>P</i>     | Среднее значение (5-е сутки) |       | <i>P</i> |
|---------------------------------|-------------------|------------------------------|-------|--------------|------------------------------|-------|----------|
|                                 |                   |                              |       |              |                              |       |          |
| <i>Ardissonea crystallina</i>   | I – II            | 6,16                         | 6,82  | 0,252        | 22,70                        | 24,71 | 0,090    |
|                                 | I – III           | 6,16                         | 6,79  | 0,283        | 22,70                        | 24,65 | 0,092    |
|                                 | II – III          | 6,82                         | 6,79  | 0,951        | 24,71                        | 24,65 | 0,747    |
| <i>Thalassiosira excentrica</i> | I – II            | 9,19                         | 9,67  | 0,416        | 20,68                        | 20,91 | 0,906    |
|                                 | I – III           | 9,19                         | 11,45 | <b>0,000</b> | 20,68                        | 24,00 | 0,084    |
|                                 | II – III          | 9,67                         | 11,45 | <b>0,003</b> | 20,91                        | 24,00 | 0,080    |
| <i>Pleurosigma aestuarii</i>    | I – II            | 17,37                        | 18,55 | 0,163        | 63,44                        | 60,78 | 0,077    |
|                                 | I – III           | 17,37                        | 19,79 | <b>0,001</b> | 63,44                        | 61,83 | 0,200    |
|                                 | II – III          | 18,55                        | 19,79 | 0,135        | 60,78                        | 61,83 | 0,671    |

**Примечание:** *P* — вероятность справедливости нуль-гипотезы об отсутствии различий между средними значениями численности клеток в сравниваемых выборках ( $P_{\alpha} = 0,05$ ). Статистически достоверно различающиеся результаты выделены жирным шрифтом.

**Note:** *P* – probability of acceptance of the null-hypothesis that there are no differences between the mean values of cell number in samples compared ( $P_{\alpha} = 0.05$ ). Statistically significantly different results are indicated in bold.

Для *A. crystallina* все попарные различия по средней численности клеток между повторностями как в 1-е, так и на 5-е сутки экспозиции недостоверны ( $P_{\text{эксн}} \gg 0,05$ ).

Для *T. excentrica* в 1-е сутки достоверные различия среднего числа клеток в полях зрения выявлены между парами повторностей I – III и II – III ( $P_{\text{эксн}} \leq 0,003$ ). Между парой I – II различия недостоверны ( $P_{\text{эксн}} = 0,416$ ). На 5-е сутки достоверные различия средних значений числа клеток между всеми парами повторностей отсутствуют.

Для *P. aestuarii* в 1-е сутки достоверные различия средних отсутствуют при попарном сравнении повторностей I – II и II – III. Только при сравнении пары I – III различия средних значений числа клеток достоверны ( $P_{\text{эксн}} \leq 0,001$ ). На 5-е сутки достоверные различия средних значений числа клеток при сравнении всех повторностей отсутствуют ( $P_{\text{эксн}} > 0,05$ ).

Скорость относительного приращения численности клеток в среднем была выше у *P. aestuarii* (0,59) и *T. excentrica* (0,40), чем у *A. crystallina* (0,37), что могло повлиять на показатели вариативности, хотя итоговые различия в численности клеток между повторностями эксперимента оказались недостоверны у обоих видов (см. табл. 3).

Таким образом, можно считать, что вариативность средней численности клеток у каждого вида в разных повторностях эксперимента в большинстве случаев не выходит за пределы статистической погрешности. Данный факт даёт основание рассматривать все повторности (случайные выборки клеток) как соответствующие одной исходно взятой совокупности (инокулят клеток каждого из видов) со сходным характером вариативности показателей.

Результаты оценки равномерности распределения числа клеток по четырём секторам дна чашек Петри показали следующее.

**Первые сутки.** Для всех изученных видов диатомовых водорослей не было выявлено статистически достоверных отличий ( $P \gg 0,05$ ) между средними значениями параметра (число клеток в 16–18 полях просмотра) при попарном сравнении 12 секторов, то есть трёх повторностей (по четыре сектора в каждой чашке — А, В, С, D). Следовательно, на начальном этапе эксперимента распределение клеток по дну чашек статистически равномерно; заметных расхождений между чашками в результатах расчёта общего числа клеток по средним значениям из выборочных полей просмотра не происходит.

**Пятые сутки.** С учётом того, что распределение числа клеток в выборках во многих секторах отличается от нормального (тест Колмогорова — Смирнова: 0,125–0,210) и имеет достоверно разные дисперсии, тестирование достоверности возможных различий между секторами чашек проведено на основе ранговых критериев (тест Краскела — Уоллеса).

*Ardissonea crystallina.* Результаты 66 попарных ранговых сравнений среднего медианного значения числа клеток в каждом секторе дна чашки Петри показали отсутствие статистически значимых различий ( $P_{эксн} = 0,067$ ) как между секторами дна одной чашки, так и между чашками (повторностями).

*Thalassiosira excentrica.* Результаты 66 попарных ранговых сравнений средних медианных значений числа клеток в каждом секторе свидетельствуют об отсутствии статистически достоверных различий ( $P_{эксн} = 0,071$ ) как между секторами дна одной чашки, так и между чашками.

*Pleurosigma aestuarii.* При всех 66 попарных ранговых сравнениях 12 секторов из трёх повторностей только в парах секторов, где рассмотрены данные из сектора 1D (1D vs 2A; 1D vs 2B; 1D vs 3B), различия по среднему числу клеток были достоверны ( $P_{эксн}$  0,001; 0,003; 0,008 соответственно). Для остальных попарных ранговых сравнений медианных средних, выполненных по алгоритму Дана, различия между секторами были недостоверны ( $P_{эксн} > 0,05$ ). В случае исключения из анализа сектора 1D, единственного с аномально высокой численностью клеток в полях просмотра, статистически достоверных различий как между секторами дна одной чашки, так и между чашками не выявлено ( $P_{эксн} = 0,272$ ).

Полученные данные подтверждают статистическую равномерность распределения клеток бентосных диатомовых водорослей по дну экспериментальных сосудов даже в том случае, когда прямым визуальным подсчётом учтено не более 5 % дна чашки. Результаты сохраняют справедливость независимо от вида микроводорослей, их морфологического строения и образа жизни, а также отличий в значениях их абсолютной численности в чашках на разных стадиях эксперимента.

**Заключение.** Результаты статистического сравнения степени вариативности числа клеток в экспериментальных чашках у трёх изученных видов морских бентосных диатомовых водорослей, относящихся к трём разным классам Bacillariophyta (*Thalassiosira excentrica*, *Ardissonea crystallina* и *Pleurosigma aestuarii*), подтвердили, что в абсолютном большинстве случаев отсутствуют достоверные различия между средними значениями исследуемого параметра при стандартном уровне значимости (0,05). Показано, что, несмотря на видоспецифические различия в интенсивности нарастания численности клеток в ходе эксперимента, вариативность параметра меняется незакономерно. После 5-суточной экспозиции самая высокая вариативность числа клеток в полях зрения ( $Cv = 42 \dots 55 \%$ ) отмечена у бентопланктонного мелкоразмерного вида *T. excentrica*, парящего в водной среде, а самая низкая ( $Cv = 27 \dots 31 \%$ ) — у крупноклеточного *A. crystallina*, прикрепляющегося к дну чашки.

Установлено, что расчётная средняя численность клеток диатомовых между тремя повторностями достоверно не различается как на первые сутки после исходного введения в чашки инокулята, так и на заключительной стадии опыта. Вывод справедлив для всех видов диатомовых водорослей, использованных в качестве тест-объектов, что позволяет рассматривать все повторности как выборки одной совокупности и осреднять полученные по ним результаты на разных стадиях токсикологических экспериментов.

Статистически подтверждена равномерность распределения клеток в пределах дна экспериментальных чашек (даже при учёте не более чем 5 % площади дна). Равномерность распределения не является видоспецифичной и не зависит от абсолютной численности клеток в чашках. Полученные результаты позволяют статистически надёжно оценивать изменения численности клеток тестовых видов на разных этапах эксперимента по выборкам, полученным на основе подсчёта клеток в ограниченном числе полей зрения.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Айздайчер Н. А., Реунова Ю. А. Влияние детергентов на рост диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* в культуре // *Биология моря*. 2002. Т. 28, № 5. С. 362–365. [Aizdaicher N. A., Reunova Yu. A. The effect of detergents on growth of the diatom *Thalassiosira pseudonana* in culture. *Biologiya morya*, 2002, vol. 28, no. 5, pp. 362–365. (in Russ.)]
2. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабилов Р. Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей* : учебное пособие. Уфа : Изд-во БГПУ, 2008. 152 с. [Gaisina L. A., Fazlutdinova A. I., Kabirov R. R. *Sovremennye metody vydeleniya i kultivirovaniya vodoroslei* : учебное пособие. Ufa : Izd-vo BGPU, 2008, 152 p. (in Russ.)]
3. Гелашвили Д. Б., Безель В. С., Романова Е. Б., Безруков М. Е., Силкин А. А., Нижегородцев А. А. *Принципы и методы экологической токсикологии*. Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет, 2015. 142 с. [Gelashvili D. B., Bezel' V. S., Romanova E. B., Bezrukov M. E., Silkin A. A., Nizhegorodtsev A. A. *Printsipy i metody ekologicheskoi toksikologii*. Nizhniy Novgorod : Nizhegorodskii gosuniversitet, 2015, 142 p. (in Russ.)]
4. Гусяков Н. Е., Загордонцев О. А., Герасимюк В. П. *Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Чёрного моря и прилегающих водоёмов*. Киев : Наукова думка, 1992. 115 с. [Guslyakov N. E., Zakordonets O. A., Gerasimiyuk V. P. *Atlas diatomovykh vodoroslei bentosa severo-zapadnoi chasti Chernogo morya i prilgayushchikh vodoemov*. Kiev : Naukova dumka, 1992, 115 p. (in Russ.)]
5. Давидович Н. А., Давидович О. И., Подунай Ю. А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 1. С. 18–28. [Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunay Yu. A. Diatom culture collection of the Karadag scientific station (Crimea). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 18–28. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.1.03>
6. *Диатомовый анализ*. Кн. 3. *Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей. Порядок Pennales* / ред. А. И. Прошкина-Лавренко. Москва ; Ленинград : Госгеолитиздат, 1950. 398 с. [*Diatomovyi analiz*. Кн. 3. *Opre-delitel' iskopaemykh i sovremennykh diatomovykh vodoroslei. Poryadok Pennales* / A. I. Proshkina-Lavrenko (Ed.). Moscow ; Leningrad : Gosgeolitizdat, 1950, 398 p. (in Russ.)]
7. Кабанова Ю. Г. *Органический фосфор как источник питания фитопланктона* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18. Москва, 1958. 13 с. [Kabanova Yu. G. *Organicheskii fosfor kak istochnik pitaniya fitoplanktona* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.18. Moscow, 1958, 13 p. (in Russ.)]
8. Крайнюкова А. Н. Биотестирование и охрана вод от загрязнения // *Методы биотестирования вод*. Черноголовка : ГК ОП СССР, 1988. С. 4–21. [Krainyukova A. N. Biotestirovanie i okhrana vod ot zagryazneniya. In: *Metody biotestirovaniya vod*. Chernogolovka : GK OP SSSR, 1988, pp. 4–21. (in Russ.)]
9. Маркина Ж. В. *Применение микроводорослей для оценки качества морской воды и действия детергентов* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 ; 03.00.16. Владивосток, 2008. 21 с. [Markina Zh. V. *Primenenie mikrovodoroslei dlya otsenki kachestva morskoi vody i deistviya detergentov* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.18 ; 03.00.16. Vladivostok, 2008, 21 p. (in Russ.)]
10. Маркина Ж. В. Действие детергентов и поверхностно-активных веществ на рост, физиологические и биохимические показатели одноклеточных водорослей (обзор). *Известия ТИНРО*. 2009. Т. 156. С. 125–134. [Markina Zh. V. Influence of detergents and surface-active substances on unicellular algae growth, physiological and biochemical parameters (review). *Izvestiya TINRO*, 2009, vol. 156, pp. 125–134. (in Russ.)]
11. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Влияние детергентов на динамику численности и физиологическое состояние бентосной микроводоросли *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) в культуре. *Биология моря*. 2007. Т. 33, № 6. С. 432–439. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. The influence of detergents on the abundance dynamics and physiological state of the benthic microalgae *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Biologiya morya*, 2007, vol. 33, no. 6, pp. 432–439. (in Russ.)]
12. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря

- на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Pheodactylum tricornerutum* Bohlin // *Сибирский экологический журнал*. 2011. Т. 18, № 1. С. 99–105. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin bioassay of water quality of Amur Bay (the Sea of Japan). *Sibirskii ekologicheskii zhurnal*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 99–105. (in Russ.)]
13. Неврова Е. Л. *Бентосные диатомовые водоросли (Bacillariophyta) Чёрного моря: разнообразие и структура таксоценов различных биотопов* : дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2015. 445 с. [Nevrova E. L. *Bentosnye diatomovye vodorosli (Bacillariophyta) Chernogo morya: raznoobrazie i struktura taksotsenov razlichnykh biotopov*. [dissertation]. Moscow, 2015, 445 p. (in Russ.)]. <https://dlib.rsl.ru/01005555099>
  14. Неврова Е. Л., Снигирева А. А., Петров А. Н., Ковалева Г. В. *Руководство по изучению морского микрофитобентоса и его применению для контроля качества среды / под ред. А. В. Гаевской*. Севастополь ; Симферополь : Н. Орианда, 2015. 176 с. [Nevrova E. L., Snigireva A. A., Petrov A. N., Kovaleva G. V. *Guidelines From Quality Control of the Black Sea. Microphytobenthos / A. V. Gaevskaya (Ed.)*. Sevastopol ; Simferopol : N. Orianda, 2015, 176 p. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/978-5-9907290-2-5>
  15. Прошкина-Лавренко А. И. *Диатомовые водоросли планктона Чёрного моря*. Москва ; Ленинград : Изд-во АН СССР, 1955. 222 с. [Proshkina-Lavrenko A. I. *Diatomovye vodorosli planktona Chernogo morya*. Moscow ; Leningrad : Izd-vo AN SSSR, 1955. 222 p. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/6623>
  16. Прошкина-Лавренко А. И. *Диатомовые водоросли бентоса Чёрного моря*. Москва ; Ленинград : Изд-во АН СССР, 1963. 243 с. [Proshkina-Lavrenko A. I. *Diatomovye vodorosli bentosa Chernogo morya*. Moscow ; Leningrad : Izd-vo AN SSSR, 1963, 243 p. (in Russ.)]
  17. Реунова Ю. А., Айздайчер Н. А. Влияние детергента на содержание хлорофилла *a* и динамику численности у микроводоросли *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (Cryptophyta). *Альгология*. 2004. Т. 14, № 1. С. 32–38. [Reunova Yu. A., Aizdaicher N. A. Vliyanie detergenta na sodержanie khlorofilla *a* i dinamiku chislenosti u mikrovdorosli *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (Cryptophyta). *Algologiya*, 2004, vol. 14, no. 1, pp. 32–38. (in Russ.)]
  18. Романова Д. Ю., Петров А. Н., Неврова Е. Л. Действие сульфата меди на рост и морфологию клеток клоновых культур четырёх видов бентосных диатомовых водорослей (Bacillariophyta) Чёрного моря // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 3. С. 53–67. [Romanova D. Yu., Petrov A. N., Nevrova E. L. Copper sulphate impact on growth and cell morphology of clonal strains of four benthic diatom species (Bacillariophyta) from the Black Sea. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 53–67. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05>
  19. Спиркина Н. Е. *Исследование культуры зелёной микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* как нового тест-объекта для оценки качества водной среды* : дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2016. 172 с. [Spirkina N. E. *Issledovanie kul'tury zelenoi mikrovdorosli Monoraphidium arcuatum kak novogo test-ob'ekta dlya otsenki kachestva vodnoi sredy*. [dissertation]. Moscow, 2016, 172 p. (in Russ.)]
  20. Шлегель Г. *Общая микробиология* : пер. с нем. Москва : Мир, 1987. 567 с. [Schlegel H. G. *Allgemeine Mikrobiologie*. Moscow : Mir, 1987, 567 p. (in Russ.)]
  21. Andersen R. A., Berges J. A., Harrison P. J., Watanabe M. M. Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal culturing techniques / R. A. Andersen (Ed.)*. San Diego : Elsevier Academic Press, 2005, pp. 429–538.
  22. Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunay Yu. A., Gastineau R., Kaczmarzka I., Poulíčková A., Witkowski A. *Ardissonea crystallina* has a type of sexual reproduction that is unusual for centric diatoms. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, article 14670 (16 p.). <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15301-z>
  23. Kim J. W., Price N. M. The influence of light on copper-limited growth of an oceanic diatom, *Thalassiosira oceanica* (Coscinodiscophyceae). *Journal of Phycology*, 2017, vol. 53, iss. 5, pp. 938–950. <https://doi.org/10.1111/jpy.12563>
  24. Markina Z. V., Aizdaicher N. A. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Phaeodactylum tricornerutum* in the copper-polluted environment. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 53, no. 3, pp. 305–309. <https://doi.org/10.1134/S1021443706030034>

25. Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Influence of the ariel detergent on the growth and physiological state of the unicellular algae *Dunaliella salina* (Chlorophyta) and *Plagioselmis protonga* (Cryptophyta). *Hydrobiological Journal*, 2010, vol. 46, iss. 2, pp. 49–56. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v46.i2.60>
26. Reid G. *A revision of the family Pleurosigmales* / A. Witkowski (Ed.). Ruggell : A. R. G. Gantner Verlag K. G., 2012, 163 p. (Diatom Monographs ; vol. 14).
27. Rijstenbil J. W., Gerringa L. J. A. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology*, 2002, vol. 56, iss. 2, pp. 115–131.
28. Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge : Cambridge University press, 1990, 747 p.
29. Seckbach J., Kociolek J. P. (Eds). *The Diatom World*. Berlin ; Heidelberg ; New York : Springer Verlag, 2011, 533 p. (Book series : Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology ; vol. 19). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7>
30. *SigmaPlot 12.5 User's Guide*. USA : Systat Software Inc., 2013, 455 p.

## ESTIMATION OF CELL DISTRIBUTION HETEROGENEITY AT TOXICOLOGICAL EXPERIMENTS WITH CLONAL CULTURES OF BENTHIC DIATOMS

**A. N. Petrov and E. L. Nevrova**

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation  
E-mail: [alexpet-14@mail.ru](mailto:alexpet-14@mail.ru)

An increase in anthropogenic pressure on coastal water areas requires regular monitoring of marine ecosystems. The appropriate bioindicators for indirect assessment of the quality of the near-shore environment are benthic diatom algae, which are a key element of coastal communities and are highly sensitive to environmental impact. Changes in the development of diatoms under the influence of various toxicants may be used as relevant tool for monitoring of marine environment quality. However, scientific and methodological approaches to application of benthic diatom algae as test objects remain unstudied. One of the important methodological problems is the assessment of the significance of the samples in experimental vessels when counting cells abundance at different stages of toxicological test. The study is focused on assessment of the statistical significance of the equality of the initial mean number of cells of clonal culture inoculum placed into each of the replicates, as well as the statistical uniformity of cell distribution over the entire bottom area of Petri dishes. We used clonal cultures of three benthic diatom species belonging to different classes of Bacillariophyta: *Thalassiosira excentrica* Cleve, 1903 (Coscinodiscophyceae), *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Fragilariophyceae), and *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. in Kütz.) W. Smith, 1853 (Bacillariophyceae). They significantly differ in valve morphology and life history (floating in water mass, attached to substrate, and motile). The results of statistical comparison of cell number variability in the experiment for all studied species confirmed the absence of significant differences between the mean values of the tested parameter at a standard significance level (0.05). It was shown that despite specific differences in cell growth rate during the experiment, the variability in cell number in the microscope viewing fields varies irregularly. The highest value of the variability coefficient was observed on the 5<sup>th</sup> day for the small-sized species *T. excentrica* ( $Cv = 42...55\%$ ), and the lowest variability – for the large-cell species *A. crystallina* ( $Cv = 27...31\%$ ). The absence of significant differences in cell number between three replicates (for each species) was established both during the initial placing of inoculum into the dishes and on the following days of the experiment. The conclusion is applicable for each of diatom species studied, which allows to consider all replicates as subsamples of the replicate sample and to average the results obtained at different stages of the toxicological experiment. The uniformity of cell distribution throughout experimental dishes bottom, which does not depend on species and absolute cell number, was statistically proven. The results obtained allow to statistically reliably estimate the changes in cell number at different stages of toxicological experiment according to replicate sampling, based on cell counting in a limited number of viewing fields.

**Keywords:** toxicological experiment, methodology, statistical estimation, Bacillariophyta, *Thalassiosira excentrica*, *Ardissonea crystallina*, *Pleurosigma aestuarii*, Black Sea