

УДК 582.276-15:628.4.043-022.53

ПОТРЕБЛЕНИЕ ЧАСТИЦ МИКРОПЛАСТИКА ГЕТЕРОТРОФНОЙ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТОЙ *OXYRRHIS MARINA*

© 2023 г. Т. В. Рауэн, В. С. Муханов, Л. О. Аганесова

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: taschi@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2020; после доработки 15.01.2021;
принята к публикации 20.10.2022; опубликована онлайн 14.03.2023.

Включение частиц микропластика (МП) в микробную пищевую цепь и их дальнейшая передача на более высокие трофические уровни практически не исследованы. В данной работе закономерности поглощения МП одноклеточными организмами анализировали в культуре гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhis marina* (OXY). В качестве пищевых объектов для *O. marina* использовали гаптофитовую микроводоросль *Isochrysis galbana* (ISO), полистирольные микросферы (MS) размером 5,6 мкм, а также их смесь (ISO-MS). Динамику численности микроорганизмов и микросфер изучали с помощью проточного цитометра. Показано, что гетеротроф *O. marina* потреблял частицы МП даже в условиях наличия своих обычных жертв — микроводорослей; при этом МП не оказывал на него негативного влияния. Скорости выедания «жертв» в смеси OXY-ISO-MS составили $(0,21 \pm 0,01) \text{ MS} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ (\pm стандартное отклонение) и $(0,38 \pm 0,01) \text{ ISO} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ и были достоверно ниже, чем в экспериментах с монодиетами OXY-ISO [$(1,93 \pm 0,68) \text{ ISO} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$] и OXY-MS [$(0,45 \pm 0,04) \text{ MS} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$], то есть усложнение состава (расширение спектра) пищевых объектов вело к снижению скорости их потребления. Скорость осветления среды динофлагеллятой *O. marina* в экспериментах с монодиетами составила $(0,12 \pm 0,04)$ и $(0,19 \pm 0,06) \text{ мкл} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ для OXY-ISO и OXY-MS соответственно, а значит, на поимку клеток ISO динофлагелляты *O. marina* затрачивала меньше времени, чем на поимку MS. Эту же закономерность наблюдали и в экспериментах со смесью пищевых объектов (OXY-ISO-MS): скорость осветления среды в сосудах с ISO [$(0,17 \pm 0,02) \text{ мкл} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$] была незначительно ниже, чем в сосудах с MS [$(0,19 \pm 0,003) \text{ мкл} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$]. Трофической адаптации *O. marina* к MS не происходило, на что указывал факт их вторичного потребления даже в условиях наличия альтернативного кормового объекта — *I. galbana*. Не была выявлена и селективность питания *O. marina* ни к одной из «жертв», будь то *I. galbana* или пластиковые микросферы. Полученные результаты указывают на возможность (и высокую вероятность) включения МП в микробную пищевую цепь и на важную роль одноклеточных организмов в передаче МП на более высокие трофические уровни.

Ключевые слова: микропластик, поглощение, микросферы, микроводоросли, стойкие органические загрязнители, трофический перенос, *Oxyrrhis marina*, *Isochrysis galbana*

Стремительное развитие производства пластиковых изделий в последние десятилетия обусловило возникновение проблемы накопления соответствующих отходов. Не менее 60 % морского мусора представлено именно пластиком [Козловский, Блиновская, 2015]. В морской среде его полимерная основа подвергается гидролизу, фотолизу и микробиологическим

окислительно-восстановительным реакциям, что приводит к деструкции пластиковых фрагментов [Ateia et al., 2020; Auta et al., 2017] и к образованию частиц различной размерности, в том числе микроскопических (менее 5 мкм), которые многие исследователи [Barnes et al., 2009; Betts, 2008; Fendall, Sewell, 2009; Moore, 2008; Støttrup et al., 1986] относят к микропластику (далее — МП). Один из основных экологических рисков, связанных с частицами МП, — его биодоступность для морских организмов [Desforges et al., 2015; Egbeocha et al., 2018]. МП, обладающий положительной либо нейтральной плавучестью [Van Cauwenberghe et al., 2015], включается в пищевые цепи водной биоты, так как сопоставим по размерам с фитопланктоном — начальным звеном пищевой цепи. Попав в желудочно-кишечный тракт организмов зоопланктона, частицы МП могут образовывать агрегаты, что, в свою очередь, приводит к снижению скорости их выведения из организма [Egbeocha et al., 2018; Ogonowski et al., 2016] и, соответственно, к повышению вероятности передачи МП на более высокие трофические уровни. Помимо физиологического ущерба организму (нарушения движения, эффекта ложного насыщения и др.), негативный эффект этого процесса связан ещё и с тем, что МП служит вектором передачи токсических веществ, входящих в его состав (пластификаторов, красителей, стирала, противомикробных препаратов и т. д.), по пищевой цепи [Egbeocha et al., 2018; Kwon et al., 2014; Wright et al., 2013]. В процессе пищеварения данные вещества могут выщелачиваться и накапливаться в тканях животных [Козловский, Блиновская, 2015; Batel et al., 2016]. Кроме того, частицы полимеров адсорбируют гидрофобные стойкие органические загрязнители, присутствующие в морской воде [Ogata et al., 2009], что увеличивает их биодоступность при поглощении МП морской биотой [Batel et al., 2016]. Концентрации стойких органических загрязнителей на поверхности частиц МП могут в несколько раз превышать фоновые показатели [Avio et al., 2015]. Это несёт в себе риск транспорта токсинов из кишечного тракта в ткани животных [Avio et al., 2015; Koelmans, 2015; Rehse et al., 2016; Watts et al., 2014], и наиболее подвержены такому негативному воздействию организмы, населяющие прибрежные воды [McCormick et al., 2016].

Связь загрязнения МП с трофикой микроорганизмов, составляющих основу пищевой цепи, — малоизученная проблема [Rehse et al., 2016]. В настоящей работе проанализировано включение в рацион гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhis marina* Dujardin, 1841, обитающей в прибрежных водах Чёрного моря, частиц МП, которые по своим размерам соответствуют клеткам микроводорослей — основных кормовых объектов данного вида в природных условиях. Выбор *O. marina* в качестве объекта исследования обусловлен тем, что эта динофлагеллята является представителем прибрежных вод, наиболее подверженных загрязнению МП, и, соответственно, находится в зоне риска. Кроме того, это один из ключевых консументов фито- и бактериопланктона в прибрежных морских экосистемах и вид, играющий важную роль в рециркуляции углерода [Hansen, 1991; Roberts et al., 2010]. *O. marina* успешно используют в аквакультурных производствах для кормления копепод [Støttrup et al., 1986] — основного и наиболее качественного корма для личинок рыб [Ханайченко, Битюкова, 1999]. Между тем 90 % аквакультурного оборудования изготовлено из различных видов пластика, что, в силу описанных выше факторов, неизбежно приводит к поступлению его частиц в среду выращивания организмов. Очевидно, что возможность включения МП в цепи питания существенно снижает качество конечной продукции аквакультуры [Wu et al., 2020]. Таким образом, *O. marina* может служить модельным организмом для исследования потребления пластика одноклеточными.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы изучить селективность питания гетеротрофной динофлагелляты *O. marina* клетками гаптофитовой микроводоросли *Isochrysis galbana* Parke, 1949 и частицами МП в их кормовой смеси, а также количественно оценить ряд трофических показателей каждого из этих кормовых объектов, включая скорость осветления среды (F) и скорость выедания (G).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ходе данной работы был проведён сравнительный анализ основных показателей потребления клеток гаптофитовой микроводоросли *I. galbana* и пластиковых микросфер динофлагеллятой *O. marina* — скорости осветления среды (облавливаемый объём на клетку в единицу времени) (F); скорости потребления (количество клеток на клетку в единицу времени) (G); элективности выедания той или иной «жертвы» в смеси.

В эксперименте использовали культуры рабочей коллекции отдела аквакультуры и морской фармакологии ФИЦ ИнБЮМ — микроводоросли *I. galbana* и динофлагелляты *O. marina*. Также применяли полистирольные многоцветные микросферы Polychromatic Red диаметром 5,6 мкм (возбуждение — 491 нм; изготовитель — Polysciences, Inc., США). Микроводоросли культивировали на среде Уолна [Coutteau, 1996] при температуре (24 ± 1) °С, при постоянном освещении 5 тыс. люкс, без аэрации. В работе использовали аликвоты культур в экспоненциальной фазе роста. Культуру *O. marina* предварительно адаптировали к условиям эксперимента и держали в течение суток без корма.

Схема эксперимента. В подготовленную культуру *O. marina* (далее — OXY) добавляли в качестве пищевых объектов *I. galbana*, микросферы и их смесь (далее — ISO, MS и ISO-MS соответственно) так, что общий объём среды составлял 18 мл, и инкубировали в конических стеклянных колбах в течение 3 ч при постоянном перемешивании.

Чтобы учитывать потери MS вследствие их оседания и налипания на стенки сосудов, ставили дополнительную склянку, содержащую только питательную среду и MS. Таким образом, в ходе эксперимента исследовали динамику численности микроорганизмов и MS в четырёх видах склянок (каждая — в трёх повторностях): 1) OXY-ISO; 2) OXY-MS; 3) OXY-ISO-MS; 4) MS. Начальные численности *O. marina*, *I. galbana* и MS в экспериментальных сосудах составляли: от 25×10^3 до 50×10^3 кл.мл⁻¹ (OXY); от 10×10^3 до 50×10^3 кл.мл⁻¹ (ISO); от 5×10^3 до 10×10^3 MS.мл⁻¹.

Контроль состояния клеток и количественный учёт микроорганизмов и MS проводили методами микроскопии и проточной цитометрии. Для этого из всех опытных сосудов отбирали 1 мл субпробы в начале эксперимента и далее через каждые 20 мин.

Скорость осветления среды (F) и потребления пищевых объектов (G) рассчитывали в соответствии с [Frost, 1972], однако дополнительно учитывали независимый от питания процесс — прилипание MS к стенкам сосудов. Для исследования селективности питания *O. marina* смесью *I. galbana* и MS (эксперимент OXY-ISO-MS) использовали индекс элективности [Ivlev, 1961], который рассчитывали как $(R_i - P_i) / (R_i + P_i)$, где R_i — доля i -го пищевого объекта в рационе хищника; P_i — доля i -го пищевого объекта в среде. Значения индекса изменялись в диапазоне от -1 (полное избегание) до +1 (максимальное предпочтение).

Микроскопия. Микрофотосъёмку MS и микроорганизмов проводили под микроскопом Nikon Eclipse TS100-F, оборудованным цифровой камерой, в эпифлуоресцентном режиме (набор светофильтров для возбуждения в синей области спектра). MS, благодаря ярко-зелёной флуоресценции, были хорошо видны в питательной среде и в пищеварительных вакуолях *O. marina* (см. рис. 2).

Цитометрический анализ. Для исследования динамики численности MS, численности и размеров клеток микроводорослей *O. marina* и *I. galbana* в экспериментальных ёмкостях применяли проточный цитометр Cytomics™ FC500 (Beckman Coulter, США), оборудованный 488-нм однофазным аргоновым лазером, и программное обеспечение СХР. Общую численность микроводорослей определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах — прямого светорассеивания (forward scatter, FS) и автофлуоресценции в красной (FL4, 675 нм) и зелёной (FL1, 525 нм) областях спектра на безразмерных логарифмических шкалах (рис. 1).

Концентрацию MS и микроводорослей рассчитывали по скорости протока пробы (15 и 60 мкл·мин⁻¹ соответственно), времени счёта (100–360 с) и количеству клеток (или MS), зарегистрированных в этот временной промежуток (в пробах микроводорослей — минимум 3000 клеток для каждой из повторностей). Контроль качества измерений производили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check™ (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Быстрое уменьшение численности MS указало на высокие скорости их выедания динофлагеллятой. Так, в течение первого часа эксперимента численности MS упали до экстремально низких значений ($< 10^2$ MS·мл⁻¹) во всех опытных склянках (см. рис. 3А, В). Клетки *O. marina*, содержащие MS в пищеварительных вакуолях, приобретали зелёную флуоресценцию; как следствие, на цитограммах формировался субкластер точек с высокими значениями FL1 (рис. 1).

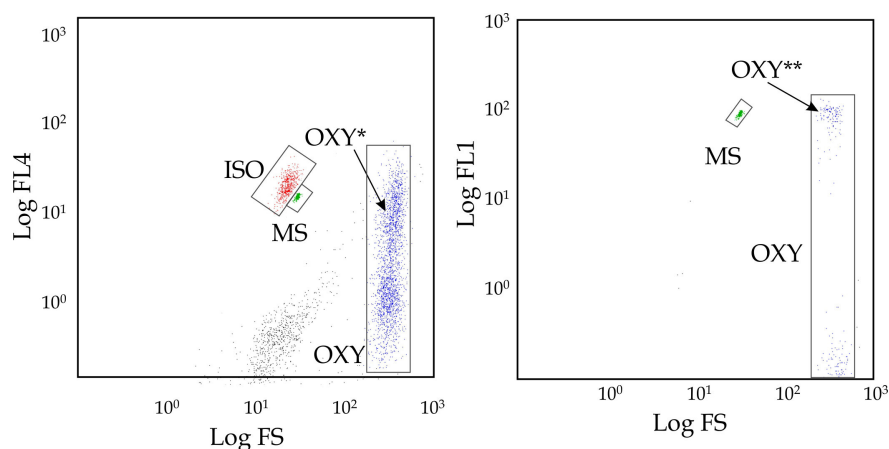


Рис. 1. Гейтинг гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhis marina* (OXY) и её кормовых объектов [микросфер (MS) и гаптофитовой микроводоросли *Isochrysis galbana* (ISO)] на 2-параметрических цитограммах — прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции в красной (FL4, 675 нм) и зелёной (FL1, 525 нм) областях спектра. OXY* — клетки динофлагелляты, потребляющие *I. galbana* и микросферы; OXY** — клетки динофлагелляты с микросферами в пищеварительных вакуолях

Fig. 1. Gating of the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina* (OXY) and its food objects [polystyrene microspheres (MS) and the haptophyte *Isochrysis galbana* (ISO)] on two-parameter cytograms – of forward scatter (FS) and of red (FL4, 675 nm) and green (FL1, 525 nm) fluorescence. OXY* denotes dinoflagellate cells grazing both *I. galbana* and microspheres; OXY**, dinoflagellate cells with microspheres in their digestive vacuoles

Потребление MS клетками *O. marina* также регистрировали под микроскопом. При этом в некоторых случаях можно было различить до 5–6 ярко флуоресцирующих микросфер в пищеварительных вакуолях одной клетки (рис. 2).

Динофлагеллята практически полностью выедала *I. galbana* в первые 2 ч эксперимента (рис. 3Б). Между тем численность MS в среде со временем восстанавливалась и к концу эксперимента достигала примерно 10^3 MS·мл⁻¹ (рис. 3А, В). Такая необычная динамика обусловлена тем, что МП не может быть переварен в пищеварительных вакуолях. Рост численности MS означал, что динофлагеллята экскретировала их обратно в среду.

Таким образом, резкое падение концентрации MS в среде на начальной стадии эксперимента было связано с их быстрым выеданием и накоплением в пищеварительных вакуолях. Затем началось выведение MS обратно в среду, что приводило к «компенсации» их численности, которая, однако, не достигала начальных значений. В соответствии с этой схемой процессов, численности клеток *O. marina*, содержащих MS в вакуолях, возрастали на начальной стадии эксперимента и далее достигали некоторого плато (рис. 3А, В).

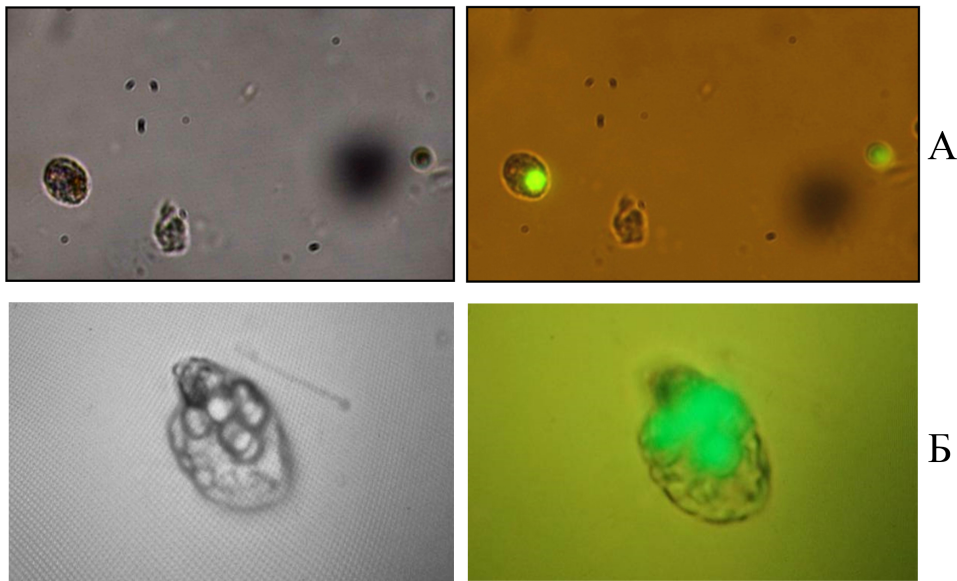


Рис. 2. Клетки динофлагелляты *Oxyrrhis marina* с одной (А) и несколькими (Б) микросферами в пищеварительных вакуолях в светлом поле (фото слева) и в эпифлуоресцентном режиме (фото справа)

Fig. 2. Cells of the dinoflagellate *Oxyrrhis marina* with one (A) and several (Б) microspheres in its digestive vacuoles in bright field (images on the left) and in epifluorescence mode (images on the right)

Значения численности *O. marina* во всех сериях опытных сосудов практически не изменялись на протяжении экспериментов (рис. 3А, Б, В), что могло указывать на отсутствие негативного воздействия MS на темпы деления динофлагелляты. Однако продолжительность экспериментов могла быть недостаточной для выявления подобного эффекта.

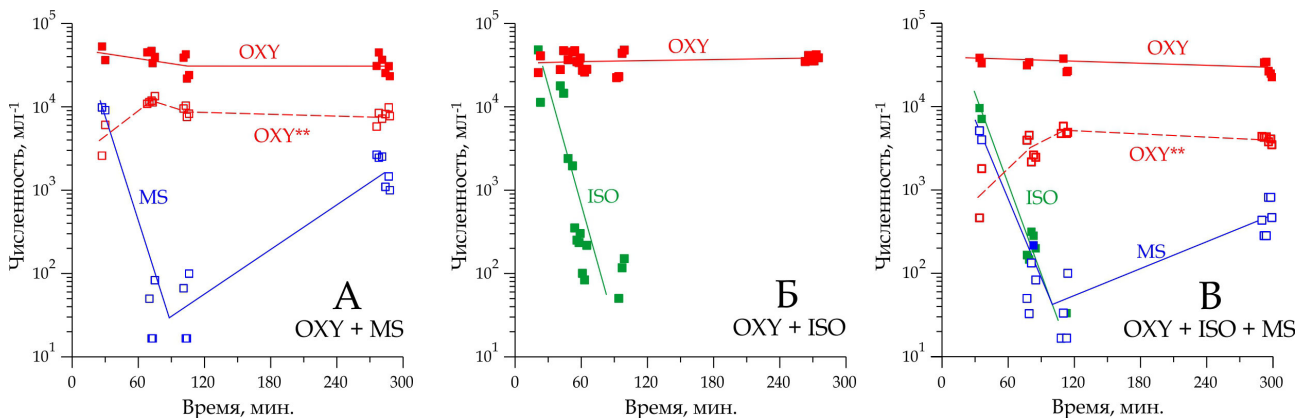


Рис. 3. Динамика численности микросфер (MS), гаптофитовой микроводоросли *Isochrysis galbana* (ISO) и гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhis marina* (OXY) в экспериментальных сосудах с разной диетой: А — только микросферы (OXY-MS); Б — только *I. galbana* (OXY-ISO); В — смешанная диета (OXY-ISO-MS). На графиках А и В отдельно показана динамика численности клеток *O. marina* с микросферами в пищеварительных вакуолях (OXY**)

Fig. 3. Dynamics of the abundance of microsphere (MS), the haptophyte *Isochrysis galbana* (ISO), and the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina* (OXY) in the experimental vessels with different diets: А, microspheres only (OXY-MS); Б, haptophytes only (OXY-ISO); В, the mixture (OXY-ISO-MS). Dynamics of *O. marina* cell abundance with MS in their digestive vacuoles (OXY**) is shown separately in plots A and B

Расчёты скоростей осветления среды (F) динофлагеллятой показали следующее. В серии OXY-ISO значение F составило $(0,12 \pm 0,04)$ мкл·кл⁻¹·ч⁻¹ и было ниже, чем в серии OXY-MS $[(0,19 \pm 0,06)$ мкл·кл⁻¹·ч⁻¹], то есть в первом случае клетки *O. marina* облавливали меньший объём в единицу времени, чем во втором (рис. 4), а на поимку клеток *I. galbana* уходило меньше времени, чем на поимку MS.

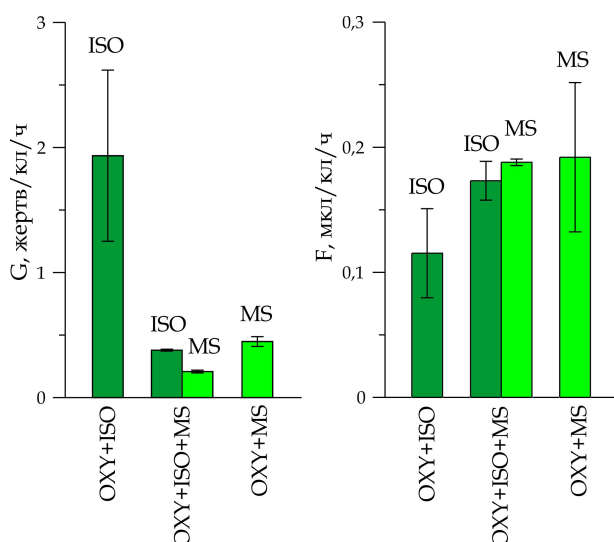


Рис. 4. Скорость выедания (G) гетеротрофом *Oxyrrhis marina* (OXY) предложенных «жертв» [гаптофитовой микроводоросли *Isochrysis galbana* (ISO) и микросфер (MS)] и скорость осветления среды (F) клетками *O. marina* в экспериментальных сосудах с разной диетой: OXY-MS — только микросферы; OXY-ISO — только микроводоросли; OXY-ISO-MS — смесь микроводорослей и микросфер

Fig. 4. Grazing rate (G) for the heterotroph *Oxyrrhis marina* (OXY) [the “preys” are the haptophyte *Isochrysis galbana* (ISO) and polystyrene microspheres (MS)] and clearance rate (F) for *O. marina* cells in the experimental vessels with different diets: OXY-MS, microspheres only; OXY-ISO, microalgae only; OXY-ISO-MS, the mixture of microalgae and microspheres

Эта же закономерность, хоть и в меньшей степени, сохранялась в серии со смесью микроводорослей и микросфер в качестве корма (OXY-ISO-MS), где скорость осветления среды, рассчитанная по гаптофитовым микроводорослям $[(0,17 \pm 0,02)$ мкл·кл⁻¹·ч⁻¹], была незначительно ниже значения, полученного для MS $[(0,19 \pm 0,003)$ мкл·кл⁻¹·ч⁻¹] (рис. 4). Скорости выедания (G) этих двух «жертв» в смеси OXY-ISO-MS составили $(0,21 \pm 0,01)$ MS·кл⁻¹·ч⁻¹ (\pm стандартное отклонение) и $(0,38 \pm 0,01)$ ISO·кл⁻¹·ч⁻¹. Данные значения были достоверно ниже, чем в экспериментах с монодиетами OXY-ISO $[(1,93 \pm 0,68)$ ISO·кл⁻¹·ч⁻¹] и OXY-MS $[(0,45 \pm 0,04)$ MS·кл⁻¹·ч⁻¹], то есть усложнение состава пищевых объектов вело к снижению скорости их потребления (рис. 4). Максимум G наблюдали в эксперименте OXY-ISO $[(1,93 \pm 0,68)$ ISO·кл⁻¹·ч⁻¹] (рис. 4), а значит, динофлагеллята *O. marina* поглощала клетки *I. galbana* с наибольшей эффективностью.

Между тем различия в скоростях выедания и осветления среды не влияли на селективность питания *O. marina*. Значения индекса селективности Ивлева, полученные для *I. galbana* и MS, оказались близки к нулю ($-0,03$ и $0,05$ соответственно), что указывало на отсутствие селективности в питании, то есть динофлагеллята *O. marina* поглощала МП наравне с живым кормом. Этот результат свидетельствовал о возможности включения МП в пищевую цепь морских экосистем на самых низких трофических уровнях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сообщений о потреблении МП многоклеточными гидробионтами (детритофагами, артемией, копеподами, мидиями, крабами и т. д.) довольно много [Batel et al., 2016; Egbeocha et al., 2018; Procter et al., 2019; Watts et al., 2014; Wu et al., 2020], в то время как включение искусственных частиц в рацион одноклеточных организмов практически не исследовано [Christaki et al., 1998; Rillig, Bonkowski, 2018]. Полученные нами результаты в некоторой степени восполняют этот пробел, демонстрируя способность морских протистов активно потреблять частицы МП. Однако мы вынуждены были поставить под сомнение способность объекта нашего исследования, гетеротрофной динофлагелляты *O. marina*, отличать искусственные частицы от своих обычных пищевых объектов — одноклеточных микроорганизмов.

Представления о хемотаксических или иных предупреждающих сигналах у гетеротрофных протистов, которые позволяют им распознавать пластиковые частицы и препятствуют их фагоцитозу, пока достаточно противоречивы. В частности, известно, что *O. marina* обладает размерной селективностью питания [Hansen et al., 1996]. В ряде работ также было отмечено, что после захвата добычи, на стадии её переваривания, *O. marina* может отказываться от некоторых типов пищевых объектов [Flynn et al., 1996; Hansen et al., 1996; Wolfe et al., 1997]. Кроме того, выявлено, что *O. marina* имеет рецепторы на поверхности клетки, с помощью которых происходит распознавание добычи [Martel, 2009]. Предварительные экспериментальные данные [Hartz, 2010] указывают на то, что плазматическая мембрана *O. marina* содержит родопсин, который обеспечивает детекцию этим гетеротрофом клеток фотоавтотрофов по их красной автофлуоресценции хлорофилла. Наличие подобного механизма распознавания жертвы свидетельствует о способности *O. marina* отличать микроводоросли от иных, не содержащих пигменты пищевых объектов, включая частицы МП.

Известно лишь три экспериментальных исследования, в которых искусственные частицы были включены в рацион *O. marina*. Так, E. Wootton с соавторами [2007] обнаружили новый биохимический механизм распознавания добычи у одноклеточных протистов, в том числе *O. marina*; он заключается в наличии на поверхности клетки хищника специального рецептора — лектина, связывающего маннозу. Блокирование рецептора, как оказалось, вело к значительному ингибированию питания *O. marina* микроводорослями *I. galbana*, а нанесение маннозы на поверхность пластиковых микросфер в два раза увеличивало скорость их выедания хищником. Преинкубация динофлагеллят с раствором маннозы полностью лишала их способности различать любые пластиковые частицы, покрытые слоем полисахаридов. Особенностью данного исследования было то, что пластиковые микросферы применяли в экспериментах только после их специальной обработки — нанесения на их поверхность сахаров [Wootton et al., 2007]. Таким образом, представленные авторами результаты не позволяли с уверенностью судить о способности *O. marina* потреблять частицы МП.

Во втором исследовании [Hammer et al., 1999] искусственные частицы (кремниевые и пластиковые микросферы, альбуминовые микрошарики и др.) были предложены гетеротрофным динофлагеллятам в качестве добычи наряду с природными пищевыми объектами (живым фитопланктоном). Как оказалось, *O. marina* уверенно потребляет искусственные частицы, однако скорость этого процесса значительно ниже, чем при питании обычной пищей. Авторы объясняли подобную селективность величиной заряда на поверхности жертвы: более отрицательный потенциал искусственной частицы препятствовал её захвату хищником. Различия между поверхностным зарядом *O. marina* и его жертвы увеличивали вероятность столкновения и продолжительность контакта между ними; следовательно, возрастала скорость потребления пищи организмом [Hammer et al., 1999]. Инициация поимки жертвы с более отрицательным поверхностным зарядом происходила на меньшем от неё расстоянии (лишь 0,5–2 мкм), а с более высоким потенциалом — на существенно больших дистанциях (6–10 мкм), что увеличивало вероятность её захвата [Hammer et al., 1999]. В любом случае в данном исследовании был установлен факт включения искусственных частиц в рацион *O. marina*. Впрочем, также была показана способность динофлагеллят распознавать эти пищевые объекты, что противоречит нашим результатам.

Наконец, D. Luakurwa [2017] продемонстрировал в эксперименте, что гетеротроф *O. marina* потреблял пластиковые микросферы так же интенсивно, как и обычную добычу, которая была представлена криптофитовой водорослью *Rhodomonas baltica* Karsten, 1898. Эти наблюдения в полной мере соответствуют полученным нами результатам. В обоих случаях не наблюдали отказа *O. marina* от предложенных пластиковых микросфер, а одинаково высокие скорости выедания гетеротрофной динофлагеллятой как искусственных, так и естественных пищевых

объектов позволяли прийти к выводу о весьма ограниченной способности этих протистов отличать МП от своей обычной пищи. Можно лишь предположить, что селективность в питании не была выявлена в нашей работе, как и в [Lyakurwa, 2017], вследствие быстрой адсорбции на поверхности частиц МП биополимеров (экзометаболитов микроводорослей и бактерий), в избытке присутствующих в экспериментальной среде. «Упаковка» микросфер в органическую «плёнку» маскировала их под «съедобную» жертву и таким образом могла препятствовать их распознаванию хищником.

Сорбционные свойства пластиковых частиц с недавних пор являются предметом пристального внимания исследователей, поскольку определяют их векторную функцию — способность аккумулировать и переносить органические поллютанты [Ateia et al., 2020]. Как и бактериальная плёнка или сообщество обрастания, тонкая органическая плёнка на поверхности частицы МП, как мы полагаем, увеличивает её биодоступность, облегчает её включение в трофические процессы. При этом «вкусовые качества» частицы могут зависеть от скорости образования органической плёнки и от её химического состава. Эти характеристики трудно контролировать даже в условиях эксперимента, поскольку они могут сильно отличаться в разных культуральных средах и у различных культивируемых микроорганизмов. Соответственно, скорость фагоцитоза частиц МП — непредсказуемая величина. Эта гипотеза хорошо объясняет, с одной стороны, факт потребления пластиковых микрочастиц хищными протистами, а с другой — противоречивые данные о способности протистов отличать МП от пищевых объектов.

Вместе с тем нами было отмечено, что в серии OXY-ISO, где гетеротроф *O. marina* питался только клетками *I. galbana*, скорость выедания последних была выше, чем скорость выедания MS в серии OXY-MS (рис. 4). Возможно, это было связано с тем, что частицы МП, попав в пищеварительные вакуоли *O. marina*, задерживались в клетке хищника на более длительное время, поскольку не могли быть усвоены. Соответственно, скорость их выедания снижалась, в то время как клетки *I. galbana* переваривались быстро, что позволяло хищнику поддерживать высокие темпы потребления пищи. Подвижность клеток *I. galbana* также могла усиливать их привлекательность для *O. marina*.

Динамика численности клеток *O. marina* с микросферами внутри (рис. 3А, В) свидетельствовала о повторных захватах MS после их экскретирования. Это происходило как в условиях отсутствия альтернативного источника питания (*I. galbana*) в серии OXY-MS, так и при его наличии в серии OXY-ISO-MS. Можно предположить, что динофлагеллята *O. marina* не идентифицировала частицы МП при повторной встрече как менее подходящий кормовой объект и захватывала их вторично наравне с клетками *I. galbana*, то есть трофической адаптации не происходило. При этом потребление MS не оказывало какого-либо негативного эффекта на динофлагелляту: во всех экспериментальных сериях в исследуемом временном диапазоне достоверных отличий между численностью клеток *O. marina* не наблюдали (рис. 3А, Б, В). Такой же результат был получен в экспериментах [Lyakurwa, 2017]. Вероятно, негативный эффект потребления MS мог бы проявиться при более длительной экспозиции; это предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

Необходимо отметить, что MS, использованные в эксперименте, представляли собой микрогранулы из полистирола, который вносит основной вклад в формирование химического состава микропластикового загрязнения морских прибрежных акваторий [Cordova et al., 2019]. Этот вид пластика, широко используемый в различных сферах деятельности человека, является непрочным продуктом [Cooper, Corcoran, 2010; Koelmans, 2015]. Так, под влиянием солнечной радиации возрастает его ломкость, а при высоких температурах полимер распадается с образованием мономера [Cooper, Corcoran, 2010]. Таким образом, мы можем утверждать, что полистирольные микрочастицы способны включаться в микробную пищевую цепь, являясь пищевыми

объектами даже для одноклеточных организмов. Результаты, полученные в данной работе, указывают на необходимость проведения дальнейших исследований включения МП в трофические цепи, его влияния на физиологическое состояние мельчайших гидробионтов, а также возможности биомагнификации стойких органических загрязнителей планктонными организмами.

Выводы:

1. Гетеротрофная динофлагеллята *Ocyrrhis marina* потребляет пластиковые микросферы даже в условиях наличия альтернативных кормовых объектов из её естественного спектра питания.
2. Скорости потребления динофлагеллятой клеток *Isochrysis galbana* и микросфер в смеси ОХУ-ISO-MS были достоверно ниже, чем в экспериментах с монодиетами ОХУ-ISO и ОХУ-MS, то есть усложнение состава пищевых объектов вело к снижению скорости их потребления.
3. Высокая скорость осветления среды динофлагеллятой при её питании живой добычей (*I. galbana*) свидетельствовала о том, что на поимку клеток микроводорослей хищник затрачивал меньше времени, чем на поимку пластиковых микросфер.
4. Значения индекса селективности Ивлева, полученные для *I. galbana* и микросфер, указывали на отсутствие селективности в питании *O. marina*. Это подтверждает возможность включения частиц микропластика в микробную пищевую цепь.
5. Трофической адаптации клеток *O. marina* к микропластику не происходило: клетки потребляли полистирольные микросферы вторично даже в условиях наличия альтернативного кормового объекта.
6. Достоверных отличий в динамике численности динофлагелляты *O. marina* при её питании живой добычей (*I. galbana*) и частицами микропластика не наблюдали, то есть не было выявлено его негативного влияния на хищника, по крайней мере на временном диапазоне эксперимента (часы).

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам «Исследование механизмов управления производственными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации 121030300149-0) и «Структурно-функциональная организация, продуктивность и устойчивость морских пелагических экосистем» (№ гос. регистрации 121040600178-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Козловский Н. В., Блиновская Я. Ю. Микропластик – макропроблема Мирового океана // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015. № 10-1. С. 159–162. [Kozlovskii N. V., Blinovskaia J. Y. Microplastic is World Ocean macroproblem. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*, 2015, vol. 10-1, pp. 159–162. (in Russ.)]
2. Ханайченко А. Н., Битюкова Ю. Е. Избирательность питания личинок калкана и выбор стратегии их кормления // *Экология моря*. 1999. Вып. 48. С. 63–67. [Khanaichenko A. N., Bityukova Y. E. Black Sea turbot larvae feeding selectivity and choice of feeding strategy. *Ekologiya morya*, 1999, iss. 3, pp. 63–67. (in Russ.)]. URL: <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4212>
3. Ateia M., Zheng T., Calace S., Tharayil N., Pilla S., Karanfil T. Sorption behavior of real microplastics (MPs): Insights for organic micropollutants adsorption on a large set of well-characterized MPs. *Science of The Total Environment*, 2020, vol. 720, art. no. 137634 (7 p.). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137634>
4. Auta H. S., Emenike C. U., Fauziah S. H. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 2017, vol. 102, pp. 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013>
5. Avio C. G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., d'Errico G., Pauletto M., Bargelloni L., Regoli F. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 2015,

- vol. 198, pp. 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>
6. Barnes D. K. A., Galgani F., Thompson R. C., Barlaz M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2009, vol. 364, iss. 1526, pp. 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
 7. Batel A., Linti F., Scherer M., Erdinger L., Braunbeck Th. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, vol. 35, iss. 7, pp. 1656–1666. <https://doi.org/10.1002/etc.3361>
 8. Betts K. Why small plastic particles may pose a big problem in the oceans. *Environmental Science and Technology*, 2008, vol. 42, iss. 24, pp. 8995. <https://doi.org/10.1021/es802970v>
 9. Christaki U., Dolan J. R., Pelegri S., Rasoulzadegan F. Consumption of picoplankton-size particles by marine ciliates: Effects of physiological state of the ciliate and particle quality. *Limnology and Oceanography*, 1998, vol. 43, iss. 3, pp. 458–464. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.3.0458>
 10. Cooper D. A., Corcoran P. L. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, vol. 60, iss. 5, pp. 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.026>
 11. Cordova M. R., Purwiyanto A. I. S., Suteja Y. Abundance and characteristics of microplastics in the northern coastal waters of Surabaya, Indonesia. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, vol. 142, pp. 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.040>
 12. Coutteau P. Micro-Algae. In: *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture* / P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds). Rome : FAO, 1996, pp. 7–48. (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 361).
 13. Desforges J. W., Galbraith M., Ross P. S. Ingestion of microplastics by zooplankton in the northeast Pacific Ocean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, vol. 69, iss. 3, pp. 320–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0172-5>
 14. Egbeocha C. O., Malek S., Emenike C. U., Milow P. Feasting on microplastics ingestion by and effects on marine organisms. *Aquatic Biology*, 2018, vol. 27, pp. 93–106. <https://doi.org/10.3354/ab00701>
 15. Fendall L. S., Sewell M. A. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, vol. 58, iss. 8, pp. 1225–1228. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>
 16. Flynn K. J., Davidson K., Cunningham A. Prey selection and rejection by a microflagellate; implications for the study and operation of microbial food webs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, vol. 196, iss. 1–2, pp. 357–372. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00140-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00140-9)
 17. Frost B. W. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*, 1972, vol. 17, iss. 6, pp. 805–815. <https://doi.org/10.4319/lo.1972.17.6.0805>
 18. Hansen P. J. Quantitative importance and trophic role of heterotrophic dinoflagellates in a coastal pelagial food web. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, vol. 73, no. 2/3, pp. 253–261. <http://doi.org/10.3354/meps073253>
 19. Hansen F. C., Witte H. J., Passarge J. Grazing in the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: Size selectivity and preference for calcified *Emiliania huxleyi* cells. *Aquatic Microbial Ecology*, 1996, vol. 10, iss. 3, pp. 307–313. <https://doi.org/10.3354/ame010307>
 20. Hammer A., Grüttner C., Schumann R. The effect of electrostatic charge of food particles on capture efficiency by *Oxyrrhis marina* Dujardin (Dinoflagellate). *Protist*, 1999, vol. 150, iss. 4, pp. 375–382. [https://doi.org/10.1016/s1434-4610\(99\)70039-8](https://doi.org/10.1016/s1434-4610(99)70039-8)
 21. Hartz A. J. *Investigating the Ecological Role of Cell Signaling in Free-living Marine Heterotrophic Protists*. PhD thesis / Oregon State University. Oregon, 2010, 182 p.
 22. Ivlev V. S. *Experimental Ecology of the Feeding of Fishes*. New Haven : Yale University Press, 1961, 302 p.
 23. Koelmans A. A. Modeling the role of microplastics in bioaccumulation of organic chemicals to marine aquatic organisms. A critical review. In: *Marine Anthropogenic Litter* / M. Bergmann,

- L. Gutow, M. Klages (Eds). Berlin : Springer, 2015, pp. 309–324. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_11
24. Kwon B. G., Saïdo K., Koizumi K., Sato H., Ogawa N., Chung S. Y., Kusui T., Kōdera Y., Kogure K. Regional distribution of styrene analogues generated from polystyrene degradation along the coastlines of the North-East Pacific Ocean and Hawaii. *Environmental Pollution*, 2014, vol. 188, pp. 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.019>
 25. Lyakurwa D. J. Uptake and effects of microplastic particles in selected marine microalgae species; *Oxyrrhis marina* and *Rhodomonas baltica*. PhD thesis / Norwegian University of Science and Technology. Trondheim, 2017, 51 p.
 26. Martel C. M. Conceptual bases for prey biorecognition and feeding selectivity in the microplanktonic marine phagotroph *Oxyrrhis marina*. *Microbial Ecology*, 2009, vol. 57, iss. 4, pp. 589–597. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9421-8>
 27. McCormick A. R., Hoellein T. J., London M. G., Hittie J., Scott J. W., Kelly J. J. Microplastic in surface waters of urban rivers: Concentration, sources, and associated bacterial assemblages. *Ecosphere*, 2016, vol. 7, iss. 11, art. no. e01556 (22 p.). <https://doi.org/10.1002/ecs2.1556>
 28. Moore C. J. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 2008, vol. 108, iss. 2, pp. 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>
 29. Ogata Y., Takada H., Mizukawa K., Hirai H., Iwasa S., Endo S., Mato Y., Saha M., Okuda K., Nakashima A., Murakami M., Zurcher N., Booyatumanondo R., Zakaria M. P., Dung L. Q., Gordon M., Miguez C., Suzuki S., Moore Ch., Karapanagioti H. K., Weerts S., McClurg T., Burrell E., Smith W., Van Velkenburg M., Lang J. S., Lang R. C., Laursen D., Danner B., Stewardson N., Thompson R. C. International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, vol. 58, iss. 10, pp. 1437–1446. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.014>
 30. Ogonowski M., Schür C., Jarsén A., Gorokhova E. The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*. *PLoS One*, 2016, vol. 11, iss. 5, art. no. e0155063 (20 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155063>
 31. Procter J., Hopkins F. E., Fileman E. S., Lindéque P. K. Smells good enough to eat: Dimethyl sulfide (DMS) enhances copepod ingestion of microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, vol. 138, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.014>
 32. Rehse S., Kloas W., Zarfl C. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2016, vol. 153, pp. 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.133>
 33. Rillig M. C., Bonkowski M. Microplastic and soil protists: A call for research. *Environmental Pollution*, 2018, vol. 241, pp. 1128–1131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.147>
 34. Roberts E. C., Wootton E. C., Davidson K., Jeong H. J., Lowe C. D., Montagnes D. J. Feeding in the dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: Linking behaviour with mechanisms. *Journal of Plankton Research*, 2010, vol. 33, iss. 4, pp. 603–614. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq118>
 35. Støttrup J. G., Richardson K., Kirkegaard E., Pihl N. J. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, 1986, vol. 52, iss. 2, pp. 87–96. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90028-1)
 36. Van Cauwenberghe L., Claessens M., Vandegheuchte M. B., Janssen C. R. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, 2015, vol. 199, pp. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.008>
 37. Watts A. J. R., Lewis C., Goodhead R. M., Beckett S. J., Moger J., Tyler Ch. R., Galloway T. S. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology*, 2014, vol. 48, iss. 15, pp. 8823–8830. <https://doi.org/10.1021/es501090e>
 38. Wolfe G. V., Steinke M., Kirst G. O. Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature*, 1997, vol. 387, pp. 894–897. <https://doi.org/10.1038/43168>
 39. Wootton E., Zubkov M., Jones D., Jones R., Martel C., Thornton C., Roberts E. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa.

- Environmental Microbiology*, 2007, vol. 9, iss. 1, pp. 216–222. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01130.x>
40. Wright S. L., Thompson R. C., Galloway T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 2013, vol. 178, pp. 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>
41. Wu F., Wang Y., Leung J. Y. S., Huang W., Zeng J., Tang Y., Chen J., Shi A., Yu X., Xu X., Zhang H., Cao L. Accumulation of microplastics in typical commercial aquatic species: A case study at a productive aquaculture site in China. *Science of the Total Environment*, 2020, vol. 708, art. no. 135432 (11 p.). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135432>

INGESTION OF MICROPLASTICS BY THE HETEROTROPHIC DINOFLAGELLATE *OXYRRHIS MARINA*

T. V. Rauen, V. S. Mukhanov, and L. O. Aganesova

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: taschi@mail.ru

Incorporation of microplastics (MP) into the microbial food web and its further transport to higher trophic levels have been hitherto poorly studied. In this work, the patterns of MP ingestion by the unicellular heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina* (OXY) were analyzed. The prymnesiophycean *Isochrysis galbana* (ISO), 5.6- μm polystyrene microspheres (MS), and their mixture (ISO-MS) were used as food objects for *O. marina*. Dynamics of the abundance of microorganisms and microspheres was investigated using a flow cytometer. As shown, the heterotroph *O. marina* ingested MP even in the presence of its natural prey (microalgae), and feeding on MP did not result in a decrease in the dinoflagellate abundance. The grazing rates of “preys” in the OXY-ISO-MS mixture were $(0.21 \pm 0.01) \text{ MS}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (\pm standard deviation) and $(0.38 \pm 0.01) \text{ ISO}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. These rates were significantly lower than in the mono-diet experiments – with OXY-ISO [$(1.93 \pm 0.68) \text{ ISO}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] and OXY-MS [$(0.45 \pm 0.04) \text{ MS}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]. Thus, the expansion of the range of food objects led to a decrease in the grazing rate. In the mono-diet experiments, the clearance rates were (0.12 ± 0.04) and $(0.19 \pm 0.06) \mu\text{L}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for OXY-ISO and OXY-MS, respectively; thereby, *O. marina* spent less time on capturing ISO cells than on capturing MS. The same pattern was observed in the experiments with the OXY-ISO-MS mixture: the clearance rate for microalgae [$(0.17 \pm 0.02) \mu\text{L}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] was slightly lower than that for MS [$(0.19 \pm 0.003) \mu\text{L}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]. Since *O. marina* re-consumed MS even in the presence of its natural food object (*I. galbana*), no trophic adaptation of the dinoflagellate to MS occurred. No selective grazing of *O. marina* for any “prey” was revealed, either ISO or MS. The obtained results indicate the possibility (and high probability) of the incorporation of MP into the microbial food web and the significant role of unicellular organisms in the transport of MP to higher trophic levels.

Keywords: microplastics, ingestion, microspheres, microalgae, persistent organic pollutants, trophic transport, *Oxyrrhis marina*, *Isochrysis galbana*