

Изменение скорости роста, флуоресцентных и цитометрических показателей у микроводоросли *Dunaliella salina* (Teod.) при различной концентрации меди в среде

А. И. АКИМОВ, Е. С. СОЛОМОНОВА, Н. Ю. ШОМАН, А. О. РЫЛЬКОВА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского Российской академии наук”
299011, Севастополь, Нахимова, 2
E-mail: n-zaichencko@yandex.ru

Статья поступила 30.08.2022

После доработки 11.01.2023

Принята к печати 23.01.2023

АННОТАЦИЯ

Проведена оценка изменения удельной скорости роста, флуоресцентных, цитометрических и морфологических показателей зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* при добавлении в культуральную среду ионов меди в концентрации 0–3750 мкг/л. Наиболее чувствительным параметром водорослей по отношению к действию меди является скорость роста, ее снижение отмечено при концентрации поллютанта выше 150 мкг/л, гибель культуры – при 1500 мкг/л и выше. Численность клеток водорослей в стационарной фазе роста закономерно снижается с повышением содержания меди в среде от 150 до 3750 мкг/л. Установлено, что медь не влияет на эффективность работы фотосинтетического аппарата водорослей при концентрациях, не приводящих к гибели культуры. Снижение значений максимального квантового выхода флуоресценции, нефотохимического тушения флуоресценции и относительной максимальной скорости электронного транспорта ниже оптимальных значений может использоваться как показатель летального воздействия исследуемого поллютанта на *D. salina*. При концентрации меди 750 мкг/л и выше отмечены: увеличение объема клеток, увеличение количества клеток шаровидной формы, деформация и перфорация плазмалеммы, преобладание деформированных клеток неправильной формы, двукратное снижение внутриклеточного содержания хлорофилла *a* и удельного выхода флуоресценции на хлорофилл *a* (мкг/л).

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, микроводоросли, ионы меди, цитотоксичность, проточная цитометрия, удельная скорость роста, FFR-флуориметрия.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день водные биоценозы характеризуются комплексом экологических проблем, связанных с их активной эксплуатацией и загрязнением промышленными и хозяйственно-бытовыми сточными вода-

ми, а также тяжелыми металлами. Загрязнение водных экосистем медью на протяжении десятилетий носит глобальный характер. Медь активно используется в промышленности и сельском хозяйстве, в противообрастающих красках, а также в фунгицидах и консервантах

древесины [Ingle et al., 2014]. Масштаб проблемы огромен и требует соответствующих усилий по выявлению и мониторингу негативных процессов и изменений в водных экосистемах. Быстрая ответная реакция микроводорослей на изменение условий роста, в частности под влиянием поллютантов, позволяет использовать изменение их структурно-функциональных характеристик в качестве чувствительных индикаторов экологического состояния водоемов. Принципиальное значение имеет получение экспресс-информации о состоянии клеток водорослей, которое позволяет уже на ранних этапах диагностировать изменение клеточного метаболизма под влиянием внешних факторов.

Исследования по влиянию меди на физиологические характеристики морских и пресноводных микроводорослей многочисленны [Stauber, Florence, 1987; Perales-Vela et al., 2007; Leal et al., 2016; Echeveste et al., 2018], в то время как вопрос влияния поллютанта на физиологию продуцентов гиперсоленых водоемов изучен слабо. Гиперсоленые водоемы есть на всех континентах и многие из них относятся к числу наиболее продуктивных экосистем планеты [Anufrieva et al., 2022]. Гиперсоленые водоемы подвержены высокой антропогенной нагрузке в результате хозяйственной и рекреационной деятельности человека [Чабан, 2013; Пасынков и др., 2014]. В ряде работ показано, что в материковых озерах Крыма отмечается повышенная концентрация Li, Co, Cu, Ni по сравнению с морскими экосистемами [Kotova et al., 2015, 2017; Чабан, Станкевич, 2017; Shadrin et al., 2020]. Вопрос оценки экотоксичности поллютантов, в частности тяжелых металлов, приобретает особую актуальность ввиду перспективности использования гиперсоленых озер для развития аквакультуры [Anufrieva et al., 2022]. Зеленая галофильная микроводоросль *Dunaliella salina* является типичным представителем микрофлоры гиперсоленых водоемов, что позволяет использовать ее в качестве объекта для биотестирования экотоксичности меди.

Исследования о влиянии меди на структурно-функциональные характеристики *Dunaliella salina* проводились ранее, однако получаемые результаты разрозненны и практически не поддаются сравнению [Nikookar et al., 2005; Parsy et al., 2022]. Причина в том, что

степень резистентности *D. salina* к действию меди зависит от многих факторов, включая исходную плотность культуры [Franklin et al., 2002] и химический состав среды, используемой для культивирования водорослей [Pascual et al., 2020]. В цитируемых работах (как и в большинстве работ исследуемой тематики) культивирование *D. salina* проводилось на питательной среде с высоким содержанием хелатирующего агента ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), связывающего растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, уменьшая их активность и токсическое действие на клетки. Кроме того, исследователями использованы высокие исходные плотности культуральной суспензии (10^5 – 10^6 кл./мл), а как известно, *D. salina* способна уменьшать токсическое действие меди на клетки путем производства внеклеточных полимерных веществ, связывающих ионы меди, и элиминации токсиканта во внешнюю среду [Shafic, 2008]. Также такая высокая численность клеток *D. salina* редко встречается в природных условиях, что затрудняет экстраполяцию полученных пороговых концентраций меди, ингибирующих рост и потенциальную фотосинтетическую активность водорослей, на природные экосистемы, и позволяет оценивать только механизм влияния меди на *D. salina*. В представленном исследовании нами предпринята попытка выявить закономерности физиологического отклика *D. salina* на цитотоксическое действие меди при культивировании водорослей на питательной среде без ЭДТА и начальной плотности культуры, сопоставимой с таковой в гиперсоленых озерах Крыма.

Цель работы заключалась в оценке изменения структурных и функциональных показателей микроводоросли *Dunaliella salina* при добавлении в среду ионов меди разной концентрации. Для достижения поставленной цели решали следующие задачи: 1) оценить динамику численности *D. salina* при различных концентрациях меди; 2) оценить влияние внесенной концентрации поллютанта на конечную плотность культуры в стационарной фазе роста; 3) оценить влияние меди на эффективность работы фотосинтетического аппарата, содержание хлорофилла *a* и морфологию клеток *D. salina*; 4) выявить пороговую концентрацию меди, ингибирующую рост

и потенциальную фотосинтетическую активность *D. salina*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использована альгологически чистая культура зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* (Teod.), штамм IBSS-1, из коллекции живых культур морских планктонных микроводорослей (IBSS) научно-образовательного центра коллективного пользования “Гидробионты мирового океана” (WDCM № 1201) Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН”.

Условия проведения экспериментов. В ходе эксперимента водоросли выращивали на разбавленной в 10 раз питательной среде Гольдберга без добавления меди и ЭДТА, способного связывать растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, тем самым уменьшая их активность и токсическое действие на клетки (ГОСТ 31960–2012). Исходная плотность культуры во всех вариантах эксперимента составляла $10 \cdot 10^3$ кл./мл и была выбрана исходя из численности клеток *Dunaliella salina*, регистрируемой в гиперсоленых озерах Крыма [Сеничева, 2005]. Для приготовления питательной среды использовали воду из открытой части Черного моря, которую фильтровали через стекловолокнистый фильтр Whatman (GF/C) (Sartorius Stedim Biotech, Франция) с диаметром пор 1 мкм и стерилизовали 3 раза при 85 °C [Финенко и др., 2008]. Специальных мероприятий по разрушению или удалению растворенного органического вещества не проводилось. Содержание меди в воде из открытой части Черного моря составляет порядка 1 мкг/л [Барабашин и др., 2020]. В представленном исследовании мы этим значением пренебрегаем и принимаем, что до начала эксперимента меди в среде не было. Вся используемая в работе посуда подвергалась вымачиванию 2–3 суток в 20%-й соляной кислоте. Предварительно, в течение 3–5 суток до начала эксперимента, для адаптации водорослей к свето-температурным условиям роста культуру выращивали при интенсивности света в области фотосинтетически активной радиации (ФАР) 30 мкмоль фотон/(м²·с), температуре 20 °C и свето-темновом периоде 14/10 ч. Указанные световые и температур-

ные условия роста сохранялись в течение всего эксперимента. В течение светового периода суспензию периодически (3 раза в сутки) взбалтывали. На протяжении периода адаптации плотность культуры поддерживали на одном уровне около $10 \cdot 10^3$ кл./мл путем ежедневного разбавления свежей питательной средой. Концентрацию клеток и степень разбавления контролировали по интенсивности флуоресценции, нормированной предварительно на количество клеток по данным цитометрических измерений. После стабилизации скорости роста в полунепрерывном режиме культуру водорослей переносили непосредственно в экспериментальные сосуды объемом 100 мл. Объем культуральной суспензии составлял 50 мл.

Освещение колб осуществляли снизу светодиодами цветовой температурой 6000 К. Уровень освещенности определяли квантометром QSL 2101 (Biospherical Instruments Inc., США). Значения pH составляли 8,2–8,5.

В качестве токсиканта использовали сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagent, $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich, США). Из маточного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 0,1 г/л готовили растворы токсиканта. В опытных колбах добавка иона меди составила 150, 375, 750, 1500, 1875, 2250 и 3750 мкг/л. В качестве контроля использовали водоросли, культивируемые на среде без добавления меди. В работе оценивалось изменение структурно-функциональных, флуоресцентных, цитометрических, морфологических показателей *D. salina* на участке экспоненциального роста водорослей (первые 5–7 суток эксперимента), а также конечная плотность культуры в стационарной фазе роста (15-е сутки эксперимента). Общая продолжительность эксперимента составляла 15 суток. В каждом варианте опыта использовали по три экспериментальные колбы.

Методы измерений. Цитометрический анализ проб проводили в центре коллективного пользования “Спектрометрия и хроматография” Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН” на проточном цитометре MACS Quant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия), оборудованном тремя лазерами (405, 488 и 635 нм). Для обработки данных использовали программу FSC Express 7 Research Edition (De Novo Software, США). Общую численность микроводорослей в культурах

определяли в кластере на двух параметрических цитограммах по прямому светорассеянию (FS) и флуоресценции отдельных клеток в красной спектральной области (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах.

Удельную скорость роста водорослей (μ , сут⁻¹) рассчитывали по уравнению [Финенко, Ланская, 1971]:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}, \quad (1)$$

где N_0 и N_t – исходная концентрация клеток и их концентрация через время t , кл./л; t – время между измерениями, сут.

Измерение флуоресценции пигментного комплекса водорослей проводили на FRR-флуориметре “Мега-25м” с импульсной модуляцией возбуждающего света на длине волны 455 нм, разработанном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова (ООО “Генная и клеточная терапия”, Россия). FRR-флуориметр – флуориметр с высокой частотой повторения (fast repetition rate) световых импульсов. Подробное описание методики и характеристики данного флуориметра представлены в работе [Погосян и др., 2009].

Определение всех флуоресцентных параметров проводили в красной области спектра на длине волны 680 нм в рамках одного измерительного цикла. Перед измерением пробы выдерживали 15 минут в темноте. После периода темновой адаптации проводили измерение параметров F_0 и F_m , где F_0 – величина флуоресценции хлорофилла *a* при открытых реакционных центрах, измеренная через 2,5 мкс от начала облучения с интенсивностью 5000 мкмоль фотон/(м²·с) (частота импульсов 16 Гц); F_m – максимальная флуоресценция хлорофилла *a* при закрытых реакционных центрах, измеренная через 1 с от начала облучения с интенсивностью 5000 мкмоль фотон/(м²·с) (частота импульсов 80 Гц). Далее проводили регистрацию параметров F'_0 (нулевая флуоресценция хлорофилла *a* при постоянном освещении) и F'_m (максимальная флуоресценция хлорофилла *a* на фоне постоянного освещения) после освещения экспериментального образца постоянным светом интенсивностью 500 мкмоль фотон/(м²·с) в течение 40 с. На основании измеренных данных проводили расчет коэффициентов, представленных ниже.

Относительную переменную флуоресценцию (F_v/F_m), характеризующую максимальную квантовую эффективность использования световой энергии, рассчитывали по формуле

$$F_v / F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}. \quad (2)$$

Величину rETR при определенной интенсивности постоянного света I рассчитывали по формуле:

$$\text{rETR} = \frac{F'_m - F'_0}{F'_m} \cdot I, \quad (3)$$

где rETR – это показатель скорости линейного переноса электронов через фотосистему 2, которая коррелирует с общей эффективностью фотосинтеза микроводорослей; I – интенсивность постоянного освещения 500 мкмоль фотон/(м²·с).

Нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) при освещенности 500 мкмоль фотон/(м²·с) рассчитывали по формуле

$$\text{NPQ} = \frac{F_m}{F'_m} - 1. \quad (4)$$

Определение концентрации хлорофилла *a* в пробах проводили флуориметрическим методом с подкислением для поправки на феофитин [Jeffrey et al., 1997]. Для этого 1–10 мл суспензии водорослей фильтровали при вакууме не более 0,2 атм через стекловолнистые фильтры Whatman (GF/C) (Sartorius Stedim Biotech) с диаметром пор 1 мкм. Осевшую на фильтре взвесь экстрагировали 90 %-м раствором ацетона. Для улучшения экстракции пигментов фильтры механически растирали стеклянной палочкой и выдерживали в холодильнике в темноте при температуре 8–10 °С в течение 18–24 ч. Полученный экстракт центрифугировали при скорости 3000 об./мин в течение 10 мин, используя лабораторную центрифугу ОПН-3 (“Дастан”, Россия). Ацетоновые экстракты объемом 3 мл переносили в кварцевую кювету, в которой измеряли флуоресценцию (F_0) до и после подкисления двумя каплями 1,2М HCl (измерение проводили через 20 с после подкисления). Флуоресценцию измеряли на лабораторном флуориметре “Мега-25м” на длине волны 680 нм. Флуориметр предварительно откалибровали, согласно работе [Юнев, Берсенева, 1986], по хроматографически чистому хлорофиллу *a* производства Sigma (США), исходную

концентрацию которого определяли на спектрофотометре СФ-2000 (“ЛОМО”, Россия) по методике [Jeffrey, Humphrey, 1975] в диапазоне концентраций хлорофилла *a* 1–250 мкг/л. Расчет концентрации пигмента проводили по формуле:

$$C_{hla} = 0,07(F - F_a) \left(\frac{V_{ex}}{V_{filt}} \right), \quad (5)$$

где C_{hla} – концентрация хлорофилла *a*, мкг/л; 0,07 – калибровочный коэффициент флуориметра “Мега-25м”; F – флуоресценция до подкисления HCl, отн. ед.; F_a – флуоресценция после подкисления, отн. ед.; V_{ex} – объем ацетонового экстракта, мл; V_{filt} – объем фильтрованной культуры, л.

Удельное содержание хлорофилла *a* в клетке ($C_{hla}/cell$, пг/кл.) рассчитывали по формуле:

$$C_{hla} / cell = \frac{C_{hla}}{N}, \quad (6)$$

C_{hla} – содержание хлорофилла *a* в пробе, мкг/мл; N – численность клеток в пробе, кл./мл.

Микроскопия. Микроскопические исследования выполняли с помощью светового микроскопа Carl Zeiss (Axiostar plus, Германия), снабженного камерой (Cannon A 620, Япония) при увеличении от $\times 630$. Размеры *D. salina* (диаметр (d), длину (l , h) и ширину (D)) по микрофотографиям определяли с помощью программы ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_20 (32-bit)). Объем рассчитывали по формуле объема “половины сфероида и параболоид” [Брянцева и др., 2005].

Статистическая обработка данных выполнялась по стандартным программным пакетам Microsoft Excel 7.0 (Microsoft Office), Grapher-16 (Golden Software). Значения, указанные на графиках и в таблице, представляют собой среднее трех измерений. Бары на графиках показывают среднеквадратичное отклонение измеряемых величин. Достоверность различий между выборками оценивали по t -критерию Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

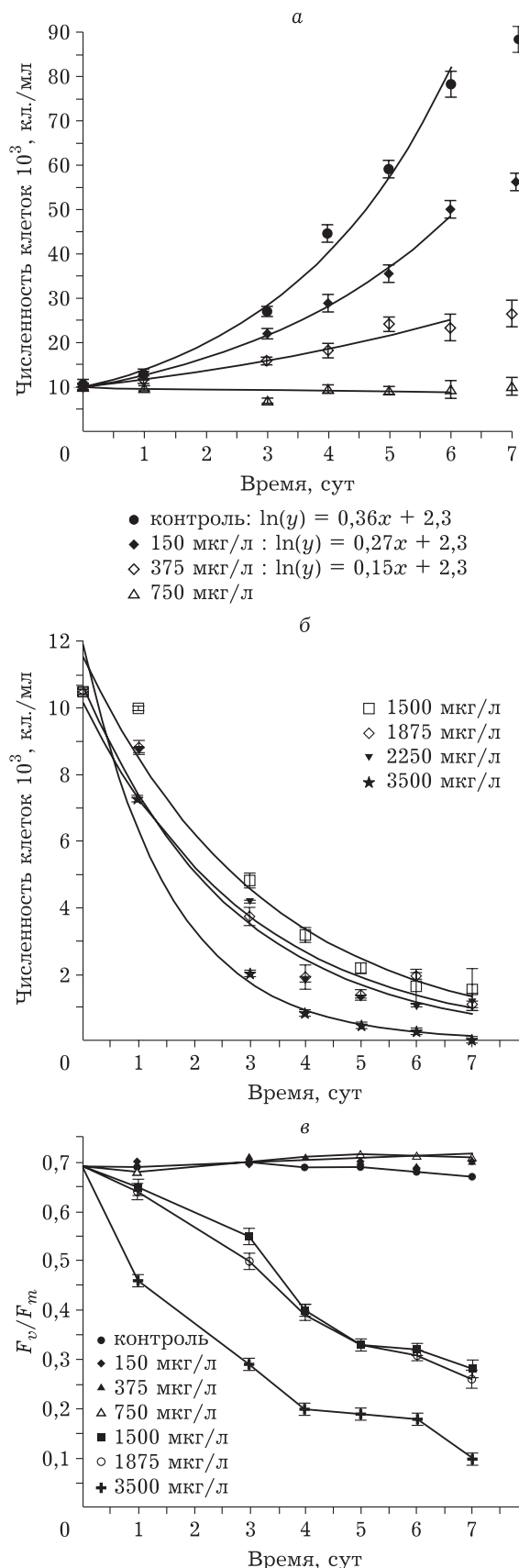
РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты показали, что внесение в культивационную среду ионов меди приводило к замедлению скорости роста водорослей

вплоть до полной остановки деления клеток при концентрации поллютанта 750 мкг/л (рис. 1, *a*). При содержании меди 150 и 375 мкг/л удельная скорость роста водорослей на участке их экспоненциального роста достоверно уменьшалась в 1,3 и 2,1 раза по сравнению с контролем (непарный t -тест, $p < 0,05$) и составляла 0,27 и 0,17 сут⁻¹ соответственно. Как видно из представленных графиков, рост клеток в течение первых шести суток эксперимента при этих концентрациях и в контрольных склянках хорошо аппроксимировался экспоненциальной зависимостью. Начиная с седьмых суток эксперимента наблюдалось замедление темпа деления клеток и постепенный переход в стационарную фазу роста этих культур. При этом конечная плотность культур в стационарной фазе зависела от внесенной концентрации поллютанта: закономерно снижалась с повышением содержания меди в среде (табл. 1). Так, в контрольном варианте эксперимента без добавления меди численность *D. salina* на 15-е сутки эксперимента составила $90,9 \cdot 10^3$ кл./мл. В то время как при добавлении в среду меди в концентрации 150 и 375 мкг/л конечная плотность культур достоверно снижалась до 78,2 и $34,5 \cdot 10^3$ кл./мл соответственно (непарный t -тест, $p < 0,05$).

При внесенной концентрации иона меди 750 мкг/л количественный рост культуры полностью останавливался, концентрация клеток оставалась практически на одном уровне (примерно $(8-10) \cdot 10^3$ кл./мл) в течение всего эксперимента (см. рис. 1, *a*, табл. 1). Однако, несмотря на снижение или полное подавление процесса деления и роста культуры, клетки сохраняли высокую подвижность. При концентрациях меди 1500 мкг/л и выше наблюдалось снижение числа клеток через 24 часа после внесения поллютанта в среду (непарный t -тест, $p < 0,05$) (рис. 1, *б*). Скорость элиминации клеток зависела от исходной концентрации меди, однако во всех случаях в конечном итоге наблюдалась гибель культуры.

На рис. 1, *в* показана динамика коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m), характеризующего эффективность утилизации световой энергии фотосинтетическим комплексом фотосистемы 2. Из представленного рисунка видно, что данный параметр сохранял высокие значения 0,7–0,71 при содержании меди в среде до 750 мкг/л.



Это указывает на высокую функциональную устойчивость фотосинтетического аппарата водорослей к действию ионов меди. Высокая толерантность фотосинтетического аппарата к меди подтверждается также и другими исследуемыми нами флуоресцентными параметрами – относительной скоростью электронного транспорта фотосистемы (rETR) и уровнем нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) (табл. 2). На рис. 2 показано изменение численности клеток и соответствующей относительной скорости электронного транспорта на 0-е, 3-и и 7-е сутки эксперимента в зависимости от концентраций ионов меди в среде.

Как уже было указано выше, ингибирующее влияние меди на рост культуры *D. salina*, находящейся в экспоненциальной фазе роста, отмечалось при концентрациях меди 150 мкг/л и выше. При этом количество клеток *D. salina* через трое суток после внесения поллютанта было на 22 и 46 % ниже, чем в контроле (непарный t-тест, $p < 0,05$) (рис. 2, а). Тогда как значения rETR клеток сохраняли высокий и примерно одинаковый уровень в диапазоне концентраций меди до 750 мкг/л включительно (рис. 2, б), что может свидетельствовать о поддержании согласованности реакций фотофизических стадий фотосинтеза в этих условиях. При концентрации меди 1500 мкг/л и выше эффективность работы фотосинтетического аппарата быстро снижалась (см. рис. 1, в), а также отмечено достоверное падение значений относительной скорости электронного транспорта (см. рис. 2, б) (в обоих случаях непарный t-тест, $p < 0,05$), что свидетельствует о нарушении работы фотосинтетического аппарата клеток и последующей гибели культуры.

Кроме скорости роста, являющейся наиболее чувствительной функцией, заметные изменения в результате воздействия меди наблюдались для ряда других исследуемых нами структурно-функциональных показателей клеток *D. salina* (см. табл. 2). Так, при повышении концентрации меди в среде отмечено увеличение объема клеток, сниже-

Рис. 1. Динамика численности (а, б) и максимального квантового выхода флуоресценции (в) в экспоненциальной фазе роста накопительной культуры *Dunaliella salina* при различных концентрациях внесенного иона меди

Т а б л и ц а 1

Численность клеток *Dunaliella salina* в стационарной фазе роста накопительной культуры при различных концентрациях внесенного иона меди ($n = 3$)

Концентрация Cu^{2+} , мкг/л	Количество клеток $\cdot 10^3$ /мл			
	7-е сутки	10-е сутки	13-е сутки	15-е сутки
0	$89,5 \pm 5,2$	$100,0 \pm 5,4$	$95,2 \pm 6,3$	$90,9 \pm 7,1$
150	$62,3 \pm 3,3$	$74,5 \pm 3,7$	$77,3 \pm 5,2$	$78,2 \pm 5,4$
375	$32,0 \pm 2,4$	$33,5 \pm 3,1$	$34,1 \pm 3,6$	$34,5 \pm 4,2$
750	$9,5 \pm 2,4$	$9,4 \pm 3,5$	$8,6 \pm 3,9$	$8,9 \pm 4,2$

П р и м е ч а н и е. Значения, указанные в таблице, представляют собой среднее $\pm$ среднеквадратическое отклонение.

ние содержания хлорофилла *a* и цитометрического показателя FL4, характеризующего среднее значение красной автофлуоресценции отдельных клеток. *D. salina* в нативной пробе (контроль) была представлена большей частью грушевидными (76 %), реже шаровидными (24 %) клетками зеленого цвета,

снабженными двумя жгутиками одинаковой длины (рис. 3, а). В культуре встречались молодые растущие клетки удлинённой формы и небольшой ширины. В среднем линейные размеры клеток в нативной пробе *D. salina* были следующими: длина 13 ± 1 мкм, ширина $9 \pm 0,6$ мкм. При этом средний объем

Т а б л и ц а 2

Зависимость структурных и функциональных характеристик *Dunaliella salina* от концентрации внесённых ионов меди через 3 и 7 суток культивирования ($n = 3$)

Cu^{2+} , мкг/л	$N_{\text{кл}} \cdot 10^3$, кл./мл	Хл, мкг/л	Хл, пг/кл	F_m , отн. ед.	$F_m/\text{Хл}$, отн. ед. / (мкг Хл а/л)	NPQ	rETR	FL4	FS	SS
3-и сутки эксперимента										
0	$27,8 \pm 2$	72 ± 5	$2,6 \pm 0,2$	625 ± 31	$8,7 \pm 0,6$	$0,24 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	76 ± 5	24 ± 2	81 ± 6
150	$21,7 \pm 1,5$	59 ± 4	$2,7 \pm 0,2$	490 ± 21	$8,1 \pm 0,5$	$0,29 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,02$	74 ± 5	24 ± 2	146 ± 11
375	$15,1 \pm 1,1$	42 ± 3	$2,8 \pm 0,2$	350 ± 19	$8,3 \pm 0,6$	$0,25 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,03$	75 ± 3	25 ± 2	187 ± 13
750	$8,2 \pm 0,6$	$25 \pm 1,6$	$3,0 \pm 0,1$	180 ± 14	$7,2 \pm 0,5$	$0,27 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$	67 ± 4	27 ± 3	162 ± 12
1500	$4,8 \pm 0,3$	$12 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,2$	53 ± 4	$4,4 \pm 0,3$	$0,23 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	44 ± 3	41 ± 2	167 ± 12
1875	$5,9 \pm 0,4$	$10 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,1$	41 ± 7	$4,1 \pm 0,3$	$0,20 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	46 ± 3	40 ± 4	180 ± 13
2250	$5,0 \pm 0,4$	$8 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,1$	40 ± 3	$5,0 \pm 0,4$	$0,14 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	46 ± 4	40 ± 4	171 ± 12
3500	$4,1 \pm 0,3$	$5 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,9$	22 ± 5	$4,4 \pm 0,3$	$0,10 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	31 ± 5	62 ± 5	235 ± 17
7-е сутки эксперимента										
0	$89,5 \pm 5,2$	224 ± 24	$2,5 \pm 0,2$	2554 ± 128	$7,4 \pm 0,5$	$0,28 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,03$	80 ± 6	25 ± 2	56 ± 4
150	$62,3 \pm 3,3$	174 ± 19	$2,8 \pm 0,2$	1944 ± 66	$7,3 \pm 0,5$	$0,26 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,03$	77 ± 5	24 ± 3	108 ± 8
375	$32,0 \pm 2,4$	82 ± 5	$2,6 \pm 0,2$	705 ± 32	$8,5 \pm 0,6$	$0,31 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,03$	74 ± 6	25 ± 3	207 ± 15
750	$9,5 \pm 2,4$	30 ± 2	$3,2 \pm 0,2$	211 ± 8	$6,0 \pm 0,4$	$0,24 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,03$	73 ± 7	24 ± 2	246 ± 18
1500	$2,2 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$	25 ± 6	$3,6 \pm 0,2$	$0,16 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,02$	42 ± 5	29 ± 3	158 ± 12
1875	$1,6 \pm 0,5$	—	—	15 ± 4	—	$0,13 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,01$	30 ± 2	30 ± 2	310 ± 22
2250	$1,6 \pm 0,4$	—	—	13 ± 4	—	$0,12 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,01$	31 ± 2	28 ± 2	187 ± 13

П р и м е ч а н и е. $N_{\text{кл}}$ – численность клеток; Хл – концентрация хлорофилла *a* в клетке (пг/кл) и в суспензии (мкг/л) *D. salina*; F_m – максимальная флуоресценция хлорофилла *a* при закрытых реакционных центрах; $F_m/\text{Хл}$ – флуоресценция, нормированная на хлорофилл *a*; NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции при освещенности 500 мкмоль фотон/(м²·с); rETR – относительная максимальная скорость электронного транспорта при освещенности 500 мкмоль фотон/(м²·с); FL4 – автофлуоресценция хлорофилла *a* на клетку на длине волны 680 нм; FS – прямое светорассеяние; SS – боковое светорассеяние клеток (гранулярность). Прочерк – измерения не проводились. Все значения представляют собой среднее $\pm$ среднеквадратическое отклонение.

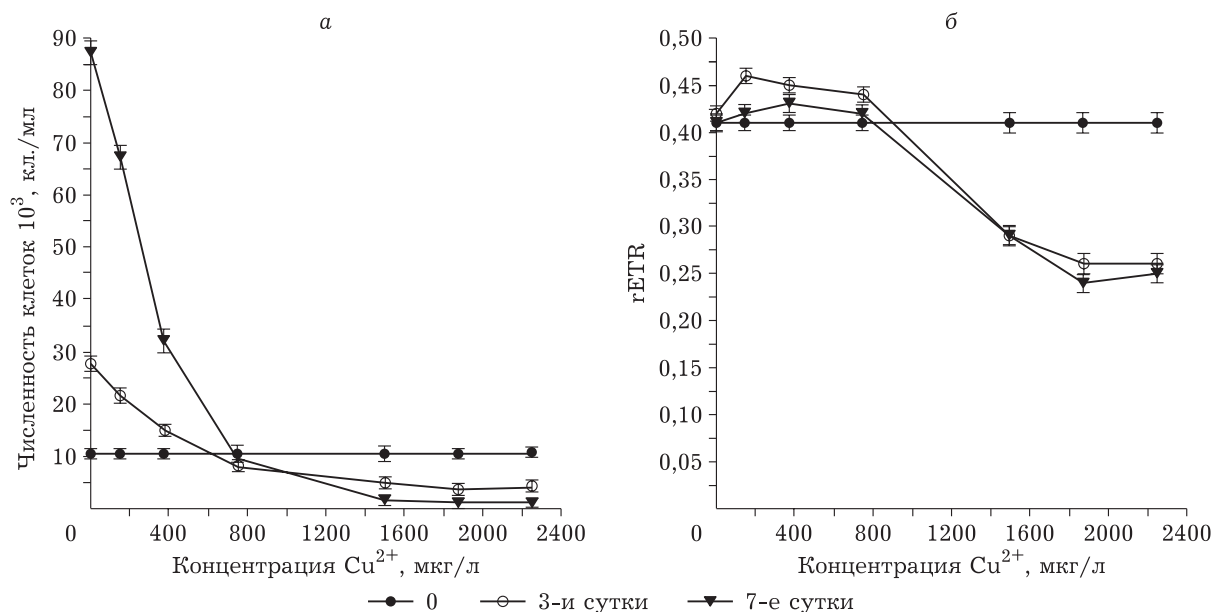


Рис. 2. Концентрация клеток *Dunaliella salina* (а) и относительная скорость электронного транспорта (б) на 0-е, 3-и и 7-е сутки при различном содержании внесенного иона меди в культуральную среду

клеток составлял 548 ± 80 мкм³. При концентрации меди в среде 1500 мкг/л в культуре *D. salina* количество клеток обычной грушевидной формы снизилось до 31 %, шарообразной формы повысилось до 62 %, кроме того у 7 % шаровидных клеток наблюдали ретракцию (втягивание) цитоплазмы и ее отде-

ление от плазмолеммы (рис. 3, б). Содержимое клеток приобрело желто-зеленую окраску, наблюдали достоверное повышение всех морфометрических показателей (во всех случаях непарный t-тест, $p < 0,05$): длина увеличилась в 1,6 раза – до $21,2 \pm 1,2$ мкм; ширина – в 1,8 раза – до $17,3 \pm 1,1$ мкм. Средний

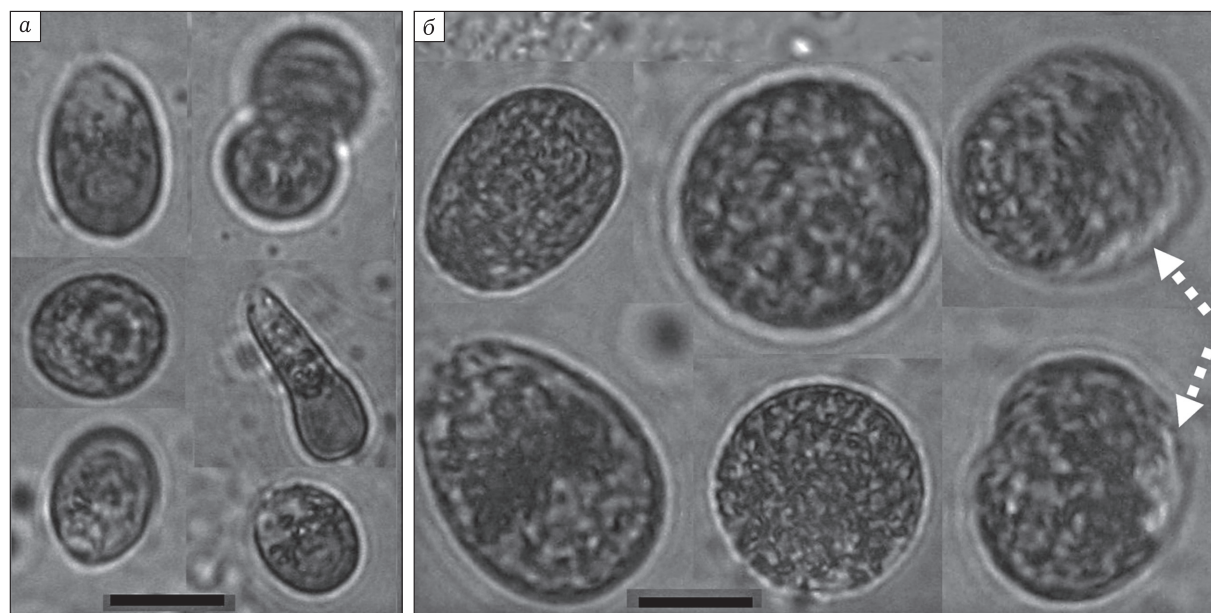


Рис. 3. Микрофотографии *Dunaliella salina* при различных условиях культивирования: а – нативная проба (контроль), б – с добавлением Cu^{2+} 1500 мкг/л, белыми пунктирными стрелками показаны клетки с ретракцией цитоплазмы. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

объем клеток по сравнению с контролем достоверно увеличился в 5,6 раза – до $3050,3 \pm \pm 470,8$ мкм³. На увеличение размеров клеток под воздействием меди указывают и значения FS (прямое светорассеяние) на 3-и сутки экспозиции, повышающиеся от 24 до 62 при концентрации поллютанта в среде 0–3500 мкг/л. Это позволяет предположить, что именно торможение и остановка деления клеток при продолжающемся фотосинтезе является основной причиной увеличения объема клеток.

При увеличении содержания поллютанта в среде от 0 до 3500 мкг/л отмечено также достоверное возрастание структурной неоднородности клеток относительно контроля, что наблюдалось как при микроскопировании (см. рис. 3), так и по увеличению индекса бокового рассеяния SS по измерениям на проточном цитометре (см. табл. 2) (непарный t-тест, $p < 0,05$).

Увеличение концентрации меди до 750 мкг/л слабо влияло на удельное содержание хлорофилла *a* у *D. salina*, значения которого находились в пределах 2,5–3,0 пг/кл. как на 3-и, так и на 7-е сутки эксперимента. Автофлуоресценция клеток FL4 в красной области спектра составляла при этом 70–80 отн. ед. В то время как при более высокой концентрации меди отмечено достоверное снижение содержания пигмента до 1,2–1,5 пг/кл., а FL4 уменьшалась до 35–45 отн. ед. (непарный t-тест, $p < 0,05$) (см. табл. 2). Значение показателя $F_m/Xл$ снижалось примерно в 2 раза при переходе от концентрации меди в суспензии от 750 до 1500 мкг/л (непарный t-тест, $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам исследования установлен ряд закономерностей физиологического отклика *D. salina* на цитотоксическое действие меди. Показано, что наиболее чувствительным параметром водорослей к действию ионов меди является скорость деления клеток. Так, замедление удельной скорости роста водорослей отмечено уже при минимальной исследуемой концентрации поллютанта 150 мкг/л. В то время как флуоресцентные параметры клеток, характеризующие эффективность работы фотосинтетического аппарата, сохраняли высокий и примерно одинаковый уровень

в диапазоне концентраций меди до 750 мкг/л включительно. Мы полагаем, что это обусловлено нарушением цикла клеточного деления в результате токсического действия меди, что приводит к торможению и остановке деления клеток при продолжающемся фотосинтезе. В работах [Jiménez et al., 2009; Giri et al., 2013; Ferradás et al., 2014] показано, что действие токсикантов приводит к изменению морфологии ядер с конденсацией хроматина, которая часто описывается как признак апоптоза. В исследовании [Esperanza et al., 2015] клетки *Chlamydomonas reinhardtii*, подвергшиеся воздействию параквата, демонстрировали неравномерное окрашивание DAPI (флуоресцентный краситель ДНК), а также небольшую степень скопления хроматина в ядрах. При этом у окрашенных клеток агрегация хроматина не ограничивалась только областью ядра и окрашенные в синий цвет гранулы наблюдались во всей полости клетки. Это указывает на некоторую степень кариолизиса [Jiménez et al., 2009], которая согласуется с серьезными повреждениями ДНК клеточного цикла. Снижение эффективности работы фотосинтетического аппарата *D. salina* в нашем исследовании отмечено при концентрациях меди, вызывающих выраженное угнетение роста водорослей, приводящее к последующей гибели клеток. Анализ литературных данных не дал однозначного объяснения наблюдаемого эффекта. Так, в ряде работ действие загрязнителей приводило к линейному снижению величины F_v/F_m с увеличением их концентрации в среде [Macedo et al., 2008; Barreto, Lombardi, 2016], в других исследованиях поллютанты не влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата водорослей [Perales-Vela et al., 2007; Joonas et al., 2019]. В более ранних работах показано, что у диатомовых водорослей *Asterionella japonica* [Fisher et al., 1981] и *Phaeodactylum tricornutum* [Cid et al., 1995] действие меди в большей степени сказывалось на скорости роста, чем на скорости фотосинтеза: ингибирование роста наблюдалось при более низких концентрациях поллютанта в среде. В исследовании [Stauber, Florence, 1987] авторы выявили, что присутствие меди и других металлов в культуральной среде воздействовало на механизмы деления клеток водорослей, не влияя при этом на эффективность их фотосинтеза.

Это несоответствие может быть объяснено ингибированием поллютантом выработки метионина, участвующего в процессе клеточного деления, в результате клетки не делятся, но характеризуются высокой фотосинтетической активностью [Davies, 1974]. Снижение значений максимального квантового выхода флуоресценции, нефотохимического тушения флуоресценции и относительной максимальной скорости электронного транспорта (F_v/F_m , NPQ и rETR) ниже оптимальных значений под воздействием меди свидетельствует о нарушении работы фотосинтетического аппарата клеток. Изменение параметров F_v/F_m , NPQ и rETR в пределах 0,6–0,7, 0,2–0,3 и 0,4–0,5 отн. ед. соответственно свидетельствует о высокой потенциальной эффективности фотосинтеза [Kumar et al., 2014; Котелевцев и др., 2015]. В то время как снижение данных величин ниже 0,5, 0,2 и 0,4 отн. ед. соответственно указывает на нарушение работы фотосинтетического аппарата водорослей и последующую гибель культуры. Вследствие чего флуоресцентные параметры F_v/F_m , NPQ и rETR могут быть использованы как показатели летального воздействия меди на *Dunaliella salina*.

Изменение других исследуемых параметров *D. salina* (объем клеток и их гранулярность, содержание хлорофилла *a*) согласуется с ранее полученными результатами [Nikookar et al., 2005; Mofeed, 2017], хотя в ряде случаев отмечается стимулирующее действие меди в малой концентрации на рост и синтез пигментов *D. salina* [Visviki, Rachlin, 1994; Shafik, 2008]. Наблюдаемое нами двукратное снижение коэффициента $F_m/Xл$ (флуоресценция, нормированная на концентрацию хлорофилла *a*, мкг/л) при увеличении концентрации меди в суспензии от 750 до 1500 мкг/л может быть связано с эффектом самозатенения молекул хлорофилла при увеличении размеров клеток и соответствующим снижением удельного коэффициента поглощения световых квантов [Flynn, 2001]. В литературе также высказывается предположение, что снижение $F_m/Xл$ может быть связано с заменой ионов магния на ионы меди в перрольном кольце молекулы хлорофилла и инактивации пигмента как переносчика энергии световых квантов [Miazek et al., 2015; Gao et al., 2017].

Токсическое действие меди влияло на конечную плотность культур в стационарной

фазе роста, численность клеток водорослей закономерно снижалась с повышением содержания меди в культуральной среде. Известно, что в накопительной культуре водорослей конечная плотность клеток определяется в основном истощением (дефицитом) одного или нескольких питательных элементов в среде при накоплении биомассы водорослей. Наблюдаемое же нами различие в конечной плотности культуры может объясняться торможением роста водорослей, вызванным токсическим действием меди, а также элиминацией значительной доли клеток в первые часы после внесения поллютанта в культуральную среду.

При оценке степени чувствительности водорослей к действию меди следует учитывать абиотические условия их роста, исходную плотность культуры, состав и концентрацию питательной среды, количество растворенной органики и другие факторы, влияющие на уровень токсичности меди в среде. Ввиду чего границы устойчивости вида к действию меди будут зависеть от условий роста *D. salina*. Наши эксперименты с *Dunaliella salina* показали, что при начальной плотности культуры $10 \cdot 10^3$ кл./мл нижний порог влияния ионов меди наблюдался при концентрации 150 мкг/л. Авторами работы [Nikookar et al., 2005] отмечено, что снижение скорости роста *Dunaliella salina* происходило при концентрации меди 318 мкг/л. При этом исходная численность клеток водорослей составляла $1 \cdot 10^5$ кл./мл, а культивирование проводилось на среде, содержащей ЭДТА и смесь металлов [Ben-Amotz, Avron, 1983]. В исследовании [Visviki, Rachlin, 1994] с *D. salina* EC₅₀ меди через 96 часов после внесения поллютанта была равна 377 мкг/л, тогда как, по нашим данным, 96 ч EC₅₀ составляла 260 мкг/л иона меди в культуральной среде. Авторы культивировали водоросли на среде AS100 [Starr, Zeikus, 1987], приготовленной на основе искусственной морской воды во избежание связывания металлов природными хелаторами, но содержащей трис-буферы, которые также имеют свойства хелаторов [Sunda, Lewis, 1987]. Начальная концентрация клеток *D. salina* при этом была $2,5 \cdot 10^5$ кл./мл. Таким образом, даже для одного вида границы устойчивости к воздействию ионов меди сильно различаются, что связано преимущественно с условиями культивирования водорослей. Учет исходной численности

клеток важен из-за способности большинства видов водорослей, в частности и *D. salina* [Franklin et al., 2002; Shafik, 2008; Leal et al., 2016], продуцировать медь хелатирующие лиганды, которые связывают растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, тем самым уменьшая их активность и токсическое действие на клетки [Echeveste et al., 2018]. Ввиду чего концентрация ионов меди в активной форме в густой культуре будет значительно ниже. Это особенно существенно может сказываться в условиях накопительного роста водорослей, так как концентрация ионов меди в активной форме в среде будет снижаться из-за их хелатирования накапливающимися органическими метаболитами водорослей в процессе жизнедеятельности и разрушения клеток. Следует учитывать, что скорость продуцирования органических лигандов видоспецифична. При этом, по мнению многих авторов, именно различия в скорости продуцирования лигандов можно объяснить различия в чувствительности видов к действию меди: штаммы, способные вырабатывать большее количество лигандов, более устойчивы к содержанию меди в среде [Quigg, 2006; Echeveste et al., 2018].

Наши результаты показали, что внесение в культуральную среду меди в концентрации 150–750 мкг/л приводит к снижению скорости роста *Dunaliella salina*, но при этом клетки остаются жизнеспособными, способными к делению и сохраняют высокую функциональную устойчивость фотосинтетического аппарата. Способность *D. salina* уменьшать токсическое действие меди на клетки путем производства внеклеточных полимерных веществ, связывающих ионы меди, и элиминации токсиканта во внешнюю среду отмечено в работе [Shafik, 2008]. Кроме того, в ряде исследований показано, что *Dunaliella salina* имеет также высокую толерантность и к другим видам металлов, в частности к кадмию, цинку, свинцу [Folgar et al., 2009; Mofeed, 2017], хрому [Kaushik, Raza, 2019] и алюминию [Akbarzadeh, Shariati, 2014]. Поэтому *D. salina*, как и ряд других зеленых микроводорослей [Shafik, 2008; Akbarzadeh, Shariati, 2014], не только является перспективным видом для промышленного получения каротиноидов, но и, вероятно, может использоваться в биоремедиации вод, загрязненных металлами. Раз-

витие данного направления требует проведения дальнейших детальных исследований по оценке динамики содержания меди в клетках *Dunaliella salina* и в среде.

ВЫВОДЫ

1. Скорость роста *Dunaliella salina* является наиболее чувствительным параметром по отношению к действию ионов меди. В условиях представленного эксперимента, при начальной плотности культуры *D. salina* $10 \cdot 10^3$ кл./мл, нижний порог внесенного иона меди, оказывающий влияние на рост водорослей, составлял 150 мкг/л. При концентрации Cu^{2+} 750 мкг/л отмечена полная остановка процесса деления клеток без изменения численности культуры и с сохранением высокой подвижности водорослей. При концентрации меди 1500 мкг/л и выше наблюдалось прогрессирующее снижение численности водорослей с последующей гибелью культуры, при этом скорость элиминации клеток повышалась с увеличением исходной концентрации внесенного поллютанта.

2. Токсическое действие меди сказывалось на конечной плотности культур в стационарной фазе роста: численность клеток *D. salina* снижалась с повышением содержания меди в культуральной среде от 150 до 3750 мкг/л.

3. Показана высокая функциональная устойчивость фотосинтетического аппарата *D. salina* к действию ионов меди в концентрации от 0 до 750 мкг/л. При содержании Cu^{2+} выше 750 мкг/л снижение значений флуоресцентных параметров F_v/F_m , NPQ и rETR, свидетельствующее о нарушении работы фотосинтетического аппарата, сопровождалось остановкой деления клеток и последующей гибелью водорослей. Флуоресцентные параметры F_v/F_m , NPQ и rETR могут быть использованы как показатели летального воздействия меди на *Dunaliella salina*.

4. При концентрации меди 750 мкг/л и выше отмечено: укрупнение клеток *D. salina*, обусловленное торможением и остановкой деления клеток при продолжающемся фотосинтезе; увеличение количества клеток шаровидной формы, деформация и перфорация плазмалеммы, преобладание деформированных клеток неправильной формы; двукратное снижение внутриклеточного содержания

хлорофилла *a* и удельного выхода флуоресценции на хлорофилл *a* (мкг/л).

Авторы выражают глубокую признательность ведущему инженеру отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ Алатарцевой О. С. за предоставленную культуру *Dunaliella salina*.

Работа выполнена в рамках тем государственного задания Федерального исследовательского центра “Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН” № 121041400077-1 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и № 121030300149-0 “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса”.

ЛИТЕРАТУРА

- Барабашин Т. О., Кораблина И. В., Павленко Л. Ф., Скрыпник Г. В., Богачев А. Н., Белоусов В. Н. Содержание токсикантов в глубоководном и прибрежных районах Черного моря у Крымского полуострова в весенне-осенний период 2019 года // Тр. ВНИРО. 2020. Т. 181. С. 187–205.
- Брянцева Ю. В., Лях А. М., Сергеева А. В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря. Севастополь: НАН Украины. Институт биологии южных морей, 2005. 25 с.
- Котелевцев С. В., Садчиков А. П., Маторин Д. Н. Экологическая токсикология и биотестирование водных экосистем. М.: Научно-издательский центр ИНФРА-М, 2015. 252 с.
- Пасынков А. А., Соцкова Л. М., Чабан В. И. Экологические проблемы сохранения и использования бальнеологических ресурсов соленых озер // Уч. зап. Крымского федерал. ун-та им. В. И. Вернадского. География. Геология. 2014. Т. 27, № 2. С. 97–117.
- Погосян С. И., Гальчук С. В., Казимирко Ю. В., Конюхов И. В., Рубин А. Б. Применение флуориметра “МЕГА-25” для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. 2009. № 6. С. 34–40.
- Сеничева М. И. Зеленая водоросль *Dunaliella salina* в природных условиях // Экология моря. 2005. Т. 67. С. 61–62.
- Финенко З. З., Ланская Л. А. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды // Экологическая физиология морских планктонных водорослей / под ред. В. Н. Грезе. Киев: Наукова думка, 1971. С. 22–51.
- Финенко З. З., Стельмах Л. В., Галатанова О. А., Бабич И. И., Харчук И. А. Культивирование водорослей в лабораторных условиях // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / под ред. Ю. Н. Токарева и др. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. С. 186–201.
- Чабан В. В. Влияние техногенных изменений геологической среды на экологическое состояние Сакского соленого озера // J. Geol. Geogr. and Geoeol. 2013. Т. 21, № 3 (2). С. 17–17.
- Чабан В. В., Станкевич Д. А. Оценка влияния хозяйственной деятельности на экологическую безопасность Сакского озера // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность-2017. 2017. С. 1482–1484.
- Юнев О. А., Берсенева Г. П. Флуориметрический метод определения концентрации хлорофилла *a* и феофитина *a* в фитопланктоне // Гидробиол. журн. 1986. Т. 22, № 2. С. 89–95.
- Akbarzadeh N., Shariati M. Aluminum remediation from medium by *Dunaliella* // Ecol. Eng. 2014. Vol. 67. P. 76–79.
- Anufrieva E., Kolesnikova E., Revkova T., Latushkin A., Shadrin N. Human-Induced Sharp Salinity Changes in the World's Largest Hypersaline Lagoon Bay Sivash (Crimea) and Their Effects on the Ecosystem // Water. 2022. Vol. 14. P. 403–420.
- Barreto D. M., Lombardi A. T. Environmentally relevant concentrations of TiO₂ nanoparticles affected cell viability and photosynthetic yield in the Chlorophyceae *Scenedesmus bijugus* // Water. Air. Soil. Pollut. 2016. Vol. 227. P. 1–11.
- Ben-Amotz A., Avron M. On the factors which determine massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* // Plant Physiol. 1983. Vol. 72, N 3. P. 593–597.
- Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters // Aquat. Toxicol. 1995. Vol. 31, N4. P. 165–174.
- Davies A. G. The growth kinetics of *Isochrysis galbana* in cultures containing sublethal concentrations of mercuric chloride // J. Mar. Biolog. Assoc. UK. 1974. Vol. 54, N 1. P. 157–169.
- Echeveste P., Croot P., von Dassow P. Differences in the sensitivity to Cu and ligand production of coastal vs offshore strains of *Emiliania huxleyi* // Sci. Total Environ. 2018. Vol. 625. P. 1673–1680.
- Esperanza M., Cid A., Herrero C., Rioboo C. Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints // Aquat. Toxicol. 2015. Vol. 165. P. 210–221.
- Ferradás Y., López M., Rey M., González M. V. Programmed cell death in kiwifruit stigmatic arms and its relationship to the effective pollination period and the progamic phase // Ann. Bot. 2014. Vol. 114. P. 35–45.
- Fisher N., Jones G., Nelson D. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve) 1 // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1981. Vol. 51. P. 37–56.
- Flynn K. J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton // J. Plankton Res. 2001. Vol. 23, N 9. P. 977–997.
- Folgar S., Torres E., Pérez-Rama M., Cid A., Herrero C., Abalde J. *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium // J. Hazard. Mater. 2009. Vol. 165, N1–3. P. 486–493.
- Franklin N., Stauber J., Apte S., Lim R. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper

- in microalgal bioassays // *Environ. Toxicol. Chem.: An Inte. J.* 2002. Vol. 21. P. 742–751.
- Gao G., Liu Y., Li X., Feng Z., Xu Z., Wu H., Xu J. Expected CO₂-induced ocean acidification modulates copper toxicity in the green tide alga *Ulva prolifera* // *Envir. Exper. Bot.* 2017. Vol. 135. P. 63–72.
- Giri B. R., Roy B., Babu S. P. S. Evidence of apoptosis in *Raillietina echinobothrida* induced by methanolic extracts of three traditional medicinal plants of Northeast India // *Exp. Parasitol.* 2013. Vol. 134, N4. P. 466–473.
- Ingle A. P., Duran N., Rai M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. P. 1001–1009.
- Jeffrey S. W., Humphrey G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 1975. Vol. 167. P. 191–194.
- Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Wright S. W. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. Monographs on Oceanographic Methodology / Eds. S. W. Wright et al. Paris: UNESCO Publishing, 1997. 661 p.
- Jiménez C., Capasso J. M., Edelstein C. L., Rivard C. J., Lucia S., Breusegem S., Berl T., Segovia M. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase // *J. Exp. Bot.* 2009. Vol. 60, N3. P. 815–828.
- Joonas E., Aruoja V., Olli K., Kahru A. Environmental safety data on CuO and TiO₂ nanoparticles for multiple algal species in natural water: Filling the data gaps for risk assessment // *Sci. Total. Environ.* 2019. Vol. 647. P. 973–980.
- Kaushik G., Raza K. Potential of novel *Dunaliella salina* from sambhar salt lake, India, for bioremediation of hexavalent chromium from aqueous effluents: An optimized green approach // *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 2019. Vol. 180. P. 430–438.
- Kotova I. K., Kotov S. R., Kayukova E. P., Mordukhai-Boltovskaya L. V. The impact of environmental and anthropogenic factors on composition of peloids in modern salt lakes // *Vestn. Spbsu. Earth Sci.* 2017. Vol. 62. P. 172–191.
- Kotova I. R., Kayukova E. P., Mordukhai-Boltovskaya L. V., Platonova H. B., Kotov S. R. Pattern of the composition formation of oozy mud from the Dead Sea and salt lakes of Crimea // *Vestn. Spbsu. Earth Sci.* 2015. Vol. 2. P. 85–106.
- Kumar K. S., Dahms H. U., Lee J. S., Kim H. C., Lee W. C., Shin K. H. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. Vol. 104. P. 51–71.
- Leal P. P., Hurd C. L., Sander S. G., Armstrong E., Role-da M. Copper ecotoxicology of marine algae: a methodological appraisal // *Chem. Ecol.* 2016. Vol. 32. P. 786–800.
- Macedo R. S., Lombardi A. T., Omachi C. Y., Rörig L. R. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum* // *Toxicol. In. Vitro* 2008. Vol. 22. P. 716–722.
- Miazek K., Iwanek W., Remacle C., Richel A., Goffin D. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. P. 23929–23969.
- Mofeed J. Biosorption of heavy metals from aqueous industrial effluent by non-living biomass of two marine green algae *Ulva lactuca* and *Dunaliella salina* as Biosorbents // *Catrina: The Int. J. Environ. Sci.* 2017. Vol. 16, N 1. P. 43–52.
- Nikookar K., Moradshahi A., Hosseini L. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity // *Biomol. Eng.* 2005. Vol. 22. P. 141–146.
- Parsy A., Guyoneaud R., Lot M. C., Baldoni-Andrey P., Périé F., Sambusiti C. Impact of salinities, metals and organic compounds found in saline oil & gas produced water on microalgae and cyanobacteria // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. Vol. 234. P. 113351.
- Pascual G., Sano D., Sakamaki T., Nishimura O. Effects of chemical interaction of nutrients and EDTA on metals toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. Vol. 203. P. 110966.
- Perales-Vela H. V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Cañizares-Villanueva R. O. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) // *Chemosphere.* 2007. Vol. 67. P. 2274–2281.
- Quigg A., Reinfelder J. R., Fisher N. S. Copper uptake kinetics in diverse marine phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 2006. Vol. 51, N 2. P. 893–899.
- Shadrin N., Mirzoeva N., Kravchenko N., Miroshnichenko O., Tereshchenko N., Anufrieva E. Trace Elements in the Bottom Sediments of the Crimean Saline Lakes. Is It Possible to Explain Their Concentration Variability? // *Water.* 2020. Vol. 12. P. 2364–23798.
- Shafik M. A. Phytoremediation of some heavy metals by *Dunaliella salina* // *Global J. Environ. Res.* 2008. Vol. 2, N 1. P. 1–11.
- Starr R. C., Zeikus J. A. UTEX – The culture collection of algae at the University of Texas at Austin // *J. Phycol.* 1987. Vol. 23. P. 1–47.
- Stauber J. L., Florence T. M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae // *Mar. Biol.* 1987. Vol. 94, N 4. P. 511–519.
- Sunda W. G., Lewis J. A. M. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri* 1 // *Limnol. Oceanogr.* 1978. Vol. 23. P. 870–876.
- Visviki I., Rachlin J. W. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on growth // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1994. Vol. 26. P. 149–153.

Changes in the Growth Rate, Fluorescent and Cytometric Parameters in the Microalgae *Dunaliella Salina* (Teod.) at Different Copper Concentration in the Medium

A. I. AKIMOV, E. S. SOLOMONOVA, N. Yu. SHOMAN, O. A. RYLKOVA

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences
299011, Sevastopol, Nahimov av., 2
E-mail: n-zaichenko@yandex.ru*

The changes in the specific growth rate, fluorescent, cytometric and morphological parameters of the green microalgae *Dunaliella salina* were evaluated when copper ions were added to the culture medium at a concentration of 0–3750 µg/L. The growth rate is the most sensitive parameter of algae to the action of copper, its decrease was noted at the concentration of the pollutant above 150 µg/L, the death of the culture – at 1500 µg/L and above. The number of algae cells in the stationary phase of growth naturally decreases with an increase in the copper content in the medium from 150 to 3750 µg/L. It was found that copper does not affect the efficiency of the photosynthetic apparatus of algae at concentrations that do not lead to the death of the culture. A decrease in the values of the maximum quantum yield of fluorescence, non-photochemical quenching of fluorescence and the maximum relative electronic transport rate below the optimal values can be used as an indicator of the lethal effect of the studied pollutant on *D. salina*. At a copper concentration of 750 µg/L and above, it was noted: an increase in cell volume, an increase in the number of spherical cells, deformation and perforation of the plasmalemma, the predominance of deformed cells of irregular shape, a twofold decrease in the intracellular content of chlorophyll *a* and the specific yield of fluorescence per chlorophyll *a*.

Key words: *Dunaliella salina*, microalgae, copper ions, cytotoxicity, flow cytometry, specific growth rate, FFR-fluorimetry.