

Петров А.Н., Неврова Е.Л.

# Оценка токсического воздействия ионов меди на показатели состояния бентосной диатомовой водоросли *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861 в эксперименте

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН"», 299011, Севастополь, Российская Федерация

**Введение.** Загрязнение морских прибрежных акваторий обуславливает актуальность экомониторинга на основе биотестирования с использованием микроводорослей с различной видоспецифической устойчивостью к действию поллютантов, что расширяет их применение в качестве биоиндикаторов.

**Цель работы** – определение пороговой концентрации ионов меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) для выживания и прироста численности клеток бентосной диатомовой водоросли *Actinocyclus subtilis* Ralfs 1861 под воздействием широкого диапазона концентрации токсиканта в ходе 10-суточных экспериментов.

**Материал и методы.** Изучена реакция клоновой культуры *A. subtilis* на воздействие возрастающих концентраций сульфата меди (от 16 до 1024 мкг/л в пересчёте на ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ). В соответствии с разработанным протоколом, оценены следующие показатели: абсолютная численность и доля (%) живых клеток в тест-культуре, а также удельный прирост численности клеток при разных концентрациях токсиканта. Подсчет живых и мертвых клеток проведен по микрофотографиям для 12–15 случайных полей зрения под световым микроскопом Nikon Eclipse.

**Результаты.** В контроле и при концентрации ионов меди 16 мкг/л прирост численности клеток в культуре описывается сигмоидной кривой отклика. В контроле фаза экспоненциального роста приходится на 5–7-е сутки, а при концентрации 16 мкг/л – на 3–5-е сутки. Определена пороговая концентрация ионов меди (32 мкг/л) для выживания *A. subtilis*, что в 3–7 раз ниже, чем для других видов бентосных диатомовых. При концентрации 32 мкг/л на кривой численности отсутствуют фазы ускорения и экспоненциального роста, а доля живых клеток снижается до 80% от контроля уже на 3-и сутки и до 39% – к 10-м суткам. При концентрациях  $\text{Cu}^{2+}$  64 мкг/л и выше наблюдается угнетение и гибель культуры уже в 1–3-и сутки. В период 1–5-х суток отмечен положительный удельный прирост культуры *A. subtilis* при концентрации 16 и 32 мкг/л, при концентрации 64 мкг/л и выше наблюдается отмирание культуры. Для периода 5–10-х суток получены отрицательные значения удельного прироста культуры при всех концентрациях токсиканта.

**Ограничения исследования.** По результатам 10-суточных экспериментов с культурой морской бентосной диатомовой *A. subtilis* изучено влияние 8 концентраций сульфата меди. Для каждой концентрации учитывалось по 3 повторности, всего выполнено более 1350 измерений, что представляет достаточную выборку для статистически надежного определения видоспецифичных пороговых значений токсичности ионов меди.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют рекомендовать *A. subtilis* в качестве нового высокочувствительного объекта для токсикологических экспериментов, а также при экологическом мониторинге акваторий, подверженных техногенному загрязнению.

**Ключевые слова:** биотестирование; микроводоросли; клоновая культура; сульфат меди; пороговая концентрация; численность клеток; Чёрное море

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов, так как все эксперименты проводились на массовых одноклеточных нетоксичных водорослях, что не нарушает запреты, связанные с ущербом для экологической среды, жизненного пространства биологических сообществ, а также не приводит к необратимым изменениям в биологической (генетической) природе и здоровье человека.

**Для цитирования:** Петров А.Н., Неврова Е.Л. Оценка токсического воздействия ионов меди на показатели состояния бентосной диатомовой водоросли *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861 в эксперименте. *Токсикологический вестник*. 2023; 31(5): 313–328. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-5-313-328>

**Для корреспонденции:** Петров Алексей Николаевич, кандидат биол. наук, вед. науч. сотр., зав. отделом Экологии бентоса ФГБУН «ФИЦ "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН"», 299011, Севастополь, Российская Федерация. E-mail: alexpet-14@mail.ru

**Участие авторов.** Все соавторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность С.А. Трофимову и Ю.И. Литвину за помощь при содержании клоновых культур и проведение экспериментов, а также В.Н. Лишаеву за микрофотографирование на СЭМ Hitachi SU3500.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа проведена в отделе Экологии бентоса ФГБУН «ФИЦ "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН"» в рамках Государственного задания по теме № 121030100028-02.

Поступила в редакцию: 09 июня 2023 / Принята к печати: 19 октября 2023 / Опубликовано: 30 октября 2023

Alexey N. Petrov, Elena L. Nevrova

## Evaluation the toxic effect of copper ions on the condition indices of benthic diatom *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861 in the experiment

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, 299011, Sevastopol, Russian Federation

**Introduction.** Pollution of marine coastal areas lead to the relevance of environmental monitoring including application of biotesting methods based on- the cultures of unicellular algae. Microalgae have different species-specific resistance to pollutants that expands application of different species as bioindicators of marine pollution.

*The aim of the study* was to determine the threshold concentration of copper ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ) for the survival and increase in the cells number of benthic diatom *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861 (Bacillariophyta) under the wide range of toxicant concentrations during 10-day toxicological experiments.

**Material and methods.** The response of strain culture of the benthic diatom *A. subtilis* to various concentrations of copper sulfate (ranged from 16 to 1024  $\mu\text{g/l}$  in terms of  $\text{Cu}^{2+}$  ions) was studied. In accordance with the previously developed protocol, the following indices were evaluated: alterations in the absolute number and proportion (%) of alive cells in the test-culture, as well as the specific growth rate in the number of *A. subtilis* cells at different concentrations of toxicant. Counting of alive and dead cells was carried out by micrographs taken for 12–15 random viewing fields under Nikon Eclipse inverted light microscope.

**Results.** It was found that in the control and at concentration of copper ions 16  $\mu\text{g/l}$ , the increase in the absolute number of cells in culture is described by sigmoid response curve. At the control the exponential growth phase occurs on days 5–7 and at concentration of 16  $\mu\text{g/l}$  on days 3–5 of the experiment. The threshold concentration of copper ions (32  $\mu\text{g/l}$ ) which is critical for the survival of *A. subtilis* was determined, which is 3–7 times lower than threshold level for other benthic diatom species. At concentration of 32  $\mu\text{g/l}$ , the phases of acceleration and exponential growth on the abundance curve are absent. The proportion of living cells in the culture decreases to 80% of the control level on day 3 and to 39% by day 10. At  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of 64  $\mu\text{g/l}$  and above, sharp inhibition and death of culture is observed as early as 1–3 days. A positive specific growth rate of *A. subtilis* culture was revealed in the period of 1–5 days at copper concentration of 16 and 32  $\mu\text{g/l}$ , and at concentration of 64  $\mu\text{g/l}$  and higher the culture dies off. Negative values of the specific growth rate for all concentrations of the toxicant within the period of 5–10 days were obtained.

**Limitations.** By the results of 10-day experiments the effect of 8 concentrations of copper sulfate on the culture of marine benthic diatom *A. subtilis* was studied. Three replicates in each concentration and exposure time were measured (1350 measurements in total), which is sufficient sampling for statistically reliable determination of the threshold values of copper ion toxicity for given test object.

**Conclusion.** Considering the results obtained, the benthic diatom *A. subtilis* is highly sensitive to copper ions impact and can be recommended as new test-object for toxicology, as well as for application in monitoring of marine water areas subject to technogenic pollution.

**Keywords:** biotesting; microalgae; clonal strain; copper; threshold concentration; cell number; Black Sea

**Compliance with ethical standards.** The study does not require the decision of biomedical ethics committee or other documents, since all experiments were carried out on common unicellular non-toxic algae, which does not violate any prohibitions associated with damage to the ecological environment, the living space of bio-communities, and also does not lead to irreversible changes in the biological (genetic) nature and human health.

**For citation:** Petrov A.N., Nevrova E.L. Evaluation the toxic effect of copper ions on the condition indices of benthic diatom *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861 in the experiment. *Toksikologicheskii vestnik / Toxicological Review*. 2023; 31(5): 313-328. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-5-313-328> (In Russian)

**For correspondence:** Alexey N. Petrov, leading researcher, Head of Benthos Ecology Dept., FRC "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS", Sevastopol 335011, Russia. E-mail: alexpet-14@mail.ru

**Information about the authors:**

Petrov A.N., <https://orcid.org/0000-0002-0137-486X> Researcher ID: F-7084-2016

Scopus Author ID: 8973404400

Nevrova E.L., <https://orcid.org/0000-0001-9963-4967> Researcher ID: D-8432-2016

Scopus Author ID: 35277386100

**Contribution of the authors.** All authors confirm that their authorship complies with the international ICMJE criteria (all authors made a significant contribution to the development of concept, research and preparation of the article, read and approved its final version before publication).

**Gratitude.** The authors express their gratitude to S.A. Trofimov and Yu.I. Litvin for their help in maintaining clone cultures and conducting experiments, as well as to V.N. Lishaev for microphotography on the Hitachi SU3500 SEM.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**Acknowledgements.** This study was carried out as a part of the State Assignment No. 121030100028-02 of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS in Benthos Ecology Dept.

Received: June 9, 2023 / Accepted: October 19, 2023 / Published: October 30, 2023

## Введение

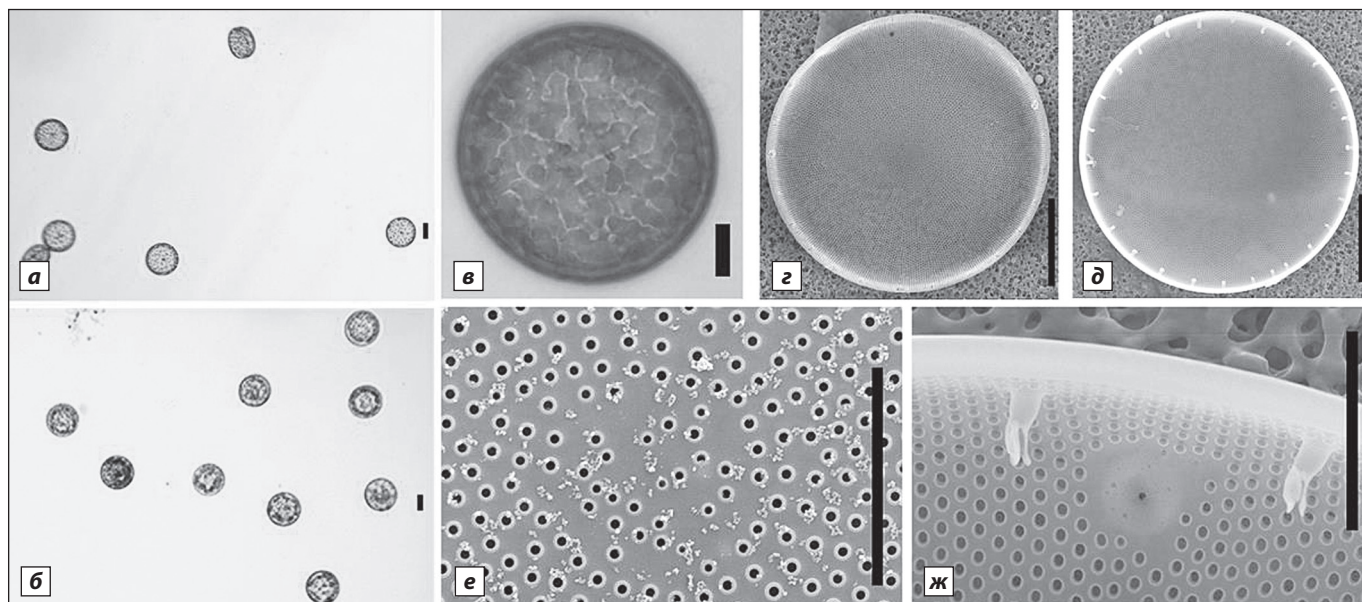
В условиях усиления антропогенного воздействия на прибрежные зоны моря возрастает актуальность проведения экологического мониторинга морской среды, в том числе с применением методов биотестирования на основе культур одноклеточных водорослей. Микроводоросли характеризуются различной видоспецифической устойчивостью ко многим поллютантам, что позволяет использовать их в качестве биоиндикаторов загрязнения морской среды (водной толщи и донных отложений) [1, 2].

Одной из групп наиболее опасных поллютантов являются тяжелые металлы и, в частности — медь, соединения которой накапливаются в донных отложениях, особенно в техногенно загрязненных акваториях [3–7]. Содержание ионов меди в морских загрязненных акваториях вблизи портов и промзон может достигать 50–100 мкг/л [8], в том числе за счет поступления из биоцидных красок, покрывающих гидротехнические объекты и днища судов [9, 10]. В илисто-песчаных грунтах у черноморского побережья Крыма содержание меди может составлять 8–11 мкг/г [11], а в закрытых и полужакрытых техногенно загрязненных бухтах — до 22–37 мкг/г [12, 13]. Столь высокие уровни аккумуляции ионов меди несут потенциальные угрозы для гидробионтов, вовлеченных в трофические цепи прибрежной морской экосистемы, в которых бентосные диатомовые водоросли являются ключевым первичным звеном.

В микроколичествах медь входит в состав активных центров многих ферментов и играет важную роль в физиологии клеток микроводорослей [6, 14–19], но в повышенных концентрациях ионы меди остротоксичны для большинства гидробионтов [14, 16, 20, 21]. Значимость соединений меди в метаболизме гидробионтов и в биогеохимических циклах в морской среде определили выбор сульфата меди в качестве тестируемого модельного токсиканта. В большинстве экспериментов по оценке воздействия соединений меди на морские микроводоросли используются планктонные формы [2, 9, 17, 22, 23], в то время как бентосные микроводоросли более объективно способны реагировать на загрязнение среды в силу тесной приуроченности к субстрату и малой подвижности. Уровень содержания меди в донных отложениях определяет пространственное распределение, структуру таксоцены и состояние клеток бентосных диатомовых [10, 12]. Указанные особенности определяют актуальность расширения исследований бентосных *Bacillariophyta* для поиска видов, удобных к применению в качестве биоиндикаторов при оценке загрязнения морской среды с учетом видоспецифичности пороговой резистентности на воздействии  $\text{Cu}^{2+}$  [2, 8, 16, 23–26].

Тестируемые виды микроводорослей должны быть эврибионтными, широко представленными в прибрежной экосистеме, легко культивироваться на стандартных средах, обеспечивая высокую скорость вегетативного размножения в культуре.





**Рис. 1.** *A. subtilis*, использованный в эксперименте: а – культура живых клеток (СМ×100); б – погибшие клетки (СМ×100); в – живая клетка с хлоропластами (СМ ×630); з – створка, вид снаружи (СЭМ×1300); д – створка, вид изнутри (СЭМ×1300); е – локулярные ареолы центра, створка снаружи (СЭМ×10000); ж – лабиатные выросты и псевдонодулюс, створка изнутри (СЭМ×7000). Размерная шкала: а–д – 20 мкм; е, ж – 5 мкм.

**Fig. 1.** *A. subtilis*, used in experiment: а – alive cells (LM ×100); б – dead cells (LM×100); в – alive cell with chloroplasts (LM ×630); з – valve external view (SEM ×1300); д – valve inside (SEM ×1300); е – areolae, external view (СЭМ×10000); ж – labiate process and pseudonodulus, internal view (СЭМ×7000). Scale bar: а–д – 20 мкм; е, ж – 5 мкм.

Выбор *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861 в качестве тест-объекта выполнен с учетом вышеуказанных критериев. Данный вид – крупноклеточный, что облегчает подсчет численности клеток и оценку их прижизненного состояния при фотофиксации.

**Цель работы** – изучить динамику прироста численности клоновой культуры бентосной диатомовой водоросли *A. subtilis* под воздействием широкого диапазона концентрации токсиканта ( $\text{Cu}^{2+}$ ), определить пороговую концентрацию ионов меди для выживания клеток, оценить пригодность данного вида в качестве перспективного тест-объекта для задач морской экотоксикологии.

## Материал и методы

В экспериментах использована клоновая культура бентосной диатомовой водоросли *Actinocyclus subtilis* (W.Gregory) Ralfs 1861, выделенная из фитоперифитона скалистого субстрата на глубине 0,5 м в бухте Севастопольская (N 44°28'25", E 33°37'58", Крым, Чёрное море). Клон создан путем выделения одной клетки под бинокуляр (увеличение ×40) и выращивания накопительной культуры на протяжении 8 мес при температуре  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  и естественном освещении на среде Гольдберг, оптимизированной для морских донных диатомовых [27, 28]. В процес-

се выращивания клоновая культура пересевалась каждые 3 нед. Клетки данного вида микроводоросли одиночные, створки круглые, хлоропласт пластинчатый, равномерно заполняет весь объем клетки (рис. 1, а–в). Диаметр клеток 60–70 мкм, ареол 18–20 в 10 мкм, у края створки один оперкулированный ложный узелок (рис. 1, е, ж).

В соответствии с протоколом эксперимента [29], в каждую чашку Петри вносили определенное количество питательной среды, стокового раствора токсиканта  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 1 мл инокулята клоновой культуры, содержащего в среднем  $6840 \pm 350$  клеток *A. subtilis*, доводя общий объем жидкости до 30 мл. Продолжительность каждой серии экспериментов – 10 сут. Для предотвращения испарения раствора в ходе экспозиции чашки Петри герметизировали пленкой Parafilm®. Оценивали резистентность *A. subtilis* на воздействие следующих концентраций ионов  $\text{Cu}^{2+}$ : 16, 32, 64, 128, 256, 320, 512 и 1024 мкг/л. Каждый вариант концентрации токсиканта тестировали в 3-х повторностях. Контрольная оценка состояния культуры клеток проводилась через 1, 3, 5, 7 и 10 сут.

Фотографирование и идентификацию живых и мертвых клеток осуществляли под инвертированным световым микроскопом (СМ) Nikon Eclipse с объективом Plan Fluor ×60 OFN25

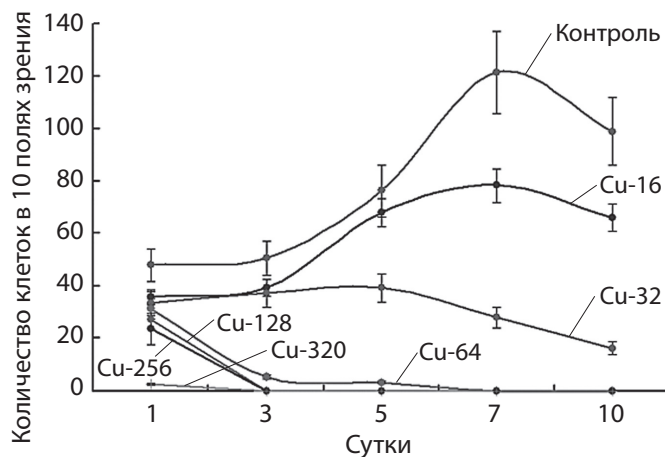
и камерой Infinity3-6URC (Япония), а также под сканирующим электронным микроскопом (СЭМ) Hitachi SU3500 (Япония). Долю (%) живых и мертвых клеток в каждый контрольный период определяли по усредненным данным, полученным по фотографиям 12–15 случайных полей зрения. Контроль прижизненного состояния клеток оценивали по целостности панциря, неизменности структуры, цвета и расположения хлоропластов в объеме клетки, полноте расхождения клеток после вегетативного деления. Клетку определяли как мертвую в случае раскрытия створок панциря, лизиса клеточного содержимого и/или резкого потемнения хлоропластов (рис. 1, 2). Ранее [28], для нескольких видов бентосных диатомовых была подтверждена статистическая надежность ( $p < 0,05$ ) результатов оценки равномерности распределения клеток по дну экспериментальных сосудов и количественного развития микроводорослей на основе анализа ограниченного числа (64–72) полей зрения. Данные результаты позволяют рассматривать все повторности (случайные выборки клеток) как единую совокупность, что является важным условием для статистически корректного сравнения численности клеток при разных концентрациях токсиканта.

Для сравнительной оценки состояния культуры диатомовых при разных концентрациях ионов меди рассчитывали изменение абсолютной численности живых клеток на разных этапах эксперимента и удельную скорость прироста численности клеток (кл/сут) [8, 24]. Скорость прироста численности клеток ( $v$ ) определяли по формуле:

$$v = \frac{\ln N_{(t+\Delta t)} - \ln N_t}{\Delta t \cdot \ln 2},$$

где  $N_t$  – средняя численность клеток в культуре в момент времени  $t$  (первые сутки эксперимента);  $N_{(t+\Delta t)}$  – средняя численность клеток в культуре в момент времени  $t+\Delta t$  (3, 5, 7 и 10-е сутки);  $\Delta t$  – период экспозиции (сутки).

Статистическая обработка результатов экспериментов выполнена на основе стандартных алгоритмов параметрического и рангового анализов с помощью компьютерной программы MS Excel. Достоверность различий показателей состояния культуры при разных концентрациях меди и периодах экспозиции оценивалась для уровня значимости  $p = 0,05$ . Значения показателей количественного развития культуры по выборкам представлены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой средней ( $SE$ ).



**Рис. 2.** Изменение в ходе эксперимента суммарной численности (среднее значение  $\pm SE$ ) живых клеток *A. subtilis* в 10 случайных полях просмотра при разных концентрациях токсиканта.

**Fig. 2.** Change in the total number (mean value  $\pm SE$ ) of alive cells of *A. subtilis* in 10 random viewing fields at different concentrations of toxicant.

## Результаты

По результатам расчета изменений абсолютной численности живых клеток *A. subtilis* установлено, что в контроле и при минимальных концентрациях ионов  $\text{Cu}^{2+}$  16 мкг/л характер роста численности культуры клеток соответствует сигмоидной кривой отклика тест-объекта в токсикологическом опыте (см. рис. 2).

В период 1–7-х суток абсолютная численность клеток возрастает в 2–2,5 раза от исходных значений, достигая максимума. В последующий период (7–10-е сутки) из-за негативного влияния токсиканта, а также накопления метаболитов и старения культуры, численность клеток снижается от максимума на 12–20 %. На 7-е сутки эксперимента средняя численность при концентрации 16 мкг/л была достоверно ниже по сравнению с контролем за счет менее интенсивного прироста клеток на экспоненциальной фазе роста. При концентрации ионов меди 32 мкг/л рост численности культуры *A. subtilis* в период с 1-й по 5-е сутки не отмечен, в последующий период численность живых клеток понижается и на 10-е сутки составляет не более 20 % от контроля. При концентрациях 64 мкг/л и выше численность живых клеток снижается почти до нуля уже на 3-и сутки (см. рис. 2). Данные результаты показывают, что концентрация ионов меди в диапазоне 32–64 мкг/л может считаться критической для выживания тестируемого вида диатомовой водоросли.

При подсчёте доли живых клеток *A. subtilis* в культуре на разных этапах эксперимента уста-

**Изменение доли живых клеток  
(среднее ± SE, %) в культуре *A. subtilis*  
при разных концентрациях токсиканта**  
Change in the share of alive cells (mean ± SE, %) in strain  
*A. subtilis* at different concentrations of toxicant

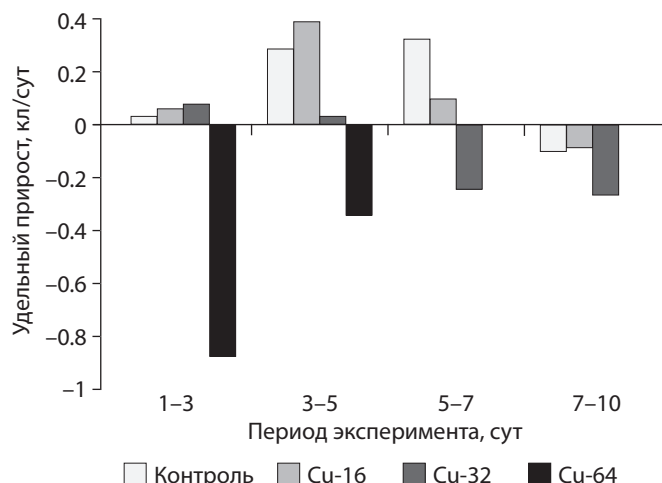
Концентрация токсиканта Cu <sup>2+</sup> , мкг/л	Периоды экспозиции, сутки				
	1-е	3-и	5-е	7-е	10-е
Контроль	95 ± 2	95 ± 1	93 ± 1	95 ± 2	94 ± 1
16	93 ± 1	91 ± 3	91 ± 2	93 ± 1	83 ± 2
32	90 ± 1	80 ± 2	77 ± 4	53 ± 8	39 ± 3
64	81 ± 2	13 ± 2	8 ± 1	0	0
128	79 ± 2	0	0	0	0
256	71 ± 12	0	0	0	0
320	8 ± 1	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0

новлено, что в контроле и при минимальных концентрациях ионов меди (16 мкг/л) доля клеток в культуре практически не меняется в период с 1-х по 7-е сутки, сохраняясь на уровне 93–95 %, и только к 10-м суткам снижается до 83 % (таблица).

Начиная с концентрации ионов меди 32 мкг/л и выше, различия в средних значениях доли живых клеток между контролем и тестовыми чашками становятся статистически высоко значимыми ( $p < 0,01–0,001$ ) уже после 3 сут экспозиции. При концентрации 64 мкг/л отмечалось усиление интенсивности отмирания клеток в культуре, а к 7–10-м суткам доля живых клеток снижалась до нуля (см. таблицу). Данные результаты также подтверждают, что концентрацию токсиканта 64 мкг/л можно считать критической для выживания и развития данного вида диатомовых.

В качестве еще одного отклика клоновой культуры *A. subtilis* на воздействие ионов меди исследовано изменение среднесуточного числа клеточных делений (рис. 3).

В период с 1-х по 3-и сутки в контроле и при концентрациях Cu<sup>2+</sup> 16–32 мкг/л культура характеризовалась незначительным положительным удельным приростом численности клеток, что может соответствовать лаг-фазе и фазе ускорения роста. При пороговой концентрации 64 мкг/л культура начинала активно отмирать уже с первых суток – прирост становился отрицательным. В период с 3-х до 7-х суток экспозиции интенсивный удельный прирост, отражающий экспо-



**Рис. 3.** Изменение удельного прироста численности клеток *A. subtilis* ( $v$ , кл/сут) при различных концентрациях ионов меди в разные периоды эксперимента.

**Fig. 3.** Change of the specific growth rate in the number of *A. subtilis* cells ( $v$ , cells/day) at various concentrations of copper ions in different stages of the experiment.

нениальную фазу роста культуры, наблюдался только для контроля (0,30–0,33 делений/сут) и концентрации меди 16 мкг/л (0,11–0,39 делений/сут). При концентрации 32 мкг/л прирост уже на 5-е сутки снижался до 0,04 делений/сут, а в период с 5-х до 7-х суток становился отрицательным (см. рис. 3). В период с 7-х до 10-х суток для всех тестируемых концентраций токсиканта, включая контроль, получены отрицательные значения удельного прироста численности клеток *A. subtilis* (культура активно отмирает), что могло быть вызвано не только воздействием токсиканта, но также истощением в экспериментальных сосудах питательных веществ и накоплением метаболитов, ингибирующих рост культуры.

### Обсуждение

По результатам проведенных экспериментов выявлено, что по сравнению с другими видами бентосных диатомовых (*Bacillariophyta*), культура *A. subtilis* характеризуется более низкой устойчивостью к воздействию ионов меди. Так, у *Pleurosigma aestuarii* W. Smith 1853 доля живых клеток в культуре не менялась на протяжении 10-суточного эксперимента в диапазоне концентраций ионов меди от 16 до 256 мкг/л, но уже при 320 мкг/л доля живых клеток на 3–5-е сутки резко снижалась до 23–10%, что определяет данную концентрацию как пороговую для выживания данного вида [26]. Для *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 концентрация ионов Cu<sup>2+</sup> 128 мкг/л является критичной для выживания и размножения клоновой культуры [30].



Для видов из других отделов микроводорослей, в частности для *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew и R. Ross (1965), наблюдалось выраженное угнетение роста и снижение содержания в клетках фотосинтетических пигментов, по сравнению с контролем, при концентрациях ионов меди 100 мкг/л [8]. При воздействии хлорида меди на *Scenedesmus quadricaudata* (Turpin) Brebisson 1835 установлено снижение общей численности и доли живых клеток при концентрации меди 10–100 мкг/л, когда доля активно размножающихся клеток не превышала 10 %, а остальная часть культуры находилась в неактивной стадии [24].

Угнетение прироста численности и физиологического состояния клеток диатомовой *A. subtilis* при сравнительно невысоких концентрациях ионов меди может быть связано и с так называемым «парадоксальным эффектом» [18], когда клетки микроводорослей накапливают более значительные количества токсиканта при его низких концентрациях в среде, чем при высоких. Замедление процессов деления клеток при низких концентрациях токсиканта может служить механизмом, обеспечивающим поддержание целостности популяции и её способности к длительному существованию в условиях загрязнения. Данный эффект, по-видимому, проявляет видоспецифичные особенности, обусловленные метаболической активностью и эффективностью защитных механизмов клеток разных видов микроводорослей при воздействии меди на фотосинтетический аппарат и процессы синтеза аминокислот, влияющих на рост популяции [2, 17, 19, 24].

**Ограничения исследования.** В ходе 10-суточных экспериментов с клоновой культурой морской бентосной диатомовой *Actinocyclus subtilis* изучено влияние 8 концентраций сульфата меди. Для каждой концентрации измерялось по 3 повторности по 12–15 просмотров в каждой, всего более 1350 измерений, что представляет достаточную выборку для статистически надежного определения пороговых значений токсичности ионов меди на данный тест-объект и видоспецифичного диапазона толерантности.

## Заключение

Результаты 10-суточного тестирования клоновой культуры бентосной диатомовой *A. subtilis* под воздействием ионов меди в диапазоне концентрации от 16 до 1024 мкг/л показали, что при концентрации 16 мкг/л доля живых клеток достоверно снижается по сравнению с контролем только на 10-е сутки экспозиции, а при 32 мкг/л – уже на 3-и сутки. Абсолютная численность клеток в культуре достигает максимума на 7-е сутки и снижается в последующий период за счет как влияния токсиканта, так и накопления в культуральной среде метаболитов. При концентрациях токсиканта 64 мкг/л и выше уже на 3-и сутки опыта отмечается снижение численности живых клеток в культуре до нуля, наряду с резким уменьшением интенсивности удельного прироста.

Впервые установлена критическая для выживания и роста *A. subtilis* концентрация ионов меди 32 мкг/л, которая в 3–7 раз ниже, чем известные пороговые значения для иных видов микроводорослей.

Расширение экспериментов по определению пороговых концентраций меди и иных тяжелых металлов обеспечивает подбор видов диатомовых водорослей с различной резистентностью к токсикантам с целью их последующего использования в качестве новых тест-объектов при токсикологических экспериментах. Полученные результаты позволяют рекомендовать *Actinocyclus subtilis* также в качестве биоиндикатора для оценки влияния поллютантов на состояние сообществ микрофитобентоса при экомониторинге прибрежных морских акваторий.

**Благодарность.** Работа проведена в отделе Экологии бентоса ФИЦ ИнБЮМ по теме государственного задания № 121030100028-02. Авторы выражают благодарность С.А. Трофимову и Ю.И. Литвину за помощь при содержании клоновых культур и проведение экспериментов, а также В.Н. Лишаеву за микрофотографирование на СЭМ Hitachi SU3500.

## ЛИТЕРАТУРА

(пп 3, 4, 6, 7, 9, 13–15, 17, 19–22, 26, 27 см. в References)

- Капков В.И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2003.
- Капков В.И., Шошина Е.В., Беленикина О.А. Использование морских одноклеточных водорослей в биологическом мониторинге. *Вестник МГУ*. 2017; 20(2): 308–15. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2017-20-2-308-315>
- Капков В.И., Беленикина О.А. Исследование устойчивости массовых видов морских водорослей к тяжелым металлам. *Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология*. 2007; 1: 35–8.
- Маркина Ж.В., Айзайчер Н.А. Влияние меди на численность, морфологию клеток и содержание фотосинтетических пигментов микроводоросли *Porphyridium purpureum*. *Морской биологический журнал*. 2019; 4(4): 34–40. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.03>
- Неврова Е.Л., Снигирева А.А., Петров А.Н., Ковалева Г.В. *Руководство по изучению морского микрофитобентоса и его применению для контроля качества среды*. Симферополь: Н.Орианда; 2015. <https://www.researchgate.net/publication/291148289>
- Овсяный Е.И., Романов А.С., Игнатьева О.Г. Распределение тяжелых металлов в поверхностном слое донных осадков Севастопольской бухты (Чёрное море). *Морской экологический журнал*. 2003; 2(2): 85–101.
- Петров А.Н., Неврова Е.Л. Сравнительный анализ структуры таксоцены донных диатомовых (*Bacillariophyta*) в районах с различным уровнем техногенного загрязнения (Чёрное море, Крым). *Морской экологический журнал*. 2004; 3(2): 72–83.

16. Гелашвили Д.Б., ред. *Принципы и методы экологической токсикологии*. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ; 2016.
17. Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Дрозденко Т.В. О некоторых особенностях физиологической гетерогенности популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. в присутствии низких концентраций металлов. *Токсикологический вестник*. 2018; 149(2): 34–43.
18. Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Pheodactylum tricoratum* Bohlin. *Сибирский экологический журнал*. 2011; 1: 99–105.
19. Филенко О.Ф., Марушкина Е.В., Дмитриева А.Г. Оценка воздействия меди на модельную популяцию водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. методом микрокультур. *Гидробиологический журнал*. 2007; 42(6): 53–61.
20. Романова Д.Ю., Петров А.Н., Неврова Е.Л. Действие сульфата меди на рост и морфологию клеток клоновых культур четырёх видов бентосных диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*) Чёрного моря. *Морской биологический журнал*. 2017; 2(3): 53–67. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05>
21. Петров А.Н., Неврова Е.Л. Оценка неоднородности распределения клеток при токсикологических экспериментах с клоновыми культурами бентосных диатомовых водорослей. *Морской биологический журнал*. 2020; 5(2): 76–87. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.07>
22. Неврова Е.Л., Петров А.Н. Динамика роста бентосной диатомовой водоросли *Ardissonea crystallina* (C.Agardh) Grunow, 1880 (*Bacillariophyta*) при воздействии ионов меди. *Морской биологический журнал*. 2022; 7(4): 31–45. <https://doi.org/10.21072/mbj.2022.07.4.03> <https://elibrary.ru/ngurdh>
23. Петров А.Н., Неврова Е.Л. Экспериментальная оценка токсикорезистентности бентосной микроводоросли *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (*Bacillariophyta*) при воздействии ионов меди. *Вестник МГТУ*. 2023; 26(1): 78–87. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2023-26-1-78-87>

## REFERENCES

1. Kapkov V.I. *Algae as biomarkers of marine coastal ecosystem pollution by heavy metals*: Diss. Moscow; 2003. (In Russian)
2. Kapkov V.I., Shoshina E.V., Belenikina O.A. Using the marine unicellular algae in biological monitoring. *Vestnik MGTU*. 2017; 20(2): 308–315. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2017-20-2-308-315> (in Russian)
3. Boyle T.P. The effect of environmental contaminations on aquatic algae. In: *Algae as ecological indicators*. Shubert L.T. (Ed.). London: Academic Press, 1984: 237–56.
4. Ahalya N., Ramachandra T.V., Kanamadi N. Biosorption of heavy metals. *Research Journal of Chemical & Environmental Sciences*. 2003; 7(4): 71–9.
5. Kapkov V.I., Belenikina O.A. Research of stability of mass species of marine algae to heavy metals. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser. 16. Biologiya*. 2007; 1: 35–8. (In Russian)
6. Miazek K., Iwanek W., Remacle C., Richel A., Goffin D. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial products biosynthesis: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(10): 23929–69. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
7. Ali H., Khan E., Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*. 2019; 19: 6730305. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
8. Markina Zh.V., Aizdaicher N.A. 2019. The effect of copper on the abundance, cell morphology and content of photosynthetic pigments in the microalga. *Porphyridium purpureum*. *Marine Biological Journal*. 2019; 4(4): 34–40. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.03> (in Russian)
9. Crespo E., Losano P., Blasco J., Moreno-Garrido I. Effect of copper, irgarol and atrazine on epiphytes attached to artificial devices for coastal ecotoxicology bioassays. *Bull of Environmental Contamination & Toxicology*. 2013; 91(6): 656–700. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1122-4>
10. Nevrova E.L., Snigireva A.A., Petrov A.N., Kovaleva G.V. *Guidelines for quality control of the Black Sea. Microphytobenthos*. Simferopol: Orianda Publ.; 2015. <https://www.researchgate.net/publication/291148289>
11. Ovsyaniy E.I., Romanov A.S., Ignatieva O.G. Distribution of heavy metals in superficial layer of bottom sediments of Sevastopol bay (the Black Sea). *Morskoy ekologicheskij zhurnal*. 2003; 2(2): 85–93. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/710> (in Russian)
12. Petrov A.N., Nevrova E.L. Comparative analysis of taxocene structures of benthic diatoms (*Bacillariophyta*) in regions with different level of technogenic pollution (the Black Sea, Crimea). *Morskoy ekologicheskij zhurnal*. 2004; 3(2): 72–83. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/748> (in Russian)
13. Burgess R.M., Ho K.T., Terletskaia A.V., Milyukin M.V., Demchenko V.Y., Petrov A.N., Bogoslavskaya T.A. и др. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine. *Maine Pollution Bulletin*. 2009; 58 (8): 1103–15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.013>
14. Levy J., Stauber J.L., Jolley D.F. Sensitivity of marine macroalgae to copper: the effect of biotic factors on copper absorption and toxicity. *Science of the total environments*. 2007; 387 (1–3): 141–54. <https://doi.org/10.1016/j.scototenv.2007.07.016>
15. Liu G., Chai X., Shao Y., Hu L., Xie Q., Wu H. Toxicity of copper, lead, and cadmium on the motility of two marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chui*. *J Environ Sci*. 2011; 23(2): 330–5. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60410-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60410-X)
16. Gelashvili D.B. *Principles and methods of environmental toxicology [Principy i metody' e' kologicheskoy toksikologii]*. Nizhniy Novgorod: Nizhegorodskiy gosuniversitet, 2016. (In Russian)
17. Leung P.T.Y., Yi A.X., Ip J.C.H., Mak S.S.T., Leung K.M.Y. Photosynthetic and transcriptional responses of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to the combined effect of temperature stress and copper exposure. *Mar. Pol. Bull.* 2017; 124(2): 938–45. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.038>
18. Ipatova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F., Drozdenko T.V. About some peculiarities of the physiological heterogeneity of the population of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. in the presence of low concentrations of metals. *Toksikologicheskij vestnik*. 2018, 149(2): 34–43. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2018-2-34-43> (in Russian)
19. Maltsev Y.I., Maltseva S.Y., Kulikovskiy M.S. Toxic effect of copper on soil microalgae: experimental data and critical review. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04766-3>
20. Stauber J.L., Florence T.M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*. 1987; 94(4): 511–9.
21. Horvatic J., Peršić V. The effect of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on the growth rate of marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* Bohlin: microplate growth inhibition test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2007; 79: 494–8. <https://doi.org/10.1007/S00128-007-9291-7>
22. Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic toxicology*. 1995; 31(2): 165–74.
23. Markina Zh.V., Ayzdaycher N.A. Evaluation of water quality of Amur Bay of the Sea of Japan based on biotesting using the unicellular alga *Pheodactylum tricoratum* Bohlin. *Sibirskiy ekologicheskij zhurnal*. 2011; 1: 99–105. (In Russian)
24. Filenko O.F., Marushkina E.V., Dmitrieva A.G. Assessment of the copper effect on the model population of the *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. by microculture method. *Gidrobiologicheskij zhurnal*. 2007; 42(6): 53–61. (In Russian)
25. Romanova D.Yu., Petrov A.N., Nevrova E.L. 2017. Copper sulphate impact on growth and cell morphology of clonal strains of four benthic diatom species (*Bacillariophyta*) from the Black Sea. *Mar. Biol. Journal*. 2017; 2(3): 53–67. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05> (in Russian)
26. Nevrova E.L., Petrov A.N. Evaluation of the threshold tolerance of marine benthic diatom *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. In Kütz.) W. Smith 1853 (*Bacillariophyta*) under the copper (II) ions impact. *Vodnye bioresursy i sreda obitaniya*. 2023; 6(1): 73–81. <https://doi.org/10.47921/2619-1024-2023-6-1-73>
27. Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal culturing techniques*. Andersen R.A., ed. Elsevier Academic Press, 2005: 429–538.
28. Petrov A.N., Nevrova E.L. Estimation of cell distribution heterogeneity at toxicological experiments with clonal cultures of benthic diatoms. *Morskoy Biologicheskij Zhurnal = Marine Biological Journal*. 2020; 5(2): 76–87. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.07> (in Russian)
29. Nevrova E.L., Petrov A.N. Growth dynamics of the benthic diatom *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (*Bacillariophyta*) under copper ions effect. *Marine Biological Journal*. 2022; 7(4): 31–45. <https://doi.org/10.21072/mbj.2022.07.4.03> <https://elibrary.ru/ngurdh> (in Russian)
30. Petrov A.N., Nevrova E.L. Experimental evaluation of toxic resistance of benthic microalgae *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (*Bacillariophyta*) under the copper ions impact. *Vestnik MGTU*. 2023; 26(1): 78–87. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2023-26-1-78-87> (in Russian)

## ОБ АВТОРАХ:

**Петров А.Н. (Alexey N. Petrov)** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом экологии бентоса ФГБУН «ФИЦ "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН"», 299011, Севастополь, Российская Федерация. E-mail: alexpet-14@mail.ru

**Неврова Е.Л. (Elena L. Nevrova)** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела экологии бентоса ФГБУН «ФИЦ "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН"», 299011, Севастополь, Российская Федерация. E-mail: el\_nevrova@mail.ru

