
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.261.1:574.24

**ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК, ИНТЕНСИВНОСТЬ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* И СОДЕРЖАНИЕ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ У *THALASSIOSIRA
NORDENSKIOELDII* CLEVE 1873 (BACILLARIOPHYTA)
ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ СРЕДЫ МЕДЬЮ**

© 2024 г. Ж. В. Маркина* (ORCID: 0000-0001-7135-1375),
А. В. Подоба (ORCID: 0009-0007-4783-3471), Т. Ю. Орлова (ORCID: 0000-0002-5246-6967)

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток, 690041 Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 02.11.2023 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Изучено влияние меди в концентрациях 10, 20 и 50 мкг/л на рост популяции, флуоресценцию хлорофилла *a* и содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов) диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskioldii*. Показано, что при концентрации металла 10 и 20 мкг/л численность клеток увеличивалась с первых дней опыта и к его завершению превышала таковую в контроле в 5.8 и 5.6 раза соответственно. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* и содержание фотосинтетических пигментов при данных условиях были выше контрольных на всем протяжении опыта. При концентрации металла 50 мкг/л рост популяции клеток ингибировался в начале опыта, но к его завершению количество клеток превышало контрольное. Такая же тенденция отмечена и для других показателей. На основании полученных данных высказано предположение, что медь в изученных концентрациях может способствовать массовому развитию *T. nordenskioldii* в природной среде.

Ключевые слова: *Thalassiosira nordenskioldii*, медь, загрязнение, численность клеток, хлорофилл *a*, флуоресценция, фотосинтетические пигменты

DOI: 10.31857/S0134347524040071

Диатомовая водоросль *Thalassiosira nordenskioldii* Cleve 1873 (Bacillariophyta) — доминирующий вид фитопланктона Японского моря. Его численность может достигать 400 кл./мл (Шевченко и др., 2020), составляя до 90% от общей численности фитопланктона в зимний период. В летнее время этот вид также может быть в числе субдоминирующих планктонных микроводорослей (Стоник, 2018; Шевченко и др., 2020). Массовое развитие *T. nordenskioldii* отмечено и в других районах Мирового океана: в Белом (Ильяш и др., 2014), Южно-Китайском (Liu et al., 2021), Шотландском (Harris et al., 1995) и Северном (Muylaert, Sabbe, 1996) морях.

Известно, что *T. nordenskioldii* массово развивается в водах, обогащенных нитратами (Ильяш и др., 2014). Снижение концентрации нитратов может быть результатом активного потребления этих соединений водорослями данного вида (Шевченко и др., 2020). Медь, относящаяся к жизненно необходимым для растения элементам, также оказывает стимулирующий эффект на рост популяций разных представителей микроводорослей (Miazek et al., 2015; Cavalletti et al., 2022; Maltsev et al., 2023). Этот металл содержится в прибрежных водах всех морей России и считается одним из основных загрязняющих элементов (Коршенко, 2021).

Для выяснения действия экологических факторов на микроводоросли традиционно изучают динамику численности клеток — интегральный показатель, отражающий происходящие в организмах микроводорослей процессы. Кроме того, эффект действия тяжелых металлов на микроводоросли часто определяется по изменению содержания фотосинтетических пигментов и интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* (Miazek et al., 2015; Cavalletti et al., 2022).

Цель настоящей работы заключалась в оценке влияния меди на рост популяции, количество клеток в колониях, интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* и содержание фотосинтетических пигментов у *Thalassiosira nordenskiöldii*.

Материал и методика. Объектом исследования служила клонная культура диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskiöldii* (Bacillariophyta) из коллекции Морского биобанка ННЦМБ ДВО РАН — клон MBRU_Tnor22 (Коллекция живых микроорганизмов). Водоросль выращивали на среде *f/2* (Guillard, Ryther, 1962), приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰, без добавления меди, в 250 мл колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 200 мл, при температуре $16 \pm 2^\circ\text{C}$, интенсивности освещения 2500 лк в области видимого света и свето-темновым периодом 14 ч свет : 10 ч темнота. В качестве инокулята использовали культуры на экспоненциальной стадии роста. Начальная концентрация клеток составляла 500 кл./мл.

Медь добавляли в виде $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в день постановки эксперимента, концентрации указаны в пересчете на ионы меди. Исследуемые концентрации составляли 10, 20 и 50 мкг/л. Выбор концентраций основан на содержании этого металла в прибрежных водах России. Предельно допустимая концентрация (ПДК) для меди составляет 5 мкг/л (Коршенко, 2021). Суспензию водоросли вводили в эксперимент без предварительной адаптации культуры к меди.

Продолжительность экспериментов составляла 14 сут. Пробы для подсчета численности клеток, количества клеток в цепочках и определения флуоресценции хлорофилла *a* отбирали на 0, 4, 7, 11 и 14 сут опыта, для определения

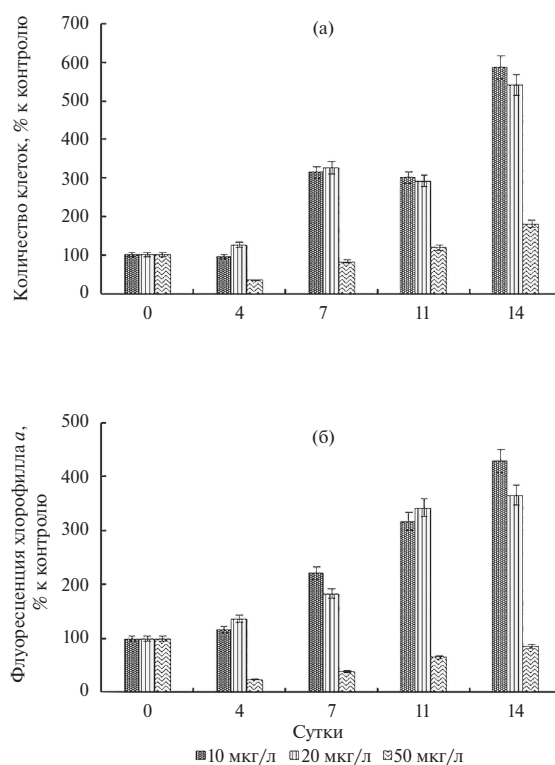


Рис. 1. Влияние разных концентраций меди на численность клеток микроводоросли *Thalassiosira nordenskiöldii* (а) и флуоресценцию хлорофилла *a* в них (б).

содержания хлорофилла *a* и каротиноидов — на 0, 7 и 14 сут опыта. Подсчет численности клеток и количества клеток в цепочках проводили в камере Седвика-Рафтера. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали в 96-луночном планшете на мультимодальном планшетном ридере Spark 10 TM (Tecan, Швейцария) при длине волны 685 нм, длина волны возбуждения составляла 490 нм. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли стандартным методом экстракции из клеток ацетоном с последующим измерением на мультимодальном планшетном ридере Spark 10 TM. Расчет концентрации пигментов проводили по известным формулам (Jeffrey, Humphrey, 1975).

Эксперименты проводили в трех биологических повторностях, данные выражали в процентах к контролю. За контроль (100%) принимали показатели, полученные на культуре без добавления меди. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel.

Результаты и обсуждение. При концентрации меди 10 мкг/л численность клеток *Thalassiosira*

Таблица 1. Доля (%) клеток *Thalassiosira nordenskioldii* в цепочках в контроле и при воздействии разных концентраций меди

Сутки	Контроль			Концентрация меди, мкг/л								
				10			20			50		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	60.0	23.6	16.4	60.0	23.6	16.4	60.0	23.6	16.4	60.0	23.6	16.4
4	74.4	16.8	8.8	55.4	30.2	14.4	62.6	27.0	10.4	69.4	23.4	7.2
7	80.9	8.3	10.8	75.0	20.6	4.4	85.4	12.3	2.3	80.6	14.8	4.6
11	90.6	7.9	1.4	90.6	7.9	1.5	92.7	6.4	0.8	87.8	9.6	2.6
14	92.4	6.9	0.7	92.4	7.0	0.6	89.4	10.0	0.6	80.3	15.8	3.9

Примечание. 1 — одиночные клетки, 2 — цепочки из 2-х клеток, 3 — более длинные цепочки.

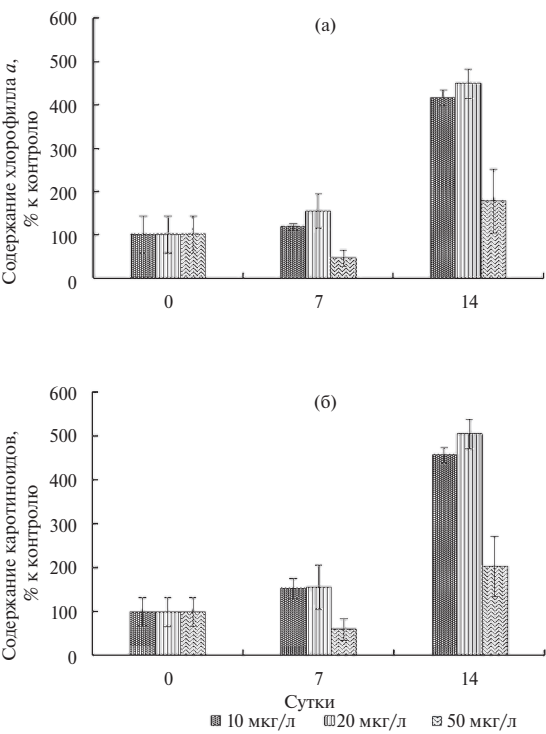


Рис. 2. Изменение содержания фотосинтетических пигментов хлорофилла *a* (а) и каротиноидов (б) в клетках *Thalassiosira nordenskioldii* под воздействием меди.

nordenskioldii на 4-е сутки опыта не отличалась от таковой в контроле (рис. 1а). На 7-е и 11-е сутки этот показатель превышал контроль соответственно в 3.1 и 3.0 раза, а на 14-е — в 5.8 раза. При внесении 20 мкг/л металла количество клеток уже на 4-е сутки превышало контрольное и впоследствии не отличалось от такового при 10 мкг/л. Увеличение концентрации меди до 50 мкг/л приводило к угнетению роста популяции микроводоросли на 4-е сутки. Впоследствии число клеток увеличивалось и

на 11-е сутки соответствовало контрольному, однако было существенно меньше, чем при концентрациях меди 10 и 20 мкг/л.

В культуре *T. nordenskioldii* преобладали одиночные клетки, доля которых возрастала к концу опыта как в контроле, так и при добавлении меди (табл. 1). Доля собранных в цепочки клеток, напротив, снижалась. При концентрации меди 50 мкг/л доля одиночных клеток на 14-е сутки была выше, чем в контроле и в остальных вариантах опыта.

В присутствии 10 и 20 мкг/л меди флуоресценция хлорофилла *a* была существенно выше контрольной на всем протяжении опыта (рис. 1б). Медь в концентрации 50 мкг/л на 4-е сутки вызывала снижение этого показателя; в дальнейшем он увеличивался, но не достигал контрольного значения.

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов превышало контрольное при добавлении 10 и 20 мкг/л меди, особенно на 14-е сутки опыта (рис. 2). Наличие в среде 50 мкг/л вещества приводило к снижению содержания пигментов на 7-е сутки, а на 14-е превышало контрольное в два раза.

Проведенный опыт подтвердил выраженный стимулирующий эффект меди, как на рост популяции *T. nordenskioldii*, так и на работу фотосинтетического аппарата, особенно при концентрациях 10 и 20 мкг/л. Увеличение численности клеток, накопление в клетках фотосинтетических пигментов и увеличение флуоресценции хлорофилла *a* под воздействием меди ранее было отмечено у *Thalassiosira pseudonana* (Wang et al., 2021). У рафидофитовой водоросли *Heterosigma akashiwo*, содержащейся в среде с добавлением

Таблица 2. Динамика интенсивности флуоресценции (относительные единицы) на клетку *Thalassiosira nordenskiöldii* в контроле и при воздействии разных концентраций меди (мкг/л)

Сутки	Контроль	10	20	50
0	0.70±0.11	0.70±0.11	0.70±0.11	0.70±0.11
4	0.72±0.11	0.88±0.20	0.78±0.21	0.50±0.14
7	0.99±0.17	0.70±0.18	0.56±0.10	0.47±0.07
11	0.56±0.12	0.48±0.06	0.51±0.13	0.31±0.05
14	0.85±0.16	0.40±0.04	0.28±0.06	0.40±0.06

10 мкг/л меди, наблюдался более интенсивный рост чем в контроле, а при 20 и 50 мкг/л происходило его ингибирование (Маркина, 2021).

Необходимо отметить, что флуоресценция хлорофилла *a* на клетку водоросли была ниже при воздействии всех концентраций меди, за исключением концентрации 10 и 20 мкг/л вещества на 4-е сутки опыта (табл. 2). Такое явление свидетельствует о токсическом воздействии металла. Например, при внесении 35.5 мкг/л металла квантовый выход флуоресценции хлорофилла *a* у *Thalassiosira weissflogii* снижался на фоне ингибирования роста клеток и содержания хлорофилла *a*, не отличавшегося от контрольного (Акимов и др., 2023).

В целом, медь в изученных концентрациях оказывала на диатомовые водоросли ингибирующий эффект чаще, чем стимулирующий (Miazek et al., 2015; Cavalletti et al., 2022). По-видимому, у *T. nordenskiöldii* существуют способы детоксикации меди и использования ее для роста. Например, у диатомеи *Skeletonema costatum* отмечено депонирование этого металла в вакуолях (Cavalletti et al., 2022). У разных представителей рода *Thalassiosira* в среде, загрязненной медью, зарегистрирован более интенсивный синтез белков и полисахаридов, предназначенных для связывания с металлами и последующей экскреции их из клетки (Miazek et al., 2015). Еще одним механизмом детоксикации тяжелых металлов является усиление синтеза фитохелатинов в токсической среде, как это отмечалось у *T. nordenskiöldii* в присутствии кадмия (Wang, Wang, 2008).

Таким образом, в изученных концентрациях медь оказывала выраженный стимулирующий эффект как на рост популяции *T. nordenskiöldii*, так и на синтез фотосинтетических пигментов и флуоресценцию хлорофилла *a*. В загрязненной медью среде при подавлении роста

сопутствующих видов фитопланктонного сообщества *T. nordenskiöldii* может получить конкурентное преимущество и достичь более высокой концентрации. Следовательно, медь может способствовать “цветению” этой микроводоросли.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны ресурсному центру “Морской биобанк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>) за предоставленную культуру *Thalassiosira nordenskiöldii* и возможность пользоваться мультимедальным планшетным ридером Spark 10 TM.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют эксперименты с людьми или животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акимов А.И., Соломонова Е.С., Шоман Н.Ю., Рылькова О.А. Сравнительная оценка влияния наночастиц оксида меди и сульфата меди на структурно-функциональные характеристики *Thalassiosira weissflogii* в условиях накопительного культивирования // Физиол. раст. 2023. Т. 70. № 5. С. 494–505.
- Ильяш Л.В., Радченко И.Г., Шевченко В.П. и др. Контрастные сообщества летнего фитопланктона в стратифицированных и перемешанных водах Белого моря // Океанология. 2014. Т. 54. № 6. С. 781–781.

- Коршенико А.Н. Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2020. М.: Наука, 2021. 281 с.
- Маркина Ж.В. Ультраструктура и автотрофная функция клеток рафидофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara and M. Chihara, 1987 в загрязненной медью среде // Биол. моря. 2021. Т. 47. № 3. С. 196–201.
- Стоник И.В. Качественный и количественный состав фитопланктона бухты Золотой Рог Японского моря // Изв. ТИНРО. 2018. Т. 194. С. 167–174.
- Шевченко О.Г., Шульгина М.А., Шулькин В.М., Тевс К.О. Многолетняя динамика и морфология диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve, 1873 (Bacillariophyta) в прибрежных водах залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2020. Т. 46. № 4. С. 277–284.
- Cavalletti E., Romano G., Palma Esposito F. et al. Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies // Toxics. 2022. V. 10. № 9. P. 527. <https://doi.org/10.3390/toxics10090527>
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // Can. J. Microbiol. 1962. V. 8. № 2. P. 229–239.
- Harris A.S.D., Medlin L.K., Lewis J. et al. *Thalassiosira* species (Bacillariophyceae) from a Scottish sea-loch // Eur. J. Phycol. 1995. V. 30. № 2. P. 117–131.
- Jeffrey S.T., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochemie und Physiologie der Pflanzen. 1975. V. 167. № 2. P. 191–194.
- Liu K., Liu S., Chen Y. et al. Complete mitochondrial genome of the harmful algal bloom species *Thalassiosira nordenskiöldii* (Mediophyceae, Bacillariophyta) from the East China Sea // Mitochondrial DNA. Part B. 2021. V. 6. № 4. P. 1421–1423.
- Muyllaert K., Sabbe K. The diatom genus *Thalassiosira* (Bacillariophyta) in the estuaries of the Schelde (Belgium/The Netherlands) and the Elbe (Germany) // Bot. Mar. 1996. V. 39. № 1–6. P. 103–116.
- Maltsev Y., Maltseva S., Kulikovskiy M. Toxic effect of copper on soil microalgae: experimental data and critical review // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2023. V. 20. P. 10903–10920.
- Miaze K., Iwanek W., Remacle C. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial products biosynthesis: a review // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. № 10. P. 23929–23969.
- Wang X., Cao W., Du H. et al. Increasing temperature alters the effects of extracellular copper on *Thalassiosira pseudonana* physiology and transcription // J. Mar. Sci. Eng. 2021. V. 9. № 8. art. ID 816. <https://doi.org/10.3390/jmse9080816>
- Wang M.J., Wang W.X. Temperature-dependent sensitivity of a marine diatom to cadmium stress explained by subcellular distribution and thiol synthesis // Environ. Sci. Technol. 2008. V. 42. № 22. P. 8603–8608.

Cell Number Dynamics, Chlorophyll *a* Fluorescence Intensity, and Photosynthetic Pigment Content in *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve 1873 (Bacillariophyta) Exposed to Environmental Copper Pollution

Zh. V. Markina^a, A. V. Podoba^a, T. Yu. Orlova^a

^aZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

The effect of copper at concentrations of 10, 20, and 50 µg/L on population growth, chlorophyll *a* fluorescence, and content of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and carotenoids) of the diatom *Thalassiosira nordenskiöldii* was studied. It was shown that at metal concentrations of 10 and 20 µg/L, the cell number started to increase from the first days of the experiment and, by the end of the experiment, exceeded that in the control group 5.8- and 5.6-fold, respectively. The intensity of chlorophyll *a* fluorescence and the content of photosynthetic pigments under these conditions were higher than in control throughout the experiment. At a metal concentration of 50 µg/L, the growth of the cell population was inhibited at the beginning of the experiment; by the end of the experiment, the cell number exceeded that in control. The same pattern was recorded for the other parameter, too. Based on the obtained data, it is hypothesized that copper at the studied concentrations may contribute to the proliferation of *T. nordenskiöldii* in the natural environment.

Keywords: *Thalassiosira nordenskiöldii*, copper, pollution, cell number, chlorophyll *a*, fluorescence, photosynthetic pigments