

УДК 574.24+582.261

## Экспериментальная оценка токсикорезистентности бентосной микроводоросли *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (Bacillariophyta) при воздействии ионов меди

А. Н. Петров\*, Е. Л. Неврова

\*Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, Россия;  
e-mail: alexpet-14@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0137-486X>

### Информация о статье Реферат

Поступила  
в редакцию  
20.09.2022;  
получена  
после доработки  
16.11.2022;  
принята к публикации  
22.11.2022

### Ключевые слова:

токсикология;  
эксперимент;  
пороговые  
концентрации;  
бентосные  
диатомовые;  
клонная культура;  
Черное море

При усилении антропогенной нагрузки на экосистему прибрежных зон моря возрастает актуальность оценки состояния сообществ планктона и бентоса. В ходе исследования определена динамика численности клеток клоновой культуры *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (Bacillariophyta) при воздействии  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  разной концентрации ( $32\text{--}1024 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) в условиях 10-суточных экспериментов. В контроле и при низкой концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  доля живых клеток практически не изменяется. Пороговая концентрация ионов меди для выживания *T. excentrica* равна  $128 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ . При более высоких концентрациях  $\text{Cu}^{2+}$  ( $256\text{--}1024 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) отмечено резкое угнетение и гибель культуры уже в течение 1–3-х суток. Прирост абсолютной численности клеток при низких концентрациях меди ( $32\text{--}64 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) описывается сигмоидной кривой отклика тест-объекта. Значения прироста возрастают в 1–5-е сутки в 4–8 раз и снижаются к 10-м суткам на 25–30 %. При концентрациях  $\text{Cu}^{2+}$   $128\text{--}256 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  положительный прирост численности клеток в 1–5-е сутки отсутствует, в последующие дни снижается в 2 раза либо падает до нуля. Интенсивность удельного прироста достоверно снижается в зависимости от увеличения концентрации токсиканта. Установлено, что в 1–5-е сутки удельный прирост положительный в диапазоне концентраций меди  $32\text{--}128 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  и отрицательный – при концентрациях  $256 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  и выше. В период 5–10-х суток для всех концентраций токсиканта значения удельного прироста отрицательные. Полученные результаты позволяют рекомендовать *T. excentrica* в качестве перспективного тест-объекта для токсикологических экспериментов.

### Для цитирования

Петров А. Н. и др. Экспериментальная оценка токсикорезистентности бентосной микроводоросли *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (Bacillariophyta) при воздействии ионов меди. Вестник МГТУ. 2023. Т. 26, № 1. С. 78–87. DOI: 10.21443/1560-9278-2023-26-1-78-87.

## Experimental evaluation of toxic resistance of benthic microalgae *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (Bacillariophyta) under the copper ions impact

Alexey N. Petrov\*, Elena L. Nevrova

\*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol, Russia;  
e-mail: alexpet-14@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0137-486X>

### Article info

Received  
20.09.2022;  
received  
in revised  
16.11.2022;  
accepted  
22.11.2022

### Key words:

toxicology;  
experiment;  
threshold concentrations;  
benthic diatom algae;  
clonal strain;  
Black Sea

### Abstract

With an increase in anthropogenic pressure on the ecosystem of the coastal zones of the sea, the relevance of assessing the state of plankton and benthos communities also increases. In the course of the study, the dynamics of the number of cells of the clone culture *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (Bacillariophyta) has been determined under the influence of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  of various concentrations ( $32\text{--}1024 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) under the conditions of 10-day experiments. In the control and at a low concentration of  $\text{Cu}^{2+}$ , the proportion of living cells remains almost unchanged. The threshold concentration of copper ions for the survival of *T. excentrica* is  $128 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . At higher concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  ( $256\text{--}1024 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), a sharp inhibition and death of the culture has been noted already within 1–3 days. The increase in the absolute number of cells at low concentrations of copper ( $32\text{--}64 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) is described by the sigmoid response curve of the test-object. The growth values increase by 4–8 times on the 1st–5th day and decrease by 25–30 % by the 10th day. At  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of  $128\text{--}256 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , there is no positive increase in the number of cells on days 1–5; on subsequent days, it decreases by 2 times or drops to zero. The intensity of the specific cell growth significantly decreases depending on the increase in the concentration of the toxicant. It has been found that on days 1–5, the specific increase is positive in the range of copper concentrations of  $32\text{--}128 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  and negative – at concentrations of  $256 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  and higher. In the period of 5–10 days, for all concentrations of the toxicant, the values of the specific increase are negative. The obtained results make it possible to recommend *T. excentrica* as a promising test object for toxicological experiments.

### For citation

Petrov, A. N. et al. 2023. Experimental evaluation of toxic resistance of benthic microalgae *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 (Bacillariophyta) under the copper ions impact. *Vestnik of MSTU*, 26(1), pp. 78–87. (In Russ.) DOI: 10.21443/1560-9278-2023-26-1-78-87.

## Введение

В современных условиях усиления антропогенной нагрузки на экосистему прибрежных зон моря, в том числе у берегов Крыма, возрастает актуальность оценки состояния сообществ планктона и бентоса. Одной из групп экологически наиболее опасных техногенных поллютантов являются тяжелые металлы, в частности медь, соединения которой накапливаются в донных отложениях, особенно в прибрежных и портовых акваториях. Ежегодно в водоемы с коммунальными и промышленными стоками поступает до 90 тыс. т меди (Miazek et al., 2015). Значительная доля медьсодержащих поллютантов присутствует в противообрастающих красках-биоцидах, которыми покрывают днища судов и различные гидротехнические объекты (Burgess et al., 2009; Crespo et al., 2013; Неврова и др., 2015).

Значимость соединений меди как в биогеохимических циклах в морской среде, так и в метаболизме гидробионтов определила выбор сульфата меди в качестве модельного токсиканта для экспериментов. В повышенных концентрациях ионы меди становятся остротоксичными для большинства морских и пресноводных гидробионтов, относясь к наиболее экологически опасным веществам, наряду с ионами Hg, Cd, Pb и Zn (Проблемы химического загрязнения..., 1985; Принципы и методы..., 2016). В микроколичествах ионы меди являются необходимыми для гидробионтов эссенциальными элементами и играют ключевую роль в физиологических процессах в клетках водорослей (азотный обмен, перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий), а также входят в состав активных центров многих ферментов (пластоцианин, цитохром оксидаза, аскорбатоксидаза, супероксиддисмутазы и др.) (Levy et al., 2007; Принципы и методы..., 2016; Miazek et al., 2015).

Величина предельно допустимой концентрации (ПДК) соединений меди для морских донных осадков неизвестна, а для водных масс такое значение принято равным  $5 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ . Отметим, что содержание меди в прибрежных морских акваториях может составлять  $50\text{--}100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  (Маркина и др., 2019). Для бентосных диатомовых более значимым является содержание меди не в водных массах, а в донных отложениях, поскольку рыхлые грунты интенсивно аккумулируют поллютанты, а клетки микроводорослей либо прикрепляются к поверхности субстрата, либо обитают в его толще. В рыхлых грунтах черноморских акваторий содержание меди может достигать  $0,4\text{--}11,2 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$  (Овсяный и др., 2003), а в закрытых и полузакрытых бухтах, загрязненных техногенными поллютантами – до  $20\text{--}37 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$  сухого осадка (Петров и др., 2004; Burgess et al., 2009).

Вследствие этого медь, наряду с другими тяжелыми металлами в донных осадках, относится к ключевым факторам, оказывающим значимое влияние на структуру таксоценоза и пространственное распределение донных диатомовых на илистых грунтах в техногенно загрязненных морских акваториях (Петров и др., 2003; 2005; Неврова и др., 2015).

К настоящему времени накоплены данные по оценке воздействия соединений меди на морские микроводоросли, но в подавляющем большинстве они основаны на использовании планктонных форм (благодаря относительной простоте их учета в ходе экспериментов) (Cid et al., 1995; Маркина и др., 2011; Crespo et al., 2013; Leung et al., 2017). В то же время бентосные диатомовые, в силу тесной приуроченности к субстрату и относительно малой подвижности, более объективно реагируют на степень загрязнения среды обитания. В связи с этим оценка изменений физиологических параметров донных диатомовых (рост клеток, размножение, количественное развитие популяций) под воздействием различных поллютантов с большей надежностью может отражать влияние неблагоприятных экологических факторов по сравнению с планктонными видами (Маркина, 2009; Неврова и др., 2015; Романова и др., 2017). Указанные особенности определяют актуальность расширения исследований бентосных диатомовых как тест-объектов при опосредованной оценке качества морской среды (Филенко и др., 2007; Markina et al., 2006; Маркина, 2009; Anantharaj et al., 2011; Принципы и методы..., 2016; Романова и др., 2017). Результаты оценки реакции планктонных водорослей *Cylindrotheca closterium*, *Ditylum brightwellii*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Porphyridium purpureum* и др. на воздействие  $\text{Cu}^{2+}$  выявляют выраженную специфичность пороговой резистентности для различных видов (Florence et al., 1986; Cid et al., 1995; Rijstenbil et al., 2002; Markina et al., 2006; Маркина и др., 2011; 2019).

Выбор для эксперимента диатомовой водоросли *Thalassiosira excentrica* Cleve 1903 обусловлен следующими причинами: крупный размер клеток, что облегчает их учет при фотофиксации и оценке прижизненного состояния; сравнительная простота при культивировании; высокая скорость вегетативного размножения и бенто-планктонный образ жизни. Ранее нами была подтверждена статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) результатов оценки равномерности распределения клеток данного вида в экспериментальном сосуде и показателей развития микроводорослей на основе анализа небольшого количества полей зрения (Петров и др., 2020).

Целью работы является определение пороговой концентрации ионов меди для выживания и прироста численности клеток клоновой культуры морской бентосной диатомовой водоросли *T. excentrica* и степени пригодности данного вида в качестве перспективного тест-объекта для экотоксикологии.

## Материалы и методы

В токсикологических экспериментах использована клоновая культура бентосной диатомовой водоросли *Thalassiosira excentrica*, выращенная путем изолирования одиночной клетки под бинокляром МБС-10 (Россия, ЛЗОС) при увеличении  $\times 40$  с последующей семикратной промывкой культуральной средой (Гайсина и др., 2008; Романова и др., 2017; Петров и др., 2020). Клоновая линия выделена из состава микрофитобентоса рыхлого субстрата, отобранного в бухте Ласпи (юго-западная часть Крыма,  $44^{\circ}25'10''\text{N}$ ,  $33^{\circ}42'27''\text{E}$ ) на глубине 9 м. Вид морской, бенто-планктонный, встречается часто в прибрежных районах; образует колонии по 4–8 клеток, соединенных тонкими прозрачными тяжами. Створки дисковидные, диаметром около 40  $\mu\text{m}$ . Структура створки состоит из округло-полигональных ареол, расположенных в тангентальных рядах, 8–9 в 10  $\mu\text{m}$  (рис. 1). Размеры клеток указаны на момент начала культивирования.

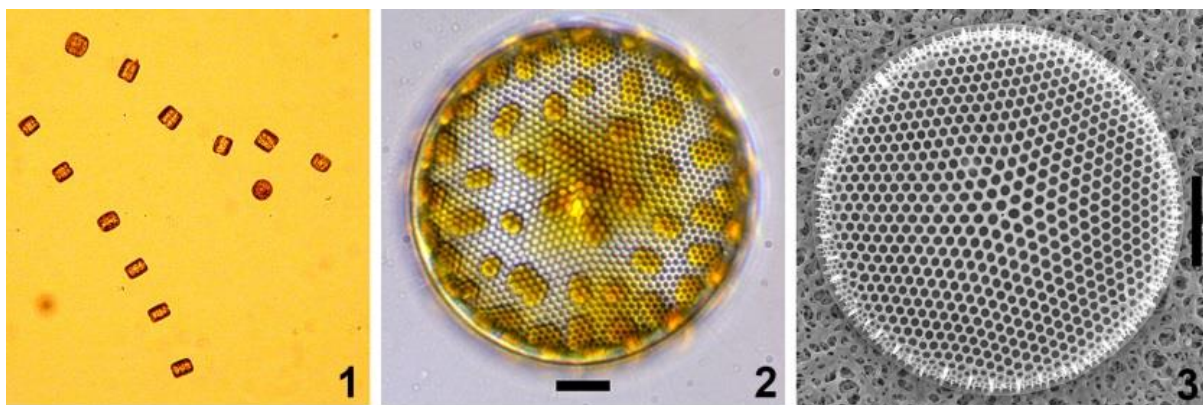


Рис. 1. Морская диатомовая *T. excentrica*, использованная в эксперименте: 1 – колония живых клеток (СМ  $\times 10$ ); 2 – живая клетка (СМ  $\times 60$ , масштаб 10  $\mu\text{m}$ ); 3 – створка, вид снаружи (СЭМ  $\times 2\,000$ )

Fig. 1. Marine diatom *T. excentrica* used in the experiment: 1 – alive colony (LM  $\times 10$ ); 2 – alive cell (LM  $\times 60$ , scale bar 10  $\mu\text{m}$ ); 3 – valve external view (SEM  $\times 2\,000$ )

Клоновую линию содержали на питательной среде Гольдберг, модифицированной для оптимального культивирования морских бентосных диатомовых, при естественном освещении и постоянной температуре  $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Морскую воду для приготовления среды отбирали в 12-мильной зоне у побережья Крыма, фильтровали через фильтр 0,45  $\mu\text{m}$ , затем трижды пастеризовали при температуре  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  и вносили питательные вещества в соответствии с протоколом (Петров и др., 2020). В ходе культивирования и эксперимента фотографии живых и мертвых клеток получали под инвертированным световым микроскопом (СМ) Nikon Eclipse с объективом Plan Fluor  $\times 60$  OFN25 и камерой Infinity3-6URC (Nikon Corp., Япония). Идентификацию очищенных створок проводили под СМ Carl Zeiss Primostar Plus с объективом Plan-Achroplan  $\times 100$ , а также под сканирующим электронным микроскопом (СЭМ) Hitachi SU3500 (Япония).

В каждую чашку Петри диаметром 90 мм вносили последовательно по схеме определенное количество питательной среды, стокового раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 1 мл инокулята клоновой культуры *T. excentrica*, чтобы общий объем жидкости составил 30 мл. Протокол эксперимента подробно описан ранее (Неврова и др., 2022). В ходе эксперимента проводили тестирование *T. excentrica* на воздействие возрастающих концентраций токсиканта: 32, 64, 128, 256, 320, 512 и 1 024  $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  (в пересчете на ионы меди) по сравнению с контролем (питательная среда Гольдберг без добавления токсиканта). Чашки Петри герметизировали пленкой Parafilm®, чтобы исключить контаминацию и испарение экспериментального раствора. Продолжительность экспериментов составляла 10 суток, периоды экспозиции – 1, 3, 5, 7 и 10 суток. Данные временные периоды выбраны с целью возможности оценить хронический аспект токсичности сульфата меди, а также детально рассмотреть динамику отклика клоновой культуры *T. excentrica* на воздействие различных концентраций токсиканта. Каждый вариант концентрации ионов меди исследовали в 3-кратной повторности, включая контроль.

Реакцию клоновой линии на воздействие разных концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  определяли визуально по микрофотографиям на основе подсчета доли живых клеток (%). Контроль прижизненного состояния оценивали по форме и целостности панциря, неизменности структуры и цвета хлоропластов, разделению клеток после вегетативного деления; в случае же лизиса клеточного содержимого, резкого потемнения хлоропластов, раскрытия панциря – клетку определяли как мертвую (рис. 2). Численность живых и мертвых клеток в каждый период экспозиции определяли по усредненным данным, полученным при фотографировании 10–15 случайных полей зрения.

Для всех концентраций меди, включая контроль, также рассчитывали изменение абсолютной численности живых клеток на разных этапах эксперимента и удельную скорость прироста (отмирания) численности клеток (кл.·сут<sup>-1</sup>) как одного из базовых показателей, используемых в токсикологии для оценки состояния популяций микроводорослей (Филенко и др., 2007; Маркина и др., 2019). Скорость прироста численности клеток ( $v$ ), число клеточных делений в сутки рассчитывали по формуле

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

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).

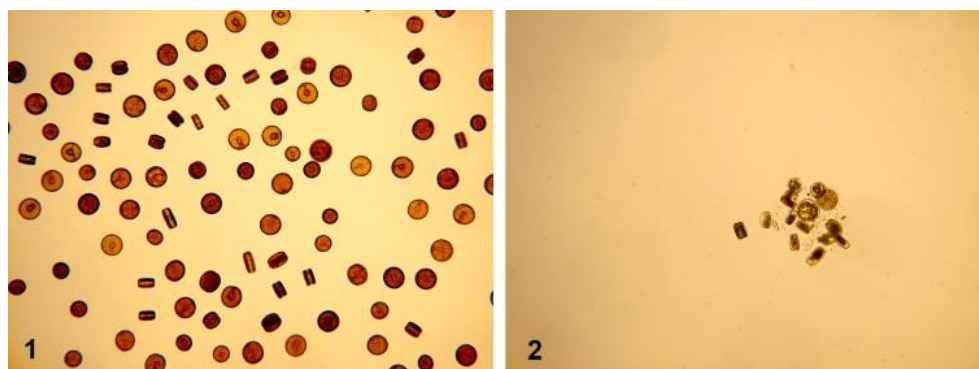


Рис. 2. Вид живых (1) и мертвых (2) клеток культуры *T. excentrica* в эксперименте  
Fig. 2. Shape and condition of alive (1) and dead cells (2) of strain *T. excentrica* in the experiment

Для статистической обработки результатов экспериментов применены стандартные алгоритмы вариационного параметрического и рангового анализов<sup>1</sup>. Сравнение дисперсий и достоверности различий средних значений параметров проведено для уровня значимости  $p < 0,05$  на основе параметрических критериев Фишера и Стьюдента (при нормальном распределении вариантов в выборках). При распределении вариант, отличном от нормального, применены непараметрические критерии Холма – Сидака (Holm – Sidak test) и Данна (Dunn's test). Значения параметров количественного развития культуры клеток представлены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой средней (SE) по выборкам.

### Результаты и обсуждение

Данная работа является продолжением наших исследований по оценке видоспецифичной резистентности культур черноморских бентосных диатомовых, принадлежащих к различным классам Bacillariophyta, и определению пороговых концентраций ионов меди в ходе 10-дневных токсикологических тестов (Романова и др., 2017; Петров и др., 2020; Неврова и др., 2022). Отметим, что помимо получения новых данных о диапазонах толерантности разных видов бентосных Bacillariophyta, исследуются и мало разработанные методические вопросы по культивированию клоновых культур диатомовых, критериям визуального учета отклика живых клеток тест-объектов при различных сроках экспозиции и концентрациях токсиканта в культуральной среде.

По результатам 10-суточных тестов установлено, что на протяжении первых 5 суток в контроле и при концентрациях ионов меди 32 и 64 мкг·л<sup>-1</sup> доля живых клеток *T. excentrica* практически не меняется, оставаясь на уровне 97–99 %, и только начиная с 7-х суток доля клеток немного снижается: до 91–92 % (в контроле и для концентрации 32 мкг·л<sup>-1</sup>) и до 77 % (для 64 мкг·л<sup>-1</sup>) (таблица).

На протяжении первых 7 суток эксперимента различия в средних значениях доли живых клеток (%) между контролем и чашками с концентрациями ионов меди 32 и 64 мкг·л<sup>-1</sup> статистически незначимы ( $p = 0,27–0,53$ ). Статистически высоко значимые отличия ( $p < 0,001$ ) между контролем и концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  64 мкг·л<sup>-1</sup> отмечены только на 10-е сутки. Различия в значениях доли живых клеток между контролем и концентрацией 128 мкг·л<sup>-1</sup> также были высоко значимыми ( $p < 0,0001$ ) уже начиная с 5-х суток экспозиции. Именно при повышении концентрации ионов меди до 128 мкг·л<sup>-1</sup> отмечалось резкое увеличение числа мертвых клеток в полях просмотра, а доля живых клеток на 7-е и 10-е сутки снижалась в среднем до 54 и 42 % соответственно. Данные результаты свидетельствуют о том, что статистически значимое ( $p < 0,008$ ) токсическое действие ионов меди существенно сказывается на состоянии клеток *T. excentrica* уже начиная с концентрации 64 мкг·л<sup>-1</sup>. При 128 мкг·л<sup>-1</sup> интенсивность отмирания клеток в тест-культуре резко

<sup>1</sup> SigmaPlot 14.5 / Systat Software Inc. 2020. Mode of Access: <https://sigmaplot.software.informer.com/14.5/>.

усиливается, что позволяет считать данную концентрацию токсиканта пороговой для выживания данного вида диатомовых (см. таблицу).

Таблица. Изменение доли живых клеток (среднее значение  $\pm$  SE, %) в культуре *T. excentrica* в ходе эксперимента при разных концентрациях токсиканта

Table. Change in the share of alive cells (mean value  $\pm$  SE, %) in strain *T. excentrica* during the experiment at different concentrations of toxicant

Концентрации токсиканта $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$	Периоды экспозиции, сут				
	1	3	5	7	10
Контроль	$99 \pm 3$	$99 \pm 4$	$99 \pm 4$	$96 \pm 5$	$92 \pm 4$
32	$99 \pm 3$	$99 \pm 3$	$97 \pm 5$	$94 \pm 4$	$91 \pm 5$
64	$98 \pm 7$	$97 \pm 8$	$97 \pm 6$	$89 \pm 9$	$77 \pm 8$
128	$95 \pm 9$	$93 \pm 10$	$72 \pm 10$	$54 \pm 12$	$42 \pm 11$
256	$97 \pm 13$	$14 \pm 5$	$8 \pm 3$	0	0
320	$98 \pm 12$	$6 \pm 2$	$3 \pm 2$	0	0
384	$97 \pm 6$	0	0	0	0
512	$96 \pm 8$	0	0	0	0

При концентрациях ионов меди  $256 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  доля живых клеток в культуре уже на 3–5-е сутки снизилась в 6–10 раз, по сравнению с таковой при концентрациях в диапазоне  $32\text{--}128 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ . При промежуточных концентрациях  $320$  и  $380 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  уже на 3-е сутки отмечено резкое угнетение клоновой культуры *T. Excentrica*. На 5-е сутки доля живых клеток в экспериментальных сосудах снижалась практически до 0 %. При повышении концентрации до  $512$  и  $1\ 024 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  доля живых клеток составляла 0 % уже к 3-м суткам (см. таблицу).

При оценке токсического влияния меди на состояние культуры *T. excentrica* важным показателем также является изменение абсолютной численности живых клеток в ходе эксперимента (рис. 3). Отметим, что предшествующие результаты анализа культуры *T. excentrica* показали, что все попарные различия по средней численности клеток данного вида между тремя повторностями недостоверны как на 1-е, так и на 5-е сутки экспозиции, т.е. вариативность средней численности клеток в разных повторностях эксперимента не выходит за пределы статистической погрешности (Петров и др., 2020). Данный факт позволяет рассматривать все повторности (случайные выборки клеток) как соответствующие одной исходно взятой совокупности со сходным характером вариативности показателей, что является важным условием для корректного сравнения отличий в абсолютной численности клеток в чашках на разных стадиях эксперимента и при разных концентрациях токсиканта.

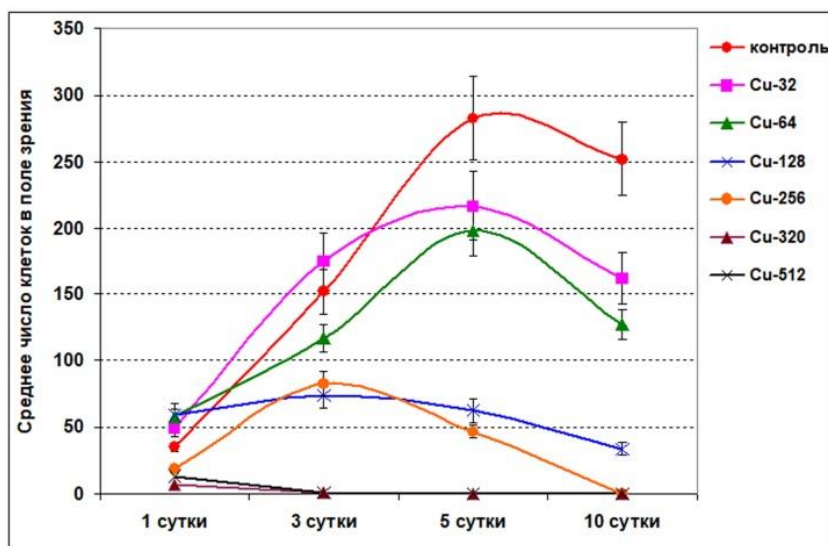


Рис. 3. Изменение абсолютной численности живых клеток *T. excentrica* (среднее значение  $\pm$  SE) в ходе эксперимента при разных концентрациях токсиканта

Fig. 3. Change in the absolute number of live cells of *T. excentrica* (mean value  $\pm$  SE) during the experiment at different concentrations of toxicant

Очевидно, что в контроле и при малых концентрациях меди ( $32\text{--}64 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) характер прироста численности клеток *T. excentrica* в целом соответствует классической сигмовидной кривой отклика тест-



объекта в токсикологическом опыте. В период 1–5-х суток абсолютная численность клеток (среднее значение по 10–28 полям просмотра) возрастает в 4–8 раз, достигая максимума. В последующий период за счет негативного влияния токсиканта, а также старения культуры численность клеток несколько снижается: на 10 % (для контрольной чашки) и на 25–30 % (для концентраций 32–64 мкг·л<sup>-1</sup>). При более высоких концентрациях меди (128–256 мкг·л<sup>-1</sup>) статистически значимого устойчивого роста численности в период 1–5-х суток не наблюдается ( $0,07 < p < 0,72$ ). В последующий период (5–10-е сутки) численность живых клеток двукратно снижается при концентрации 128 мкг·л<sup>-1</sup> и падает до нуля (при 256 мкг·л<sup>-1</sup>). При наиболее высоких концентрациях 512 и 1 024 мкг·л<sup>-1</sup> численность живых клеток в культуре снижается до нуля уже к 3-м суткам (см. рис. 3). На 5–10-е сутки различия между средними значениями численности клеток при сравнении концентраций 64 и 128 мкг·л<sup>-1</sup> высоко значимы ( $p = 0,009–0,0004$ ), что также служит подтверждением, что данный диапазон концентраций ионов меди является пороговым для выживания тестируемого вида диатомовой водоросли.

Исследован еще один тип отклика *T. excentrica* на токсическое воздействие ионов меди – изменение в ходе экспозиции среднего числа клеточных делений в сутки ( $v$ ); сопоставлены средние значения ( $v \pm SE$ ) удельного прироста численности клеток в тест-культуре при разных концентрациях токсиканта (рис. 4).

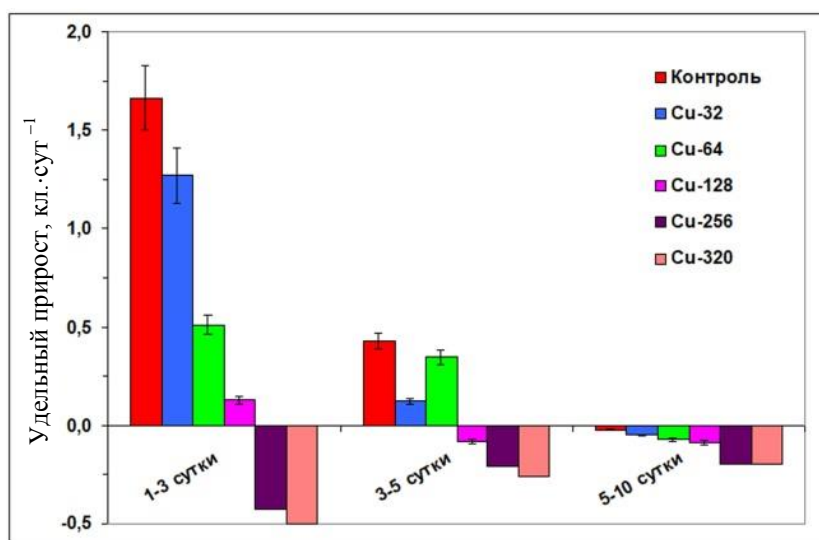


Рис. 4. Изменение удельного прироста численности клеток *T. excentrica* ( $v$ , кл.·сут<sup>-1</sup>) при различных концентрациях ионов меди в разные периоды эксперимента  
Fig. 4. Change of the specific growth rate in the number of *T. excentrica* cells ( $v$ , cells·day<sup>-1</sup>) at various concentrations of copper ions and in different stages of the experiment

Установлено, что в период до 3 суток культура клеток характеризуется положительным удельным приростом клеток в диапазоне концентраций Cu<sup>2+</sup> от 32 до 128 мкг·л<sup>-1</sup>. Наибольший удельный прирост выявлен в контроле (1,67 делений в сутки) и при концентрациях меди 32 мкг·л<sup>-1</sup> (1,27 делений в сутки). При пороговой концентрации токсиканта (128 мкг·л<sup>-1</sup>) скорость деления клеток *T. excentrica* в первые трое суток опыта еще сохраняла положительную динамику (0,13 делений в сутки), но была ниже в 12 раз по сравнению с контролем. При концентрации ионов меди 256 мкг·л<sup>-1</sup> и выше прирост численности становится отрицательным (рис. 4).

В период 3–5-х суток величина удельного прироста сохранялась положительной только для низких концентраций меди (32–64 мкг·л<sup>-1</sup>), хотя и была в несколько раз ниже, чем в период 1–3-х суток. При концентрации 128 мкг·л<sup>-1</sup> прирост уже становился отрицательным. Отметим, что удельная скорость прироста численности клеток снижалась в течение эксперимента даже в контроле, а к 10-м суткам падала практически до нуля, что объясняется старением культуры и истощением питательных веществ в экспериментальном сосуде. В период 5–10-х суток для всех тестируемых концентраций токсиканта выявлены отрицательные значения удельного прироста численности клеток *T. excentrica* в культуре (т. е. отмирает клеток больше, чем появляется новых в ходе делений).

По результатам наших экспериментов у бентосной диатомовой *T. excentrica* выявлена более высокая резистентность к воздействию ионов меди по сравнению с данными других авторов по тестированию преимущественно планктонных видов микроводорослей. Так, при изучении воздействия хлорида меди на выживание и размножение *Scenedesmus quadricaudata* (Turpin) Brebisson 1835 установлено, что заметное снижение общей численности и доли живых клеток наблюдалось при концентрации меди 10–100 мкг·л<sup>-1</sup> на экспоненциальной фазе роста культуры (10–14-е сутки) (Филенко и др., 2007). Уже при концентрациях меди 1–10 мкг·л<sup>-1</sup> доля активно размножающихся клеток не превышала 10 %, а остальная часть культуры находилась в покоящейся стадии, не изменяя показатели прироста численности клеток. При тестировании

влияния ионов меди на микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) K. M. Drew et R. Ross 1965 показано (Маркина и др., 2019), что при концентрациях токсиканта 50–100 мкг·л<sup>-1</sup> уже на 4-е сутки эксперимента наблюдалось выраженное угнетение роста популяции и снижение содержания в клетках фотосинтетических пигментов по сравнению с контролем. Для бентосной диатомовой *Amphora coffeaeformis* (C. Agardh) Kützing 1844 выявлено, что токсическое воздействие тяжелых металлов (медь, свинец, кадмий) наблюдается уже при концентрации 0,02 мкг·л<sup>-1</sup>, когда отмечается подавление роста клеток и разрушение клеточных мембран, что приводит к уменьшению содержания хлорофилла (Anantharaj et al., 2011).

Установлено, что техногенно загрязненные бухты региона Севастополя характеризуются высоким содержанием меди и кадмия в водной толще: от 7,07 до 22,56 мкг·л<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> и 0,13–1,74 мкг·л<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>, вследствие чего в произрастающих в этом районе макрофитах накапливается значительное количество токсикантов: 3,38–14,96 мг Cu<sup>2+</sup> на 1 кг и 0,12–1,13 мг Cd<sup>2+</sup> на 1 кг сухой массы таллома (Niemiec et al., 2015). Столь высокие значения уровней аккумуляции ионов тяжелых металлов могут нести потенциальные угрозы для гидробионтов, вовлеченных в трофические цепи прибрежной морской экосистемы, в которых бентосные диатомовые являются ведущим первичным звеном.

С учетом вышесказанного следует отметить, что угнетение роста численности и физиологического состояния клеток *T. excentrica* и других видов диатомовых может быть вызвано как негативным воздействием ионов меди на фотосинтетический аппарат и процессы синтеза аминокислот, влияющих на рост популяции (Cid et al., 1995; Kim et al., 2017; Leung et al., 2017), так и подавлением вегетативного размножения клеток (Филенко и др., 2007). При этом повышенная резистентность (по сравнению с планктонными видами) бентосной *T. excentrica* к токсическому эффекту меди может быть обусловлена наличием у клеток силифицированного панциря, снабженного сложной многоуровневой системой ареол, снижающих токсичное воздействие на клетку ионов меди, поступающих из внешней среды. Подобные морфологические адаптации могут обеспечивать устойчивое развитие колоний бентосных диатомовых на рыхлых субстратах, в которых уровни содержания токсиканта, как правило, значительно выше, чем в водной толще (Levy et al., 2007; Niemiec et al., 2015; Kim et al., 2017). Выявленная у *T. excentrica* более высокая токсикорезистентность может быть также связана с ее обитанием при черноморской солености до 18 ‰, поскольку в морской воде атомы хлора могут замещать ионы меди в процессе образования хелатных комплексов, в целом менее токсичных по сравнению со свободными ионами металлов. Защитной реакцией на повышенное содержание меди в среде может служить и дополнительное выделение клетками диатомовых водорослей полисахаридной слизи, что является одним из универсальных механизмов детоксикации тяжелых металлов (Crespo et al., 2013; Miazek et al., 2015).

## Заключение

По результатам изучения отклика клоновой культуры морской бентосной диатомовой *T. excentrica* на воздействие широкого диапазона концентрации ионов меди установлено, что при концентрациях Cu<sup>2+</sup> 32–64 мкг·л<sup>-1</sup> доля живых клеток достоверно снижается по отношению к контролю только на 10-е сутки эксперимента. Характер прироста абсолютной численности клеток *T. excentrica* при данных концентрациях соответствует сигмоидной кривой "доза – эффект". Значения прироста достигают максимума к 5-м суткам эксперимента, а в период 5–10-х суток – снижаются за счет накопленного негативного влияния токсиканта и старения культуры. Для концентраций ионов меди 128–256 мкг·л<sup>-1</sup> статистически значимого прироста численности живых клеток в период 1–5-х суток не отмечено, в последующий период 5–10-х суток значения снижаются до нуля. При высоких концентрациях токсиканта (320 мкг·л<sup>-1</sup> и выше) численность живых клеток в культуре падает до нуля уже на 3-и сутки. В этот же период выявлено и достоверное снижение интенсивности удельного прироста клеток.

Для *T. excentrica* впервые установлена пороговая для выживания и роста концентрация Cu<sup>2+</sup> (128 мкг·л<sup>-1</sup>), которая в 3–10 раз превышает известные в литературе значения, критичные для некоторых видов облигатных планктонных микроводорослей. Более высокая резистентность бенто-планктонной *T. excentrica* к токсическому воздействию меди может быть обусловлена морфофизиологическими адаптациями, которые обеспечивают устойчивое развитие данного вида при контакте с рыхлым донным субстратом, в котором поллютанты аккумулируются в значительно больших концентрациях, чем в водной толще.

Полученные результаты позволяют рекомендовать диатомовую водоросль *T. excentrica* для использования в качестве нового перспективного тест-объекта в токсикологических экспериментах по изучению влияния тяжелых металлов на эту ключевую группу одноклеточных автотрофов.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБИОМ РАН по теме "Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна" (госрегистрация № 121030100028-0). Авторы выражают благодарность коллегам из ИнБИОМ РАН вед. инженерам Трофимову С. А. и Литвину Ю. И. за помощь при содержании клоновых культур, проведении

экспериментов и обработке экспериментальных данных, а также вед. инженеру Лишаеву В. Н. – за микрофотографирование на СЭМ Hitachi SU3500.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Библиографический список

- Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров Р. Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей. Уфа : Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.
- Маркина Ж. В. Действие детергентов и поверхностно-активных веществ на рост, физиологические и биохимические показатели одноклеточных водорослей (обзор) // Известия ТИПРО. 2009. Т. 156. С. 125–134. EDN: KUSPUB.
- Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Влияние меди на численность, морфологию клеток и содержание фотосинтетических пигментов микроводоросли *Porphyridium purpureum* // Морской биологический журнал. 2019. Т. 4, № 4. С. 34–40. DOI: <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.03>.
- Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin // Сибирский экологический журнал. 2011. Т. 18, № 1. С. 99–105. EDN: NDRYRP.
- Неврова Е. Л., Петров А. Н. Динамика роста бентосной диатомовой водоросли *Ardissonea Crystallina* (С. Agardh) Grunow, 1880 (Bacillariophyta) при воздействии ионов меди // Морской биологический журнал. 2022. Т. 7, № 4. С. 31–45. EDN: NGURDH.
- Неврова Е. Л., Снигирева А. А., Петров А. Н., Ковалева Г. В. Руководство по изучению морского микрофитобентоса и его применению для контроля качества среды / под ред. А. В. Гаевской. Севастополь ; Симферополь : Н. Орианда, 2015. 176 с. URL: <https://www.researchgate.net/publication/291148289>.
- Овсяный Е. И., Романов А. С., Игнатъева О. Г. Распределение тяжелых металлов в поверхностном слое донных осадков Севастопольской бухты (Черное море) // Морський екологічний журнал. 2003. Т. 2, № 2. С. 85–93. EDN: UCSJFH.
- Петров А. Н., Неврова Е. Л. Влияние антропогенного пресса на структуру таксоцены диатомовых водорослей (на примере Севастопольской бухты) // Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма : (черноморский сектор) / под ред. В. Н. Еремеева, А. В. Гаевской. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. С. 288–302.
- Петров А. Н., Неврова Е. Л. Оценка неоднородности распределения клеток при токсикологических экспериментах с клоновыми культурами бентосных диатомовых водорослей // Морской биологический журнал. 2020. Т. 5, № 2. С. 76–87. DOI: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.07>. EDN: ZBKKOV.
- Петров А. Н., Неврова Е. Л. Сравнительный анализ структуры таксоцены донных диатомовых (Bacillariophyta) в районах с различным уровнем техногенного загрязнения (Черное море, Крым) // Морський екологічний журнал. 2004. Т. 3, № 2. С. 72–83. EDN: UBXKHD.
- Петров А. Н., Неврова Е. Л., Малахова Л. В. Многомерный анализ распределения бентосных диатомовых (Bacillariophyta) в поле градиентов абиотических факторов в Севастопольской бухте (Черное море, Крым) // Морський екологічний журнал. 2005. Т. 4, № 3. С. 65–77. EDN: VLMFWX.
- Принципы и методы экологической токсикологии / под ред. Д. Б. Гелашвили. Нижний Новгород : Изд-во ННГУ, 2016. 702 с.
- Проблемы химического загрязнения вод Мирового океана. В 9 т. Т. 5. Эколого-токсикологические аспекты загрязнения морской среды / под ред. С. А. Патина. Ленинград, 1985. 120 с.
- Романова Д. Ю., Петров А. Н., Неврова Е. Л. Действие сульфата меди на рост и морфологию клеток клоновых культур четырех видов бентосных диатомовых водорослей (Bacillariophyta) Черного моря // Морской биологический журнал. 2017. Т. 2, № 3. С. 53–67. DOI: <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05>. EDN: ZQKYVX.
- Филенко О. Ф., Марушкина Е. В., Дмитриева А. Г. Оценка воздействия меди на модельную популяцию водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. методом микрокультур // Гидробиологический журнал. 2007. Т. 42, № 6. С. 53–61.
- Anantharaj K., Govindasamy C., Natanamurugaraj G., Jeyachandran S. Effect of heavy metals on marine diatom *Amphora coffeaeformis* (Agardh. Kutz) // Global Journal of Environmental Research. 2011. Vol. 5, Iss. 3. P. 112–117.
- Burgess R. M., Terletskaaya A. V., Milyukin M. V., Povolotskii M. [et al.]. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine // Marine Pollution Bulletin. 2009. Vol. 58, Iss. 8. P. 1103–1115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.013>.
- Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: Effects on photosynthesis and related parameters // Aquatic Toxicology. 1995. Vol. 31, Iss. 2. P. 165–174. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(94\)00071-w](https://doi.org/10.1016/0166-445x(94)00071-w).



- Crespo E., Lozano P., Blasco J., Moreno-Garrido I. Effect of copper, irgarol and atrazine on epiphytes attached to artificial devices for coastal ecotoxicology bioassays // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013. Vol. 91, Iss. 6. P. 656–600. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1122-4>.
- Florence T. M., Stauber J. L. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium* // *Aquatic Toxicology*. 1986. Vol. 8, Iss. 1. P. 11–26. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(86\)90069-x](https://doi.org/10.1016/0166-445x(86)90069-x).
- Kim J. W., Price N. M. The influence of light on copper-limited growth of an oceanic diatom, *Thalassiosira oceanica* (Coscinodiscophyceae) // *Journal of Phycology*. 2017. Vol. 53, Iss. 5. P. 938–950. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.12563>.
- Leung P. T. Y., Yi A. X., Ip J. C. H., Mak S. S. T. [et al.]. Photosynthetic and transcriptional responses of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to the combined effect of temperature stress and copper exposure // *Marine Pollution Bulletin*. 2017. Vol. 124, Iss. 2. P. 938–945. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.038>.
- Levy J., Stauber J. L., Jolley D. F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity // *Science of the Total Environment*. 2007. Vol. 387, Iss. 1–3. P. 141–154.
- Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Pheodactylum tricorutum* in the copper-polluted environment // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2006. Vol. 53, Iss. 3. P. 305–309. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1021443706030034>.
- Miazek K., Iwanek W., Remacle C., Richel A. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, Iss. 10. P. 23929–23969. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>.
- Niemiec M., Wiśniowska-Kielian B., Arasimowicz M., Kuzminowa N. Assessment of the Black Sea ecosystem pollution with copper and cadmium in selected bays of Sevastopol region // *Journal of Ecological Engineering*. 2015. Vol. 16, Iss. 5. P. 119–127. DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/60467>.
- Rijstenbil J. W., Gerringa L. J. A. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper // *Aquatic Toxicology*. 2002. Vol. 56, Iss. 2. P. 115–131. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00188-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00188-6).

## References

- Gaisina, L. A., Fazlutdinova, A. I., Kabirov, R. R. 2008. Modern methods of isolation and cultivation of algae. Ufa. (In Russ.)
- Markina, Zh. V. 2009. The effect of detergents and surfactants on the growth, physiological and biochemical parameters of unicellular algae (review). *Izvestiya TINRO*, 156, pp. 125–134. EDN: KUSPUB. (In Russ.)
- 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*, 4(4), pp. 34–40. DOI: <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.03>. (In Russ.)
- Markina, Zh. V., Ayzdaycher, N. A. 2011. Evaluation of water quality of Amur Bay of the Sea of Japan based on biotesting using the unicellular alga *Pheodactylum tricorutum* Bohlin. *Contemporary Problems of Ecology*, 18(1), pp. 99–105. EDN: NDRYRP. (In Russ.)
- Nevrova, E. L., Petrov, A. N. 2022. Growth dynamics of benthic diatom *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow 1880 (Bacillariophyta) under the copper ions impact. *Marine Biological Journal*, 7(4), pp. 31–45. EDN: NGURDH. (In Russ.)
- Nevrova, E. L., Snigireva, A. A., Petrov, A. N., Kovaleva, G. V. 2015. Guidelines from quality control of the Black Sea. Microphytobenthos. Ed. A. V. Gaevskaya. Simferopol. URL: <https://www.researchgate.net/publication/291148289>. (In Russ.)
- Ovsyaniy, E. I., Romanov, A. S., Ignatieva, O. G. 2003. Distribution of heavy metals in superficial layer of bottom sediments of Sevastopol bay (the Black Sea). *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2(2), pp. 85–93. EDN: UCBJFH. (In Russ.)
- Petrov, A. N., Nevrova, E. L. 2003. Influence of anthropogenic stress upon the taxocene structure of diatom alga (Sevastopol bay as an example). In *Modern condition of biological diversity in near-shore zone of Crimea (the Black Sea sector)*. Eds.: V. N. Ereemeev, A. V. Gaevskaya. Sevastopol, pp. 288–302. (In Russ.)
- Petrov, A. N., Nevrova, E. L. 2020. Estimation of cell distribution heterogeneity at toxicological experiments with clonal cultures of benthic diatoms. *Marine Biological Journal*, 5(2), pp. 76–87. DOI: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.07>. EDN: ZBK KOV. (In Russ.)
- Petrov, A. N., Nevrova, E. L. 2004. Comparative analysis of taxocene structures of benthic diatoms (Bacillariophyta) in regions with different level of technogenic pollution (the Black Sea, Crimea). *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 3(2), pp. 72–83. EDN: UBXKHD. (In Russ.)
- Petrov, A. N., Nevrova, E. L., Malakhova, L. V. 2005. Multivariate analysis of benthic diatoms distribution across the multidimensional space of the environmental factors gradient in Sevastopol Bay (the Black Sea, Crimea). *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 4(3), pp. 65–77. EDN: VLMFWX. (In Russ.)
- Principles and methods of environmental toxicology. 2016. Ed. D. B. Gelashvili. Nizhniy Novgorod. (In Russ.)

- Ecological and toxicological aspects of marine environment pollution. Vol. 5. 1985. Ed. S. A. Patin. Leningrad. (In Russ.)
- 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. *Marine Biological Journal*, 2(3), pp. 53–67. DOI: <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05>. EDN: ZQKYVX. (In Russ.)
- Fileiko, O. F., Marushkina, E. V., Dmitrieva, A. G. 2007. Assessment of the copper effect on the model population of the *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. by microculture method. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 42(6), pp. 53–61. (In Russ.)
- Anantharaj, K., Govindasamy, C., Natanamurugaraj, G., Jeyachandran, S. 2011. Effect of heavy metals on marine diatom *Amphora coffeaeformis* (Agardh. Kutz). *Global Journal of Environmental Research*, 5(3), pp. 112–117.
- Burgess, R. M., Terletskaia, A. V., Milyukin, M. V., Povolotskii, M. et al. 2009. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), pp. 1103–1115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.013>.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J. 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: Effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 31(2), pp. 165–174. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(94\)00071-w](https://doi.org/10.1016/0166-445x(94)00071-w).
- Crespo, E., Lozano, P., Blasco, J., Moreno-Garrido, I. 2013. Effect of copper, irgarol and atrazine on epiphytes attached to artificial devices for coastal ecotoxicology bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(6), pp. 656–600. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1122-4>.
- Florence, T. M., Stauber, J. L. 1986. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquatic Toxicology*, 8(1), pp. 11–26. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(86\)90069-x](https://doi.org/10.1016/0166-445x(86)90069-x).
- Kim, J. W., Price, N. M. 2017. The influence of light on copper-limited growth of an oceanic diatom, *Thalassiosira oceanica* (Coscinodiscophyceae). *Journal of Phycology*, 53(5), pp. 938–950. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.12563>.
- Leung, P. T. Y., Yi, A. X., Ip, J. C. H., Mak, S. S. T. et al. 2017. Photosynthetic and transcriptional responses of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to the combined effect of temperature stress and copper exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), pp. 938–945. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.038>.
- Levy, J., Stauber, J. L., Jolley, D. F. 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, 387(1–3), pp. 141–154.
- Markina, Zh. V., Aizdaicher, N. A. 2006. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Phaeodactylum tricorutum* in the copper-polluted environment. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(3), pp. 305–309. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1021443706030034>.
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A. 2015. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), pp. 23929–23969. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>.
- Niemiec, M., Wiśniowska-Kielian, B., Arasimowicz, M., Kuzminowa, N. 2015. Assessment of the Black Sea ecosystem pollution with copper and cadmium in selected bays of Sevastopol region. *Journal of Ecological Engineering*, 16(5), pp. 119–127. DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/60467>.
- Rijstenbil, J. W., Gerringa, L. J. A. 2002. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology*, 56(2), pp. 115–131. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00188-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00188-6).

#### Сведения об авторах

**Петров Алексей Николаевич** – пр. Нахимова 2, г. Севастополь, Россия, 299011; Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник;  
e-mail: alexpet-14@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0137-486X>

**Alexey N. Petrov** – 2 Nakhimov Ave., Sevastopol, Russia, 99011; Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher; e-mail: alexpet-14@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0137-486X>

**Неврова Елена Леонидовна** – пр. Нахимова 2, г. Севастополь, Россия, 299011; Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник;  
e-mail: el\_nevrova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9963-4967>

**Elena L. Nevrova** – 2 Nakhimov Ave., Sevastopol, Russia, 99011; Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Dr Sci. (Biology), Leading Researcher; e-mail: el\_nevrova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9963-4967>