



**ДИНАМИКА РОСТА БЕНТОСНОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ
ARDISSONEA CRYSTALLINA (С. AGARDH) GRUNOW, 1880 (BACILLARIOPHYTA)
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНОВ МЕДИ**

© 2022 г. **Е. Л. Неврова, А. Н. Петров**

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

Севастополь, Российская Федерация

E-mail: el_nevrova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.10.2020; после доработки 11.02.2021;
принята к публикации 26.09.2022; опубликована онлайн 29.11.2022.

Увеличение антропогенной нагрузки на прибрежные экосистемы Чёрного моря определяет необходимость постоянной оценки состояния сообществ планктона и бентоса. В качестве тест-объектов традиционно используют планктонные диатомовые микроводоросли, вносящие до 20–25 % глобальной первичной продукции, между тем как вклад микрофитобентоса сопоставим по своей значимости. Диатомовые бентоса обладают высокой чувствительностью к влиянию техногенных поллютантов, накапливающихся в донных отложениях. Изменение физиологических параметров бентосных Bacillariophyta объективно отражает воздействие различных токсикантов, что позволяет применять их как тест-объекты при опосредованной оценке качества морской среды. Целью работы было изучить динамику численности клеток клоновой культуры нового для практики биотестирования вида морской микроводоросли *Ardissonaea crystallina* (С. Agardh) Grunow, 1880 (Bacillariophyta) при воздействии разных концентраций $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в течение 10 суток. Данный вид микроводорослей характеризуется широкой встречаемостью в сублиторали Чёрного моря и высокой чувствительностью к различным техногенным поллютантам, включая тяжёлые металлы. Показано, что при концентрациях токсиканта от 32 до 128 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ (в пересчёте на ионы Cu^{2+}) динамика роста *A. crystallina* в целом соответствует кривой отклика тест-объекта в токсикологическом эксперименте. Выявлено снижение интенсивности прироста культуры и возрастание концентраций токсиканта в экспериментальной среде. При концентрациях ионов меди в диапазоне от 256 до 320 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ доля живых клеток в культуре монотонно уменьшается от 62–66 % (1-е сутки) до 34–37 % (10-е сутки); показатели прироста численности клеток в культуре демонстрируют отрицательную динамику в течение опыта — от –0,01 (на 2-е сутки) до –0,34 (на 10-е сутки). При концентрациях в культуральной среде ионов Cu^{2+} 384 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ и выше происходило резкое угнетение и последующее отмирание клеток *A. crystallina*, а для 448–1024 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ отмирание 100 % клеток отмечено уже на 3-и сутки эксперимента. Статистическое сравнение вариативности доли живых клеток *A. crystallina* и показателей удельного прироста их численности для контроля и концентраций ионов меди 64–128 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ продемонстрировало, что только на 10-е сутки различия между средними значениями параметров достоверны ($P = 0,002 \dots 0,020$). Изменение общей численности и доли живых клеток в культуре при 256 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ достоверно отличается ($P = 0,002 \dots 0,014$) от такового как при меньших, так и при более высоких концентрациях, что позволяет рассматривать этот уровень токсиканта как критический для обитания данного вида диатомовой водоросли: его превышение приводит к резкому усилению процесса отмирания клеток. С учётом полученных результатов вид *A. crystallina* может быть рекомендован для широкого использования в качестве тест-объекта в токсикологических экспериментах, а также при экологическом мониторинге и опосредованной оценке состояния прибрежных морских акваторий, подверженных техногенному загрязнению.

Ключевые слова: токсикологический эксперимент, ионы меди, клоновая культура, численность клеток, бентосные диатомовые водоросли, Чёрное море

Усиление антропогенной нагрузки на экосистему Чёрного моря, особенно проявляющееся в прибрежных акваториях, в том числе у берегов Крыма, определяет необходимость регулярной оценки состояния сообществ планктона и бентоса. В качестве одного из объектов для биотестирования и биоиндикации традиционно применяют планктонные микроводоросли, что объяснимо относительной простотой их культивирования и учёта в ходе экспериментов (Гелашвили и др., 2015 ; Неврова, 2015 ; Спиркина и др., 2014 ; Эколого-токсикологические аспекты, 1985). Следует отметить, что вклад микрофитобентоса (в который до 99 % численности и биомассы вносят представители отдела Bacillariophyta) в первичную продукцию морей и океанов сопоставим с таковым сообщества фитопланктона, определяющего 20–25 % глобальной продукции (Diatoms: Fundamentals and Applications, 2019 ; Kumar et al., 2015 ; The Diatom World, 2011). Наряду с высокой скоростью размножения, диатомовые бентоса характеризуются приуроченностью к определённым микробиотопам и чувствительностью к влиянию неблагоприятных экологических факторов (Маркина, 2009 ; Неврова и др., 2015 ; Романова и др., 2017). В связи с этим изменение физиологических параметров донных диатомовых (рост клеток, размножение, количественное развитие популяций) с большей объективностью (по сравнению с планктонными видами) отражает воздействие различных поллютантов, что позволяет использовать диатомовые бентоса как удобные тест-объекты при опосредованной оценке качества морской среды (Гелашвили и др., 2015 ; Маркина, 2009 ; Маркина и Айздайчер, 2007, 2011, 2019 ; Романова и др., 2017 ; Anantharaj et al., 2011 ; Florence & Stauber, 1986 ; Markina & Aizdaicher, 2006 ; Rijstenbil & Gerringa, 2002 ; The Diatom World, 2011 ; Yan et al., 2014).

Научно-методические подходы к использованию бентосных диатомовых для мониторинга прибрежных морских акваторий разработаны пока недостаточно (Anantharaj et al., 2011 ; Leung et al., 2017 ; Nagajoti et al., 2010) из-за сложностей их клонирования, культивирования и количественного учёта в эксперименте (Неврова и др., 2015 ; Петров и Неврова, 2020 ; Романова и др., 2017). Исследователи не только получают новые данные о диапазонах толерантности разных видов морских диатомовых при воздействии различных токсикантов (медь в ионной форме, СПАВы, пестициды и пр.) (Айздайчер и Реунова, 2002 ; Маркина, 2009 ; Маркина и Айздайчер, 2007), но и отрабатывают методические вопросы. К их числу относятся изучение особенностей содержания клоновых культур, определение критериев учёта живых клеток при визуальной оценке морфологических изменений и при фотофиксации, оценка прироста численности популяции, соотношение живых и мёртвых клеток тест-объектов при разных концентрациях токсиканта в культуральной среде, анализ абсорбции тяжёлых металлов клетками и др. (Спиркина и др., 2014 ; Ahalya et al., 2003 ; Anantharaj et al., 2011 ; Leung et al., 2017). Важным является и расширение знания о биологии развития различных таксонов Bacillariophyta.

Сульфат меди выбран как модельный токсикант для экспериментов по причине значимости соединений меди как в биогеохимическом цикле, так и в метаболизме гидробионтов. Медь является эссенциальным микроэлементом и играет важную роль в физиологических процессах, таких как азотный обмен, антиоксидантная защита (Cu/Zn-супероксиддисмутаза), перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий эукариот (цитохром-с-оксидаза) и др. (Гелашвили и др., 2015 ; Miazek et al., 2015 ; Smolyakov et al., 2010). Соединения меди массово встречаются в земной коре, образуя около 250 минералов, и являются наиболее распространённым техногенным поллютантом в водной среде и донных отложениях (Гелашвили и др., 2015 ; Smolyakov et al., 2010), в том числе в прибрежных акваториях Чёрного моря (Неврова и др., 2015). Ионы меди относятся к наиболее экологически опасным веществам (наряду с ионами ртути) и в повышенных концентрациях становятся остротоксичными для большинства морских и пресноводных гидробионтов (Гелашвили и др., 2015 ; Эколого-токсикологические аспекты, 1985).

При проведении токсикологических экспериментов по воздействию Cu^{2+} в составе CuSO_4 на низшие водные растения и планктонные формы Bacillariophyta отмечено ингибирование их роста при концентрации соединений меди порядка $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Гелашвили и др., 2015). Результаты оценки воздействия сульфата меди в различной концентрации на клетки планктонных форм *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin, 1964, *Ditylum brightwellii* (West) Grunow ex Van Heurck emend. Dzhafarova, 1984, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897 и *Thalassiosira oceanica* Hasle, 1983 (Маркина и Айздайчер, 2011, 2019; Ahalya et al., 2003; Cid et al., 1995; Florence & Stauber, 1986; Kim & Price, 2017; Markina & Aizdaicher, 2006; Rijstenbil & Gerringa, 2002; Yan et al., 2014) позволяют предположить выраженную видоспецифичность пороговой резистентности диатомовых водорослей к ионам меди.

Отметим, что принятые значения ПДК меди для морских вод составляют $5 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$, притом что содержание меди в прибрежной зоне морских акваторий может достигать $50\text{--}100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Маркина и Айздайчер, 2019). По нашему мнению, экологически более значимым для бентосных диатомовых является содержание меди не в толще воды, а в донных отложениях, поскольку в них аккумулируются поллютанты, а клетки микроводорослей обитают на поверхности частиц субстрата в свободноживущей либо прикрепленной форме. Известно, что в илистых грунтах прибрежных черноморских акваторий содержание меди может составлять от $0,4$ до $11,2 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ (Овсяный и др., 2003), а в техногенно загрязнённых бухтах — до 20 и даже $37 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого осадка (Петров и Неврова, 2003; Петров и др., 2005; Burgess et al., 2009). Установлено также, что ионы меди, наряду с ионами других тяжёлых металлов, накопленными в донных осадках, относятся к факторам, которые оказывают значимое воздействие на структуру таксоценоза и пространственное распределение донных диатомовых на рыхлых грунтах в акваториях, подвергнутых значительному техногенному загрязнению (Петров и Неврова, 2003, 2004; Петров и др., 2005).

Выбор *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 как модельного объекта для эксперимента обусловлен рядом причин. Вид характеризуется крупным размером клеток, что облегчает их учёт при фотофиксации и оценку прижизненного состояния, а также отсутствием затруднений при культивировании, высокой скоростью вегетативного размножения, прикрепленным образом жизни, способностью формировать колонии. По результатам молекулярно-генетических исследований и экспериментов по половому воспроизведению систематическое положение вида *A. crystallina*, ранее переведённого из класса Fragilariophyceae в класс Coscinodiscophyceae, а затем — в Mediophyceae, поставлено под сомнение. Предполагается, что *Ardissonea* (и иные представители Toxariales) могут формировать уникальную эволюционную группу, обособленную от других пениатных диатомовых и характеризующуюся необычным способом полового размножения (Davidovich et al., 2017). В недавних исследованиях некоторые виды из рода *Ardissonea* были переведены в иные роды, в частности *Ardissonea crystallina* — в *Synedrosphenia crystallina* (C. Agardh) Lobban & Ashworth comb. nov. (род *Synedrosphenia* (H. Peragallo ex H. Peragallo et M. Peragallo, 1897–1908) Azpeitia, 1911, emend. Lobban & Ashworth) (Lobban et al., 2022). Тем не менее, принимая во внимание палочковидную форму панциря и способность к образованию прикрепленных к субстрату пучковидных колоний, а также опираясь на таксономическую систему (Round et al., 1990), мы в целях своего исследования рассматриваем данный вид именно в классе Fragilariophyceae (к каковому он и относился до недавнего времени). Отметим, что данная работа — продолжение серии экспериментов по выявлению видоспецифичной толерантности у донных диатомовых, являющихся представителями трёх разных классов Bacillariophyta, с присущими им морфологическими особенностями и с различными жизненными формами. Ранее статистически была подтверждена достоверность выборочной оценки распределения клеток представителей трёх классов, в том числе *A. crystallina*, в экспериментальном сосуде (Петров и Неврова, 2020).

Цель работы — изучить динамику прироста численности и отмирания клеток морской бентосной диатомовой водоросли *Ardissonea crystallina* в ходе 10-суточных экспериментов под воздействием широкого диапазона концентраций токсиканта (ионов меди) в культуральной среде и оценить пригодность использования данного вида в качестве нового для экотоксикологии тест-объекта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследований. Тест-объектом послужила клоновая культура бентосной диатомовой водоросли *A. crystallina* (Bacillariophyta), выделенная из фитоперифитона искусственного субстрата, который был отобран в Казачьей бухте (акватория у г. Севастополя) в ноябре 2018 г. на глубине 5 м. Для получения клоновой линии одиночную клетку изолировали с помощью микропипетки под бинокуляром МБС-10 при увеличении $\times 40$ и семикратно промыли питательной средой (Гайсина и др., 2008 ; Петров и Неврова, 2020 ; Романова и др., 2017). Вид морской, бентосный, часто встречается в прибрежных районах; клетки прикрепляются к поверхности субстрата, образуя пучковидные колонии из 4–30 особей (Петров и Неврова, 2020). Створки узколинейные, длина 410 мкм, ширина 18 мкм (см. 1–6 на рис. 1). Размеры клеток указаны на момент начала культивирования.

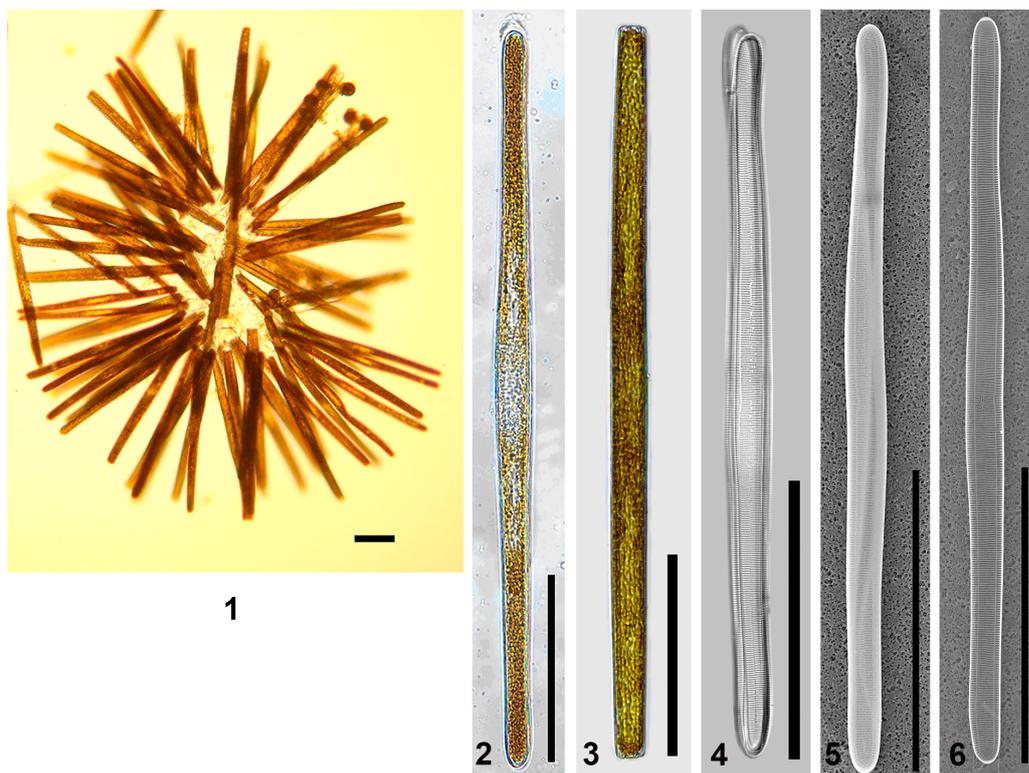


Рис. 1. Используемый в эксперименте новый тест-объект — морская бентосная диатомовая водоросль *Ardissonea crystallina*: 1 — колония живых клеток (СМ, $\times 10$, масштаб 10 мкм); 2 — живая клетка со створки (СМ, $\times 60$, масштаб 100 мкм); 3 — живая клетка с пояска (СМ, $\times 60$, масштаб 100 мкм); 4 — створка, вид снаружи (СМ, $\times 100$, масштаб 100 мкм); 5 — створка, вид снаружи (СЭМ, $\times 550$, масштаб 100 мкм); 6 — створка, вид изнутри (СЭМ, $\times 550$, масштаб 100 мкм) (СМ — световой микроскоп; СЭМ — сканирующий электронный микроскоп)

Fig. 1. Marine benthic diatom *Ardissonea crystallina* used in the experiment as a new test object: 1, colony of alive cells (LM, $\times 10$, scale bar 10 μm); 2, alive cell, valve view (LM, $\times 60$, scale bar 100 μm); 3, alive cell, band view (LM, $\times 60$, scale bar 100 μm); 4, valve external view (LM, $\times 100$, scale bar 100 μm); 5, valve external view (SEM, $\times 550$, scale bar 100 μm); 6, valve internal view (SEM, $\times 550$, scale bar 100 μm) (LM denotes light microscope; SEM, scanning electron microscope)

Содержание культуры. Клоновую линию *A. crystallina* содержали на питательной среде Гольдберг (Andersen et al., 2005), модифицированной для оптимального культивирования морских бентосных диатомовых (Петров и Неврова, 2020), при постоянной температуре (15 ± 2) °C и рассеянном естественном освещении. Морскую воду для приготовления среды отбирали в 12-мильной зоне побережья Крыма в ходе научных рейсов НИС «Профессор Водяницкий», фильтровали через фильтр 0,45 мкм и трижды пастеризовали при +75 °C; затем вносили питательные вещества в соответствии с протоколом (Петров и Неврова, 2020).

Микрофотографирование. В процессе эксперимента микрофотографирование живых клеток осуществляли с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axiostar Plus с объективом Achroplan $\times 10$ и камерой Canon PowerShot A640 (отдел экологии бентоса ФИЦ ИнБЮМ). Микрофотографии живых и очищенных створок для таксономического определения получали под инвертированным световым микроскопом Nikon Eclipse Ts2R с объективом Plan Fluor $\times 60$ OFN25 DIC и камерой Infinity3-6UR, под световым микроскопом Carl Zeiss Primostar Plus с объективом N-Achroplan $\times 100$ и интегрированной камерой (лаборатория биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана ФИЦ ИнБЮМ), а также с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500. Идентификацию вида проводили в соответствии с определителями (Гусяков и др., 1992 ; Witkowski et al., 2000).

Схема эксперимента. Был приготовлен стоковый раствор с концентрацией $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, равной $40\,000 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ($10\,240 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ в пересчёте на ионы Cu^{2+}). В экспериментах по исследованию воздействия ионов меди в каждую чашку Петри диаметром 90 мм вносили микропипеткой-дозатором определённое количество питательной среды и стокового раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, а также 1 мл инокулята клоновой культуры *A. crystallina* таким образом, чтобы общий объём жидкости в каждой чашке составил 30 мл. Для получения тестовых растворов с возрастающими концентрациями ионов меди (от 32 до $1024 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) в чашки Петри вносили различные аликвоты стокового раствора (от 0,09 до 3 мл) (табл. 1). Воздействие каждой концентрации ионов меди исследовали в трёх повторностях. Продолжительность всех экспериментов составляла 10 суток. Чашки Петри герметизировали плёнкой Parafilm® во избежание контаминации либо испарения экспериментального раствора.

Таблица 1. Схема эксперимента для исследования влияния сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) на рост клоновой культуры *A. crystallina*

Table 1. Design of the experimental study of copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) effect on the growth of *A. crystallina* clonal strain

Концентрация $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в экспериментальном растворе, $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$	Концентрация Cu^{2+} в экспериментальном растворе, $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$	Объём вносимого в чашку стокового раствора, мл	Объём питательной среды, мл	Объём инокулята, мл
Контроль	0	0	29,00	1
125	32	0,09	28,91	1
250	64	0,19	28,81	1
500	128	0,38	28,62	1
1000	256	0,75	28,25	1
1250	320	0,94	28,06	1
1500	384	1,13	27,87	1
1750	448	1,31	27,69	1
2000	512	1,50	27,50	1
4000	1024	3,00	26,00	1

Нам неизвестны данные об использовании микроводоросли *A. crystallina* в практике биотестирования, особенностях развития культуры в течение продолжительного периода, уровнях резистентности клеток этого вида к действию меди, а также ПДК меди и других металлов для морских грунтов. Именно поэтому для выявления критических диапазонов концентрации ионов меди эксперимент проводили в два последовательных этапа. На первом этапе, помимо контроля (питательная среда Гольдберг без добавления токсиканта), проводили тестирование *A. crystallina* на воздействие двукратно возрастающих концентраций токсиканта — 32, 64, 128, 256, 512 и 1024 мкг·л⁻¹ (в пересчёте на ионы Cu²⁺).

По итогам первого этапа тестов установили, что пороговые концентрации ионов меди, при которых начинается резкое отмирание клеток данного вида в культуре, находятся в диапазоне от 256 до 512 мкг·л⁻¹. В связи с этим провели второй этап эксперимента, в ходе которого тестировали промежуточные концентрации ионов меди — 320, 384 и 448 мкг·л⁻¹. Отклик культуры на воздействие токсиканта оценивали по изменению доли живых клеток (%). Все эксперименты выполняли в трёх повторностях для каждой концентрации и периода экспозиции (через 1, 3, 5, 7 и 10 суток). Подсчёт клеток и контроль их прижизненного состояния проводили визуально по микрофотографиям. Клетку определяли как живую по форме и целостности панциря, неизменности структуры и цвета хлоропластов, разделению клеток после вегетативного деления. В случае лизиса клеточного содержимого, резкого потемнения хлоропластов, раскрытия панциря клетку определяли как мёртвую. Численность живых и мёртвых клеток в каждый период экспозиции рассчитывали по усреднённым данным, которые были получены в 12–16 случайных полях зрения, сфотографированных в экспериментальных чашках Петри с площадью дна около 5700 мм². Помимо доли живых клеток, для всех тестируемых концентраций ионов меди оценивали также скорость прироста (отмирания) численности клеток (кл.·сут⁻¹); это один из базовых показателей, используемых в токсикологии для оценки состояния популяций микроводорослей (Маркина и Айздайчер, 2007, 2019; Спиркина и др., 2014; Филенко и др., 2006). Скорость прироста численности клеток в культуре оценивали по числу клеточных делений (ν) в сутки и рассчитывали по формуле (Шлегель, 1987):

$$\nu = \frac{\ln N_{(t+\Delta t)} - \ln N_t}{\Delta t \times \ln 2}, \quad (1)$$

где N_t — средняя численность клеток в культуре в момент времени t (1-е сутки эксперимента);

$N_{(t+\Delta t)}$ — средняя численность клеток в культуре в момент времени $t + \Delta t$ (3, 5, 7 и 10-е сутки);

Δt — период экспозиции (сутки).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка результатов экспериментов проведена с применением стандартных алгоритмов вариационного параметрического и рангового анализов, входящих в пакет статистических программ SigmaPlot 11.5 (2021).

Сравнение дисперсий трёх независимых повторностей для каждой концентрации токсиканта проведено для уровня значимости $P = 0,05$ по критерию Фишера (ANOVA). Сравнение достоверности различий средних значений численности и доли живых клеток, а также скорости прироста клеток при различных периодах экспозиции выполнено на основе t -критерия Стьюдента (в случае нормальности распределения вариантов и равенства дисперсий). Для сравнения независимых выборок, в которых распределение вариантов отличалось от нормального, применены непараметрические критерии Манна — Уитни (Mann–Whitney U test), Холма — Шидака (Holm–Šidák test) (для равных по объёму выборок) и Данна (Dunn's test) (при сравнении разноразмерных выборок) (SigmaPlot NG, 2021). Средние значения параметров и стандартные ошибки выборки (SE) представлены на рис. 2 и в табл. 2 и 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что при концентрациях меди в экспериментальных чашках от 32 до 128 мкг·л⁻¹ (в пересчёте на ионы Cu²⁺) изменение доли живых клеток и прирост численности *A. crystallina* в целом соответствуют кривой отклика тест-объекта в токсикологическом опыте (Гелашвили и др., 2015). В течение 1-х суток в чашках с различными концентрациями ионов Cu²⁺ не было статистически достоверных отличий ($P = 0,30...0,39$) между средними значениями параметра (доля живых клеток в 12–16 полях зрения составила 56–60 %). По прошествии 1-х суток эксперимента для концентраций ионов меди 32–128 мкг·л⁻¹ наблюдали короткий период адаптации клеток (для контроля и при минимальной концентрации Cu²⁺, 32 мкг·л⁻¹) либо отсутствие лаг-фазы. В период с 3-х по 7-е сутки выявлены рост значений параметра и выход на плато; с 7-х по 10-е сутки опыта отмечено снижение значений (рис. 2, табл. 2). В период с 3-х по 7-е сутки (по средним значениям из выборочных полей зрения) не выявлено статистически достоверного влияния ($P = 0,18...0,93$) разных концентраций токсиканта на показатели прироста численности и доли живых клеток тест-объекта. Достоверное снижение ($P = 0,002...0,020$) значений тест-параметров отмечено в период с 7-х по 10-е сутки опыта, что напрямую может быть вызвано негативным влиянием высоких концентраций токсиканта в экспериментальной среде.

При концентрациях в экспериментальных чашках ионов меди 256 мкг·л⁻¹ и выше доля живых клеток в культуре на всех этапах эксперимента, начиная с 3-х суток, была достоверно ниже ($P = 0,002...0,014$), чем при концентрациях Cu²⁺ в диапазоне 32–128 мкг·л⁻¹. При 256–320 мкг·л⁻¹ доля живых клеток монотонно снижалась от 47–49 % (на 3-и сутки) до 34–37 % (на 10-е сутки), без выраженных перегибов в модельной кривой отклика. Установленную в ходе экспериментов критическую концентрацию токсиканта (256 мкг·л⁻¹ в пересчёте на ионы Cu²⁺) можно рассматривать в качестве пороговой: при её достижении происходит статистически достоверное угнетение ростовой активности и физиологического состояния клоновой тест-культуры.

При концентрациях ионов меди 384 мкг·л⁻¹ и выше отмечено резкое угнетение клоновой культуры в экспериментальных чашках уже с 1-х суток опыта. На 5-е сутки доля живых клеток в культуре снижалась до 0 %. Для концентраций ионов меди 448–1024 мкг·л⁻¹ фактически полное отмирание клеток отмечено уже на 3-и сутки эксперимента (см. рис. 2, табл. 2).

Вариативность данных при подсчёте числа клеток в полях зрения в разные периоды эксперимента заметно различалась. Так, коэффициент вариации в выборках *A. crystallina* в течение 1-х суток с начала эксперимента составлял до 46 %, через 5 суток — 31 %, что может быть связано с неравномерностью распределения, когда наряду с одиночно расположенными клетками в полях зрения присутствуют и их агрегации, в которых клетки образуют пучковидные колонии, прикреплённые ко дну чашки в одной точке (см. 1 на рис. 1). Результаты анализа показали, что дисперсии выборок при сравнении трёх повторностей статистически не различаются: $P = 0,25...0,28$ (через сутки) и $P = 0,09...0,23$ (через пять суток). Все попарные различия по средней численности клеток *A. crystallina* между повторностями как на 1-е, так и на 5-е сутки экспозиции недостоверны ($P_{эксн} \gg 0,05$). Можно считать, что вариативность средней численности клеток в разных повторностях эксперимента не выходит за пределы статистической погрешности, что даёт основание рассматривать все повторности (случайные выборки клеток) как принадлежащие одной исходно взятой совокупности со сходным характером вариативности показателей (Петров и Неврова, 2020). Данный факт является важным аспектом для корректного сравнения различий в абсолютной численности клеток в чашках на разных стадиях эксперимента и при разных концентрациях токсиканта.

Таблица 2. Доля (%) живых клеток *A. crystallina* (среднее \pm SE) при разных концентрациях токсиканта (в пересчёте на ионы Cu^{2+}) и сроках экспозиции (объединены результаты первого и второго этапов)

Table 2. Ratio (%) of *A. crystallina* alive cells (mean \pm SE) at different toxicant concentrations (in terms of Cu^{2+} ions) and exposure time (results of the first and second stages are combined)

Концентрация Cu^{2+} , $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки	10-е сутки	<i>P</i> (7-е сутки vs. 10-е сутки)
Контроль	63 \pm 3	67 \pm 2	85 \pm 2	84 \pm 2	76 \pm 3	0,071
32	58 \pm 1	75 \pm 4	86 \pm 4	84 \pm 1	81 \pm 3	0,248
64	60 \pm 6	79 \pm 2	86 \pm 1	80 \pm 1	67 \pm 4	0,002
128	60 \pm 2	83 \pm 2	83 \pm 2	79 \pm 4	65 \pm 10	0,003
256	56 \pm 2	77 \pm 6	79 \pm 1	77 \pm 3	60 \pm 1	0,017
320	58 \pm 2	49 \pm 1	47 \pm 2	44 \pm 1	46 \pm 5	0,398
384	30 \pm 5	22 \pm 3	8 \pm 1	0,8 \pm 0,8	0,6 \pm 0,6	0,412
448	21 \pm 5	0,6 \pm 0,4	0	1,0 \pm 0,6	0,5 \pm 0,5	–
512	13 \pm 3	0,3 \pm 0,1	0	0	0	–
1024	3,6 \pm 1	0,2 \pm 0,1	0	0	0	–

Примечание: *P* — уровень значимости отсутствия различий между средними значениями параметра при сравнении доли живых клеток на 7-е и 10-е сутки эксперимента. Статистически значимые различия выделены жирным шрифтом.

Note: *P* is significance level of no differences between the mean values of the indicator when comparing the ratio of alive cells on the 7th and 10th days of the experiment. Statistically significant differences are highlighted in bold.

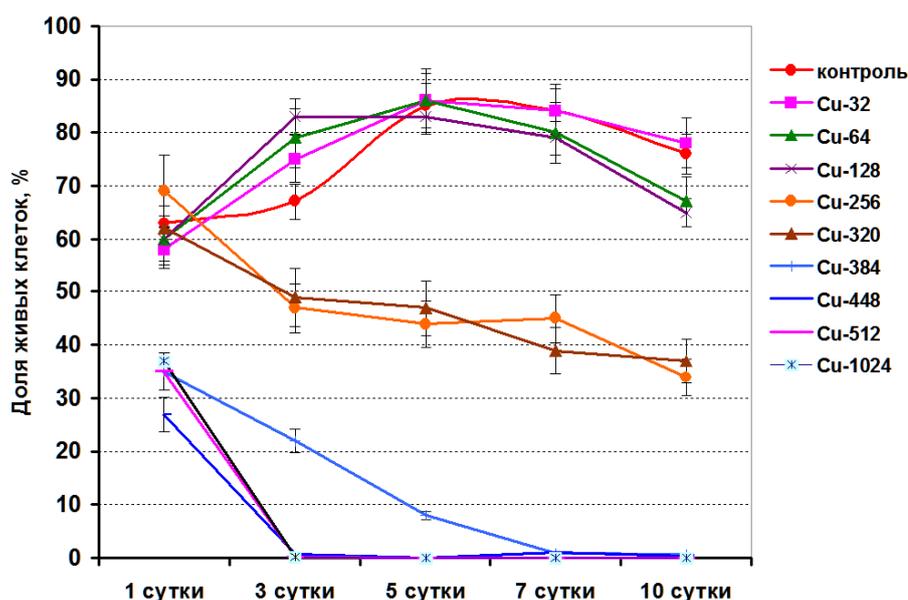


Рис. 2. Изменения доли (%) живых клеток (среднее \pm SE) в культуре *A. crystallina* в ходе эксперимента при разных концентрациях токсиканта (в пересчёте на ионы Cu^{2+})

Fig. 2. Changes in the ratio (%) of alive cells (mean \pm SE) in *A. crystallina* clonal strain during the experiment at different toxicant concentrations (in terms of Cu^{2+} ions)

Дополнительным показателем оценки токсического влияния меди на культуру *A. crystallina* послужило среднее число клеточных делений в сутки (ν). Сопоставление средних значений удельных приростов численности клеток в культуре при разных концентрациях токсиканта отражено в табл. 3. Установлено, что в первые трое суток культура характеризуется положительным приростом в диапазоне концентраций от 32 до 128 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. Важно отметить, что с возрастанием концентраций ионов меди повышалась и суточная скорость прироста; наибольший удельный прирост

выявлен при $128 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. Возможно, именно при этой концентрации происходит первичная стимуляция ионами меди процессов роста и деления клеток (Филенко и др., 2006). Так, по сравнению с контролем, скорость деления клеток *A. crystallina* возросла в 18 раз (с 0,17 до 3 делений в сутки); между тем уже при $256 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ она замедлилась практически до нуля. При концентрациях токсиканта $320 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ и выше прирост численности становился отрицательным, а скорость отмирания клеток увеличивалась (см. табл. 3). Отметим, что в контроле удельная скорость прироста численности сначала возрастала (до 0,42 деления на 7-е сутки), а после снижалась (до 0,21 деления на 10-е сутки), в культуре было зарегистрировано заметное отмирание клеток. В целом прирост численности клеток наблюдался по 5-е сутки эксперимента при концентрациях токсиканта от 32 до $128 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. При более высоких концентрациях ионов меди и больших сроках экспозиции были выявлены отрицательные значения прироста численности клеток в тест-культуре.

Таблица 3. Сопоставление удельного прироста численности клеток *A. crystallina* (v , кл.·сут $^{-1}$) в разные периоды эксперимента и при разных концентрациях токсиканта (в пересчёте на ионы Cu^{2+})

Table 3. Comparison of the specific growth in *A. crystallina* cell abundance (v , cells·day $^{-1}$) at different stages of experiment and different toxicant concentrations (in terms of Cu^{2+} ions)

Концентрация ионов меди	Период			
	С 1-х по 3-и сутки	С 3-х по 5-е сутки	С 5-х по 7-е сутки	С 7-х по 10-е сутки
Контроль	0,17 ± 0,04	0,27 ± 0,07	0,42 ± 0,10	0,21 ± 0,06
32	1,15 ± 0,11	0,30 ± 0,03	0,03 ± 0,01	-0,03
64	1,60 ± 0,05	0,11 ± 0,01	-0,12	-0,13
128	3,00 ± 0,32	0,06 ± 0,01	-0,13	-0,11
256	-0,01	-0,10	-0,19	-0,04
320	-0,02	-0,11	-0,25	-0,34
384	-0,04	-0,32	-0,47	
448	-0,48	-0,50		
512	-0,49	-0,50		
1024	-0,47			

Примечание: значения положительного прироста числа клеток выделены жирным шрифтом.

Note: values of positive increase in cell abundance are highlighted in bold.

В наших экспериментах выявлена более высокая резистентность клеток бентосной диатомовой водоросли *A. crystallina* к воздействию меди, чем у планктонных микроводорослей. Так, в работе по изучению воздействия хлорида меди на выживание и размножение *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, 1835 (Филенко и др., 2006) отмечено, что заметное снижение общей численности и доли живых клеток происходит уже при концентрации меди $10\text{--}100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ на экспоненциальной фазе роста культуры (10–14-е сутки). При этом через 14 дней эксперимента доля активно размножающихся клеток не превышала 10 % уже при $1\text{--}10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$, а остальная часть культуры находилась в покоящейся стадии, не оказывая влияние на показатели прироста численности клеток в тест-культуре. При тестировании влияния ионов меди на другую планктонную микроводоросль, *Porphyridium purpureum* (Bory) K. M. Drew & R. Ross, 1965 (Маркина и Айздайчер, 2019), показано, что при концентрациях токсиканта $50\text{--}100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ отмечены выраженное угнетение роста популяции и снижение содержания в клетках фотосинтетических пигментов, по сравнению с контролем, уже на 4-е сутки. Установлено также, что тяжёлые металлы (медь и кадмий) подавляют рост клеток и могут вызывать нарушение клеточной мембраны, что приводит к уменьшению содержания пигментов хлорофилла бентосной диатомовой *Amphora coffeaeformis* (C. Agardh) Kützing, 1844 в диапазоне концентраций ионов меди от $0,02$ до $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Anantharaj et al., 2011).

Угнетение роста численности и физиологического состояния клеток *A. crystallina* и других видов микроводорослей может быть связано как с негативным воздействием ионов меди на фотосинтетический аппарат и повреждением мембран хлоропластов, которые участвуют в синтезе аминокислот и фитогормонов, влияющих на рост популяции (Kiseleva et al., 2012), так и с процессом подавления вегетативного размножения клеток (Филенко и др., 2006). Более высокая резистентность к токсическому воздействию меди у бентосной диатомовой *A. crystallina*, чем у планктонных видов, может быть обусловлена наличием толстого силифицированного одностеночного (single-wall) с псевдосептами панциря, который снабжён сложной системой ареол, обеспечивающих контакт с водной средой, но не допускающих непосредственного поступления частиц грунта внутрь клетки (Lobban et al., 2022 ; The Diatom World, 2011). Именно подобные морфологические адаптации обуславливают устойчивое развитие бентосных диатомовых на рыхлом донном субстрате, в котором уровни содержания меди значительно выше, чем в водной толще. Помимо этого, диатомовые водоросли обладают уникальной способностью к биоаккумуляции тяжёлых металлов — к их накоплению до значений в десятки тысяч раз выше, чем в окружающей среде. Повышенное содержание меди может также вызывать у диатомовых водорослей дополнительное выделение полисахаридной слизи, что служит одним из универсальных механизмов детоксикации тяжёлых металлов, включая медь (Crespo et al., 2013 ; Miazek et al., 2015). Представляется важным продолжить исследования по оценке состояния донных диатомовых с целью определения видоспецифичных пороговых концентраций токсикантов для более полного понимания характера отклика этой ключевой для бентосных морских экосистем группы одноклеточных автотрофов.

Заключение. В ходе 10-суточных токсикологических экспериментов с новым тест-объектом, морской бентосной диатомовой водорослью *Ardissonea crystallina*, проанализированы разные типы отклика на воздействие меди — изменение общей численности клеток, доли живых клеток и удельной скорости роста популяции — при концентрациях ионов меди в диапазоне от 32 до 1024 мкг·л⁻¹. Установлено, что при концентрациях Cu²⁺ от 32 до 128 мкг·л⁻¹ динамика удельного прироста численности и выживания клеток *A. crystallina* в целом соответствует сигмоидной кривой отклика тест-объекта в токсикологическом опыте: минимальный период лаг-фазы (1-е сутки эксперимента), выход на плато (с 3-х по 7-е сутки) и более или менее выраженный отрицательный удельный прирост численности клеток в культурах (с 7-х по 10-е суток). Выявлена зависимость, при которой с увеличением концентрации токсиканта происходит достоверное снижение доли живых клеток и интенсивности удельного прироста в культуральной среде. Впервые установлена критическая (пороговая) концентрация (256 мкг·л⁻¹ в пересчёте на ионы Cu²⁺), при достижении которой отмечено статистически достоверное угнетение ростовой активности и физиологического состояния клоновой тест-культуры. Эта пороговая концентрация значительно выше (в 3–10 раз), чем экспериментально полученные пороговые концентрации меди, критичные для выживания и роста некоторых видов планктонных микроводорослей. При концентрациях меди 384 мкг·л⁻¹ и выше уже с 1-х суток опыта происходило резкое угнетение и последующее отмирание клеток *A. crystallina*; на 5–7-е сутки смертность клеток достигала 100 %. При 448–1024 мкг·л⁻¹ прекращение прироста и полное отмирание клеток отмечено уже на 3-и сутки эксперимента.

Более высокая резистентность *A. crystallina* к токсическому воздействию меди, чем у планктонных видов, обусловлена, по-видимому, адаптациями, обеспечивающими устойчивое развитие бентосных диатомовых при непосредственном контакте с рыхлым донным субстратом, в котором поллютанты накапливаются в значительно бóльших концентрациях, чем в водной толще. Результаты экспериментов позволяют рекомендовать бентосную диатомовую микроводоросль *A. crystallina* в качестве нового тест-объекта для токсикологических экспериментов с тяжёлыми металлами, а также при экологическом мониторинге прибрежных морских акваторий в условиях высокого техногенного загрязнения донных биотопов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации 121030100028-0).

Благодарность. Авторы выражают благодарность руководителю лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана ФИЦ ИнБЮМ к. б. н. О. В. Кривенко за предоставленное оборудование, ведущим инженерам С. А. Трофимову и Ю. И. Литвину — за помощь при содержании клоновых культур, проведении экспериментов и обработке полученных данных, ведущему инженеру В. Н. Лишаеву — за микрофотографирование на сканирующем электронном микроскопе Hitachi SU3500.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Айздайчер Н. А., Реунова Ю. А. Влияние детергентов на рост диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* в культуре // *Биология моря*. 2002. Т. 28, № 5. С. 362–365. [Aizdaicher N. A., Reunova Yu. A. The effect of detergents on growth of the diatom *Thalassiosira pseudonana* in culture. *Biologiya morya*, 2002, vol. 28, no. 5, pp. 362–365. (in Russ.)]
2. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабилов Р. Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей* : учебное пособие. Уфа : Изд-во БГПУ, 2008. 152 с. [Gaisina L. A., Fazlutdinova A. I., Kabirov R. R. *Sovremennye metody vydeleniya i kul'tivirovaniya vodoroslei* : uchebnoe posobie. Ufa : Izd-vo BGPU, 2008, 152 p. (in Russ.)]
3. Гелашвили Д. Б., Безель В. С., Романова Е. Б., Безруков М. Е., Силкин А. А., Нижегородцев А. А. *Принципы и методы экологической токсикологии*. Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет, 2015. 142 с. [Gelashvili D. B., Bezel V. S., Romanova E. B., Bezrukov M. E., Silkin A. A., Nizhegorodtsev A. A. *Printsipy i metody ekologicheskoi toksikologii*. Nizhnii Novgorod : Nizhegorodskii gosuniversitet, 2015, 742 p. (in Russ.)]
4. Гусяков Н. Е., Закордонец О. А., Герасимюк В. П. *Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Чёрного моря и прилегающих водоёмов*. Киев : Наукова думка, 1992. 115 с. [Guslyakov N. E., Zakordonets O. A., Gerasimyuk V. P. *Atlas diatomovykh vodoroslei bentosa severo-zapadnoi chasti Chernogo morya i prilegayushchikh vodoemov*. Kyiv : Naukova dumka, 1992, 115 p. (in Russ.)]
5. Маркина Ж. В. Действие детергентов и поверхностно-активных веществ на рост, физиологические и биохимические показатели одноклеточных водорослей (обзор) // *Известия ТИНРО*. 2009. Т. 156. С. 125–134. [Markina Zh. V. Influence of detergents and surface-active substances on unicellular algae growth, physiological and biochemical parameters (review). *Izvestiya TINRO*, 2009, vol. 156, pp. 125–134. (in Russ.)]
6. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Влияние детергентов на динамику численности и физиологическое состояние бентосной микроводоросли *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) в культуре // *Биология моря*. 2007. Т. 33, № 6. С. 432–439. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. The influence of detergents on the abundance dynamics and physiological state of the benthic microalgae *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Biologiya morya*, 2007, vol. 33, no. 6, pp. 432–439. (in Russ.)]
7. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Pheodactylum tricornerutum* Bohlin // *Сибирский экологический журнал*. 2011. Т. 18, № 1. С. 99–105. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin bioassay of water quality of Amur Bay (the Sea of Japan). *Contemporary Problems of Ecology*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 74–79. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S1995425511010127>
8. Маркина Ж. В., Айздайчер А. Н. Влияние меди на численность, морфологию клеток и содержание фотосинтетических пигментов микроводоросли *Porphyridium purpureum* // *Морской биологический журнал*. 2019. Т. 4, № 4. С. 34–40. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. The effect of copper on the abundance, cell morphology and content of photosynthetic

- pigments in the microalga *Porphyridium purpureum*. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 34–40. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.03>
9. Неврова Е. Л. *Бентосные диатомовые водоросли (Bacillariophyta) Чёрного моря: разнообразие и структура таксоценов различных биотопов* : дис. ... д-ра биол. наук. Москва, 2015. 445 с. [Nevrova E. L. *Bentosnye diatomovye vodorosli (Bacillariophyta) Chernogo morya: raznoobrazie i struktura taksotsenov razlichnykh biotopov*. [dissertation]. Moscow, 2015, 445 p. (in Russ.)]. <https://dlib.rsl.ru/01005555099>
 10. 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. [Nevrova E. L., Snigireva A. A., Petrov A. N., Kovaleva G. V. *Guidelines From Quality Control of the Black Sea. Microphytobenthos / A. V. Gaevskaya (Ed.)*. Sevastopol ; Simferopol : N.Orianda, 2015, 176 p. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/978-5-9907290-2-5>*
 11. Овсяный Е. И., Романов А. С., Игнатьева О. Г. Распределение тяжёлых металлов в поверхностном слое донных осадков Севастопольской бухты (Чёрное море). *Морской экологический журнал*. 2003. Т. 2, № 2. С. 85–101. [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, vol. 2, no. 2, pp. 85–101. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/710>
 12. Петров А. Н., Неврова Е. Л. Влияние антропогенного пресса на структуру таксоценов 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. [Petrov A. N., Nevrova E. L. Anthropogenic press on the diatom algae taxocene structure (Sevastopol Bay as an example). In: *Modern Condition of Biological Diversity in Near-shore Zone of Crimea (the Black Sea Sector) / V. N. Eremeev, A. V. Gaevskaya* (Eds). Sevastopol : EKOSI-Gidrofizika, 2003, pp. 288–302. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/966-02-3133-4>*
 13. Петров А. Н., Неврова Е. Л. Сравнительный анализ структуры таксоценов донных диатомовых (Bacillariophyta) в районах с различным уровнем техногенного загрязнения (Чёрное море, Крым) // *Морской экологический журнал*. 2004. Т. 3, № 2. С. 72–83. [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, vol. 3, no. 2, pp. 72–83. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/748>
 14. Петров А. Н., Неврова Е. Л., Малахова Л. В. Многомерный анализ распределения бентосных диатомовых (Bacillariophyta) в поле градиентов абиотических факторов в Севастопольской бухте (Чёрное море, Крым) // *Морской экологический журнал*. 2005. Т. 4, № 3. С. 65–77. [Petrov A. N., Nevrova E. L., Malakhova L. V. Multivariate analysis of benthic diatoms distribution across the multidimensional space of the environmental factors gradient in Sevastopol Bay (the Black Sea, Crimea). *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2005, vol. 4, no. 3, pp. 65–77. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/812>
 15. 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. [Petrov A. N., Nevrova E. L. Estimation of cell distribution heterogeneity at toxicological experiments with clonal cultures of benthic diatoms. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 76–87. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.07>
 16. 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. Т. 2, № 3. С. 53–67. [Romanova D. Yu., Petrov A. N., Nevrova E. L. Copper sulphate impact on growth and cell morphology of clonal strains of four

- benthic diatom species (Bacillariophyta) from the Black Sea. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 53–67. (in Russ.). <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05>
17. Спиркина Н. Е., Ипатова В. И., Дмитриева А. Г., Филенко О. Ф. Сравнительная динамика роста культур микроводорослей видов *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind. и *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. // *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*. 2014. Т. 119, вып. 2. С. 64–69. [Spirkina N. E., Ipatova V. I., Dmitrieva A. G., Filenko O. F. Comparative growth of microalgae cultures of species *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind. and *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series*, 2014, vol. 119, iss. 2, pp. 64–69. (in Russ.)]
 18. Филенко О. Ф., Марушкина Е. В., Дмитриева А. Г. Оценка воздействия меди на модельную популяцию водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. методом микрокультур // *Гидробиологический журнал*. 2006. Т. 42, № 6. С. 53–61. [Filenko O. F., Marushkina E. V., Dmitrieva A. G. Assessment of impact of copper on a model population of alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. by a microculture method. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 2006, vol. 42, no. 6, pp. 53–61. (in Russ.)]
 19. Шлегель Г. *Общая микробиология* : пер. с нем. Москва : Мир, 1987. 567 с. [Schlegel H. G. *Allgemeine Mikrobiologie*. Moscow : Mir, 1987, 567 p. (in Russ.)]
 20. *Эколого-токсикологические аспекты загрязнения морской среды*. Т. 5 / под ред. С. А. Патина. Ленинград : Гидрометеиздат, 1985. 116 с. [*Ekologo-toksikologicheskie aspekty zagryazneniya morskoi sredy*. Vol. 5 / S. A. Patin (Ed.). Leningrad : Gidrometeoizdat, 1985, 116 p. (in Russ.)]
 21. Ahalya N., Ramachandra T. V., Kanamadi N. Biosorption of heavy metals. *Research Journal of Chemical & Environmental Sciences*, 2003, vol. 7, iss. 4, pp. 71–79.
 22. 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, no. 3, pp. 112–117.
 23. Andersen R. A., Berges J. A., Harrison P. J., Watanabe M. M. Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal Culturing Techniques* / R. A. Andersen (Ed.). Amsterdam ; Boston ; London : Elsevier Academic Press, 2005, pp. 429–538.
 24. Burgess R. M., Terletskaya A. V., Milyukin M. V., Povolotskii M. I., Demchenko V. Y., Bogoslovskaya T. A., Topkin Yu. V., Vorobyova T. V., Petrov A. N., Lyashenko A. V., Ho K. T. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, vol. 58, no. 8, pp. 1103–1115. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.013>
 25. 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, vol. 31, iss. 2, pp. 165–174. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00071-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00071-W)
 26. 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013, vol. 91, iss. 6, pp. 656–660. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1122-4>
 27. Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunay Yu. A., Gastineau R., Kaczmarek I., Poulíčková A., Witkowski A. *Ardissonea crystallina* has a type of sexual reproduction that is unusual for centric diatoms. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, art. no. 14670 (16 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15301-z>
 28. *Diatoms: Fundamentals and Applications* / J. Seckbach, R. Gordon (Eds). Hoboken, New Jersey : Wiley ; Salem, Massachusetts : Scrivener, 2019, 679 p.
 29. Florence T. M., Stauber J. L. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquatic Toxicology*, 1986, vol. 8, iss. 1, pp. 11–26. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(86\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(86)90069-X)
 30. 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, pp. 938–950. <https://doi.org/10.1111/jpy.12563>
 31. Kiseleva A. A., Tarachovskaya E. R., Shishova M. F. Biosynthesis of phytohormones

- in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, vol. 59, iss. 5, pp. 595–610. <http://doi.org/10.1134/S1021443712050081>
32. Kumar S., Baweja P., Sahoo D. Diatoms: Yellow or golden brown algae. In: *The Algae World* / D. Sahoo, J. Seckbach (Eds). Dordrecht, Netherlands : Springer, 2015, pp. 235–258. (Book series: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology ; vol. 26). http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-7321-8_8
 33. 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. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, vol. 124, iss. 2, pp. 938–945. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.038>
 34. Lobban C. S., Ashworth M. P., Camacho T., Lam D. W., Theriot E. C. Revision of *Ardissonaceae* (Bacillariophyta, Mediophyceae) from Micronesian populations, with descriptions of two new genera, *Ardissonopsis* and *Grunowago*, and new species in *Ardissonaea*, *Synedrosphenia* and *Climacosphenia*. *PhytoKeys*, 2022, vol. 208, pp. 103–184. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.208.89913>
 35. Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Phaeodactylum tricorutum* in the copper-polluted environment. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 53, no. 3, pp. 305–309. <https://doi.org/10.1134/S1021443706030034>
 36. 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, vol. 16, iss. 10, pp. 23929–23969. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
 37. Nagajoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 2010, vol. 8, iss. 3, pp. 199–216. <http://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
 38. 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, no. 2, pp. 115–131. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00188-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00188-6)
 39. Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge : Cambridge University Press, 1990, 747 p.
 40. *SigmaPlot NG. USA* : [site]. 2021. <https://sigmaplot.com> [accessed: 15.01.2021].
 41. Smolyakov B. S., Ryzhikh A. P., Romanov R. E. The fate of Cu, Zn, and Cd in the initial stage of water system contamination: The effect of phytoplankton activity. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, vol. 184, iss. 1–3, pp. 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.115>
 42. *The Diatom World* / J. Seckbach, J. P. Kociolek (Eds). Berlin ; Heidelberg ; New York : Springer Verlag, 2011, 533 p. (Book series : Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology ; vol. 19). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7>
 43. Witkowski A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. *Diatom Flora of Marine Coasts. 1*. Rugell ; Königstein : Gantner Verlag : Koeltz Scientific Books, 2000, 925 p. (Iconographia Diatomologica : Annotated Diatom Micrographs ; vol. 7: Diversity-Taxonomy-Identification / H. Lange-Bertalot (Ed.)).
 44. Yan J., Liu J., Li Y., Lang S. Effect of water current on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons, heavy metals and benthic diatom community in sediments of Haihe estuary, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, vol. 21, no. 20, pp. 12050–12061. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3145-8>

**GROWTH DYNAMICS OF THE BENTHIC DIATOM
ARDISSONEA CRYSTALLINA (C. AGARDH) GRUNOW, 1880 (BACILLARIOPHYTA)
UNDER COPPER IONS EFFECT**

E. L. Nevrova and A. N. Petrov

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

E-mail: el_nevrova@mail.ru

Increasing anthropogenic load on coastal ecosystems of the Black Sea determines the need for regular assessing the state of planktonic and benthic communities. Planktonic microalgae contributing up to 20–25 % of global primary production are traditionally used as test objects; however, the contribution of microphytobenthos is comparable to that of phytoplankton. Benthic diatoms are close-associated with bottom substrate, and most of them are highly sensitive to the effect of technogenic pollutants accumulating in sediments. The changes in physiological indicators of benthic Bacillariophyta may objectively reflect the negative effect of various toxicants; accordingly, benthic diatoms can be used as test objects in the indirect assessment of the marine environment quality. We aimed to study the growth dynamics of abundance of clonal strain cells for a new biotesting object – the diatom *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Bacillariophyta) – under the effect of various $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ concentrations during 10-day laboratory experiments. This species is widespread in the Black Sea sublittoral and highly sensitive to the effect of different technogenic pollutants, *inter alia* heavy metals. As shown, at copper ions concentrations of 32–128 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *A. crystallina* growth dynamics generally corresponds to the dose–response curve in a toxicological experiment. The correlation was found between a decrease in intensity of the culture growth and increase in toxicant concentration in the experimental medium. At copper ions concentration of 256–320 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the ratio of alive cells in the clonal strain decreases gradually from 62–66 % (the 1st day) to 34–37 % (the 10th day); the indicators of an increase in cell abundance in the clonal strain are characterized by a negative trend – from –0.01 (on the 2nd day) to –0.34 (on the 10th day). At Cu^{2+} concentrations of 384 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and higher, drastic inhibition and subsequent death of *A. crystallina* cells were revealed. At 448–1,024 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, complete cell mortality was registered already on the 3rd day of the experiment. Statistical comparison of the ratio variability of *A. crystallina* alive cells and the specific growth in their abundance for the control and Cu^{2+} concentrations of 64–128 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ showed as follows: at 32–128 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the differences between the mean values of the test indicators were significant ($P = 0.002\dots 0.020$). At 256 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the changes in total abundance and alive cells ratio in the test culture significantly differ ($P = 0.002\dots 0.014$) from those both at lower and higher copper concentrations. This fact allows to consider the toxicant level of 256 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ as a critical one for *A. crystallina*: its exceeding will result in a sharp increase in cell mortality. Based on the results obtained, this benthic diatom can be recommended for use as a suitable test object in toxicological experiments, as well as for monitoring and indirect environmental assessment of coastal water areas subjected to technogenic pollution.

Keywords: toxicological experiment, copper ions, clonal strain, cell abundance, benthic diatom algae, Black Sea