



УДК 546.56:582.261.1(262.5)

**ДЕЙСТВИЕ СУЛЬФАТА МЕДИ НА РОСТ И МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК
КЛОНОВЫХ КУЛЬТУР ЧЕТЫРЁХ ВИДОВ
БЕНТОСНЫХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ (BACILLARIOPHYTA)
ЧЁРНОГО МОРЕЯ**

© 2017 г. **Д. Ю. Романова**, вед. инж., **А. Н. Петров**, канд. биол. наук, зав. отд.,
Е. Л. Неврова, д-р биол. наук, вед. н. с.

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия
E-mail: driaromanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.06.2017 г. Принята к публикации 01.08.2017 г.

Многие виды диатомовых водорослей чувствительны к влиянию экологических стрессоров, поэтому изменения показателей их развития под воздействием различных токсикантов могут быть использованы как биоиндикаторы при оценке качества среды. Целью работы было исследование особенностей роста популяции и изменения морфологии клеток диатомовых водорослей при однократном внесении раствора сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в пяти последовательно снижающихся концентрациях ионов меди (от 128 до 8 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ Cu^{2+}). В эксперименте использованы клоновые культуры четырёх видов морских бентосных форм Bacillariophyta, выделенных из Чёрного моря: *Cyclophora tenuis* Castracane 1878, *Psammodictyon panduriforme* var. *continua* (Grunow) Snoeijjs 1998, *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer in Patrick & Reimer 1975 и *Haslea* sp. Первые два упомянутых вида зарегистрированы нами впервые для черноморской флоры. По результатам 10-суточных токсикологических экспериментов установлено, что по степени резистентности к токсиканту изученные виды подразделяются на две группы. Высокочувствительные виды *P. panduriforme* var. *continua* и *Haslea* sp. прекращают деление клеток уже при минимальных концентрациях токсиканта (8 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$). Токсический порог воздействия сульфата меди, вызывающий остановку развития и роста численности клеток, у данных двух видов очень низкий (диапазон между контролем и концентрацией 8 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$). В группе среднетолерантных видов для *E. paludosa* пороговой является концентрация ионов меди 16 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$: при воздействии такого уровня токсиканта различия средних значений численности клеток всегда статистически достоверны. Для *C. tenuis* пороговая концентрация Cu^{2+} , при которой угнетение роста клеток относительно контроля всегда статистически достоверно, составляет 32 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$. При низких концентрациях ионов меди (8 и 16 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) рост численности клеток среднетолерантных видов по мере увеличения периода экспозиции аппроксимируется степенной (для *C. tenuis*) либо затухающей сигмоидной (для *E. paludosa*) моделью. В контроле у каждого из четырёх исследованных видов диатомовых водорослей рост популяции клеток идёт по экспоненциальной модели на протяжении всего эксперимента. Отмечены особенности отклика клеток диатомовых водорослей при высокой концентрации токсиканта, выраженные в нарушении процесса морфогенеза и множественном нерасхождении створок с одной стороны после вегетативной фазы цитокинеза.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, биотестирование, цитометрия, сульфат меди, токсикант, новые виды для флоры Bacillariophyta, Чёрное море

Диатомовые водоросли являются одним из основных структурных компонентов трофодинамических цепей морских экосистем, обеспечивая за счёт фотосинтеза до 20 % первичной продукции в Мировом океане [14, 29], поэтому исследование жизнедеятельности Bacillariophyta и их роли в процессах

трансформации вещества и энергии имеет большое значение как для изучения фундаментальных основ формирования морского биоразнообразия, так и для использования полученных данных для целей экологического мониторинга состояния прибрежных акваторий.

В связи со значительной антропогенной нагрузкой на Чёрное море необходимо отслеживать изменения состояния сообществ бентоса, и одними из наиболее подходящих для этих целей являются методы биотестирования и биоиндикации [1, 4, 6]. Многие виды диатомовых водорослей характеризуются пониженной резистентностью к влиянию неблагоприятных факторов среды, поэтому рассматриваются как перспективные тест-объекты, параметры изменения физиологических показателей которых (роста, размножения, количественного развития) под воздействием различных поллютантов (солей тяжёлых металлов, хлорорганических соединений, ПАВ, нефтепродуктов и др.) могут служить удобным инструментом при опосредованной оценке качества среды [3, 9, 13, 21, 22]. Очевидно, что благодаря массовому развитию в шельфовой зоне, малым размерам и высокой скорости внутриклеточных обменных процессов и, вследствие этого, чувствительности к изменениям среды обитания, отклик одноклеточных диатомовых водорослей на изменения гидрохимических условий в биотопе будет более быстрым, чем таковой многоклеточных макрофитов. Кроме того, работа с клоновыми культурами диатомовых водорослей имеет ряд преимуществ (генетическая однородность биоматериала, а также высокая репрезентативность и воспроизводимость результатов), поскольку коллекция штаммов микроводорослей является референтным материалом, с которым можно провести повторные исследования для расширения пула экспериментальных данных. Поэтому использование донных диатомовых для токсикологических экспериментов позволяет обеспечить достоверность результатов [3, 5, 9].

Выбор сульфата меди в качестве модельного токсиканта при проведении наших экспериментов обусловлен, прежде всего, экологической значимостью соединений меди как в метаболизме живых организмов, так и в биогеохимическом цикле [3]. С одной стороны, медь является эссенциальным микроэлементом для различных физиологических процессов, поддерживающих жизнеспособность гидробионтов [27], соединения меди принимают участие в азотном обмене, входят в число ключевых ферментов, обеспечивающих антиоксидантный эффект (Cu/Zn-супероксид дисмутаза) и осуществляющих перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий эукариот (цитохром С оксидаза) и др. [25]. С другой стороны, соединения меди относятся к наиболее массовым природным элементам земной коры и наиболее распространённым техногенным поллютантам в водной среде и донных отложениях [3], в том числе в прибрежной части Чёрного моря [6]. Однако в повышенных концентрациях соединения меди становятся остротоксичными для большинства морских и пресноводных гидробионтов и в ряду токсичности относятся к наиболее экологически опасным (после ртути) веществам [3, 9].

По результатам токсикологических экспериментов, в которых сульфат меди использован в качестве общепринятого токсиканта, выявлено, что под воздействием ионов меди увеличивается проницаемость мембран водных растений за счёт перекисного окисления липидов [3]. В исследованиях по воздействию CuSO_4 на планктонные формы Bacillariophyta и низшие водные растения установлено, что при концентрации соединений меди порядка $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ наблюдается ингибирование их роста [3, 7]. Результаты работ [5, 13, 15, 20, 22, 25, 31] по оценке влияния сульфата меди в различной концентрации на клетки планктонных диатомовых видов, являющихся общепринятыми тест-объектами (*Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin 1964, *Ditylum brightwellii* (West) Grunow ex Van Heurck emend Dzhafarova 1984, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1897), позволили нам предположить, что пороговая чувствительность к соединениям меди, при которой бентосные диатомовые водоросли жизнеспособны, индивидуальна для вида (группы видов).

Наше исследование сфокусировано на изучении особенностей реакции клеток бентосных диатомовых на соединения меди (CuSO_4) с целью выявления видов с высокой чувствительностью для их потенциального использования в качестве тест-объектов. Задачами настоящей работы были: 1) выделение клоновых культур различных видов Bacillariophyta; 2) выполнение сравнительной оценки влияния различных концентраций ионов меди в культуральной среде на рост и морфологию клеток бентосных

диатомовых водорослей в ходе вегетативной фазы их жизненного цикла; 3) изучение токсикорезистентности штаммов разных видов диатомовых водорослей и статистическая оценка достоверности межвидовых отличий; 4) выявление возможных случаев аномалий онтогенеза клеток диатомовых водорослей под воздействием различных концентраций ионов меди.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор эпипелона рыхлых субстратов произведён в 83-м рейсе НИС «Профессор Водяницкий» (январь — февраль 2016 г.). Донные отложения подняты с помощью дночерпателя «Океан-50» ($S = 0,25 \text{ м}^2$) и автоматического коробчатого дночерпателя Vox coeger. Материал отобран из поверхностного слоя массива грунта (2–5 см) с помощью пластикового пробоотборника ($d = 4 \text{ см}$), помещён на хранение в холодильник при температуре $+14 \text{ }^\circ\text{C}$ в афотических условиях на период 1–7 суток до завершения экспедиции. Сбор эпилитона твёрдых и эпифитона растительных субстратов осуществлён с мая по август 2016 г. в прибрежной зоне акватории Карадагского горного массива и в акватории Алуштинского района, у пос. Рыбачье (табл. 1); этот материал собран с помощью соскобов и смывов в пробирки Эппендорфа объёмом 10 мл. Дальнейшая обработка и постановка экспериментов осуществлены в лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского — природного заповедника РАН и в отделе экологии бентоса Института морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН (ФГБУН ИМБИ).

1–2 мл собранного материала помещали в чашку Петри ($d = 9 \text{ см}$) с добавлением 40–50 мл искусственной морской среды ESAW с целью получения накопительной культуры микроводорослей [11, 18]. Клоновые линии диатомовых водорослей выделены Д. Ю. Романовой микропипеточным способом под инвертированным микроскопом при увеличении $\times 10$ [2]. Очищение культуры проводили с помощью семикратной промывки и изолирования, для чего одиночную клетку помещали в чашку Петри с питательной средой ESAW с временным промежутком от 3 до 5 дней. Альгологически чистые неаксеничные культуры содержали при постоянной температуре $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ и рассеянном естественном освещении. Каждому клону присвоена кодировка по следующей системе: форма хранения + первые буквы вида + номер штамма (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика местообитаний и видов диатомовых водорослей, отобранных для клоновых штаммов и токсикологических экспериментов

Table 1. Characteristics of sampling biotopes and of diatom species selected for clonal strains and toxicological experiments

Вид	Код штамма	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Дата сбора	Координаты места сбора	Глубина сбора, м	Характер местообитания
<i>Psammodyctyon panduriforme</i> var. <i>continua</i>	1PP60427F	19,4	7,3	02.2016	44°53'07"N, 35°13'09"E	46,0	рыхлый грунт
<i>Entomoneis paludosa</i>	1EP60530P	249,4	101,0	05.2016	44°54'51.9"N, 35°13'52.5"E	5,0	твёрдый субстрат
<i>Haslea</i> sp.	1Ha60530Q	91,0	14,8	05.2016	44°46'08.7"N, 34°35'52.6"E	0,5	растительный субстрат
<i>Cyclophora tenuis</i>	1CT60824A	118,4	89,5	08.2016	44°54'44.9"N, 35°12'15.7"E	10,0	рыхлый грунт

Референтный материал хранится в коллекции Д. Ю. Романовой в отделе экологии бентоса ФГБУН ИМБИ в нескольких вариантах: 1 — постоянно пересеваемые штаммы живых клеток, 2 — очищенные панцири клеток в дистиллированной воде, 3 — прижизненно фиксированные этиловым

спиртом клетки, 4 — постоянные препараты для светового микроскопа (СМ), изготовленные из суспензии очищенных створок, заключённых в среду Naphrax®, 5 — цифровые микрофотографии клеток, полученные с помощью СМ и сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). В настоящее время готовится пакет документов для оформления данной коллекции как части Коллекции гидробионтов Мирового океана ФГБУН ИМБИ в соответствии с действующими нормативными и правовыми актами РФ.

Для приготовления постоянных препаратов для микрофотографирования на СМ створки диатомовых трижды промывали в дистиллированной воде в течение 24 ч для снижения солёности, далее для освобождения клеток от органического содержимого добавляли равное количество 30%-ной перекиси водорода, нагревали на песчаной бане в течение 5–6 ч, затем тщательно промывали 8–10 раз дистиллированной водой и заключали в среду Naphrax®. Микрофотографии выполнены при помощи СМ Levenhuk 670T с объективом $\times 40$ и цифровой камеры Canon 700D.

Для приготовления препаратов для микрофотографирования на СЭМ суспензия очищенных створок проведена в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (25, 50, 75 и 90°) и нанесена на нуклеопоровый фильтр, затем фильтр подсушен и приклеен двусторонним скотчем к металлическому предметному столику. Сканирующие микрофотографии получены Д. Ю. Романовой на оборудовании в ЦКП ФГБУН ННЦМБ ДВО РАН (г. Владивосток) с помощью ZEISS EVO 40XVP с использованием детектора вторичных электронов при прогрессивной развёртке в 46 сек.·кадр⁻¹.

Для видовой идентификации диатомовых водорослей использованы определители [19, 26, 28, 30]. Названия видов приведены по Catalogue of Diatom Names [16].

Для ввода культуры в экспоненциальную фазу роста перед началом эксперимента культуры пересеивали 1 раз в 7 дней в свежую питательную среду ESAW 18‰ [11, 18] в чашки Петри ($d = 6$ см, объём среды 10 мл). Выбор искусственной морской среды ESAW для проведения экспериментов обусловлен определёнными концентрациями содержащихся в ней химических веществ, что необходимо для воспроизводимости полученных результатов. Протокол приготовления среды ESAW включает разведение в 2 л дистиллированной воды солей NaCl (21,2 г), Na₂SO₄ (3,55 г), KCl (0,6 г), NaHCO₃ (0,175 г), KBr (0,09 г), H₃BO₃ (0,025 г), NaF (0,003 г), MgCl₂·6H₂O (9,6 г), CaCl₂·6H₂O (1,35 г), SrCl₂·6H₂O (0,022 г), NaNO₃ (0,8 мл из р-ра 46,67 г·л⁻¹), NaH₂PO₄ (0,8 мл из р-ра 3,094 г·л⁻¹), Na₂SiO₃ (2 мл из р-ра 15,0 г·л⁻¹), Fe(NH₄)-цитрат (0,5 мл из р-ра 0,72 г·л⁻¹), FeCl₃ (1 мл из р-ра 1,77 г·л⁻¹), растворов микроэлементов (ZnSO₄·7H₂O, CoSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O, Na₂SeO₃, NiCl₂·6H₂O, Na₂ЭДТА·2H₂O) и витаминов В₁ (0,5 мл из р-ра 50 мг·мл⁻¹), В₁₂ (5 мл из р-ра 0,5 мг·мл⁻¹).

Отметим, что в состав среды ESAW не входят соединения меди, что дало нам возможность синхронизировать культуру клеток перед выполнением эксперимента для получения точных данных по динамике роста популяций и для повышения достоверности результатов [12]. Внесение сульфата меди происходило одновременно в пять экспериментальных групп каждого вида, что необходимо для совпадения фазы деления у всех особей популяции по отношению к действию ионов меди. Применена следующая схема эксперимента: в чашку Петри добавляли 1 мл инокулята клоновой культуры, стоковый раствор сульфата меди CuSO₄·5H₂O (ООО «Реактив», х. ч.) и рассчитанный объём питательной среды ESAW, с последующим доведением общего объёма водных компонентов до 10 мл. В контроль с инокулятом клоновой культуры раствор сульфата меди не вносили (табл. 2).

В эксперименте исследовано влияние водного раствора сульфата меди (CuSO₄) в пяти последовательно снижающихся концентрациях ионов меди Cu²⁺ (128 – 64 – 32 – 16 – 8 мкг·л⁻¹) на интенсивность роста популяции и изменение морфологических признаков клеток четырёх видов бентосных диатомовых водорослей. Каждый опыт проведён в трёх повторностях.

Раствор токсиканта вышеуказанных концентраций, полученных путём последовательного двукратного уменьшения исходного объёма (1 мл) стокового раствора, внесённого в чашку Петри вместе с инокулятом (1 мл) и средой ESAW, добавляли в пять соответствующих экспериментальных групп однократно, в первый день эксперимента. Для исключения испарения воды и соответственного увеличе-

Таблица 2. Схема приготовления растворов токсиканта для экспериментального исследования влияния сульфата меди на рост популяции диатомовых водорослей**Table 2.** Scheme of the preparation of toxicant solutions for experimental study of the copper sulfate influence on population growth of diatoms

Экспериментальная группа	Объём инокулята, мл	Объём стокового раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, мл	Объём среды ESAW, мл	Концентрация CuSO_4 ($\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) в чашке с культурой	Концентрация ионов меди ($\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) в чашке с культурой
Контроль		0,000	9,000	0,00	0
1	1	1,000	8,000	500,00	128
2		0,500	8,500	250,00	64
3		0,250	8,750	125,00	32
4		0,125	8,875	62,50	16
5		0,064	8,936	31,25	8

ния концентрации токсиканта чашки Петри герметизировали пленкой Parafilm.

Поскольку рост популяции (в экспериментальном растворе объёмом 10 мл) выходит на стационарную фазу на 10-й день, продолжительность каждого эксперимента составляла 10 суток. Подсчёт числа клеток диатомовых водорослей каждого вида и оценку особенностей их морфологии и физиологического состояния проводили на 1, 3, 5, 7 и 10-е сутки эксперимента в одно и то же время, с 8:00 до 10:00. Учёт вели под инвертированным микроскопом при увеличении $\times 20$ для мелкоклеточных видов *P. panduriforme* var. *continua* и *Haslea* sp. и при увеличении $\times 10$ для крупноклеточных видов *E. paludosa* и *C. tenuis*. В качестве тест-параметра показателей роста популяции использовали среднее значение количества живых клеток в 25 полях зрения для каждой экспериментальной группы. Важным условием эксперимента являлось сохранение целостности нарастающей культуры для характеристики действия токсиканта на популяцию клеток в течение 10 суток, поэтому для подсчёта клеток из экспериментальной культуры биоматериал не изымали.

В контроле, как указано выше, вегетативное деление в накопительной культуре каждого тестируемого вида водорослей протекало без добавления токсиканта и без каких-либо иных физико-химических воздействий.

Статистическая обработка результатов токсикологических экспериментов проведена с применением стандартных алгоритмов для параметрического и рангового анализов, входящих в пакет программ Sigmaplot 11.5. Критерий нормальности распределения вариант (число клеток в каждом из 25 полей просмотра) относительно медианного значения для каждой серии экспериментов оценивали по алгоритму Колмогорова — Смирнова с предварительным тестированием результатов (по методу квантилей) и исключением из расчётов резко выделяющихся значений (агрегаций клеток) в каждой выборке из 25 просмотров. Подобные агрегации с аномально высоким количеством клеток не являются итогом естественного нарастания их количества в ходе эксперимента, но возникают вследствие исходного внесения в чашку Петри инокулята, иногда содержащего соединённые полисахаридами клетки.

Сравнение равенства дисперсий двух нормально распределённых выборок проведено по критерию Фишера (ANOVA) для уровня значимости $P < 0,01$. Последующее сравнение достоверности отличий средних значений признака (изменение числа клеток при разных концентрациях токсиканта и различных периодах экспозиции) выполняли на основе t-критерия Стьюдента (в случае нормальности распределения вариант в выборке и равенства дисперсий) либо непараметрических критериев Манна — Уитни (при сравнении двух выборок), Крускала — Уоллеса и Данна (Dunn's test) при сравнении более чем двух независимых выборок, в которых распределение вариант отличается от нормального.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор местообитаний для отбора проб и выделение видов диатомовых водорослей для постановки клоновых культур и дальнейшего проведения экспериментов были обусловлены следующими критериями: не должно быть ранее отмечено массового развития вида в биотопах, подверженных интенсивному техногенному загрязнению и иным видам антропогенного воздействия, поскольку это может свидетельствовать о его высокой толерантности к экологическим стрессорам и токсикантам; вид должен быть пригодным для длительного культивирования в условиях лаборатории; вид должен иметь высокий темп деления в культуре. Поскольку постановка клоновых линий бентосных диатомовых водорослей является длительным и трудоёмким процессом, и лишь немногие виды способны выдерживать культивирование, для проведения эксперимента нам удалось выделить четыре вида, отвечающих вышеописанным критериям, из условно чистых местообитаний у восточного побережья Крыма.

Psammodictyon panduriforme var. *continua* (Grunow) Snoeijs 1998 (рис. 1: 1, 2) выделен из эпипелона рыхлого грунта, отобранного у м. Меганом, на глубине 46 м, *Cyclophora tenuis* Castracane 1878 (рис. 1: 7, 8) выделен из эпипелона рыхлого грунта, отобранного у побережья Карадагского горного массива, на глубине 5 м, *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer in Patrick & Reimer 1975 (рис. 1: 3, 4) выделен из эпипелона рыхлого грунта, отобранного у побережья Карадагского горного массива, на глубине 10 м, *Haslea* sp. (рис. 1: 5, 6) выделен из эпифитона макрофитов у пос. Рыбачье, на глубине 0,5 м.

Первые два упомянутых таксона — *P. panduriforme* var. *continua* и *C. tenuis* — относятся к числу новых для флоры Bacillariophyta Чёрного моря, обнаруженных нами ранее, причём если *P. panduriforme* var. *continua* уже был отмечен нами неоднократно в северной части черноморского шельфа [6], то *Cyclophora tenuis* в Чёрном море найден лишь второй раз. Впервые *C. tenuis* был обнаружен нами в б. Омега в июле 2004 г., на песчаном субстрате на глубине 1,5 м, но поскольку по единичному экземпляру идентификация не могла быть осуществлена корректно, вид в то время зарегистрирован не был. В настоящей работе на основании полученных данных СЭМ и сравнения с имеющимися данными СМ видовую принадлежность *C. tenuis* удалось верифицировать.

Вид *Entomoneis paludosa* распространён повсеместно в условно чистых местообитаниях, но редок. Не определённый до вида представитель рода *Haslea* является, возможно, новым для науки, но его таксономическое описание требует дальнейших исследований.

По результатам экспериментов установлено, что виды *P. panduriforme* var. *continua* и *Haslea* sp. характеризуются низкой токсикорезистентностью к ионам меди. Отмечено, что для всех концентраций токсиканта, включая минимальную ($8 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$), наблюдается ингибирование или полное прекращение нарастания числа клеток уже при экспозиции 3 суток (рис. 2 А, Б). Соответственно, для всех концентраций токсиканта тесты на достоверность отличий параметров роста числа клеток в течение эксперимента от таковых в его начале (1-е сутки) не были подтверждены несмотря на то, что в контроле рост численности клеток обоих видов по мере увеличения периода экспозиции (1 – 3 – 5 – 7 – 10 суток) шёл очень интенсивно (по экспоненциальной или сигмоидной модели). С учётом результатов реакции диатомовых водорослей на использованный нами токсикант можно утверждать, что критические концентрации ионов меди, при которых наблюдается значительная, но не полная элиминация клеток обоих вышеупомянутых видов, могут находиться в диапазоне от 0 до $8 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$. Более точное определение пороговых концентраций требует проведения дополнительных серий экспериментов с малыми (менее $8 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) концентрациями токсиканта.

Для *P. panduriforme* var. *continua* отмечено множественное нерасхождение створок в процессе морфогенеза (рис. 3 А), а также единичные случаи сферификации содержимого клеток на 3, 5 и 7-е сутки эксперимента (рис. 3 В). На 10-е сутки данное изменение наблюдали в каждом 4-м поле просмотра.

Виды *E. paludosa* и *C. tenuis* характеризуются более высокой резистентностью к токсическому воздействию ионов меди (рис. 2, С-Д). В контроле рост численности клеток этих видов по мере увеличения периода экспозиции шёл по экспоненциальной модели ($R^2 = 0,96 \div 0,98$).

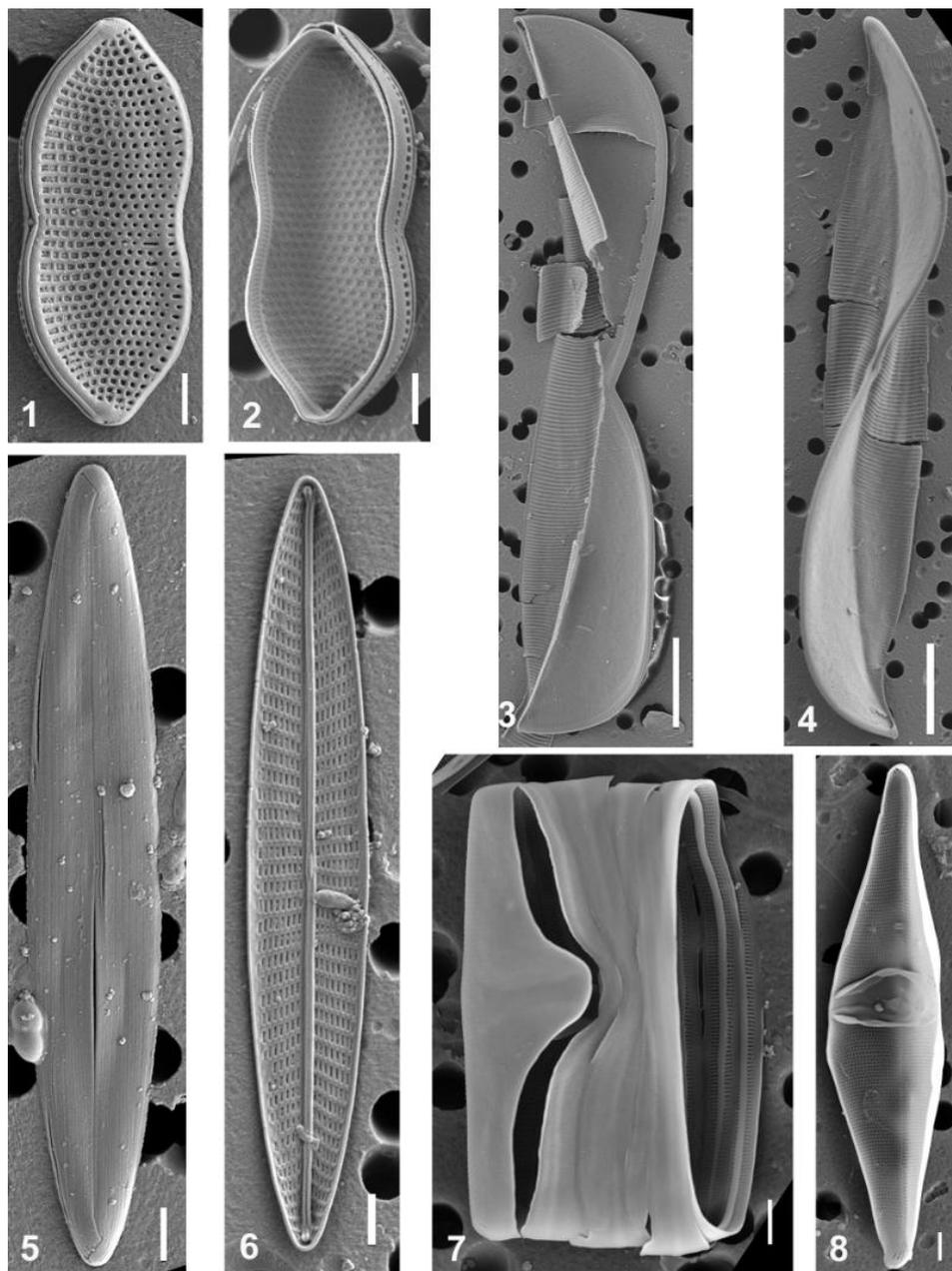


Рис. 1. Виды бентосных диатомовых водорослей, выделенные в клоновые линии и использованные в эксперименте (СЭМ). 1, 2 — *Psammodictyon panduriforme* var. *continua* (вид створки с внешней и внутренней стороны соответственно); 3, 4 — *Entomoneis paludosa* — вид со стороны пояска и килля); 5, 6 — *Haslea* sp. (вид створки с внешней и внутренней стороны соответственно); 7, 8 — *Cyclophora tenuis* (вид створки с внешней и внутренней стороны соответственно). Размерная шкала: 1, 2, 5, 6, 7, 8 — 2 мкм; 3, 4 — 10 мкм

Fig. 1. Clonal lines of benthic diatoms used in the experiments (SEM). 1, 2 – *Psammodictyon panduriforme* var. *continua* (external and internal view, respectively); 3, 4 – *Entomoneis paludosa* (girdle view and keel view, respectively); 5, 6 – *Haslea* sp. (external and internal view, respectively); 7, 8 – *Cyclophora tenuis* (external and internal view, respectively). Scale bar: 1, 2, 5, 6, 7, 8 – 2 mkm; 3, 4 – 10 mkm

При добавлении токсиканта динамика роста численности клеток *C. tenuis* характеризовалась следующими особенностями: после трёх суток экспозиции средняя численность клеток вида недостоверно отличается от таковой в контроле, что справедливо для всех исследованных концентраций ионов меди, за исключением наибольшей ($128 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$). Таким образом, средняя численность клеток в культуре (по результатам подсчёта клеток в 25 полях просмотра) через трое суток становится достоверно ниже, чем в контроле, только при концентрации токсиканта $128 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ и выше (рис. 2, D).

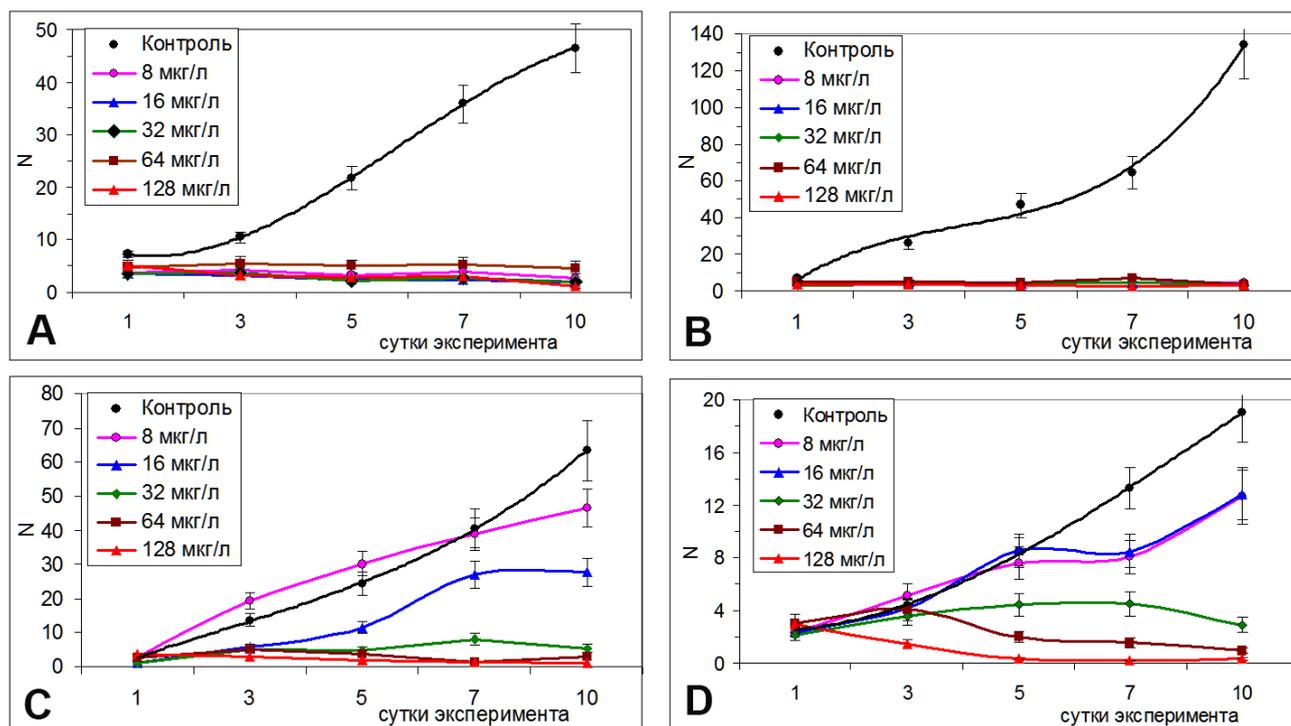


Рис. 2. Изменение численности клеток в эксперименте при разных сроках экспозиции и концентрациях токсиканта: А — *P. panduriforme* var. *continua*, В — *Haslea* sp., С — *E. paludosa*, D — *C. tenuis*. N — среднее число клеток в поле просмотра

Fig. 2. Changes in cells number at different duration of the experiment and toxicant concentrations: А – *P. panduriforme* var. *continua*, В – *Haslea* sp., С – *E. paludosa*, D – *C. tenuis*. N – average number of cells in each microscope viewing field

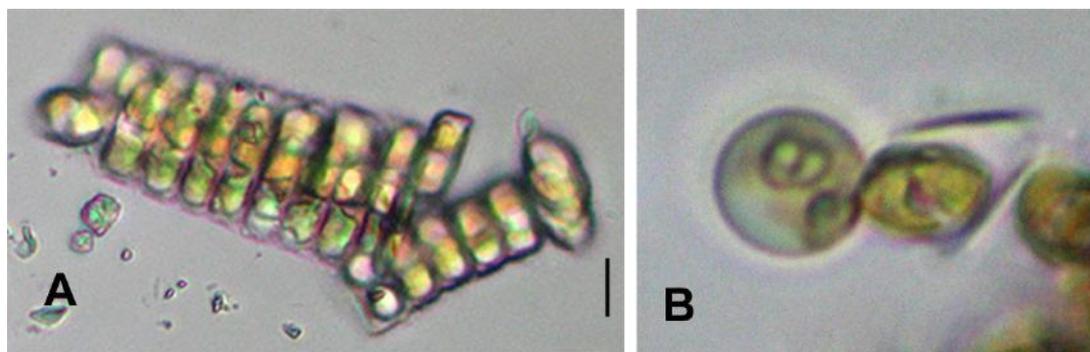


Рис. 3. Морфологические изменения у *P. panduriforme* var. *continua* под воздействием сульфата меди (СМ, $\times 40$): А — множественное нерасхождение створок в процессе морфогенеза; В — сферификация содержимого клеток на 10-е сутки эксперимента. Размерная шкала: А, В — 10 мкм

Fig. 3. Abnormality of morphogenesis of *P. panduriforme* var. *continua* under copper sulphate impact (LM, $\times 40$): А – multiple non-separations of valves; В – spherification of protoplast for 10th day of the experiment. Scale bar: А, В – 10 mkm

После 5 суток эксперимента достоверное снижение роста численности клеток по сравнению с таковым в контроле отмечено при трёх наиболее высоких концентрациях ионов меди: 32, 64 и 128 мкг·л⁻¹, тогда как при двух наименьших концентрациях (16 и 8 мкг·л⁻¹) степень угнетения роста недостоверно отличается как от контрольных значений, так и между собой (табл. 3). Сходные тенденции достоверного угнетения роста числа клеток при концентрациях токсиканта 32–128 мкг·л⁻¹ сохраняются и после 7- и 10-суточной экспозиции (рис. 2 D). В целом можно считать, что для *C. tenuis* пороговой является

ся концентрация ионов меди $32 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$: при её достижении угнетение роста клеток (по отношению к контролю) всегда статистически достоверно.

Для *E. paludosa* динамика численности клеток при сходстве общих тенденций несколько отличается от таковой *C. tenuis*, а именно: для короткого срока экспозиции (1–3 суток) снижение средней численности клеток достоверно отличается от такового в контроле при всех использованных концентрациях ионов меди, за исключением наименьшей ($8 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) (рис. 2 С). При более длительных периодах экспозиции (5–10 суток) эта тенденция сохраняется, т. е. число клеток в культурах становится достоверно ниже контрольного уровня уже при воздействии токсиканта в концентрации $16 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ и выше (табл. 3).

Таблица 3. Статистическая оценка достоверности отличий средней численности клеток *C. tenuis* и *E. paludosa* при разных сроках экспозиции и концентрациях токсиканта (Cu^{2+})

Table 3. Statistical evaluation of significance of the difference in average cell number of *C. tenuis* and *E. paludosa* under different duration of experiment and toxicant concentrations (Cu^{2+})

Концентрация ионов меди (Cu^{2+}), $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$	<i>Cyclophora tenuis</i>				<i>Entomoneis paludosa</i>			
	3 сут. (Q)*	5 сут. (Q)	7 сут. (Q)	10 сут. (Q)	3 сут. (Q)	5 сут. (Q)	7 сут. (Q)	10 сут. (Q)
128	4,05 (+)	7,06 (+)	8,61 (+)	8,24 (+)	6,24 (+)	7,59 (+)	7,52 (+)	8,84 (+)
64	0,16 (–)	5,19 (+)	7,09 (+)	7,37 (+)	4,81 (+)	6,05 (+)	7,57 (+)	7,37 (+)
32	1,05 (–)	2,74 (+)	4,69 (+)	5,83 (+)	4,65 (+)	5,52 (+)	4,75 (+)	6,14 (+)
16	0,18 (–)	0,28 (–)	2,21 (–)	1,48 (–)	4,02 (+)	2,69 (+)	1,78 (–)	3,32 (+)
8	0,92 (–)	0,18 (–)	2,43 (–)	2,27 (–)	0,59 (–)	0,48 (–)	0,86 (–)	0,84 (–)

*Q — статистика Данна (Dunn's test) при сравнении ранговых средних (для $P = 0,05$);

(+/-) — достоверные /недостоверные отличия от контроля

*Q – Dunn's test results under comparison of the rank average values ($P = 0.05$)

(+/-) – significant / non significant differences from the control

Отметим, что только для *E. paludosa* наблюдали незначительный рост численности клеток на 3-и – 5-е сутки эксперимента при воздействии минимальной концентрации ионов меди ($8 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$), однако недостоверно отличный от такового в контроле (см. рис. 2 С). Такая реакция в целом может соответствовать первой фазе классической модели отклика тест-объекта на стресс (активации роста), которая при дальнейшей экспозиции сменяется фазой угнетения роста числа клеток. Можно заключить, что для *E. paludosa* пороговой является концентрация ионов меди $16 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$: при достижении данного уровня токсиканта различия средних значений численности клеток (по отношению к контролю) становятся статистически достоверными.

Для обоих рассмотренных видов при наименьших концентрациях токсиканта ($8\text{--}16 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) в ходе всего периода эксперимента достоверно отмечено увеличение среднего числа клеток популяции по отношению к показателям за предшествующий период экспозиции. Это позволяет говорить о том, что для *C. tenuis* и *E. paludosa* концентрации ионов меди $8\text{--}16 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ хотя и вызывают достоверное ингибирование роста численности клеток относительно контроля (для *C. tenuis* – на 7–10 сутки эксперимента), но не приводят к полному прекращению роста популяции, как это происходит у высокочувствительных видов *P. panduriforme* var. *continua* и *Haslea* sp.

Выявлена характерная морфологическая особенность реакции *C. tenuis* и *E. paludosa* на воздействие субпороговых концентраций ионов меди ($128\text{--}64 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$): в первые дни проведения эксперимента клетки изменяют цвет хлоропластов на более зелёный и плавают в толще культуральной среды, практически не оседая на дно чашки Петри. Для *E. paludosa* также отмечено следующее: начиная с третьих суток экспозиции, после фазы цитокинеза у клетки отсутствует расхождение створок с одной из сторон (рис. 4 А, В). После череды вегетативных делений число неразошедшихся створок может составлять от 2 до 7. Тем не менее, подобная клеточная агрегация продолжает быть достаточно актив-

ной, она способна плавать в толще культуральной среды либо опускаться на дно чашки, хлоропласты в клетке имеют обычный коричневатый или зеленоватый оттенок. Кроме того, отмечены единичные случаи сферификации содержимого клеток (рис. 4 С).

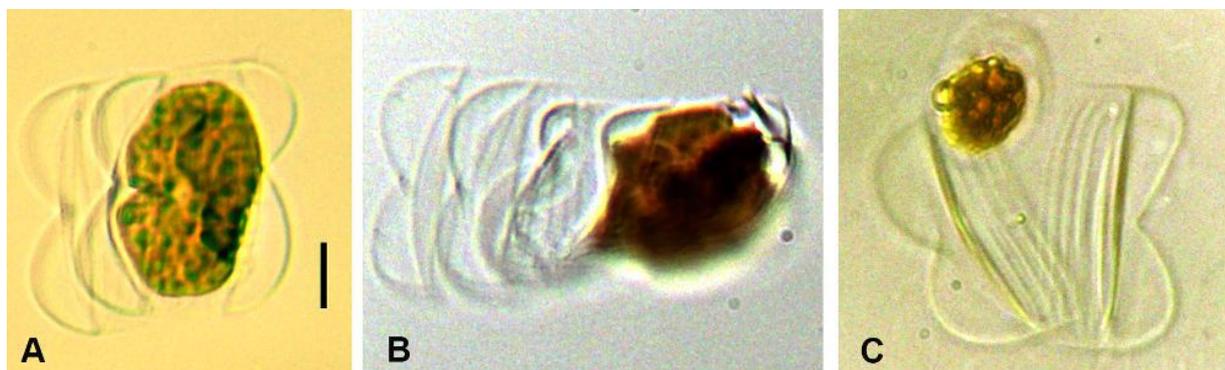


Рис. 4. Морфологические изменения у *E. paludosa* под воздействием сульфата меди (СМ, $\times 40$): А, В — множественное нерасхождение створок в процессе морфогенеза; С — сферификация содержимого клеток. Размерная шкала: А, В, С — 10 мкм

Fig. 4. Abnormality of morphogenesis of *E. paludosa* under the impact of copper sulfate (LM, $\times 40$): А, В — multiple non-separation of valves; С — spherification of protoplast. Scale bar: А, В, С — 10 mkm

Ранее было показано [20], что для вида *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1897 при экспозиции эксперимента 14 суток и концентрациях сульфата меди $0,13\text{--}0,25\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ (или $32\text{--}63\text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ в пересчёте на концентрацию ионов меди) наблюдаются сходные морфологические изменения клеток, остановка работы пигментных систем, а также уменьшение темпа вегетативного деления, что характеризует данный вид как высокочувствительный к действию токсиканта. Эти результаты согласуются с нашими данными. При этом отметим, что длина клеток *P. tricornutum* (в среднем $10\text{--}15\text{ мкм}$) лишь немного меньше длины клеток штаммов, использованных в наших исследованиях. Известно, что одним из факторов, влияющих на чувствительность штаммов, является морфология клеток [7]. По размерным характеристикам (см. табл. 1) *P. panduriforme* var. *continua* и *Haslea* sp. относятся к мелкоклеточным видам (длина створки $19,4$ и $91,4\text{ мкм}$), характеризуются вытянутой гитарообразной и игольчатой формой клеток, соответственно, имеют большую удельную поверхность и вследствие этого могут обладать большей чувствительностью к воздействию токсикантов. По сравнению с ними клетки видов *S. tenuis* и *E. paludosa* характеризуются средними и крупными размерами (длина створки $249,4$ и $118,4\text{ мкм}$), за счёт вставочных ободков образуют больше пространства для протопласта и, соответственно, имеют меньшую удельную поверхность клеток, поэтому их отклик на воздействие сходных концентраций ионов меди выражен слабее.

Для *Ditylum brightwellii* (West) Grunow ex Van Heurck emend Dzhafarova 1984 при тестировании диапазона значений соединений меди $0,2\text{--}11,0\text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ в течение более чем 6 месяцев выявлено, что повышенное содержание ионов меди в среде вызывает увеличение размеров клеток и усиленное выделение слизистого секрета при агрегировании клеток [25]. Увеличение темпа вегетативного деления отмечается при воздействии ионов меди в диапазоне концентраций от $3,0$ до $6,0\text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$, при $8,0\text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ и выше темп деления клеток замедляется [25].

Поскольку медь является эссенциальным элементом, сульфат меди используется для приготовления большинства культуральных сред. К примеру, в протоколе приготовления среды L1, являющейся модификацией наиболее широко употребляемой среды f/2, указаны концентрации CuSO_4 $0,245\text{ мг}\cdot 100\text{ мл}^{-1}$ [18]. Заметим, что эти значения ($2450\text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) намного выше, чем наибольшие значения концентрации токсиканта, применённые в наших экспериментах ($500\text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$). Отметим также, что в использованной нами среде ESAW соединения меди не содержатся, что позволило нам протестировать именно видоспецифичную чувствительность диатомовых к сульфату меди и сделать вывод

о строго индивидуальном характере воздействия данного токсиканта на клетки разных видов. Вероятнее всего, отклик различных видов диатомей на воздействие ионов меди связан с потенциальными видоспецифическими адаптационными способностями к действию токсиканта. Для подтверждения или опровержения данного предположения очевидна необходимость проведения подобного рода исследований с привлечением большего количества видов бентосных диатомовых водорослей. Полученные в настоящей работе результаты могут быть применимы для оптимизации протокола приготовления искусственной морской среды для культивирования диатомовых в лабораторных условиях.

В заключение отметим: хотя токсикологические эксперименты традиционно проводят с планктонными видами диатомовых водорослей [1, 5, 7, 10, 13, 15, 22], не менее важны немногочисленные пока ещё исследования действия токсикантов на бентосные Bacillariophyta, находящиеся в непосредственном контакте с донными отложениями прибрежных акваторий, где аккумуляция поллютантов различного генезиса идёт наиболее интенсивно [6, 10]. Оценка жизнеспособности и физиологического состояния популяций и отдельных клеток необходима для формирования полной картины воздействия ключевых токсикантов, к которым относится медь, на доминирующие виды и таксоны бентосных диатомовых водорослей. Такие исследования позволят выделить виды — потенциальные тест-объекты, а также установить видоспецифичные границы их чувствительности и вариативность клеточного ответа, что значительно расширит фундаментальные данные основ биоразнообразия как отдела Bacillariophyta, так и морского микрофитобентоса в целом.

Заключение. По результатам токсикологических экспериментов по влиянию сульфата меди в концентрациях 128, 64, 32, 16 и 8 мкг·л⁻¹ (в пересчёте на ионы меди) на клоновые культуры четырёх видов морских бентосных диатомовых водорослей (*Psammodyctyon panduriforme* var. *continua*, *Haslea* sp., *Cyclophora tenuis* и *Entomoneis paludosa*) установлено, что по степени резистентности к токсиканту изученные виды можно подразделить на две группы.

К высокочувствительным отнесены виды *P. panduriforme* var. *continua* и *Haslea* sp., которые прекращают деление клеток уже при минимальных концентрациях использованных в эксперименте ионов меди (8 мкг·л⁻¹). Токсический порог воздействия токсиканта, вызывающий остановку развития и роста численности клеток у данных двух видов даже после кратковременной экспозиции (3 суток), очень низок и лежит в диапазоне значений 0–8 мкг·л⁻¹.

К группе среднетолерантных отнесены виды *C. tenuis* и *E. paludosa*. Для *E. paludosa* пороговая концентрация ионов меди, при воздействии которой различия в средних значениях численности клеток в полях просмотра по отношению к контролю всегда статистически достоверны, независимо от продолжительности периода экспозиции (от 3 до 10 суток), составляет 16 мкг·л⁻¹. Для *C. tenuis* пороговая концентрация ионов меди, при которой угнетение роста клеток относительно контроля всегда статистически высоко достоверно с 5-х суток эксперимента, составляет 32 мкг·л⁻¹.

При низких (8 и 16 мкг·л⁻¹) концентрациях токсиканта рост численности клеток водорослей двух перечисленных видов по мере увеличения периода экспозиции аппроксимируется степенной (для *C. tenuis*) либо затухающей сигмоидной (для *E. paludosa*) моделью. Средние значения численности клеток в эксперименте были достоверно ниже таковых в контроле, в котором рост численности популяции клеток у всех четырёх исследованных видов диатомовых водорослей на протяжении эксперимента описывался экспоненциальной моделью.

Для *C. tenuis* и *E. paludosa* при концентрациях ионов меди (128–64 мкг·л⁻¹) клетки изменяли цвет хлоропластов на более зелёный и длительно плавали, не оседая на дно чашки Петри. Отмечен эффект нарушения процесса морфогенеза у *P. panduriforme* var. *continua* и *E. paludosa*, выраженный в множественном нерасхождении створок их клеток с одной стороны после вегетативной фазы цитокинеза.

Установлен видоспецифичный характер чувствительности бентосных диатомовых водорослей к сульфату меди. Отклик различных исследованных видов Bacillariophyta зависел от размеров клеток, величины их удельной поверхности и внутренних адаптационных возможностей таксона к воздействию

стрессора.

P. panduriforme var. *continua* и *Haslea* sp. относятся к мелкоклеточным видам, имеют большую удельную поверхность и вследствие этого могут обладать большей чувствительностью к воздействию токсиكانтов. По сравнению с ними клетки видов *C. tenuis* и *E. paludosa* характеризуются средними и крупными размерами и имеют, соответственно, меньшую удельную поверхность клеток, поэтому их отклик на воздействие сходных концентраций ионов меди выражен слабее.

Полученные данные могут быть применены для усовершенствования состава искусственных морских сред для культивирования диатомовых водорослей. Виды *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua*, *Haslea* sp., *Cyclophora tenuis* и *Entomoneis paludosa* могут быть использованы в качестве тест-объектов при опосредованной оценке качества морской среды.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИМБИ по теме № 0828-2014-0014 «Мониторинг биологического разнообразия гидробионтов Черноморско-Азовского бассейна и разработка эффективных мер по его сохранению» (гос. рег. № 115081110013).

Благодарность: авторы глубоко признательны коллективу лаборатории физиологии за оказанные консультации и начальнику отдела электронной микроскопии Д. В. Фомину за предоставленную возможность работы на СЭМ в ЦКП ФГБУН ННЦМБ ДВО РАН (г. Владивосток).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Барина С. С., Медведева Л. А., Анисимова О. В. *Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды*. Тель-Авив : PiliesStudio, 2006. 498 с. [Barinova S. S., Medvedeva L. A., Anissimova O. V. *Diversity of algae indicators in environmental assessment*. Tel Aviv: Pilies Studio, 2006, 498 p. (in Russ.)].
2. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров 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. *Sovremennyye metody vydeleniya i kultivirovaniya 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: Nizhnegorodskii gosuniversitet, 2015, 142 p. (in Russ.)].
4. Крайнюкова А. Н. Биотестирование и охрана вод от загрязнения // *Методы биотестирования вод*. Черноголовка, 1988. С. 4–21. [Kraynukova A. N. Biotestirovanie i okhrana vod ot zagrazneniya. In: *Metody biotestirovaniya vod*. Chernogolovka, 1988, pp. 4–21. (in Russ.)].
5. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Pheodactylum tricornutum* Bohlin // *Сибирский экологический журнал*. 2011. Т. 1. С. 99–105. [Markina Z. V., Aizdaicher N. A. *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin bioassay of water quality of amur bay (the Sea of Japan). *Sibirskii ekologicheskii shurnal*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 99–105. (in Russ.)].
6. 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.)].
7. Шилова Е. Л. *Влияние тяжелых металлов на представителей пресноводного фито- и зоопланктона в условиях засоления*: дис. ... канд.

- биол. наук. Саратов, 2014. 133 с. [Shilova E. L. *Vliyanie tyazhelykh metallov na predstavitelei presnovodnogo fito- I zooplanktona v usloviyakh zasoleniya*: dis. ... kand. biol. nauk. Saratov, 2014, 133 p. (in Russ.)].
8. Флеров Б. А. Биотестирование: терминология, задачи, перспективы // *Теоретические вопросы биотестирования*. Волгоград : АН СССР, Ин-т биологии внутренних вод, 1983. С. 13–20. [Flerov B. A. Biotestirovanie: terminologiya, zadachi, perspektivy. In: *Teoreticheskie voprosy biotestirovaniya*. Volgograd: AN SSSR, In-t biologii vnutrennikh vod, 1983, pp. 13–20. (in Russ.)].
 9. *Эколого-токсикологические аспекты загрязнения морской среды* / под ред. С. А. Патина. Ленинград : Гидрометеиздат, 1985. Т. 5. 116 с. [*Ekologo-toksikologicheskie aspekty zagryazneniya morskoi sredy*. S. A. Patin (Ed.). Leningrad: Gidrometeoizdat, 1985, vol. 5, 116 p. (in Russ.)].
 10. Behrenfeld M. J., Boss E., Siegel D. A., Shea D. M. Carbon-based ocean productivity and phytoplankton physiology from space. *Global Biogeochemical Cycles*, 2005, vol. 19, iss. 1, GB1006. doi: [10.1029/2004GB002299](https://doi.org/10.1029/2004GB002299).
 11. Berges J. A., Franklin D. J., Harrison P. J. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology*, 2001, vol. 37, iss. 6, pp. 1138–1145. doi: [10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x).
 12. Bishop N. I., Senger H. Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. *Methods in Enzymology*, 1971, vol. 23, pp. 53–66. doi: [10.1016/S0076-6879\(71\)23079-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)23079-2).
 13. Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornerutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 1995, vol. 31, iss. 2, pp. 165–174. doi: [10.1016/0166-445X\(94\)00071-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00071-W).
 14. Field C. B., Behrenfeld M. J., Randerson J. T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 1998, vol. 281, iss. 5374, pp. 237–240. doi: [10.1126/science.281.5374.237](https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237).
 15. 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. doi: [10.1016/0166-445X\(86\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(86)90069-X).
 16. Fourtanier E., Kociolek J. P. *Catalogue of Diatom Names*. California Academy of Sciences, 2011. Available at: <http://researcharchive.calacademy.org/research/diatoms/names/index.asp> [accessed 12.07.2017].
 17. Guillard R. R. L., Hargraves P. E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, 1993, vol. 32, no. 3, pp. 234–236. doi: [10.2216/i0031-8884-32-3-234.1](https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1).
 18. Harrison P. J., Waters R. E., Taylor F. J. R. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology*, 1980, vol. 16, iss. 1, pp. 28–35. doi: [10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x).
 19. Hustedt F. Die Kieselalgen Deutschlands, Osterreichs und der Schweiz. In: *Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreichs und der Schweiz*. L. Rabenhorst (Ed.). Leipzig, 1961–1966, bd. 7, teil 3, 816 p.
 20. Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Phaeodactylum tricornerutum* in the copper-polluted environment. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 53, no. 3, pp. 305–309.
 21. Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Influence of the ariel detergent on the growth and physiological state of the unicellular algae *Dunaliella salina* (Chlorophyta) and *Plagioselmis protonga* (Cryptophyta). *Hydrobiological Journal*, 2010, vol. 46, no. 2, pp. 49–56.
 22. Metal ions in Biological systems. Vol. 44: *Biogeochemistry, Availability and Transport of Metals in the Environment*. H. Sigel, A. Sigel, R. K. Sigel (Eds.). New York, 2005, 352 p.
 23. Nelson D. M., Treguer P., Brzezinski M. A., Leynaert A., Queguiner B. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles*, 1995, vol. 9, iss. 3, pp. 359–372.

- doi: [10.1029/95GB01070](https://doi.org/10.1029/95GB01070).
24. Polyak Y. M., Zaytseva T. V., Petrova V. N., Medvedeva N. G. Development of mass cyanobacteria species under heavy metals pollution. *Hydrobiological Journal*, 2011, vol. 47, no. 3, pp. 75–90.
 25. 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, pp. 115–131. doi: [10.1016/S0166-445X\(01\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00188-6).
 26. Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *The diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge : Cambridge University press, 1990, 747 p.
 27. 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 on phytoplankton activity. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, vol. 184, iss. 1–3, pp. 819–825.
 28. Tempère J., Peragallo H., Peragallo M. *Diatomées du Monde Entier* : in 30 fascs. 2nd ed. Arcachon : J. Tempère, 1912, fascs. 20–23, pp. 305–352.
 29. *The Diatom World*. Seckbach, J., Kociolek, J. P. (Eds). Dordrecht ; Heidelberg ; London ; New-York: Springer, 2011, 533 p.
 30. Witkowski A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. *Diatom flora of Marine coast*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 2000, vol. 1, 926 p. (Iconographia Diatomologica : Annotated Diatom Monographs. H. Lange-Bertalot (Ed.); vol. 7).
 31. Yan J. X., Liu J. L., Yi L., Lang S. 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 & Pollution Research*, 2014, vol. 21, iss. 20, pp. 12050–12061.

COPPER SULPHATE IMPACT ON GROWTH AND CELL MORPHOLOGY OF CLONAL STRAINS OF FOUR BENTHIC DIATOM SPECIES (BACILLARIOPHYTA) FROM THE BLACK SEA

D. Yu. Romanova, A. N. Petrov, E. L. Nevrova

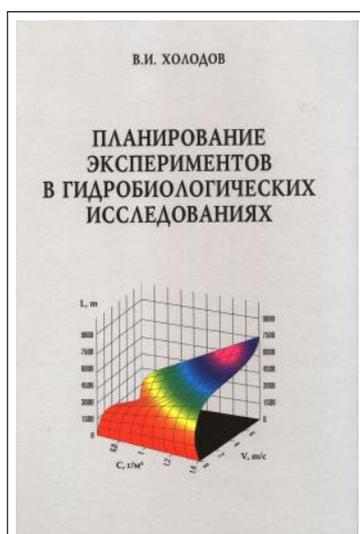
Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: driaromanova@yandex.ru

Many species of benthic diatoms (Bacillariophyta) are sensitive to ecological stressors and therefore changes in its parameters of development under various toxicants' impact can be considered as bioindicators on indirect assessment of the environment quality. The study is focused on investigation of the population growth and changes in morphologic features of diatom cells in cloned cultures under single addition of copper sulfate (CuSO_4) in five successively decreasing concentrations ($128 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1}$ to $8 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1}$ of copper ions). The cloned cultures of 4 marine benthic species Bacillariophyta: *Cyclophora tenuis* Castracane 1878, *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua* (Grunow) Snoeijns 1998, *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer in Patrick & Reimer 1975 and *Haslea* sp. were used in experiments. The first two taxa were reported from the Black Sea diatom flora for the first time. By the results of 10-days toxicological experiments was ascertain that according to resistance to the toxicant the considered species are split into two groups. The mostly sensitive species *P. panduriforme* var. *continua* and *Haslea* sp. stopped population growth already at the minimum concentration of toxicant ($8 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$). Toxic benchmark of the copper sulphate causing to termination of cell development and growth of cell number for these 2 species is very low and falls within range 0 to $8 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Considering moderately tolerant species *E. paludosa*, the threshold concentration of copper ions is $16 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1}$, when differences in average cell number comparing with the control level are statistically significant under various exposure time of experiments. For tolerant *C. tenuis* the threshold concentration of Cu^{2+} is $32 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1}$ by which depression of cell growth always significantly differed from the control. By low concentrations of copper ions (8 and $16 \text{ mkg}\cdot\text{l}^{-1}$), increasing the cell number of moderately tolerant species along to extension of experiments can be well extrapolated by power function (for *C. tenuis*) or by sigmoid function (for *E. paludosa*). In the control, population growth of all 4 investigated diatom species can

be approximated by the exponential curve fitting for different duration of experiments (3 to 10 days). The certain peculiarities of diatom cells response under high concentration of toxicant, such as abnormality of morphogenesis and multiple non-separations of valves from any one side of cell after vegetative phase of cytokinesis were marked.

Keywords: diatom algae, biotesting, cytometry, copper sulfate, toxicant, newly-found species for the Bacillariophyta flora, Black Sea



Холодов В. И. Планирование экспериментов в гидробиологических исследованиях. – Симферополь: Н. Орианда, 2016. – 196 с.; 13 ил., 80 табл., библи. 31.

Руководство по организации и проведению экспериментальных и полевых гидробиологических и биологических исследований. Подробно на примерах изложена методика планирования активных экспериментов на основе регрессионного и дисперсионного анализов. Описаны методы пассивного эксперимента (полевых наблюдений). Для научных сотрудников, аспирантов и студентов, специализирующихся в морской биологии, гидробиологии и биологии.

Kholodov V. I. Experimental design techniques in hydrobiology. Simferopol, 2016, 196 p.

Experimental design techniques and the related organizational principles are given for laboratory and researches biology and hydrobiology. Using examples, the Guide offers a detailed methodology of the active experiment design based on regression analysis and the analysis of variance. Methods supporting passive experiment, i. e., field observation, are also described. The Guide is intended for scientists, postgraduates and university students having concern in marine biology, hydrobiology and biology.