

Ж.В. МАРКИНА

Рост и физиологическое состояние морских зеленых микроводорослей *Chlorella minutissima* и *Tetraselmis striata* в условиях загрязнения среды обитания медью

Изучено действие меди в концентрациях 50, 100 и 150 мкг/л на рост популяции, флуоресценцию хлорофилла *a*, содержание активных форм кислорода (АФК), мембранный потенциал митохондрий и содержание нейтральных липидов морских микроводорослей *Chlorella minutissima* и *Tetraselmis striata* (*Chlorophyta*) из зал. Петра Великого Японского моря. Рост *C. minutissima* стимулировался при концентрациях меди 50 и 100 мкг/л, *T. striata* – 50 мкг/л. У обеих микроводорослей отмечено снижение показателя флуоресценции хлорофилла *a*. У *C. minutissima* содержание АФК при внесении 50 мкг/л металла было ниже контрольного, а при 100 и 150 мкг/л не отличалось от такового. У *T. striata* содержание АФК увеличивалось при дозе меди 150 мкг/л. Мембранный потенциал митохондрий незначительно изменялся у *C. minutissima* при всех концентрациях меди и существенно снижался у *T. striata* при добавлении ее в количестве 100 и 150 мкг/л. Содержание нейтральных липидов увеличивалось при добавлении 50 мкг/л меди у *C. minutissima*, а при остальных концентрациях не отличалось от контроля. Токсикант во всех концентрациях приводил к снижению содержания нейтральных липидов у *T. striata*. Проведенные исследования показали, что *T. striata* более чувствителен к меди, чем *C. minutissima*. Концентрация меди 150 мкг/л выражено более токсична, чем 50 и 100 мкг/л, для обеих водорослей.

Ключевые слова: загрязнение, медь, *Chlorella minutissima*, *Tetraselmis striata*, флуоресценция хлорофилла *a*, активные формы кислорода, митохондрии, нейтральные липиды.

Growth and physiological state of marine green microalgae *Chlorella minutissima* and *Tetraselmis striata* in copper polluted environment. Zh.V. MARKINA (A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Far Eastern Federal University, Vladivostok).

Copper influence (in concentrations 50, 100 and 150 mkg/l) on population growth, chlorophyll *a* fluorescence, reactive oxygen species (ROS) content, mitochondrial membrane potential and neutral lipids content of marine microalgae from *Chlorella minutissima* and *Tetraselmis striata* (*Chlorophyta*) isolated from Peter the Great Bay (Sea of Japan) were investigated. *C. minutissima* growth stimulated at 50 and 100 mkg/l copper concentrations and *T. striata* - at 50 mkg/l. Both microalgae had decreased chlorophyll *a* fluorescence. *C. minutissima* ROS content in metal addition of 50 mkg/l were lower than control and at 100 and 150 mkg/l copper concentrations didn't differ from microalgae growing in pure environment. *T. striata* ROS content increasing at copper dose 150 mkg/l. Membrane potential of *C. minutissima* mitochondrion were slightly altered at all copper concentrations and the parameter of *T. striata* significantly decreased at its addition in the amount of 100 and 150 mkg/l substance. Neutral lipids of *C. minutissima* increased, during microalga exposition to 50 mkg/l copper, but other concentrations didn't alter the parameter. Toxicants in all concentrations lead to decreasing neutral lipids content in *T. striata*. This study revealed that *T. striata* more susceptible to copper than *C. minutissima*. Copper concentration 150 mkg/l significantly more toxic, than 50 and 100 mkg/l to both microalgae.

МАРКИНА Жанна Васильевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток), доцент (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток). E-mail: zhannav@mail.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 18-3-052 программы «Приоритетные научные исследования в интересах комплексного развития Дальневосточного отделения РАН».

Key words: contamination, copper; Chlorella minutissima, Tetraselmis striata, chlorophyll a fluorescence, reactive oxygen species, mitochondria, neutral lipids.

Влияние тяжелых металлов на представителей водных экосистем привлекает огромное внимание исследователей с 60-х годов XX в. в связи с отравлениями людей, употреблявших в пищу морепродукты, выловленные или выращенные в загрязненной данными веществами среде. Наиболее изучаемыми в экотоксикологическом плане металлами являются кадмий, ртуть и медь [17, 18]. Первые два металла не являются эссенциальными, т.е. не участвуют в физиолого-биохимических реакциях, что обуславливает их высокую токсичность для организмов [12]. Медь, напротив, жизненно необходимый элемент, в том числе для растений: способствует образованию хлорофиллов, входит в состав пластоцианина (одного из переносчиков электронов между фотосистемами), участвует в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях и азотном обмене, функционирует в цитохромоксидазном комплексе дыхательной цепи митохондрий [22]. Однако в высоких концентрациях она вызывает негативные эффекты, в том числе летальный [16]. Первичным токсическим действием данного металла на растительный организм является индуцирование продукции активных форм кислорода (АФК) [9]. Пристальное внимание к меди обусловлено также ее присутствием в разных типах сточных вод и, как следствие, большими объемами поступления в Мировой океан [18].

Увеличение содержания тяжелых металлов в водоемах в результате антропогенной деятельности приводит к их активному поглощению и накоплению в растениях, что отрицательно отражается не только на самих растениях, но и представляет серьезную угрозу здоровью человека и животных [22]. Одноклеточные водоросли являются источником питания для личинок беспозвоночных и взрослых двухстворчатых моллюсков, в том числе промысловых [1]. Это делает изучение действия меди на микроводоросли актуальным.

В экотоксикологической оценке микроводорослей базовым показателем является численность клеток [9]. Однако при неизменной или увеличивающейся величине этого показателя физиологические процессы в клетках могут быть угнетены. Наиболее часто измеряется флуоресценция хлорофилла *a* как показатель работы фотосинтетического аппарата – основного поставщика энергии растительной клетке [7]. В то же время состоянию митохондрий в токсической среде уделяется гораздо меньше внимания, хотя их работа также нарушается в стрессовых условиях [8, 19]. Известно, что стрессовые факторы наряду с физиологическими изменениями приводят к дефициту или накоплению некоторых веществ, например нейтральных липидов. Их метаболизм тесно связан с фотосинтезом, дыханием и другими физиологическими процессами [20].

Помимо выявления механизмов действия меди на микроводоросли и их органеллы, наиболее подверженные ее влиянию, что необходимо для пополнения данных об экологии видов, прогнозирования изменений в экосистемах, необходимо подобрать наиболее чувствительные показатели для оценки физиолого-биохимических нарушений для биотестирования природных вод с помощью микроводорослей, а также оценки токсичности веществ.

Действие меди на пресноводные одноклеточные зеленые водоросли исчерпывающе исследовано [9, 11, 16, 17], однако морским видам в данном плане все еще не уделяется должного внимания [5, 15], несмотря на их важную роль в экосистемах [21].

Для быстрой и качественной оценки состояния культур микроводорослей все чаще применяется проточная цитометрия, вошедшая в альгологическую практику более 30 лет назад [13]. На современном этапе она оснащена всем арсеналом методов флуоресцентного анализа компонентов клеток и происходящих в них процессов [2]. Измеряется автофлуоресценция хлорофилла *a*, применяются флуоресцентные красители для выявления физиологических и биохимических откликов на условия среды. Например, определение содержания липидов с помощью проточной цитометрии соответствует данным, полученным другими методами, что продемонстрировано на разных микроводорослях [13].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании действия меди на динамику численности популяции, состояние фотосинтетического аппарата и митохондрий, содержание АФК и нейтральных липидов морских зеленых микроводорослей *Chlorella minutissima* и *Tetraselmis striata*.

Материал и методика исследования

Объектами исследования служили культуры одноклеточных водорослей из отдела Chlorophyta, выделенные из зал. Петра Великого (Японское море): *Chlorella minutissima* Fott et Novakova и *Tetraselmis striata* Butcher. Культуры микроводорослей *Chlorella minutissima* штамм MBRU_CM-86 и *Tetraselmis striata* штамм MBRU_P-86 предоставлены ресурсным центром «Морской биобанк» ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>). Водоросли выращены на среде *f*, приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32 ‰, в 250 мл колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл при температуре 18 °С, интенсивности освещения 70 мкмоль/м²·с в области видимого света и свето-темновым периодом 14 ч свет : 10 ч темнота [4]. В качестве инокулята использовали культуры на экспоненциальной стадии роста. Начальная концентрация клеток *C. minutissima* – $20 \cdot 10^4$ кл./мл, *T. striata* – $3,7 \cdot 10^4$ кл./мл. Продолжительность экспериментов 7 сут. Пробы для проточно-цитометрического анализа отбирали через 3 и 7 сут опыта.

Медь добавляли в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, концентрации (50, 100 и 150 мкг/л) указаны в пересчете на ионы меди. ПДК меди для морских вод России – 5 мкг/л, ее содержание достигает 50 мкг/л, уровень 150 мкг/л относится к категории «высокое загрязнение» [3].

Измерения всех показателей проведены на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа записано 10 000 событий (региструемых в пробе частиц) в течение каждого измерения. Выбор клеток водорослей из общего числа событий, регистрируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* [13]. Проточно-цитометрический анализ выполнен в ННЦМБ ДВО РАН.

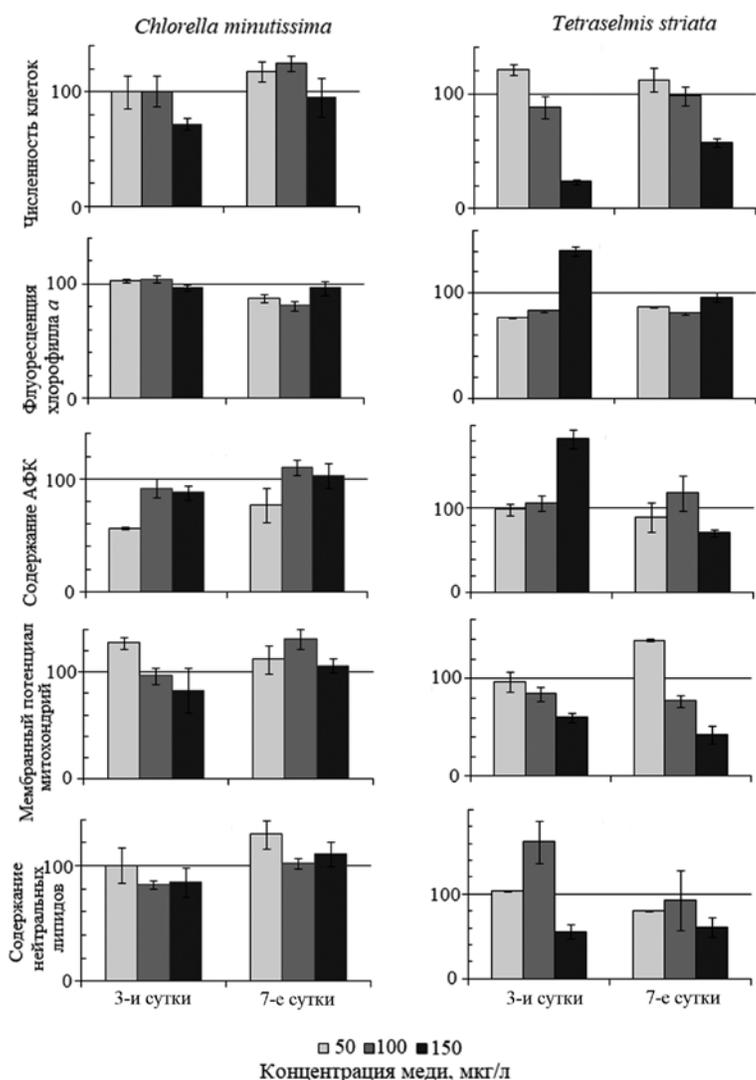
Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм [13]. Продукцию активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцин диацетата, окрашивание проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Показатель флуоресценции его окисленного и диацетилированного продукта определяли на длине волны 525 нм, длина волны возбуждения 488 нм [10]. Для определения мембранного потенциала митохондрий использовали флуоресцентный краситель DiOC6(3), окрашивание проводили в течение 30 мин, длина волны возбуждения 488 нм, испускания – 525 нм [2]. Содержание нейтральных липидов определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red, окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, длина волны возбуждения 488 нм, испускания – 580 нм [6].

Эксперименты проведены в трех повторностях. Данные в виде средних значений и стандартных отклонений, выраженные в процентах к контролю, представлены на рисунке. За контроль приняты показатели, полученные без добавления меди.

Результаты и обсуждение

Влияние разных концентраций меди на рост и физиологические показатели *Chlorella minutissima* и *Tetraselmis striata* было разнонаправленным (см. рисунок).

Медь оказывала как стимулирующий эффект на микроводоросли *Chlorella minutissima* и *Tetraselmis striata* при концентрации 50 мкг/л, так и ингибирующий при концентрации 150 мкг/л. Ранее было показано, что рост пресноводной зеленой водоросли *Scenedesmus incrassatulus* замедлялся через 6 сут экспозиции при 40 и 80 мкг/л этого металла [19].



Численность и показатели физиологического состояния микроводорослей *Chlorella minutissima* и *Tetraselmis striata* при воздействии меди (% к контролю)

Такую же реакцию на медь в концентрации 50–100 мкг/л проявила диатомея *Phaeodactylum tricoratum* [8]. Обнаруженное как нами, так и другими авторами снижение численности клеток при добавлении в среду меди обусловлено нарушением процессов фотосинтеза. В условиях интоксикации растительный организм может использовать энергию, предназначенную для роста, на другие клеточные процессы, необходимые для поддержания гомеостаза клетки [19]. Кроме того, медь оказывает негативное действие на морфологию хромосом и клеточный цикл, что приводит к ингибированию клеточного деления [14].

Рост растений прежде всего зависит от эффективного поглощения солнечной энергии и ее трансформации в химическую, которая утилизируется в процессе фотосинтеза [19]. Снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* у обеих микроводорослей в наших опытах может быть связано как с уменьшением количества пигмента (в результате ингибирования его синтеза, непосредственного разрушения, выхода из фотосинтетических мембран), так и с ингибированием процесса фотосинтеза в результате нарушения работы электрон-транспортной цепи фотосистем. Также медь способна заменять магний в молекуле хлорофилла *a*, делая его неспособным к фотосинтезу. Сбрасываемая энергия от

таких поврежденных хлорофиллов может передаваться молекулярному кислороду, приводя к появлению синглетного кислорода, вызывающего окислительное повреждение [18], что также является одной из причин снижения флуоресценции хлорофилла *a* и изменения других физиологических показателей.

Проведенные опыты показали, что у *C. minutissima* добавление 50 мкг/л меди привело к снижению содержания АФК. Так как данный процесс происходил одновременно с увеличением численности клеток, можно предположить, что эта концентрация является благоприятной для развития водоросли. У *T. striata* содержание АФК увеличивалось на 3-и сутки при концентрации 150 мкг/л металла. Показано, что с началом возрастания содержания АФК в клетках запускается активация генов, вовлеченных в пути детоксикации [23]. Вероятно, поэтому мы наблюдали снижение содержания АФК после его резкого увеличения при данных условиях к 7-м суткам опыта, что свидетельствует о включении адаптационных механизмов водоросли.

Функционирование митохондрий напрямую зависит от условий среды и энергетических потребностей клетки [16]. У *C. minutissima* в присутствии меди мембранный потенциал митохондрий увеличивался. Это также зарегистрировано у *P. tricornutum* при добавлении 50 и 100 мкг/л, однако рост диатомеи ингибировался [8]. Мембранный потенциал митохондрий *T. striata* снижался при воздействии меди, что свидетельствует о деполяризации мембран. Возможно, большее воздействие меди на митохондрии *T. striata* связано с тем, что данный вид, в отличие от *C. minutissima*, является подвижным, а на поддержание двигательной активности требуется большее количество АТФ, и, соответственно, возрастает нагрузка на митохондрии. Такое же явление зарегистрировано у зеленой микроводоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* при концентрации меди 80 мкг/л через 3 сут опыта [16]. При подавлении фотосинтеза микроводорослей в токсических условиях усиливается роль митохондрий в метаболических процессах. Например, активация дыхания является следствием потребления энергии для обеспечения детоксикации меди. Митохондрии *C. minutissima* и *T. striata* подверглись большему воздействию меди, чем хлоропласты. Однако Н.В. Perales-Vela с соавторами [19] указывают, что процессы, связанные с обеспечением дыхания растений, более устойчивы к меди, чем фотосинтез. Возможно, это обусловлено видовыми различиями, однако в настоящее время мало экспериментов, посвященных одновременному изучению митохондрий и хлоропластов, чтобы сделать однозначные выводы. Также имеются сведения, что медь влияет на мембраны митохондрий сильнее, чем другие металлы даже в больших концентрациях [16].

У водорослей при стрессовых условиях любой природы часто отмечается накопление нейтральных липидов, однако в настоящей работе, напротив, отмечено их уменьшение. Это может быть связано с их использованием для восполнения энергозатрат клетки в токсических условиях. На примере другого тяжелого металла – кадмия показано, что его содержание в среде приводит к снижению количества нейтральных липидов, даже разрушению липидных телец у микроводорослей [9, 17]. Известно также, что накопление нейтральных липидов уменьшается при высоком уровне АФК [17], что было наиболее ярко выражено у *T. striata* на 3-и сутки опыта при концентрации 150 мкг/л меди.

Выводы

Проведенные исследования показали, что вид *Tetraselmis striata* более чувствителен к действию меди в концентрациях 50–150 мкг/л, чем *Chlorella minutissima*. Одной из возможных причин этого может являться присутствие в составе клеточной оболочки *Chlorella* споропеллина, устойчивого к химическим воздействиям [1].

При концентрации 50 мкг/л рост обеих водорослей стимулировался, при 100 мкг/л у *C. minutissima* он продолжился, а у *T. striata* слабо ингибировался. Концентрация 150 мкг/л приводила к гибели части популяции *T. striata*.

Флуоресценция хлорофилла *a* уменьшалась к концу опыта у обеих водорослей при всех концентрациях токсиканта.

Содержание АФК у *C. minutissima* выражено уменьшалось при концентрации 50 мкг/л. Самое большое его увеличение происходило при 150 мкг/л у *T. striata*. В остальных случаях отмечались незначительные колебания показателя.

Мембранный потенциал митохондрий при добавлении меди увеличивался или оставался неизменным у *C. minutissima* и снижался у *T. striata*.

Содержание нейтральных липидов у *C. minutissima* увеличивалось при 50 мкг/л к концу опыта и оставалось неизменным при остальных концентрациях меди. У *T. striata* во всех случаях показатель был ниже контрольного уровня. Снижение содержания нейтральных липидов у водорослей, особенно в сочетании с уменьшением их численности, может являться дополнительной причиной (помимо непосредственной интоксикации медью) гибели организмов, чьей кормовой базой являются микроводоросли, например моллюсков и личинок беспозвоночных.

Таким образом, по увеличению чувствительности к влиянию меди исследованные показатели можно расположить в следующий ряд: флуоресценция хлорофилла *a* < численность клеток < содержание нейтральных липидов = содержание АФК < мембранный потенциал митохондрий. То есть такой широко используемый вследствие быстроты анализа критерий оценки, как флуоресценция хлорофилла *a*, является самым малоинформативным. В связи с этим рекомендуется или сочетать его с другими, или выбирать для оценки качества морских вод и токсичности веществ с помощью микроводорослей иные показатели, например мембранный потенциал митохондрий.

Автор искренне благодарит сотрудников лаборатории клеточных технологий ННЦМБ ДВО РАН за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботаника: курс альгологии и микологии / под ред. Т.Ю. Дьякова. М.: МГУ, 2007. 559 с.
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расшир. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 576 с.
3. Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник. 2016 / под ред. А.Н. Коршенко. М.: Наука, 2017. 190 с.
4. Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А., Стоник И.В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов: науч.-метод. пособие. Владивосток: Дальнаука, 2011. 89 с.
5. Adams M.S., Dillon C.T., Vogt S., Lai B., Stauber J., Jolley D.F. Copper uptake, intracellular localization and speciation in marine microalgae measured by synchrotron radiation X-Ray fluorescence and absorption microspectroscopy // Environ. Sci. Technol. 2016. Vol. 50. P. 8827–8839.
6. Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // J. Microbiol. Methods. 2016. Vol. 128. P. 74–79.
7. Araújo C.V.M., Diz F.R., Lubián L.M., Blasco J., Moreno-Garrido I. Sensitivity of *Cylindrotheca closterium* to copper: Influence of three test endpoints and two test methods // Sci. Total. Environ. 2010. Vol. 408. P. 3696–3703.
8. Cid A., Fidalgo P., Herrero C., Abalde J. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry // Cytometry. 1996. Vol. 25. P. 32–36.
9. El-Naggar A.H., Sheikh H.M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals // Life Sci. J. 2014. Vol. 11. P. 1349–1357.
10. Gomes F., Ferdandes E., Lima J.F.L.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // J. Biophys. Biochem. Methods. 2005. Vol. 65. P. 45–80.
11. Hamed S.M., Selim S., Klöck G., AbdElgawad H. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2017. Vol. 144. P. 19–25.
12. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53. P. 1–11.
13. Hyka P., Lickova S., Přibyl P., Melzoch K., Kovar K. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 2–16.
14. Jiang W., Liu D., Liu X. Effect of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* // Biol. Plantarum. 2001. Vol. 44. P. 105–109.
15. Kumar K.S., Shin K.-H. Effect of copper on marine microalga *Tetraselmis suecica* and its influence on intra- and extracellular iron and zinc content // KJEE. 2017. Vol. 50. P. 16–28.

16. Machado M.D., Soares E.V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress // *Aquat. Toxicol.* 2014. Vol. 147. P. 1–6.
17. 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 // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. P. 23929–23969.
18. Nagajyoti P.S., Lee K.D., Sreekanth Tvm. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // *Environ. Chem. Lett.* 2010. Vol. 8. P. 199–216.
19. Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Canizares-Villanueva R.O. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) // *Chemosphere.* 2007. Vol. 67. P. 2274–2281.
20. Pyc M., Cai Y., Greer M.S. et al. Turning over a new leaf in lipid droplet biology // *Trends Plant Sci.* 2017. Vol. 22. P. 596–609.
21. Tragin M., Vaultot P. Green microalgae in marine coastal waters: the ocean sampling day (OSD) dataset // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. DOI: 10.1038/s41598-018-32338-w.
22. Yruela I. Copper in plants // *Braz. J. Plant Physiol.* 2005. Vol. 17. P. 145–156.
23. Zhu Q.-L., Sai-Nan G., Wen F. et al. Transcriptional and physiological responses of *Dunaliella salina* to cadmium reveals time-dependent turnover of ribosome, photosystem, and ROS-scavenging pathways // *Aquat. Toxicol.* 2019. Vol. 207. P. 153–162.