

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ И СУЛЬФАТА МЕДИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *Thalassiosira weissflogii* В УСЛОВИЯХ НАКОПИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. И. Акимов^а, *, Е. С. Соломонова^а, Н. Ю. Шоман^а, О. А. Рылькова^а

^а Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия

*e-mail: arkady.akimov@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 12.01.2023 г.

Исследовано влияние наночастиц оксида меди (500, 1000, 2000 мкг/л) и ионов меди (37.5, 75, 150 мкг/л) на морфологические, структурно-функциональные и флуоресцентные параметры диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* в условиях длительного культивирования. Показано, что медь в ионной форме более токсична для данного вида микроводоросли, чем в виде наноксидов. Характер воздействия меди в ионной и наноформе на клетки *Thalassiosira weissflogii* имел как схожие черты, так и существенные отличия. Выявлено различие в действии исследуемых токсикантов на рост водорослей и работу их фотосинтетического аппарата. Добавление ионов меди в культивационную среду приводило к длительной лаг-фазе на начальном этапе эксперимента с последующим восстановлением роста на 3–6 сут экспозиции. Увеличение концентрации наночастиц оксида меди в среде вызывало торможение роста водорослей без выраженной лаг-фазы. С ростом концентрации Cu^{2+} в культуральной среде наблюдалось снижение квантовой эффективности утилизации световой энергии фотосинтетическим комплексом ФС II и относительной максимальной скорости электронного транспорта, тогда как наночастицы оксида меди слабо влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата *Thalassiosira weissflogii*. При повышении концентрации меди как в ионной форме, так и в форме наноксидов у водорослей отмечено увеличение объема клеток, изменение их формы и гранулярности, увеличение продукции активных форм кислорода, подавление ферментативной активности и снижение значений автофлуоресценции отдельных клеток в красной области спектра.

Ключевые слова: *Thalassiosira weissflogii*, накопительное культивирование, наночастицы оксида меди, ионы меди, клеточная морфология, проточная цитометрия, фотосинтетический аппарат, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0015330322600826, **EDN:** PZQKPK

ВВЕДЕНИЕ

Особый интерес к меди в экотоксикологических исследованиях обусловлен тем, что она относится к эссенциальным микроэлементам, участвующим во многих метаболических и физиологических процессах клеток растений [1, 2]. Вместе с тем высокие концентрации меди оказывают токсическое воздействие на клетки, что приводит к ингибированию роста водорослей [3, 4], повреждению фотосинтетического аппарата [5, 6], увеличению среднего объема клеток [4], потере клеточной подвижности [7] и ряду других структурных и функциональных изменений. Анализ литературных данных показал, что к настоящему времени накоплен огромный фактический материал, касаю-

щийся как оценки действия меди на морские одноклеточные водоросли [8, 9], так и их адаптационного отклика на воздействие этого поллютанта за счет внутренних и/или внешних механизмов детоксикации [10]. Увеличение продукции внеклеточных хелаторов в ответ на присутствие токсиканта, иммобилизация металла путем связывания на поверхности клетки или с помощью внеклеточного слизистого слоя полисахаридов — это основные примеры внешних защитных механизмов микроводорослей, препятствующих проникновению металлов внутрь клеток. В свою очередь к внутриклеточным механизмам детоксикации металлов следует отнести связывание ионов с небелковыми тиоловыми соединениями, накопление метал-

лов в полифосфатных тельцах и выведение их из клетки.

В последние десятилетия для водных экосистем появилась новая угроза — загрязнение медью в наноформе с размером частиц менее 100 нм. Бурное развитие нанотехнологической промышленности и экспоненциальный рост производства наночастиц металлов и их оксидов, используемых практически во всех отраслях человеческой деятельности [11], привело к увеличению объемов поступления данного загрязнителя в водную среду. Количество инженерных продуктов, содержащих в своем составе наночастицы (НЧ), увеличилось в 91 раз в период с 2005 по 2020 гг. [12]. Мировое ежегодное производство НЧ оксида меди (CuO НЧ) в 2014 г. составляло примерно 570 т/год и, по прогнозам, к 2025 г. составит 1600 т/год [13]. CuO НЧ в основном используются в качестве биоцидов [14], в сельском хозяйстве [15], входят в состав большинства противобразующих красок [16]. Масштаб проблемы и опасность наночастиц металлов для живых организмов начали признавать к концу 2000-х гг. [17]. Этим объясняется наблюдаемый в последние годы рост количества публикуемых экспериментальных исследований, посвященных оценке воздействия НЧ оксида меди на живые организмы и, в частности, на микроводоросли как первично-продукционное звено водных биоценозов [18–20]. Большинство исследований посвящено оценке краткосрочного (в первые 72 ч культивирования) воздействия загрязнителя и определению концентраций НЧ CuO , угнетающих и/или останавливающих рост микроводорослей [18, 21]. Однако не менее важным является выявление причин, лежащих в основе изменений физиологического состояния клетки при воздействии загрязнителя и в конечном итоге вызывающих снижение ее ростовых и продукционных характеристик. Для этого целесообразно проведение длительных экспериментов, включающих оценку динамики основных структурно-функциональных показателей микроводорослей при разной концентрации загрязняющего вещества в среде. Кроме того, неясным остается вопрос сравнительной оценки воздействия меди в ионной и наноформе на растительную клетку. В литературных источниках нам удалось найти лишь несколько исследований, посвященных сравнению воздействия CuSO_4 и НЧ CuO для одного вида водорослей в одинаковых условиях культивирования [22, 23].

Цель работы — оценка физиологического отклика диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* при длительном культивировании в среде с наночастицами оксида меди и ионами меди разной концентрации. Для достижения поставленной цели решали следующие задачи: 1) оценить динамику ростовых, структурных, флуоресцентных и цитометрических показателей водорослей при различных концентрациях меди в ионной и нанофор-

ме; 2) оценить влияние внесенной концентрации загрязнителя на конечную плотность культуры в стационарной фазе роста; 3) определить пороговые концентрации Cu^{2+} и НЧ CuO , ингибирующие рост и потенциальную фотосинтетическую активность *Thalassiosira weissflogii*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объекта исследования была использована альгологически чистая культура морской диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.A. Fryxell & Hasle 1977 из коллекции живых культур морских планктонных микроводорослей (IBSS) научно-образовательного центра коллективного пользования “Гидробионты мирового океана” (WDCM № 1201) Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”.

Условия проведения экспериментов. В ходе эксперимента водоросли выращивали на разбавленной в 5 раз питательной среде Гольдберга без добавления меди и ЭДТА, способного связывать растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, тем самым уменьшая их активность и токсическое действие на клетки (ГОСТ 31960-2012). Используемая концентрация питательной среды обеспечивала экспоненциальный рост водорослей в контрольных склянках в течение 5–6 сут при начальной концентрации клеток около 9×10^3 кл./мл.

Культивирование водорослей проводили в конических колбах с объемом культуральной суспензии 150 мл при интенсивности света $85 \text{ мкЭ}/(\text{м}^2 \text{ с})$, свето-темновом периоде 14/10 ч и температуре 20°C . Освещение колб осуществляли снизу светодиодами холодного света. Уровень освещенности определяли зондирующим 4π датчиком квантометра QSL 2101 (“Biospherical Instruments Inc.”, США). Барботаж культур осуществляли аквариумными компрессорами, величина pH культуральной среды находилась в пределах 8.2–8.5. Предварительно до начала эксперимента водоросли адаптировали к заданным абиотическим условиям роста в течение 3 сут. При этом плотность культуры поддерживали на постоянном уровне путем ежедневного разбавления свежей питательной средой. После периода адаптации в экспериментальные колбы вносили растворы загрязнителей. Дальнейшее культивирование водорослей проводили в накопительном режиме. Измерение всех исследуемых параметров проводили ежедневно в течение 12 сут.

В качестве токсиканта использовали сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagent, $\geq 98.0\%$, “Sigma-Aldrich”, США) и нанопорошок оксида меди CuO (“Sigma-Aldrich”, США) со средним размером частиц 50–80 нм. Из маточного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

готовили растворы токсиканта с концентрациями 37,5, 75, 150 мкг/л (в пересчете на ионы Cu^{2+}). Маточный раствор, содержащий наночастицы оксида меди, предварительно обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвуковой ванны УЗВ-1.3 (“Сапфир”, Россия) в течение 1 ч для диспергирования частиц. Концентрация наночастиц оксида меди в разных вариантах эксперимента составляла 500, 1000, 2000 мкг/л (в пересчете на ионы Cu^{2+}). Выбор исследуемых концентраций токсикантов обусловлен предварительно полученными данными о степени токсичности меди на данный вид водорослей. В качестве контроля применяли водоросли, культивируемые на среде без добавления меди. В каждом варианте опыта использовали по три экспериментальные колбы.

Методы измерения. Цитометрический анализ проб проводили в центре коллективного пользования “Спектрометрия и хроматография” Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” на проточном цитометре MACS Quant Analazer (“Miltenyi Biotec”, Германия), оборудованном тремя лазерами (405 нм, 488 нм, 635 нм). Для обработки данных использовали программу FSC Express 7 Research Edition. Общую численность микроводорослей в культурах определяли согласно методике, описанной нами ранее [24].

Удельную скорость роста микроводорослей рассчитывали по уравнению (1):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}, \quad (1)$$

где μ — удельная скорость роста водорослей, сут^{-1} ; N_0 и N_t — исходная концентрация клеток и их количество через время t , $\text{клеток} \cdot \text{л}^{-1}$; t — время между измерениями, сут.

Производство активных форм кислорода (АФК) у *Th. weissflogii* оценивали по флуоресценции красителя 2–7-дихлорфлуоресцеиндиацетат (H2DCF-DA; “Merck”, Германия). H2DCF-DA — клеточно-проницаемый индикатор АФК, наиболее часто используемый для их количественной оценки [25]. Окраску суспензии клеток проводили в соответствии с [25]. Интенсивность флуоресценции H2DCF-DA оценивали по свечению клеток в зелёной области спектра, 525 нм, предварительно вычитали значение автофлуоресценции клеток *Th. weissflogii* в данной области спектра.

Метаболическую активность клеток (относительная величина) оценивали на двух параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (диацетатфлуоресцеина) (канал FL1 в зелёной области спектра, 525 нм) и автофлуоресценции клеток в красной области (FL4) спектра на безразмерных логарифмических шкалах. FDA, в состав, которого входит субстрат, специфичен к ферментам груп-

пы эстераз, является маркером метаболической активности в живых клетках, а интенсивность его флуоресценции пропорциональна физиологической активности каждой из исследуемых клеток [24]. Окрашивание водорослей витальным красителем диацетатом флуоресцеина (FDA) производили по протоколу [24]. Рассчитывали среднее значения аккумулятивной флуоресценции FDA на клетку, предварительно вычитали значения автофлуоресценции клеток *Th. weissflogii* в данной области спектра.

Измерение флуоресценции пигментного комплекса водорослей проводили на флуориметре с импульсной модуляцией возбуждающего света на длине волны 455 нм “Мега–25м”, разработанном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (производитель ООО “Генная и клеточная терапия”, г. Москва, Россия) [26]. Перед измерением пробы выдерживали 15 мин в темноте.

Относительную вариабельную флуоресценцию, характеризующую максимальную квантовую эффективность использования световой энергии, рассчитывали по формуле (2):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m, \quad (2)$$

где F_0 — величина флуоресценции хлорофилла *a* при открытых реакционных центрах, измеренная через 2,5 мкс от начала облучения с интенсивностью 5000 мкЭ/(м² с); F_m — максимальная флуоресценция хлорофилла *a* при закрытых реакционных центрах, измеренная через 1 с от начала облучения с интенсивностью 5000 мкЭ/(м² с).

Относительную максимальную скорость электронного транспорта ФС II при интенсивности света 500 мкЭ/(м² с) и длительности экспозиции 40 с рассчитывали по формуле (3):

$$\text{rETR} = \frac{F'_m - F'_0}{F'_m} I, \quad (3)$$

где F'_m — максимальная флуоресценция хлорофилла *a* на фоне постоянного освещения; F'_0 — нулевая флуоресценция хлорофилла *a* при постоянном освещении; I — интенсивность постоянного освещения.

Определение концентрации хлорофилла *a* в пробе проводили флуориметрическим методом [27]. Измерения флуоресценции осуществляли на лабораторном флуориметре с импульсной модуляцией возбуждающего света на длине волны 455 нм “Мега–25м” (“Генная и клеточная терапия”, Россия). Предварительная калибровка флуориметра была проведена по хроматографически чистому хлорофиллу *a* (“Sigma”, США), исходную концентрацию которого определяли на спектрофотометре СФ-2000 (“ЛОМО”, Россия). Расчет

удельного содержания хлорофилла *a* (пг/кл.) в клетках водорослей производили путем деления суммарной концентрации данного пигмента на численность клеток культуры для каждого отдельного случая. Также рассчитывали выход флуоресценции на единицу хлорофилла *a* ($F_m/\text{Хл}$, где F_m — максимальная флуоресценция хлорофилла *a* при закрытых реакционных центрах, Хл — суммарная концентрация пигмента в пробе).

Микроскопия. Для световой микроскопии (СМ) использовали микроскоп Микмед-6 (“ЛОМО”, Россия), при увеличении $\times 1000$, с цифровой камерой МС-6.3 (“ЛОМО”, Россия), снабженный компьютерным программным обеспечением MCView (“ЛОМО-Микросистемы”, Россия) на базе ЦКП “Молекулярная структура вещества” Севастопольского государственного университета. Размеры клеток определяли по микрофотографиям с помощью программы Image J 1.50i (National Institutes of Health, США, Java 1.6.0_20 (32-bit)). Объем рассчитывали по формуле цилиндра [28].

При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) использовали протокол [29]. Для сушки образцов в критической точке (1.5–2.5 ч) использовали устройство Leica EM CPD300 (Германия). Для напыления (Au/Pd; 0.5–1.0 мин) применяли прибор Leica EM ACE200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония), при увеличении от $\times 500$ до $\times 5000$. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) выполнена с помощью детектора рентгеновского излучения Oxford instruments ULTIM MAX 65 (Великобритания).

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнялась по стандартным программным пакетам “Microsoft Excel 7.0” (Microsoft Office), “Grapher-16” (Golden Software). Значения, указанные на графиках и в таблице, представляют собой среднее трех измерений. Достоверность различий между выборками оценивали по *t*-критерию Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ионов меди Cu^{2+} и наночастиц оксида меди CuO на динамику численности *Thalassiosira weissflogii* в условиях накопительного культивирования

На рисунке 1 представлена динамика изменения численности культуры *Thalassiosira weissflogii* при добавлении в среду ионов меди Cu^{2+} и наночастиц оксида меди разной концентрации. Внесение в культивационную среду Cu^{2+} приводило к замедлению скорости роста водорослей вплоть до полной остановки деления клеток при концен-

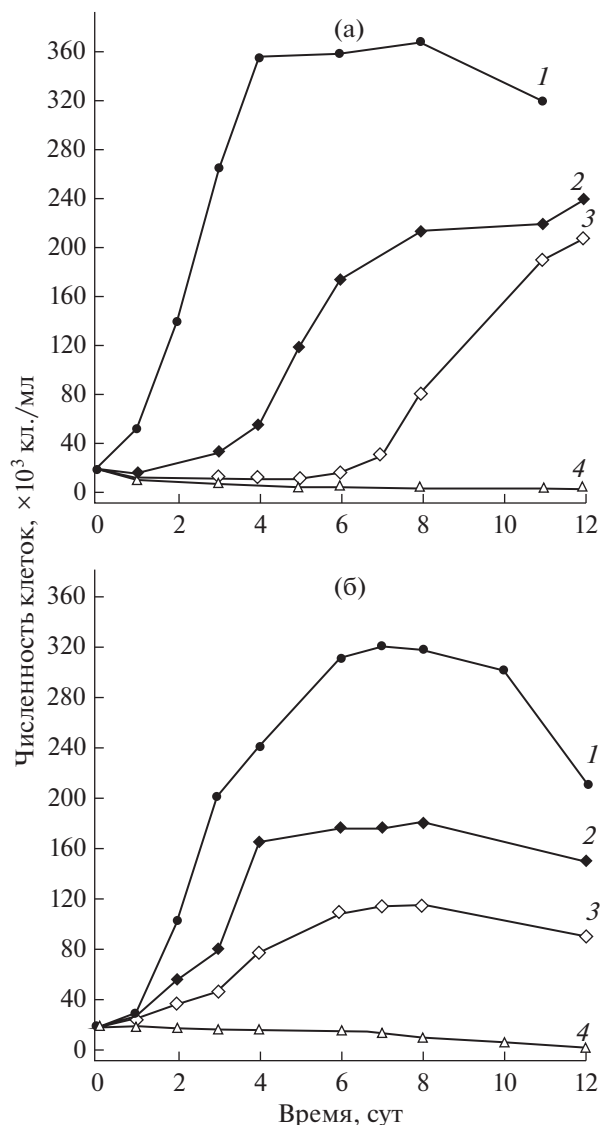


Рис. 1. Динамика численности клеток *Thalassiosira weissflogii* при различных концентрациях Cu^{2+} (а): 0 мкг/л (1), 35.5 мкг/л (2), 75 мкг/л (3) и 150 мкг/л (4) и наночастиц оксида меди (б): 0 мкг/л (1), 500 мкг/л (2), 1000 мкг/л (3) и 2000 мкг/л (4).

трации поллютанта 150 мкг/л. Такая концентрация меди была летальной для *Th. weissflogii* и способствовала быстрой необратимой деградации исследуемой культуры. При внесении в среду ионов меди в более низких концентрациях 37.5 и 75 мкг/л наблюдалась длительная лаг-фаза роста: 3 и 6 сут, соответственно. Кроме того, при концентрации Cu^{2+} 75 мкг/л на начальном этапе эксперимента отмечена частичная элиминация клеток в культуре, однако на 5–6 сут рост *Th. weissflogii* возобновлялся. На участке экспоненциального роста водорослей их удельная скорость роста составляла 1.1, 0.7 и 0.6 сут⁻¹ в вариантах без добавления меди,

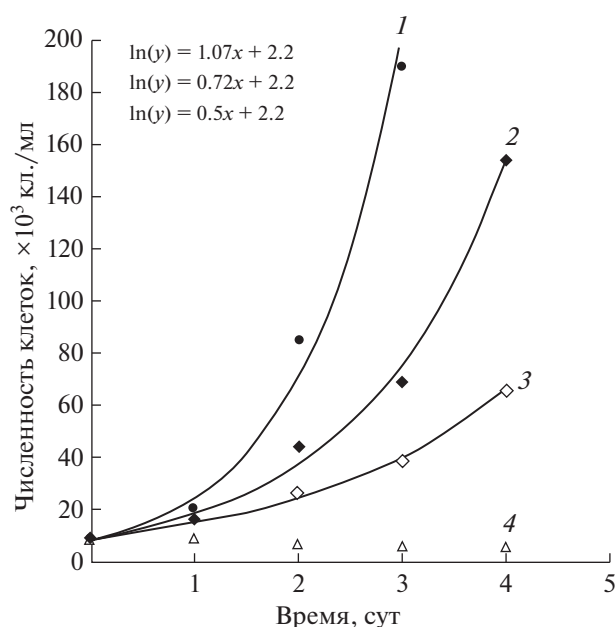


Рис. 2. Динамика численности клеток *Thalassiosira weissflogii* в культуральной среде в экспоненциальной фазе роста при различном содержании наночастиц оксида меди: 0 мкг/л (1), 500 мкг/л (2), 1000 мкг/л (3) и 2000 мкг/л (4).

при концентрации меди 37.5 и 75 мкг/л соответственно.

При добавлении наночастиц CuO в культуральную среду в концентрациях 500 и 1000 мкг/л водоросли имели положительную динамику роста, однако, также как и в случае с ионами меди, наблюдалось снижение удельной скорости роста при увеличении концентрации поллютанта. Так, в контрольном варианте опыта без добавления

НЧ удельная скорость роста составляла 1.1 сут^{-1} , а при концентрациях НЧ CuO 500 и 1000 мкг/л она снижалась до 0.7 и 0.5 сут^{-1} соответственно. Однако, в отличие от ионов меди, добавление наночастиц CuO не вызывало длительную лаг-фазу и начальный рост исследуемой культуры аппроксимировался нами по экспоненциальной зависимости для каждого эксперимента в отдельности, что показано на рисунке 2. При концентрации наночастиц CuO 2000 мкг/л наблюдалась гибель культуры *Th. weissflogii*.

Конечная плотность культур в стационарной фазе роста также зависела от внесенной концентрации поллютанта: закономерно снижалась с повышением исходного содержания меди как в ионной, так и в наноформе в среде. В контрольном варианте эксперимента без добавления меди численность *Th. weissflogii* в стационарной фазе роста составила $3.6 \times 10^5 \text{ кл./мл}$. В то время как при добавлении в среду Cu^{2+} в концентрации 37.5 и 75 мкг/л конечная плотность культур снижалась до 2.5 и $2 \times 10^5 \text{ кл./мл}$, соответственно. Максимальная наблюдаемая численность *Th. weissflogii* при внесении НЧ CuO в концентрациях 500 и 1000 мкг/л составила 1.7 и $1.1 \times 10^5 \text{ кл./мл}$ соответственно.

Влияние ионов меди и наночастиц оксида меди на морфологию клеток *Th. weissflogii*

При увеличении содержания поллютанта в среде отмечено возрастание структурной неоднородности клеток относительно контроля, наблюдаемое по увеличению индекса бокового рассеяния SS по измерениям на проточном цитометре (табл. 1, 2). Максимальные величины бокового

Таблица 1. Ростовые и флуоресцентные параметры клеток *Thalassiosira weissflogii* при культивировании в среде с CuSO_4 на третьи и шестые сутки эксперимента

Концентрация Cu^{2+} , мкг/л	Сутки эксперимента	$N_{\text{кл.}} \times 10^3$, кл./мл	μ , сут^{-1}	$X_{\text{л}}$, пг/кл	$F_m/X_{\text{л}}$	$r\text{ETR}^*$	F_v/F_m	FL4	FS	SS	FDA	АФК
0	3 сут	265	1.1	1.43	7.7	0.48	0.77	67	55	33	146	76
	6 сут	399		1.38	8.1	0.49	0.74	68	57	32	109	
37.5	3 сут	32	0.7	1.5	7.5	0.43	0.68	66	60	40	118	81
	6 сут	173		1.32	7	0.45	0.71	64	58	38	98	
75	3 сут	10	-0.1	1.06	6.4	0.24	0.64	52	66	55	63	75
	6 сут	16	0.6	1.36	5.3	0.41	0.69	60	61	43	90	
150	3 сут	6		0.61	3.9	0.18	0.41	38	74	63	58	
	6 сут	3		0.42	2.6	0.08	0.29	33	78	86	41	180

Примечание: $N_{\text{кл.}}$ — число клеток; μ — удельная скорость роста; $X_{\text{л}}$ — удельное содержание хлорофилла *a*; $F_m/X_{\text{л}}$ — выход флуоресценции на единицу хлорофилла *a*; $r\text{ETR}$ — относительная максимальная скорость электронного транспорта при освещенности $500 \text{ мкЭ} / (\text{м}^2 \text{ с})$; F_v/F_m — максимальный квантовый выход флуоресценции; FL4 — автофлуоресценция хлорофилла *a* на клетку на длине волны 680 нм; FS — прямое светорассеяние; SS — боковое светорассеяние клеток (гранулярность); FDA — среднее значение флуоресценции FDA на клетку; АФК — активные формы кислорода.

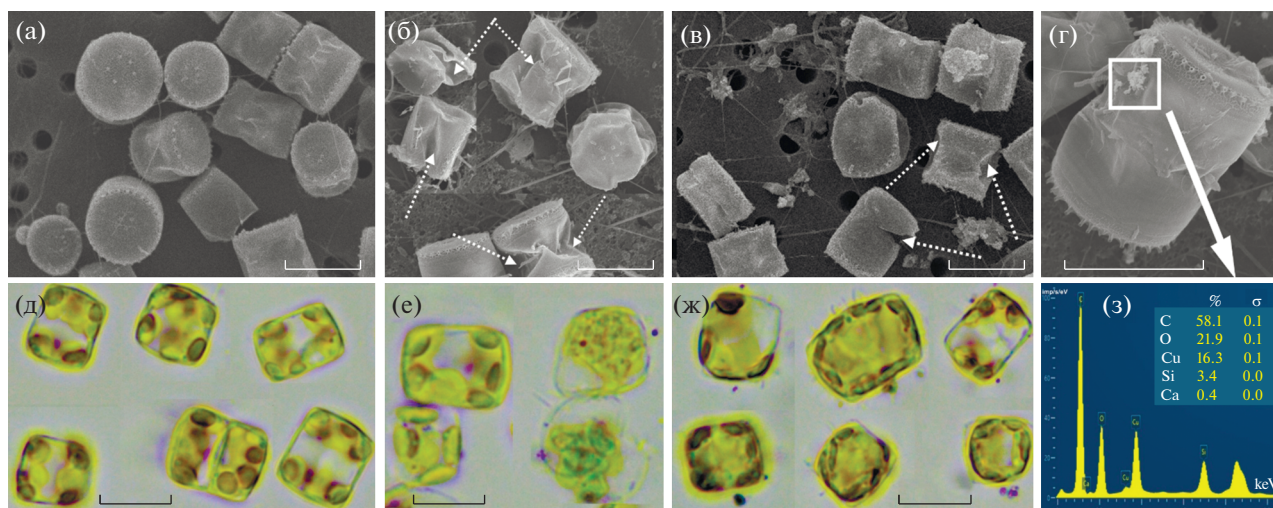


Рис. 3. Микрофотографии *Thalassiosira weissflogii* при различных условиях культивирования: а — нативная проба (контроль); б — культивирование с добавлением Cu^{2+} 75 мкг/л; в, г — культивирование с добавлением НЧ CuO 1000 мкг/л (по данным СЭМ); д — контроль, е — культивирование с добавлением Cu^{2+} 75 мкг/л; ж — культивирование с добавлением CuO НЧ 1000 мкг/л (по данным СМ), з — энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия. Масштабная линейка соответствует 10 мкм.

светорассеяния у *Th. weissflogii* отмечены при культивировании водорослей с концентрацией НЧ CuO 1000 мкг/л и выше. Это, вероятно, обусловлено механическим воздействием наночастиц, приводящим к деформации клеток и их ультраструктурным повреждениям. Подтверждением этому являются изображения, полученные с применением световой и сканирующей электронной микроскопии (рис. 3). Так, морфометрические исследования нативной пробы (контроль) *Th. weissflogii* показали, что клетки имели правильную цилиндрическую форму со вставочным ободком (рис. 3а). В то же время клетки, подвергшиеся воздействию CuO НЧ в концентрации 1000 мкг/л и Cu^{2+} 75 мкг/л, имели ряд морфологических изменений, включая деформацию поясной полосы, неправильные клеточные контуры и сжатие самих клеток (при воздействии наночастиц оксида

меди) (рис. 3б, в). Количество деформированных клеток составляло порядка 30 и 50% исследуемой культуры при добавлении ионов меди и НЧ, соответственно. Отмечено выраженное механическое воздействие НЧ CuO на поверхность клеточной стенки *Th. weissflogii*, белыми пунктирными стрелками на микрофотографиях (СЭМ) обозначены места очевидных повреждений. Кроме того, наблюдалась адсорбция агрегатов, предположительно НЧ CuO , на поверхности клеток *Th. weissflogii* (рис. 3г). Элементный анализ этих агрегатов с применением энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии подтвердил наличие меди в их составе (рис. 3з). Адсорбция НЧ происходит за счет электростатических взаимодействий и химических связей на поверхности клеток микроводорослей [30]. Подобного рода реакция на присутствие в среде металлических наночастиц является

Таблица 2. Ростовые и флуоресцентные параметры клеток *Thalassiosira weissflogii* при культивировании в среде с наночастицами оксида меди на третьи сутки эксперимента

Концентрация Cu^{2+} , мкг/л	$N_{\text{кл.}} \times 10^3$, кл./мл	μ , сут ⁻¹	$X_{\text{л.}}$, пг/кл	$F_{\text{м}}/X_{\text{л.}}$	$r\text{ETR}^*$	$F_{\text{в}}/F_{\text{м}}$	FL4	FS	SS	FDA	АФК
0	190	1.1	1.3	7.1	0.46	0.78	64	57	33	123	78
500	69	0.7	1.2	7.2	0.4	0.75	65	60	36	100	79
1000	39	0.5	1.18	5.7	0.38	0.73	55	65	78	69	91
2000	6	0	0.6	3.5	0.22	0.59	42	73	117	48	118

Примечание: $N_{\text{кл.}}$ — число клеток; μ — удельная скорость роста; $X_{\text{л.}}$ — удельное содержание хлорофилла *a*; $F_{\text{м}}/X_{\text{л.}}$ — выход флуоресценции на единицу хлорофилла *a*; $r\text{ETR}$ — относительная максимальная скорость электронного транспорта при освещенности 500 мкЭ / (м² с); $F_{\text{в}}/F_{\text{м}}$ — максимальный квантовый выход флуоресценции; FL4 — автофлуоресценция хлорофилла *a* на клетку на длине волны 680 нм; FS — прямое светорассеяние; SS — боковое светорассеяние клеток (гранулярность); FDA — среднее значение флуоресценции FDA на клетку; АФК — активные формы кислорода.

типичной и наблюдается у многих других видов микроводорослей [17–22].

Анализ проб с применением световой микроскопии позволил выявить изменения внутренней структуры клеток после воздействия исследуемых поллютантов. Так, в контрольном образце цитоплазма клеток *Th. weissflogii* плотно прилегала к плазмолемме, а внутриклеточные компоненты были не повреждены и четко структурированы (рис. 3д). В то время как у водорослей, культивируемых на среде с добавлением 1000 мкг/л НЧ CuO и 75 мкг/л Cu^{2+} , была отмечена ретракция (втягивание) цитоплазмы и ее отделение от клеточной стенки. Кроме того, в культуре в большом количестве наблюдались полупрозрачные клетки с частично или полностью разрушенным содержимым (рис. 3е, ж). Средний объем клеток в контроле составлял $871 \pm 81 \text{ мкм}^3$. При воздействии сублетальной концентрации меди (75 мкг/л) он достоверно увеличивался в 1.6 раза до $1373 \pm 177 \text{ мкм}^3$ (непарный *t*-тест, $P < 0.05$) по сравнению с контролем. При добавлении в среду НЧ CuO (1000 мкг/л) средний объем клеток *Th. weissflogii* также достоверно увеличивался по сравнению с контролем в 1.7 раза — до $1465 \pm 187 \text{ мкм}^3$ (непарный *t*-тест, $P < 0.05$).

Влияние ионов меди и наночастиц оксида меди на физиолого-биохимические и флуоресцентные показатели Th. weissflogii

Внесение в культуральную среду меди оказывало влияние на физиолого-биохимические показатели клеток *Th. weissflogii* (табл. 1, 2). При концентрациях поллютантов, временно или необратимо ингибирующих рост водорослей, отмечено снижение содержания хлорофилла *a*, значений автофлуоресценции отдельных клеток в красной области спектра FL4, а также выхода флуоресценции на единицу хлорофилла ($F_m/\text{Хл}$). Уменьшение значений отношения $F_m/\text{Хл}$ под воздействием токсикантов указывает на снижение функциональной активности хлорофилла, что, вероятно, связано с эффектом самозатенения молекул пигмента при увеличении размеров клеток и соответствующим снижением удельного коэффициента поглощения световых квантов [31]. В литературе также высказывается предположение, что снижение выхода флуоресценции может быть связано с замедленной ионами магния на ионы меди в перерольном кольце молекулы хлорофилла и инактивацией пигмента как переносчика энергии световых квантов [32].

При повышении концентрации Cu^{2+} и НЧ CuO в среде отмечено снижение метаболической активности клеток *Th. weissflogii*, измеренной с помощью флуорохромного красителя FDA (табл. 1, 2). Максимальные значения FDA флуоресценции 120–140 наблюдались у водорослей, культивируе-

мых без добавления меди. При внесении в среду меди как в ионной, так и в наноформе у *Th. weissflogii* отмечено уменьшение значений FDA флуоресценции, указывающее на снижение жизнеспособности водорослей, вплоть до 40–50 при летальных или близких к ним концентрациях поллютантов. Повышение концентрации Cu^{2+} и НЧ CuO в среде сопровождалось увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках водорослей, что, как известно, инициирует интенсивный окислительный стресс, приводящий к разрушению клеток и их гибели. Следует отметить, что существенных различий между действием ионов и наночастиц меди на данные параметры нами не выявлено.

Отдельно хотелось бы акцентировать внимание на особенностях влияния ионов и наночастиц оксида меди на эффективность работы фотосинтетического аппарата *Th. weissflogii*. Результаты показали, что параметр F_v/F_m , характеризующий квантовую эффективность утилизации световой энергии фотосинтетическим комплексом ФС II, сохранял высокие значения в тех условиях, где действие меди хоть и оказывало влияние на рост водорослей, но клетки сохраняли жизнеспособность (рис. 4). При концентрации ионов меди 150 мкг/л показатель F_v/F_m быстро снижался, тогда как при добавлении наночастиц оксида меди в концентрации 2000 мкг/л отмечено незначительное падение коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла в первые четверо суток эксперимента, затем он снижался до значений 0.45–0.5, что также является нетипичным для культуры, находящейся на стадии элиминации, и свидетельствует о слабом или опосредованном воздействии CuO НЧ на этот показатель. Как видно из графиков, влияние меди в большей степени сказывается на максимальной величине относительной скорости электронного транспорта (нормированной на единицу хлорофилла). Изменения параметра $gETR^*$, вызванные добавлением поллютантов в культуральную среду, в данном случае согласуется с изменениями в скоростях роста водорослей. На рисунке 5 представлены корреляционные зависимости, подтверждающие данный тезис. При концентрациях меди в двух ее формах, где наблюдаются положительные значения скорости роста водорослей, коэффициенты детерминации связи скорости роста и рассматриваемых флуоресцентных величин достаточно высоки, но при очень низких коэффициентах линейной регрессии. Проверка этих коэффициентов по критерию *t*-Стьюдента показала статистическую достоверность при уровне значимости $P \leq 0.1$, а их двукратное различие показывает более сильную связь $gETR^*$ со скоростью роста водорослей по сравнению с показателем F_v/F_m .

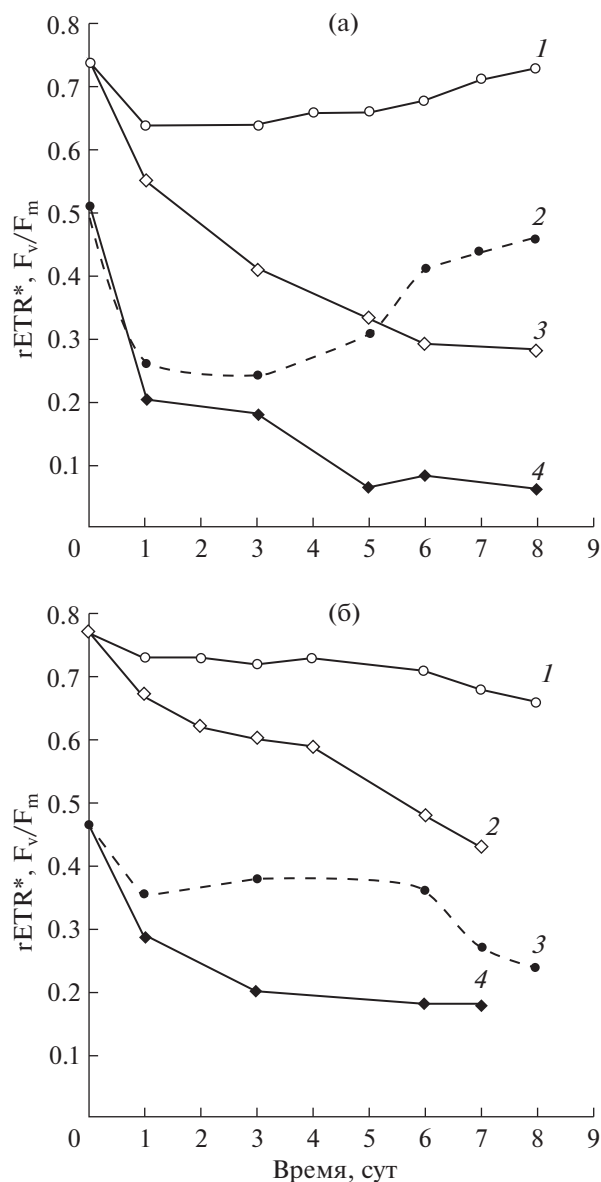


Рис. 4. Динамика изменения квантовой эффективности ФС II при открытых (F_v/F_m , 1, 2 для а и б) и закрытых реакционных центрах ($rETR^*$, 3, 4 для а и б) у *Thalassiosira weissflogii* при добавлении в культуральную среду ионов меди в концентрации 75 (1, 3) и 150 (2, 4) $\mu\text{г/л}$ (а) и наночастиц оксида меди в концентрации 1000 (1, 3) и 2000 $\mu\text{г/л}$ (2, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что характер воздействия меди в ионной форме и в форме наноксида на клетки *Th. weissflogii* имеет как схожие черты, так и существенные различия. Во всех вариантах эксперимента увеличение концентрации поллютантов в культуральной среде приводило к снижению удельной скорости роста водорослей и конечной плотности культуры. Однако воздействие ионов меди вызывало у водо-

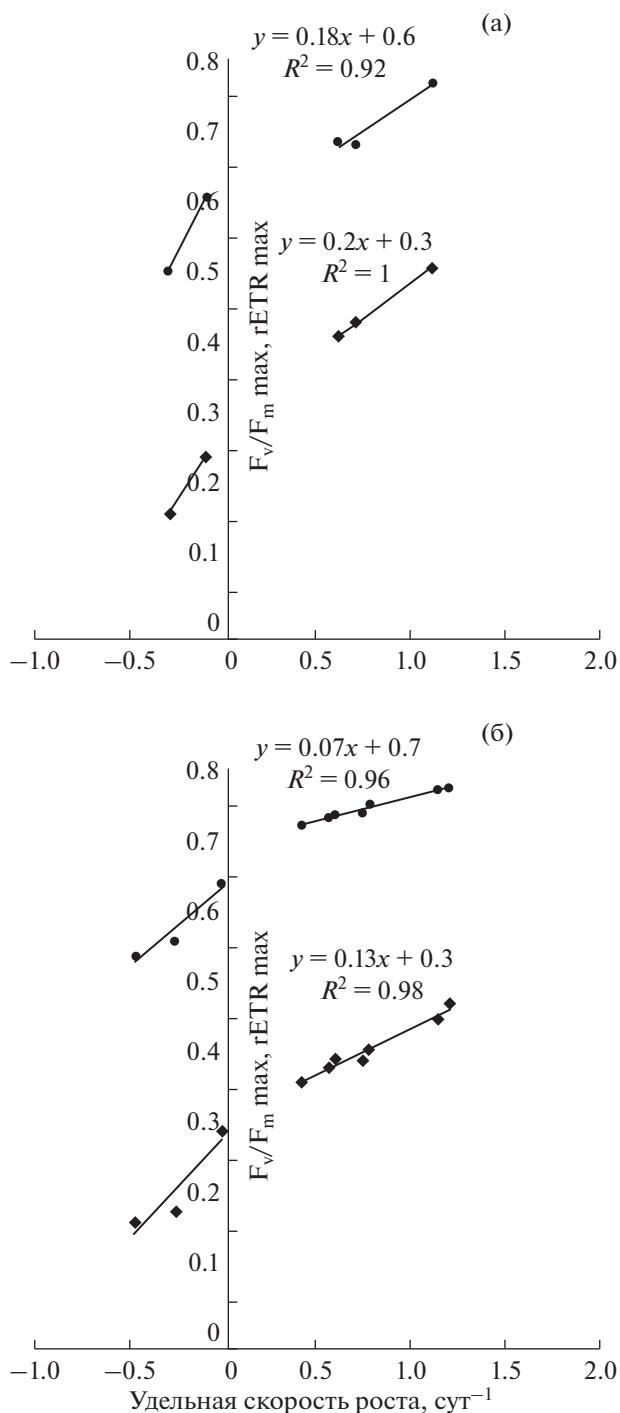


Рис. 5. Взаимосвязь изменений скорости роста *Thalassiosira weissflogii* и соответствующих значений $rETR^*$ и F_v/F_m при воздействии наночастиц оксида меди (а) и ионов меди (б).

рослей длительную лаг-фазу, тогда как при добавлении наночастиц оксида меди данного эффекта не наблюдалось, и начальный рост исследуемой культуры аппроксимировался по экспоненциальной зависимости. Мы полагаем, что торможение роста водорослей на начальном этапе эксперимента

при концентрациях Cu^{2+} в среде 37.5 и 75 мкг/л вызвано цитотоксическим действием ионов меди. Восстановление роста *Th. weissflogii* на 3–6 сут эксперимента, вероятно, является следствием внутри- и внеклеточных процессов детоксикации меди и снижения концентрации меди в активной форме в среде. В свою очередь, при культивировании водорослей в среде с добавлением наночастиц, концентрация Cu^{2+} в воде мала. Так, по оценкам разных авторов [22, 23], процент высвобождаемых ионов меди из НЧ CuO составляет порядка 2–10%. Поэтому отсутствие лаг-фазы у водорослей, выращиваемых в среде с наночастицами, очевидно, связано с низкой концентрацией Cu^{2+} в среде. Наблюдаемое же снижение скорости роста *Th. weissflogii* при увеличении содержания НЧ CuO в среде может быть обусловлено механическим повреждением мембран клеток, адсорбцией отдельных НЧ и их агрегатов на поверхности клеточной стенки водорослей, что нарушает ее проницаемость и дыхательную функцию, а также интернализацией металлических наночастиц внутрь клеток [20–23]. В целом полученный результат показывает, что оценка токсического действия поллютанта на микроводоросли в краткосрочных экспериментах длительностью от нескольких минут до нескольких суток не всегда дает достоверные результаты. Кроме того, такой подход не позволяет выявить долгосрочные изменения численности популяции, особенно при воздействии сублетальных концентраций токсиканта [33]. Прогнозировать состояние биологических процессов в водоемах и распознавать скрытое токсическое воздействие среды позволяют более долгосрочные эксперименты, которые служат для определения хронической токсичности [34].

Медь как в ионной форме, так и в форме наноксидов приводила к увеличению объемов клеток *Th. weissflogii* и изменению их формы и гранулярности. При этом сигнал SS, характеризующий гранулярность, был значительно выше у клеток *Th. weissflogii*, подвергшихся воздействию наночастиц. Аналогичные результаты получены с другими видами водорослей [18, 20]. При добавлении в культуральную среду 5 мг/л НЧ TiO_2 у *Nitzschia closterium* обнаружено значительное повышение интенсивности бокового рассеяния (SS) по сравнению с контролем [35]. Авторы предполагают, что такое выраженное увеличение интенсивности SS может указывать на поглощение/интернализацию НЧ TiO_2 водорослями. Изображения клеток *Th. weissflogii*, полученные нами с применением световой и сканирующей электронной микроскопии, позволили установить, что повышение значений SS является следствием значительной деформации и перфорации плазмалеммы, а также адсорбции отдельных агрегатов наночастиц на поверхности клеток (энергодисперсионная рент-

геновская спектроскопия элементного состава данных агрегатов подтвердила наличие меди в их составе).

Интернализация наночастиц внутрь клеток является одним из возможных механизмов их влияния на микроводоросли. *Th. weissflogii* как представитель диатомовых водорослей характеризуется наличием плотного кремниевого панциря [36], что, по мнению ряда авторов [18, 20, 37], может служить “защитным барьером” от проникновения НЧ внутрь клетки. В то же время, с использованием атомно-силовой микроскопии показано, что НЧ Ag проникают сквозь поры панциря диатомей *Cylindrotheca fusiformis* и *C. closterium*, вызывая локальное механическое повреждение внутриклеточных органелл без нарушения целостности клеточной стенки [38]. К сожалению, результаты нашего исследования не позволяют подтвердить или опровергнуть интернализацию наночастиц CuO в клетки *Th. weissflogii*. Рост продукции АФК и снижение метаболической активности водорослей, наблюдаемые нами в эксперименте, могут быть обусловлены как проникновением НЧ внутрь клеток водорослей, так и высвобождением ионов меди из металла и их токсическим действием на клетку. Отметим, что развитие окислительного стресса (увеличение производства АФК) и подавление ферментативной активности водорослей являются первыми сигнальными маркерами ингибирующего воздействия поллютанта на клетку, что позволяет использовать их в качестве индикаторов стрессового воздействия.

Ионы меди и наночастицы оксида меди по-разному влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата исследуемой культуры водорослей. При высоких концентрациях Cu^{2+} в среде показатель F_v/F_m у микроводорослей быстро снижался (до 0.29 при $\text{Cu}^{2+} = 150$ мкг/л). При этом при концентрации НЧ, полностью ингибирующей рост *Th. weissflogii*, данный показатель сохранял значения 0.45–0.5, что является нетипичным для культуры, находящейся на стадии элиминации, и свидетельствует о слабом или опосредованном воздействии НЧ CuO на эффективность работы ФС II. Влияние Cu^{2+} также в большей степени сказывалось на величине максимальной относительной скорости электронного транспорта $g\text{ETR}^*$ (нормированной на единицу хлорофилла). Изменения параметра $g\text{ETR}^*$, вызванные добавлением поллютантов в культуральную среду, в данном случае согласуются с изменениями в скорости роста водорослей. Вероятно, это можно объяснить тем, что ионы меди индуцируют производство пероксида водорода H_2O_2 , который разрушает хлоропласты. Отсутствие изменений параметра F_v/F_m в клетках при воздействии наночастиц оксида меди может объясняться физиологической адаптацией растений, препятству-

ющей развитию окислительного стресса, вызванного воздействием исследуемого поллютанта [39]. К тому же ионы меди, выделяемые из наночастиц оксида меди и составляющие 2–10%, могут действовать как кофактор на различные жизненно важные метаболические процессы, например, фотосинтез, дыхание и усвоение азота, как это показано в работе [40]. Вероятно, по этой причине мы не регистрируем значительного снижения эффективности работы фотосинтетического аппарата водорослей. Аналогичные данные представлены и в ряде других исследований с микроводорослями [41, 42]. Полученные результаты не позволяют считать параметр F_v/F_m корректным индикатором физиологического состояния водорослей в условиях загрязнения медью. Однако он может применяться для скрининга ингибиторов фотосинтеза [43].

ВЫВОДЫ

1. По результатам экспериментального исследования установлены основные закономерности изменения морфологических, структурно-функциональных и флуоресцентных показателей диатомовой микроводоросли *Th. weissflogii* при добавлении в среду наночастиц оксида меди и ионов меди разной концентрации. Показано, что медь в ионной форме более токсична для *Th. weissflogii*, чем в виде наноксида.

2. Показан различный характер действия используемых токсикантов на рост водорослей и работу фотосинтетического аппарата *Th. weissflogii* в условиях длительного культивирования. При внесении в культивационную среду ионов меди у водорослей отмечена длительная лаг-фаза кривой роста, тогда как при добавлении наночастиц оксида меди данного эффекта не наблюдалось. При концентрации ионов меди, приводящей к необратимой деградации исследуемой культуры водорослей, показатели $gETR$ и F_v/F_m быстро снижались, в то время как сублетальные концентрации наночастиц оксида меди слабо влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата *Th. weissflogii*.

3. Выявлено схожее действие меди в ионной и наноформе на морфологию клеток водорослей, продукцию активных форм кислорода, активность внутриклеточных эстераз и автофлуоресценцию клеток *Th. weissflogii*. Медь в различных ее формах приводила к увеличению объема клеток, изменению их формы и гранулярности. С ростом концентрации исследуемых поллютантов в культуральной среде отмечено увеличение продукции активных форм кислорода, подавление ферментативной активности водорослей и снижение значений автофлуоресценции отдельных клеток в красной области спектра.

Авторы выражают глубокую признательность сотруднику отдела экологической физиологии водорослей Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” О.С. Алатарцевой за предоставленную культуру *Thalassiosira weissflogii* и руководителю лаборатории микроскопии В.Н. Лишаеву за помощь в работе с электронным микроскопом.

Работа выполнена в рамках тем государственного задания Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” № 121041400077-1 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и № 121030300149-0 “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macfie S.M., Tarmohamed Y., Welbourn P.M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1994. V. 27. P. 454.
<https://doi.org/10.1007/BF00214835>
2. Echeveste P., Croot P., von Dassow P. Differences in the sensitivity to Cu and ligand production of coastal vs offshore strains of *Emiliania huxleyi* // Sci. Total Environ. 2018. V. 625. P. 1673.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.050>
3. Nielsen E.S., Wium-Andersen S. Copper ions as poison in the sea and in freshwater // Mar. Biol. 1970. V. 6. P. 93.
<https://doi.org/10.1007/BF00347237>
4. Pistocchi R., Guerrini F., Balboni V., Boni L. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. // Eur. J. Psychol. 1997. V. 32. P. 125.
<https://doi.org/10.1080/09670269710001737049>
5. Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters // Aquat. Toxicol. 1995. V. 31. P. 165.
[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00071-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00071-W)
6. Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Cañizares-Villanueva R.O. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) // Chemosphere. 2007. V. 67. P. 2274.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.036>

7. Lage O.M., Parente A.M., Soares H.M.V.M., Vasconcelos M.T.S.D., Salema R. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture // Eur. J. Psychol. 1994. V. 29. P. 253.
<https://doi.org/10.1080/09670269400650711>
8. Miazek K., Iwanek W., Remacle C., Richel A., Goffin D. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 23929.
<https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
9. Leal P.P., Hurd C.L., Sander S.G., Armstrong E., Roleda M. Copper ecotoxicology of marine algae: a methodological appraisal // Chem. Ecol. 2016. V. 32. P. 786.
<https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1177520>
10. di Toppi L.S., Pawlik-Skowrońska B., Vurro E., Vattuone Z., Kalinowska R., Restivo F.M., Musetti R., Skowroński T. First and second line mechanisms of cadmium detoxification in the lichen photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta) // Environ. Pollut. 2008. V. 151. P. 280.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.010>
11. Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? // Environ. Sci. Eur. 2018. V. 30. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
12. Dumont E.R., Elger A., Azéma C., Miche H.C., Surble S., Larue C. Cutting-edge spectroscopy techniques highlight toxicity mechanisms of copper oxide nanoparticles in the aquatic plant *Myriophyllum spicatum* // Sci. Total Environ. 2022. V. 803. P. 150001.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150001>
13. Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials // J. Nanopart. Res. 2013. V. 15. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
14. Ivask A., Juganson K., Bondarenko O., Mortimer M., Aruoja V., Kasemets K., Blinova I., Heinlaan M., Slaveykova V., Kahru A. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: a comparative review // Nanotoxicology. 2014. V. 8. P. 57.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855831>
15. Xiong T.T., Dumat C., Dappe V., Vezin H., Schreck E., Shahid M., Pierart A., Sobanska S. Copper oxide nanoparticle foliar uptake, phytotoxicity, and consequences for sustainable urban agriculture // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. P. 5242.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05546>
16. Adeleye A.S., Conway J.R., Garner K., Huang Y., Su Y., Keller A.A. Engineered nanomaterials for water treatment and remediation: costs, benefits, and applicability // Chem. Eng. J. 2016. V. 286. P. 640.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.105>
17. Lee W.M., An Y.J. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: no evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation // Chemosphere. 2013. V. 91. P. 536.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.033>
18. Saison C., Perreault F., Daigle J.C., Fortin C., Clavierie J., Morin M., Popovic R. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* // Aquat. Toxicol. 2010. V. 96. P. 109.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.002>
19. Wang Y., Zhu X., Lao Y., Lv X., Tao Y., Huang B., Wang J., Zhou J., Cai Z. TiO₂ nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum* // Sci. Total. Environ. 2016. V. 565. P. 818.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>
20. Oukarroum A., Halimi I., Siaj M. Cellular Responses of *Chlorococcum* sp. algae exposed to zinc oxide nanoparticles by using flow cytometry // Water Air Soil Pollut. 2019. V. 230. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-4051-3>
21. Sendra M., Moreno-Garrido I., Blasco J., Araujo C.V. Effect of erythromycin and modulating effect of CeO₂ NPs on the toxicity exerted by the antibiotic on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum* // Environ. Pollut. 2018. V. 242. P. 357.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.009>
22. Wan J.K., Chu W.L., Kok Y.Y., Cheong K.W. Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical *Chlorella* // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. P. 3153.
<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1408-3>
23. Huang W., Zhou Y., Zhao T., Tan L., Wang J. The effects of copper ions and copper nanomaterials on the output of amino acids from marine microalgae // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. V. 29. P. 9780.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-16347-3>
24. Соломонова Е., Муханов В. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. с помощью проточной цитометрии // Морской экологический журнал. 2011. Т. 10. С. 67.
25. Wang H., Joseph J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader // Free Radical Biol. Med. 1999. V. 27. P. 612.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)
26. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла: учеб.-метод. пособие. М.: Макс Пресс, 2010. 116 с.
27. Jeffrey R.F.C., Mantoura S.W. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods // Monograph on Oceanographic Methodology / Eds. S.W. Wright et al. Paris. UNESCO Publishing. 1997. P. 661.
28. Брянцева Ю.В., Лях А.М., Сергеева А.В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря. Севастополь: НАН Украины Институт биологии южных морей, 2005. 25 с.
29. Galletti A., Seo S., Joo S.H., Su C., Blackwelder P. Effects of titanium dioxide nanoparticles derived from consumer products on the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 21113.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7556-6>
30. Adeleye A.S., Keller A.A. Interactions between algal extracellular polymeric substances and commercial TiO₂

- nanoparticles in aqueous media // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 12258.
https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03684
31. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton // J. Plankton Res. 2001. V. 23. P. 977.
https://doi.org/10.1093/plankt/23.9.977
 32. Gao G., Liu Y., Li X., Feng Z., Xu Z., Wu H., Xu J. Expected CO₂-induced ocean acidification modulates copper toxicity in the green tide alga *Ulva prolifera* // Envir. Exper. Bot. 2017. V. 135. P. 63.
https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.12.007
 33. Дмитриева А.Г., Даллакян Г.А., Лысенко Н.Л. Анализ функциональных показателей популяции водорослей в условиях накопления меди // Альгология. 1992. Т. 2. № 2. С. 30.
 34. Koppel D.J., Adams M.S., King C.K., Jolley D.F. Chronic toxicity of an environmentally relevant and equitoxic ratio of five metals to two Antarctic marine microalgae shows complex mixture interactivity // Environ. Pollut. 2018. V. 242. P. 1319.
https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.110
 35. Xia B., Chen B., Sun X., Qu K., Ma F., Du M. Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: growth inhibition, oxidative stress and internalization // Sci. Total Environ. 2015. V. 508. P. 525.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.066
 36. Franzitta M., Feijão E., Cabrita M.T., Gameiro C., Matos A.R., Marques J.C., Johannes W., Reis-Santos P., Fonseca V., Pretti C., Caçador I., Duarte B. Toxicity going nano: ionic versus engineered Cu nanoparticles impacts on the physiological fitness of the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Front. Mar. Sci. 2020. V. 7. P. 1154.
https://doi.org/10.3389/fmars.2020.539827
 37. Tang Y., Xin H., Yang F., Long X. A historical review and bibliometric analysis of nanoparticles toxicity on algae // J. Nanopart. Res. 2018. V. 20. P. 1. doi.org/
https://doi.org/10.1007/s11051-018-4196-4
 38. Pletikapić G., Žutić V., VinkovićVrčec I., Svetličić V. Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance // J. Mol. Recognit. 2012. V. 2. P. 309. doi.org/
https://doi.org/10.1002/jmr.2177
 39. Shaw A.K., Ghosh S., Kalaji H.M., Bosa K., Brestic M., Zivcak M., Hossain Z. Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.) // Envir. Exper. Bot. 2014. V. 102. P. 37.
https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.02.016
 40. Mahawar H., Prasanna R., Singh S.B., Nain L. Influence of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles on the cyanobacterium *Calothrix elenkinii* // Bio-NanoScience. 2018. V. 8. P. 802.
https://doi.org/10.1007/s12668-018-0543-2
 41. Marchello A.E., Barreto D.M., Lombardi A.T. Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) // Water, Air, Soil Pollut. 2018. V. 229. P. 1.
https://doi.org/10.1007/s11270-018-3705-5
 42. Wu D., Zhang J., Du W., Yin Y., Guo H. Toxicity mechanism of cerium oxide nanoparticles on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and their ecological risks // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. V. 29. P. 34010.
https://doi.org/10.1007/s11356-021-18090-1
 43. Fai P.B., Grant A., Reid B. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment // Environ. Toxicol. Chem. 2007. V. 26. P. 1520.
https://doi.org/10.1897/06-394R1.1