

УДК 574.24:574.58

ВЛИЯНИЕ ЦИНКА И ЖЕЛЕЗА НА РОСТ ПОПУЛЯЦИИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ *HETEROSIGMA AKASHIWO* (RAPHIDOPHYCEAE)

© 2023 г. Ж. В. Маркина¹ *, А. В. Огнистая¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток, 690041 Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Исследовано влияние цинка и железа в концентрациях 50 и 100 мкг/л на численность клеток, флуоресценцию хлорофилла *a*, содержание фотосинтетических пигментов и активных форм кислорода, а также нейтральных липидов у рафидофитовой водоросли *Heterosigma akashiwo*. Обнаружено, что цинк действует на физиологические и биохимические процессы, не влияя при этом на динамику численности микроводоросли. Выявлено негативное воздействие железа на флуоресценцию хлорофилла *a*, содержание фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и нейтральных липидов. Наиболее токсичным металлом для *H. akashiwo* оказалось железо. Показано, что используемые концентрации исследованных металлов не способствуют развитию “цветений” *H. akashiwo*.

Ключевые слова: цинк, железо, *Heterosigma akashiwo*, численность клеток, флуоресценция, фотосинтетические пигменты, активные формы кислорода, нейтральные липиды

DOI: 10.31857/S0134347523040071, **EDN:** UQLWXU

Исследования влияния тяжелых металлов на растительные организмы, в том числе и микроводоросли, проводятся на протяжении многих лет. Несмотря на то, что механизмы воздействия металлов в целом выяснены, изучение данного вопроса остается актуальным (Nagajyoti et al., 2010). Известно, что тяжелые металлы в высоких концентрациях токсичны для растений, однако многие из них необходимы для жизнедеятельности растительного организма. Так, цинк (Zn^{2+}) выступает как кофактор ферментов, важен для поддержания целостности митохондрий, участвует в синтезе углеводов, включен в процесс фиксации углекислого газа (Masmoudi et al., 2013). Железо (Fe^{3+}) необходимо для работы электрон-транспортной цепи, участвует в фиксации углерода, синтезе хлорофиллов и формировании хлоропластов, входит в состав белков и является катализатором окислительно-восстановительных реакций (Nagajyoti et al., 2010). Его низкое содержание лимитирует развитие фитопланктона (Rana, Prajapati, 2021).

В последние десятилетия в разных акваториях Мирового океана отмечается увеличение количества вредоносных “цветений”, вызываемых рафидофитовой водорослью *Heterosigma akashiwo*, приводящих к массовой гибели рыб и беспозво-

ночных (Bornman et al., 2022). Ряд исследователей связывает учащение “цветений” водорослей с возрастанием загрязнения окружающей среды (Dursun et al., 2016; Lemley et al., 2020).

Цель настоящей работы заключалась в оценке действия цинка и железа на численность клеток микроводоросли *H. akashiwo*, их размер и внутреннюю структуру, фотосинтетический аппарат, содержание активных форм кислорода и нейтральных липидов. В работе использованы концентрации металлов, регулярно регистрируемые в прибрежных водах России. Концентрации Zn^{2+} , Fe^{3+} составляли 50 и 100 мкг/л, что соответствует предельно допустимой концентрации (ПДК и 2ПДК) (Качество..., 2021).

Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara & M. Chihara, 1987 (Raphidophyceae). Водоросль выращивали на среде *f* (Guillard, Ryther, 1962), приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰ в 250 мл колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл, при температуре 18°C, интенсивности освещения 70 мкмоль/м²/с в области видимого света и свето-темным периодом 14 ч свет : 10 ч темнота. В качестве инокулята использовали

культуру на экспоненциальной стадии роста. Продолжительность экспериментов составляла 7 сут. Пробы для анализа показателей отбирали на третьи и седьмые сутки. Zn^{2+} добавляли в виде $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Fe^{3+} в виде $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, с пересчетом на ионы металла, в день постановки эксперимента.

Подсчет численности клеток водоросли, определение показателей прямого и бокового светорассеяния производили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). В течение каждого измерения записывали 10000 событий (регистрируемых в пробе частиц). Выбор клеток водоросли из общего числа событий, записываемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* (Нука et al., 2013). Прямое светорассеяние, косвенно характеризующее размер клеток водоросли, регистрировали на канале FSC; боковое, характеризующее внутреннюю структуру, гранулярность, на канале SSC. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали при длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм — канал PC 5.5 (Нука et al., 2013). Продукцию активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата, окрашивание проводили в течение одного часа при комнатной температуре в темноте. Показатель флуоресценции окисленного и диацетилированного 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата определяли при длине волны 525 нм, длина волны возбуждения — 488 нм, канал FITC (Gomes et al., 2005). Содержание нейтральных липидов (НЛ) определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red в концентрации 1 мкг/мл. Окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания — 580 нм, канал PE (Alemán-Nava et al., 2016).

Для анализа содержания фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и общего содержания каротиноидов) суспензию водоросли собирали на мембранах МФАС-ОС-2 путем фильтрации. Из собранных клеток пигменты экстрагировали 90%-ным ацетоном, полученный экстракт центрифугировали в течение 15 мин при 7000 об./мин. Супернатант отбирали и определяли его оптическую плотность с помощью спектрофотометра Shimadzu-UV 2550 (Япония) при следующих длинах волн: 480, 630, 647, 664 и 750 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по стандартным формулам (Jeffrey, Humphrey, 1975).

Показатели в контроле приняты за 100%. Эксперименты проведены в трех биологических повторностях. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel. Достоверность различий между выборками оценивали по критерию Манна—Уитни при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Цинк в концентрациях 50 и 100 мкг/л не вызывал отклонений в динамике численности клеток, в показателях прямого и бокового светорассеяния (рис. 1а, 1в). Флуоресценция хлорофилла *a* уменьшалась на седьмые сутки опыта (рис. 1г). Содержание хлорофилла *a* возрастало на третьи сутки и снижалось на седьмые (рис. 1д). Для каротиноидов зафиксирована такая же тенденция, однако колебания показателей были менее выраженными (рис. 1е). Содержание АФК достоверно снижалось на третьи сутки и возрастало на седьмые, особенно при концентрации цинка 100 мкг/л (рис. 1ж). На седьмые сутки при концентрации металла 50 мкг/л обнаружено наибольшее содержание НЛ (рис. 1з).

Внесение железа в концентрации 50 и 100 мкг/л приводило к слабой стимуляции роста популяции водоросли (рис. 2а). Показатель прямого светорассеяния на третьи сутки стал ниже контрольного на протяжении всего опыта (рис. 2б). Показатель бокового светорассеяния значительно отклонялся от контроля на седьмые сутки эксперимента (рис. 2в). Такая же тенденция отмечена для флуоресценции хлорофилла *a* (рис. 2г). Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов существенно увеличивалось к третьим суткам и падало на седьмые, особенно при концентрации железа 100 мкг/л (рис. 2д, 2е). При этом слабо снижалась концентрация АФК (рис. 2ж). Содержание НЛ к завершению эксперимента значительно повышалось по сравнению с контрольным при концентрации металла 50 мкг/л и снижалось при 100 мкг/л (рис. 2з).

В проведенном нами опыте цинк не оказал действия на рост численности клеток и показатели прямого и бокового светорассеяния. Однако ранее у динофлагелляты *Prorocentrum micans* отмечено ингибирование роста в присутствии 100 мкг/л цинка (Kayser, 1977). При этом у *H. akashiwo* происходило снижение флуоресценции хлорофилла *a* наряду со снижением содержания фотосинтетических пигментов. Ранее на *Isochrysis galbana* показано, что при внесении 5000 мкг/л металла численность клеток не менялась, но содержание хлорофилла *a* снижалось (Kumar et al., 2015). Содержание АФК возрастало к концу эксперимента, что также свидетельствует о негативном действии металла на состояние *H. akashiwo*. Цинк в токсичных концентрациях приводит к увеличению содержания липидов (Yang et al., 2015), подобный эффект зафиксирован на седьмые сутки нашего опыта.

У *H. akashiwo* при концентрациях железа 50 и 100 мкг/л отмечена стимуляция роста. В целом, железо оказало более токсическое действие на *H. akashiwo* по сравнению с цинком: происходило изменение всех исследованных показателей, особенно фотосинтетических пигментов. При токсическом воздействии железа в первую очередь

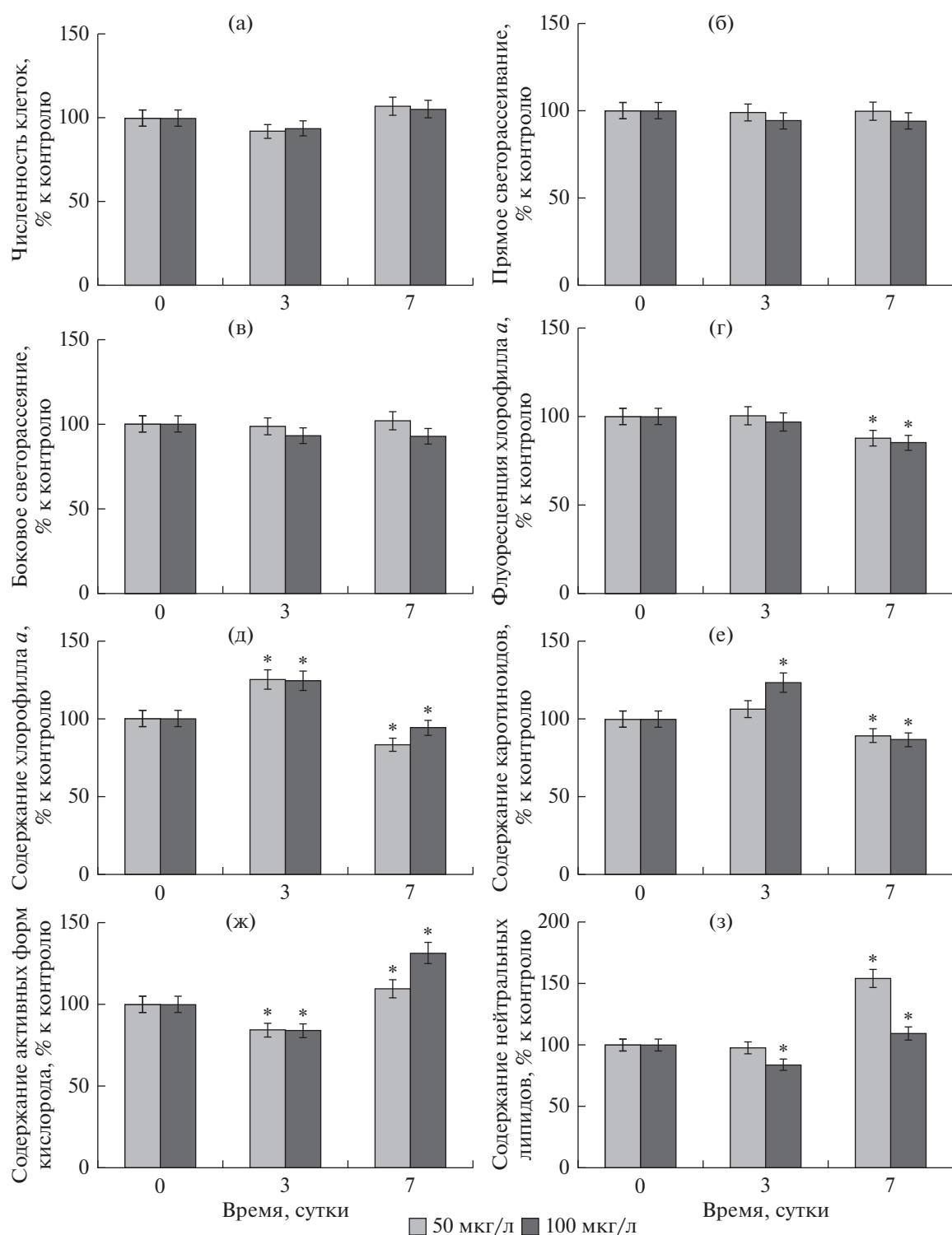


Рис. 1. Рост популяции и физиологическое состояние *Heterosigma akashiwo* при воздействии цинка. * — различия достоверны при $p \leq 0.05$.

страдают хлоропласты и митохондрии (Rana, Prajapati, 2021). Однако содержание АФК снижалось по сравнению с контролем. Механизм генерирования АФК у микроводорослей под воздействием железа изучен слабо (Rana, Prajapati, 2021).

К седьмым суткам, при концентрации 50 мкг/л происходило увеличение содержания НЛ, а при 100 мкг/л, напротив, уменьшение. При стрессовых условиях липиды синтезируются и аккумулируются как источник энергии и углерода, а при

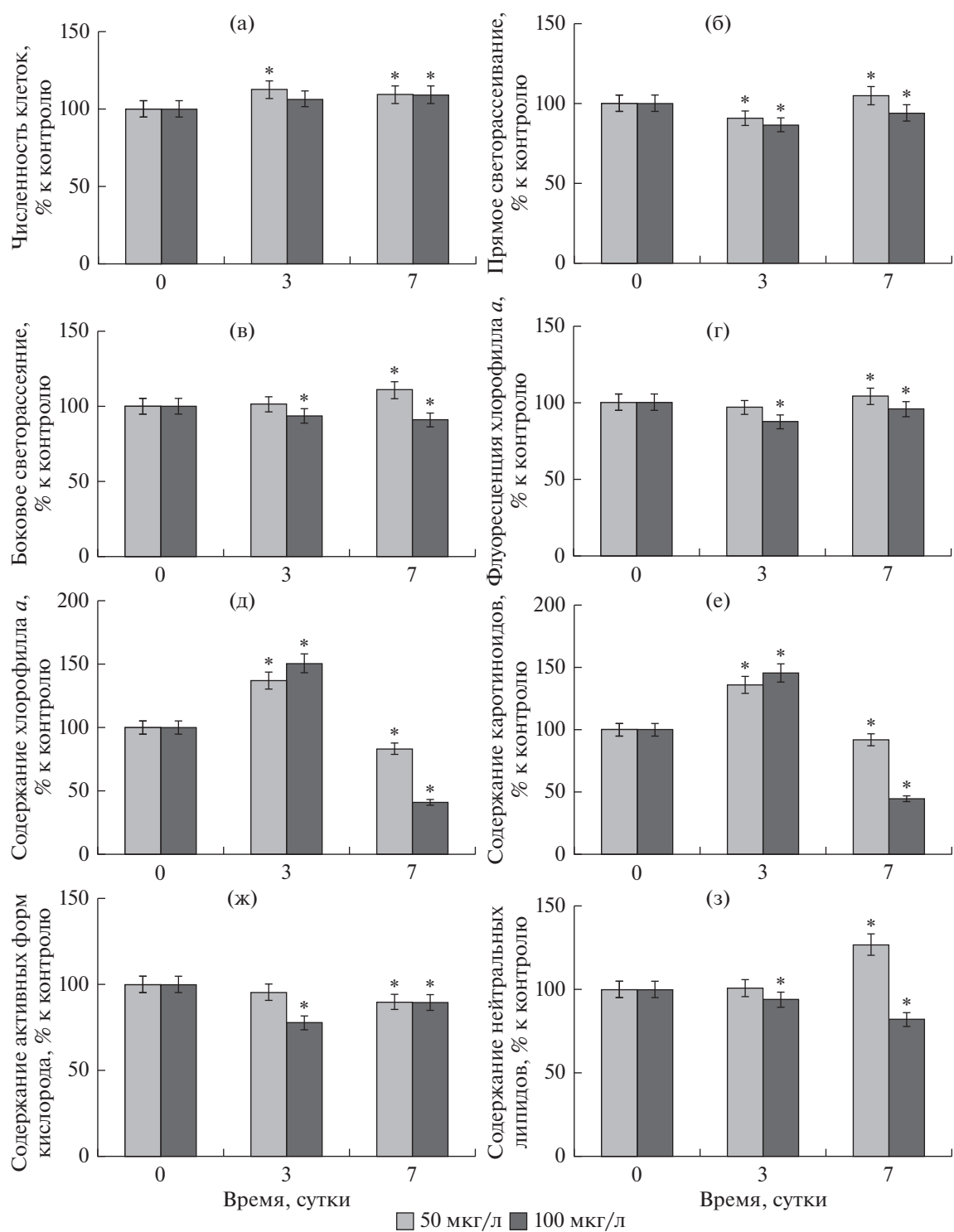


Рис. 2. Рост популяции и физиологическое состояние *Heterosigma akashiwo* при воздействии железа. * — различия достоверны при $p \leq 0.05$.

особенно неблагоприятном состоянии – расходуется (Wan et al., 2014).

Таким образом, при воздействии цинка численность клеток *H. akashiwo*, их размер и гранулярность не изменялись. Однако происходило нарушение физиологических и биохимических процессов микроводоросли. Железо оказало слабое стимулирующее действие на рост *H. akashiwo*, но значительные отклонения от контрольных размера клеток, флуоресценции хлорофилла *a*, содержания фотосинтетических пигментов, АФК и НЛ свидетельствуют о неблагоприятном влиянии металла. На основании полученных данных можно предположить, что цинк и железо в концентрациях 50 и 100 мкг/л не являются причиной “цветений” *H. akashiwo*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Центр коллективного пользования Ресурсная коллекция “Морской биобанк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>) за предоставленную культуру микроводоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2020 / под ред. А.Н. Корщенко. М: Наука. 2021. 281 с.
- 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. V. 128. P. 74–79.
- Bornman E., Adams J.B., Strydom N.A. Algal blooms of *Heterosigma akashiwo* and *Mugilidae* gill alterations // Estuaries and Coasts. 2022. V. 45. P. 1674–1687.
- Dursun F., Taş S., Koray T. Spring bloom of the raphidophycean *Heterosigma akashiwo* in the Golden Horn Estuary at the northeast of Sea of Marmara // Ege J. Fish. Aquat. Sci. 2016. V. 33. P. 201–207.
- Gomes F., Fernandes E., Lima J.F.L.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // J. Biochem. Methods. 2005. V. 65. P. 45–80.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // Can. J. Microbiol. 1962. V. 8. P. 229–239.
- Hyka P., Lickova S., Přibyl P. et al. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 2–16.
- Jeffrey S.T., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochemie und physiologie der pflanzen. 1975. V. 167. № 2. P. 191–194.
- Kayser H. Effect of zinc sulphate on the growth of mono- and multispecies cultures of some marine plankton algae // Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen. 1977. V. 30. № 1. P. 682–696.
- Kumar K.S., Dahms H.U., Won E.J. et al. Microalgae – a promising tool for heavy metal remediation // Ecotoxicol Envir Safety. 2015. V. 113. P. 329–352.
- Lemley D.A., Adams J.B., Rishworth G.M., Purdie D.A. Harmful algal blooms of *Heterosigma akashiwo* and environmental features regulate *Mesodinium* cf. *rubrum* abundance in eutrophic conditions // Harmful Algae. 2020. V. 100. Art. 101943.
- Martínez-Ruiz E.B., Martínez-Jerónimo F. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: an integrative study // Aquat. Toxicol. 2015. V. 169. P. 27–36.
- Masmoudi S., Nguyen-Deroche N., Caruso A. et al. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: from heaven to hell – a review // Cryptogamie Algologie. 2013. V. 34. P. 185.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // Envir. Chem. Lett. 2010. V. 8. № 3. P. 199–216.
- Rana M.S., Prajapati S.K. Resolving the dilemma of iron bioavailability to microalgae for commercial sustenance // Algal Research. 2021. V. 59. Art. 102458.
- Wan M., Jin X., Xia J. et al. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 22. P. 9473–9481.
- Yang J., Cao J., Xing G. et al. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341 // Biores. Technol. 2015. V. 175. P. 537–544.

Influence of Zinc and Iron on Population Growth and Physiological State of Microalgae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)

Zh. V. Markina^a and A. V. Ognistaya^a

^a*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

It was studied the influence of zinc and iron at concentrations of 50 and 100 µg/L on cell number, chlorophyll *a* fluorescence, content of photosynthetic pigments and reactive oxygen species, as well as neutral lipids in the raphidophyte algae *Heterosigma akashiwo*. Zinc has been found to act on physiological and biochemical processes without affecting the population dynamics of microalgae. It was revealed the negative effect of iron on the fluorescence of chlorophyll *a*, number of photosynthetic pigments, reactive oxygen species and neutral lipids. The most toxic metal for *H. akashiwo* turned out to be iron. It was shown that the concentrations of the studied metals do not contribute to the development of *H. akashiwo* “blooms”.

Keywords: zinc, iron, *Heterosigma akashiwo*, cell cells, fluorescence, photosynthetic pigments, reactive oxygen species, neutral lipids