

Влияние состава питательной среды на чувствительность водоросли *Dunaliella tertiolecta* к бихромату калия

© 2021. Е. С. Стравинскене, к. б. н., ст. преподаватель,
Ю. С. Григорьев, к. б. н., профессор, Т. Л. Шашкова, к. б. н., доцент,
М. А. Субботин, ст. преподаватель, М. А. Полосухина, инженер,
Сибирский федеральный университет,
660041, Россия, г. Красноярск, пр. Свободный, д. 79,
e-mail: estravinskene@sfu-kras.ru

Исследовано воздействие модельного токсиканта на рост культуры водоросли *Dunaliella tertiolecta* в среде Гольдберга, приготовленной на основе растворов готовой морской соли различных производителей, а также раствора NaCl. Прирост культуры водоросли в контроле во всех вариантах питательных сред составлял 10–15 раз через 48 ч культивирования. Бихромат калия в концентрации 5 мг/дм³ оказывал слабое воздействие или вовсе не влиял на рост тест-культуры в средах, приготовленных на основе растворов морской соли. При этом внесение той же концентрации бихромата калия в среду, приготовленную на основе раствора NaCl, полностью подавляло рост тест-объекта. Результаты химического анализа всех исследованных растворов морской соли показали близкое для природной морской воды соотношение основных ионов. Все исследованные образцы растворов морской соли содержали от 5 до 8% ионов магния и кальция, что является возможным объяснением более низкой чувствительности *Dunaliella tertiolecta* к бихромату калия в этих средах, поскольку жёсткость среды влияет на биодоступность токсикантов для тест-организмов.

Ключевые слова: *Dunaliella tertiolecta*, биотестирование, бихромат калия, питательная среда, морская соль.

Effect of the cultivation medium composition on *Dunaliella tertiolecta* sensitivity to potassium dichromate

© 2021. E. S. Stravinskene ORCID: 0000-0002-8685-2620,
Yu. S. Grigor'ev ORCID: 0000-0003-4324-0728, T. L. Shashkova ORCID: 0000-0002-2871-0069,
M. A. Subbotin ORCID: 0000-0001-6145-5218, M. A. Polosukhina ORCID: 0000-0002-7898-819X,
Siberian Federal University,
79, Prospekt Svobodny, Krasnoyarsk, Russia, 660041,
e-mail: estravinskene@sfu-kras.ru

The effect of a model toxicant on the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta* in Goldberg medium, prepared on the basis of solutions of various sea salt complexes, as well as NaCl alone solution, has been studied. The growth of algae in the controls was 10–15 times after 48 hours in all variants of media. Potassium dichromate at a concentration of 5 mg/L had little or no effect on the growth of the test culture in media prepared from the sea salt solutions. Simultaneously, the same concentration of potassium dichromate completely suppressed the algae growth in NaCl-media. The results of the chemical analysis of all the studied sea salt solutions showed a ratio of the main ions close to that of natural sea water. All studied samples of sea salt solutions contained 5 to 8% magnesium and calcium ions, which is a possible explanation for the lower sensitivity of *Dunaliella tertiolecta* to potassium dichromate in these media, since the hardness of the medium affects the bioavailability of toxicants for test organisms.

Keywords: *Dunaliella tertiolecta*, bioassay, potassium dichromate, cultivation medium, sea salt.

Результаты токсикологических тестов на одних и тех же или идентичных организмах могут значительно различаться по причине отличий в физических и химических условиях проведения биотестирования [1]. Поэтому

при осуществлении сравнительного анализа токсичности веществ для микроводорослей нужно особое внимание уделять методике выполнения таких тестов [1]. Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на результаты

биотестирования, признан состав питательной среды [2–4].

Разработка оптимального состава питательной среды для проведения биотестирования на микроводорослях является важной задачей; в течение регламентированного времени токсикологического эксперимента тест-объект должен сохранять экспоненциальный рост и не испытывать недостатка в питательных элементах. Вместе с тем, неоднократно было показано, что состав питательной среды может определять степень проявления токсических свойств тестируемых веществ по отношению к микроводорослям [3–5]. В частности, в высококонцентрированной питательной среде наблюдалось снижение чувствительности водорослей к ионам тяжёлых металлов [6]. Согласно некоторым литературным данным, чувствительность водорослей к металлам удавалось значительно увеличить в условиях пониженного содержания макроэлементов [7, 8].

При проведении биотестирования на морских водорослях стандартная методика допускает приготовление питательной среды на основе растворов готовой морской соли [9]. Состав питательной среды при таком подходе сложно контролировать, в ней могут оказаться компоненты, влияющие на биодоступность тестируемых веществ, что в итоге может значительно повлиять на результаты токсикологических экспериментов. Возможным решением данной проблемы может стать использование вместо готовой морской соли раствора хлорида натрия. В связи с этим, целью настоящей работы являлась оценка воздействия модельного токсиканта ($K_2Cr_2O_7$) на динамику роста и прирост тест-культуры водоросли *Dunaliella tertiolecta* Butcher в средах, приготовленных на основе морской соли разных производителей и раствора NaCl.

Материалы и методы исследования

Маточную культуру микроводоросли *D. tertiolecta* выращивали в питательной среде Гольдберга, содержащей 200 мг/дм^3 KNO_3 ; $9,5 \text{ мг/дм}^3$ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; $0,2 \text{ мг/дм}^3$ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $0,2 \text{ мг/дм}^3$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $0,3 \text{ мг/дм}^3$ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ и приготовленной на основе раствора морской соли с концентрацией 20 г/дм^3 . Выращивание и поддержание культуры водоросли производили в климатостате Р2 (ТУ 4211-012-26218570-2014) при непрерывном освещении белым светом (1200 ± 200 лк) и температуре 20 ± 2 °С. Маточные культуры содержали в колбах объёмом $100\text{--}500 \text{ см}^3$,

регулярно перемешивали и профильтровывали. Для поддержания альгологической чистоты и экспоненциальной стадии роста культуры пересев её в свежую среду производили каждые трое суток. Перед биотестированием маточную культуру профильтровывали через 4 слоя марли и разбавляли до оптической плотности $0,250 \pm 0,010$ средой Гольдберга. Оптическую плотность суспензии водоросли измеряли на приборе ИПС-03 в кювете 2 см при длине волны 560 нм (ТУ 4437-003-26218570-2006).

Культуру водоросли вносили в стаканы, содержащие контрольную среду Гольдберга, приготовленную на основе растворов морской соли различных торговых марок (Red Sea Salt, Red Sea, Израиль; Tetra Marine Sea Salt, Tetra GmbH, Германия; Coral Marine Easy Mix, GROTECH GmbH, Германия; МА, «Морской аквариум на Чистых прудах», Россия–Германия) или NaCl в концентрации 20 г/дм^3 , а также тестируемые пробы с добавлением 5 мг/дм^3 $K_2Cr_2O_7$. При этом, в результате разбавления, исходная оптическая плотность тест-культуры была равна $0,0075 \pm 0,0025$ единиц, что эквивалентно $(3,9 \pm 1,3) \cdot 10^4$ клеток/ см^3 . Далее приготовленные пробы в объёме 30 см^3 вносили в 18 стеклянных флаконов в трёх повторностях. Флаконы закрывали полиэтиленовыми пробками с отверстием для газообмена и устанавливали в автоматизированный культиватор УЭР [10]. Культиватор помещали в климатостат Р2, где производилось одновременное выращивание 18 проб культуры водорослей при температуре $25 \pm 0,5$ °С и интенсивности света 2500 ± 500 лк. Регистрацию оптической плотности образцов производили автоматически в течение всего эксперимента (48 ч) с интервалом 30 мин, что позволило построить кривые роста тест-культуры. Всё используемое в работе оборудование разработано в Сибирском федеральном университете (СФУ).

После регистрации результатов эксперимента проводили их статистическую обработку. Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали по значениям трёх повторностей каждой из тестируемых проб. Достоверность отличий между тестируемыми и контрольными вариантами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Химический анализ растворов морских солей производили в Испытательной лаборатории Центра коллективного пользования Института нефти и газа СФУ. Содержание основных ионов, характерных для морских вод, определяли методом капиллярного элек-

трофореза [11], хлорид-титрованием [12] и сульфат-гравиметрией [13].

Результаты и обсуждение

Динамика роста культур микроводорослей, как правило, следует S-образной кривой, включающей стадии лаг-фазы, экспоненциального роста, стационарного роста и гибели [14]. Изменение характера кривой роста может свидетельствовать о неблагоприятных воздействиях, в том числе при наличии в среде токсикантов или недостатке питательных элементов [14]. В частности, токсическое воздействие на культуру водоросли может выражаться

в увеличении длительности лаг-фазы [15]. В этой связи нами были исследованы кривые роста культуры *D. tertiolecta* в контрольных вариантах и в присутствии модельного токсиканта (бихромата калия).

Полученные кривые роста тест-культуры (рис. 1) показали существенное отличие чувствительности водоросли к $K_2Cr_2O_7$ при выращивании в средах на основе морской соли и NaCl. Внесение бихромата калия в концентрации 5 мг/дм³ полностью подавляло рост тест-культуры в среде, приготовленной на растворе хлорида натрия (рис. 1а). Прирост культуры водоросли в среде, приготовленной на основе морской соли Red Sea Salt, в при-

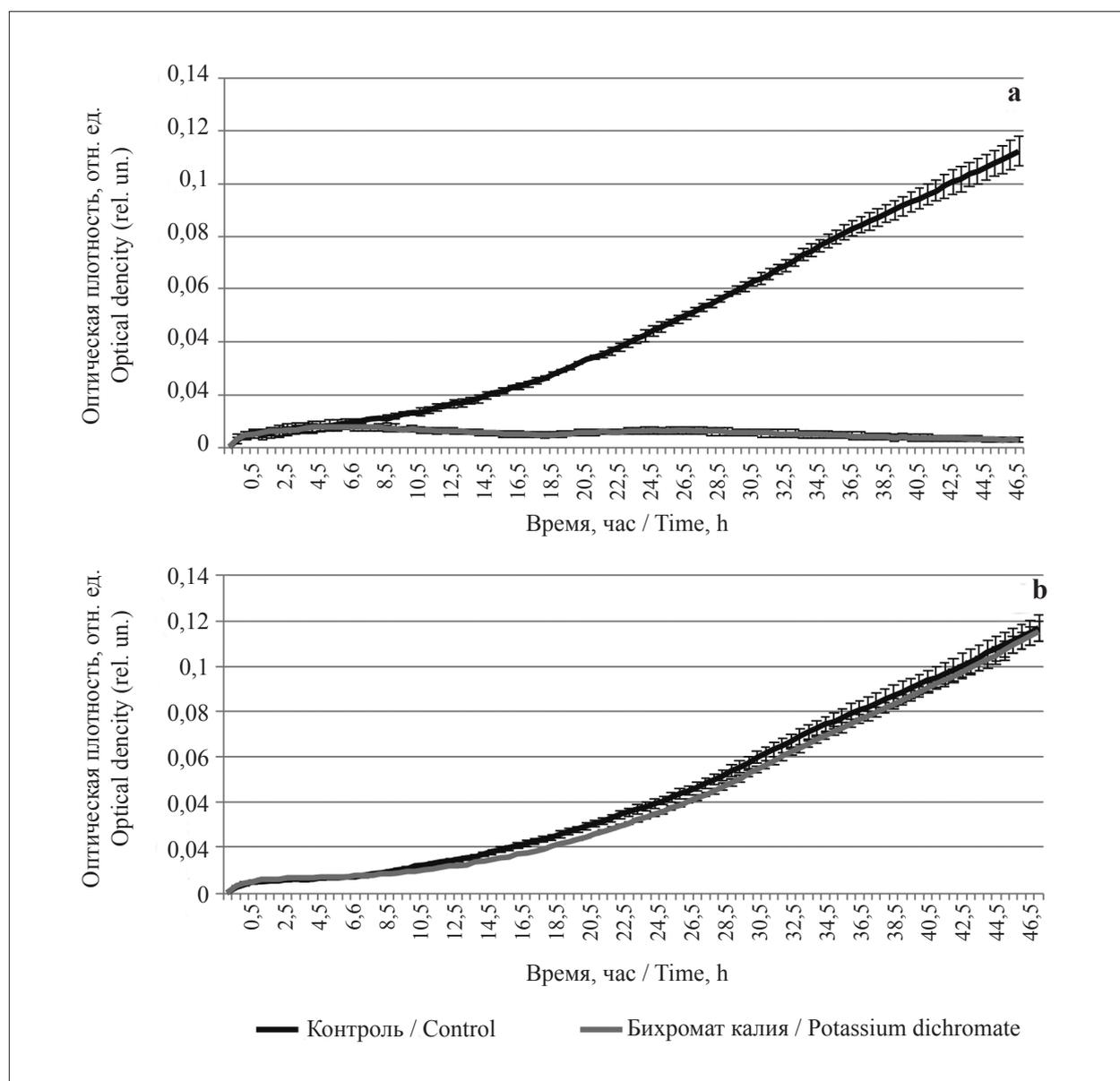


Рис. 1. Кривые роста культуры *D. tertiolecta* в средах на основе NaCl (а) и морской соли Red Sea Salt (б) в контрольном варианте и в присутствии 5 мг/дм³ бихромата калия
Fig. 1. Growth curves of *D. tertiolecta* culture in media based on NaCl (a) and Red Sea Salt (b) in control and in samples containing 5 mg/dm³ of potassium dichromate

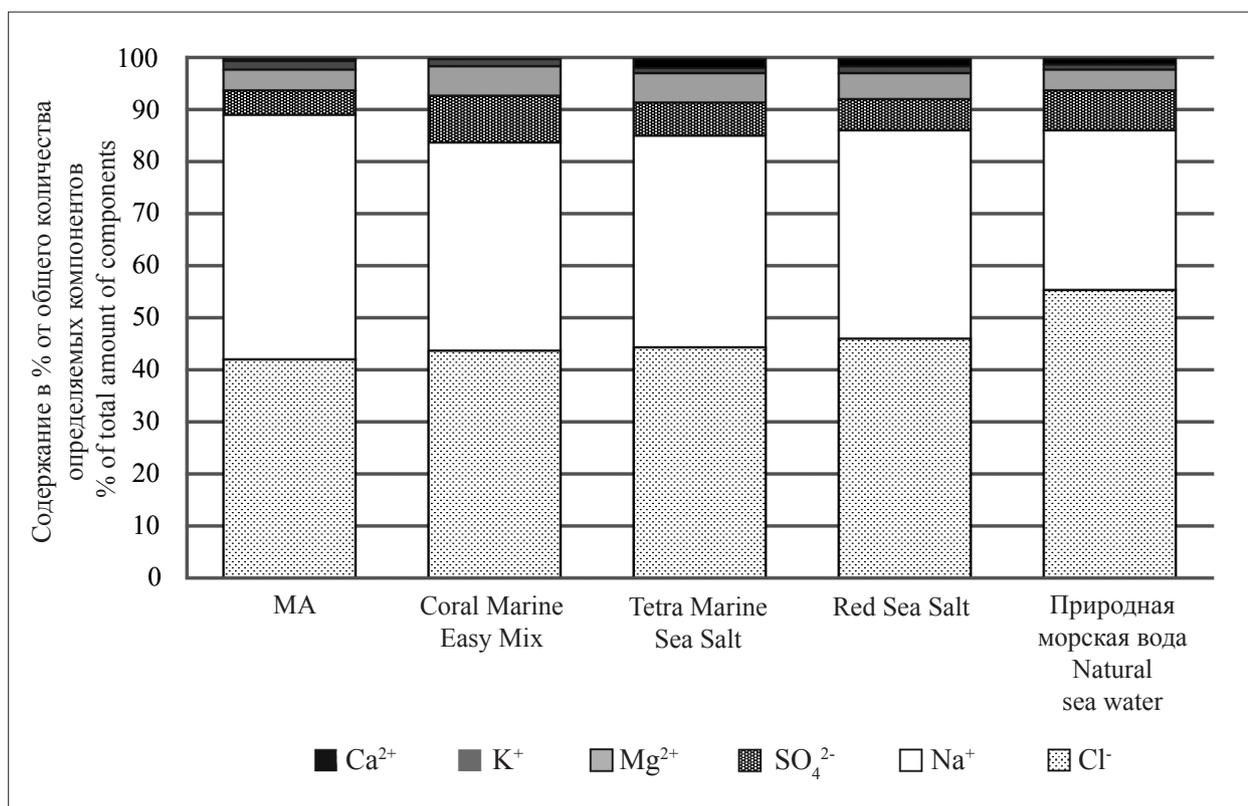


Рис. 2. Доля основных ионов (%) в общем количестве определяемых компонентов в растворах морской соли (данные химического анализа) и природной морской воде [18]
 Fig. 2. Proportion of basic ions (% of the total content) in sea salt solutions (chemical analysis data) and natural seawater [18]

сутствии модельного токсиканта достоверно не отличался от такового в соответствующем контрольном варианте (рис. 1b). Подобное снижение чувствительности тест-объекта было показано нами ранее для пресноводной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer в средах, содержащих увеличенное количество питательных элементов [6].

Одним из вероятных объяснений эффекта снижения чувствительности водорослей в некоторых средах может являться уменьшение биодоступности токсикантов при взаимодействии с компонентами таких сред [16, 17]. В связи с этим нами было определено содержание основных ионов в растворах исследуемых морских солей (рис. 2). Согласно полученным данным, в растворах морской соли всех четырех производителей от 11 до 16% составляли ионы кальция, магния, калия, а также SO_4^{2-} (рис. 2). Такое распределение ионов практически не отличается от данных для природной морской воды, где они в совокупности составляют 14% (рис. 2, [18]), однако эти ионы в растворе NaCl могут присутствовать только в следовых количествах. При этом доля катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , определяющих жёсткость воды, состав-

ляла от 5 до 8% в исследуемых растворах (рис. 2). Следует отметить, что влияние жёсткости воды на проявление токсического воздействия различных веществ было неоднократно показано в отношении разных тест-организмов. В частности, было выявлено снижение токсичности никеля для рачков *Daphnia pulex* при повышенном содержании кальция и магния [19]; токсичность полимеров для водоросли *Raphidocelis subcapitata* также снижалась с увеличением жёсткости [20]. В качестве возможного механизма подобного ослабляющего действия Ca^{2+} и Mg^{2+} на проявление токсических свойств веществ предложена конкуренция этих ионов с токсикантами у поверхности клетки [19]. Таким образом, более высокая чувствительность водоросли *D. tertiolecta* в среде, приготовленной на основе раствора NaCl (рис. 1), может быть следствием отсутствия в ней ионов, определяющих жёсткость воды.

Как показали результаты исследований (рис. 1), замена морской соли в составе питательной среды на раствор NaCl позволяла значительно увеличить чувствительность водоросли *D. tertiolecta* к бихромату калия. Однако при таком подходе, несмотря на то,

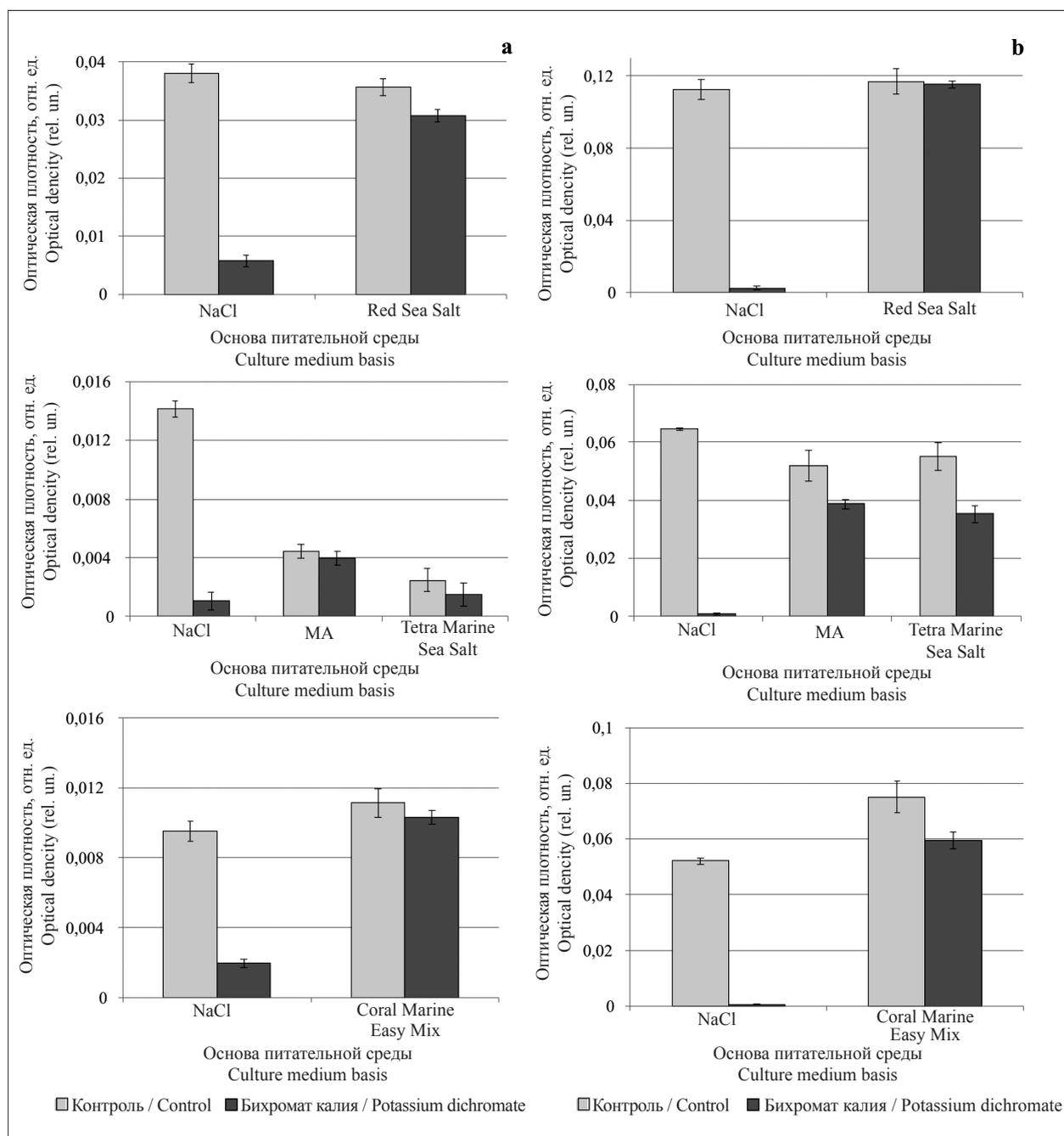


Рис. 3. Оптическая плотность культуры *D. tertiolecta* через 24 (а) и 48 (б) часов культивирования в питательных средах разного состава в контроле и при добавлении 5 мг/дм³ бихромата калия
Fig. 3. The optical density of *D. tertiolecta* culture after 24 (a) and 48 (b) hours of cultivation in growth media of different composition in controls and in samples containing 5 mg/dm³ of potassium dichromate

что концентрации основных питательных веществ во всех вариантах сред сохраняются одинаковыми (см. состав среды Гольдберга), существует вероятность недостаточного снабжения водоросли отдельными элементами, добавляемыми вместе с морской солью. Оценить приемлемость подобной модификации питательной среды можно по показателю конечного прироста оптической плотности тест-культуры в контрольных вариантах. Как

видно из рисунка 1, оптическая плотность культуры водоросли после 48 ч выращивания различалась незначительно в двух вариантах сред, увеличившись за этот период в 11 и 12 раз в средах на основе NaCl и Red Sea Salt соответственно. Таким образом, отсутствие компонентов, привносимых в питательную среду с морской солью, не сказывалось неблагоприятно на росте тест-культуры водоросли *D. tertiolecta* при культивировании в течение

двух суток. Возможно, недостающие компоненты питания в ней восполнялись из среды с морской солью, на которой выращивалась маточная культура водоросли.

Кривые роста водоросли *D. tertiolecta* дают подробную информацию о состоянии тест-объекта в течение всего времени тестирования, поскольку регистрация оптической плотности осуществляется через каждые 30 мин. Вместе с тем при рассмотрении большого количества вариантов, а также для рутинного анализа, более удобным является отображение тест-функций в конкретные моменты времени. В качестве таких измерений нами были приняты данные по оптической плотности культуры водоросли, зарегистрированные после 24 и 48 ч культивирования (рис. 3). Полученные результаты позволили выявить, что среди исследованных 4 питательных сред на основе морской соли различных марок в двух (Tetra Marine Sea Salt и МА) прирост тест-культуры был существенно ниже такового в среде на основе NaCl после первых суток культивирования (рис. 3). Так, прирост в среде, приготовленной на морской соли Tetra Marine Sea Salt составлял 18% от прироста водоросли в среде на основе NaCl (рис. 3). Вместе с тем, прирост водоросли через 24 ч в среде на основе соли Coral Marine Easy Mix, практически не отличающейся по составу от Tetra Marine Sea Salt (рис. 2), превышал таковой в среде на основе NaCl. Одним из возможных объяснений таких различий может быть присутствие не учтённых в химическом анализе компонентов морской соли, влияющих на начальные этапы роста культуры водоросли.

Через 48 ч прирост тест-культуры практически выравнивался в контрольных средах на основе NaCl и морской соли Red Sea Salt. В одном из вариантов питательной среды (содержащей морскую соль Coral Marine Easy Mix) прирост был выше такового в среде на основе NaCl в течение всего времени культивирования (рис. 3). В целом, во всех контрольных вариантах через двое суток оптическая плотность культуры водоросли увеличивалась в 10–15 раз. При этом воздействие бихромата калия на прирост водоросли было значительно ниже во всех вариантах питательных сред, приготовленных на основе исследованных вариантов морской соли по сравнению со средой Гольдберга на основе NaCl. Подавление прироста тест-культуры составляло 97,5; 37,2; 25,3 и 19,9% в средах на основе растворов NaCl, Tetra Marine Sea Salt, МА и Coral Marine Easy Mix соответственно, а в среде на основе соли

Red Sea Salt достоверное снижение прироста в присутствии бихромата калия (5 мг/дм³) отсутствовало (рис. 3).

Таким образом, проведённые исследования показали возможность недооценки токсического эффекта при биотестировании на галофильных водорослях в средах, приготовленных на основе готовой морской соли. Вместе с тем, дискуссионным остаётся вопрос о соответствии данных, полученных в лаборатории в средах с низким содержанием влияющих на биодоступность токсикантов, результатам в реальных условиях в природных водных объектах [20]. Следует отметить, что наравне с показателем жёсткости воды, не менее важным фактором, влияющим на биодоступность токсикантов, является содержание в среде растворённого органического вещества [20]. Данный фактор может иметь решающее значение в проявлении токсических свойств некоторых веществ в природных водах [6]. Кроме того, степень проявления токсических свойств веществ также может определяться уровнем фосфатов в среде [21]. Оценка значения этих факторов при биотестировании на водоросли *D. tertiolecta* также является важной задачей в целях совершенствования существующих методов.

Заключение

Полученные нами результаты показали значительное снижение токсического воздействия бихромата калия на рост культуры *D. tertiolecta* при культивировании её в средах, приготовленных из растворов морской соли различных марок. Использование питательной среды, приготовленной на основе раствора NaCl, позволило существенно увеличить чувствительность тест-объекта к K₂Cr₂O₇.

References

1. Nyholm N., Källqvist T. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae // Environmental Toxicology and Chemistry. 1989. V. 8. P. 689–703. doi: 10.1002/etc.5620080807
2. Wang W.X., Dei R.C.H. Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton // Environmental Pollution. 2001. No. 111. P. 233–240. doi: 10.1016/S0269-7491(00)00071-3
3. Miao A.J., Wang W.X. Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions // Aquatic Toxicology. 2006. No. 78. P. 114–126. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.02.008
4. Källqvist T. Effect of water hardness on the toxicity of cadmium to the green alga *Pseudokirchneriella*

subcapitata in an artificial growth medium and nutrient-spiked natural lake waters // Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2009. No. 72. P. 277–283. doi:10.1080/15287390802539368

5. Anu P.R., Nandan S.B., Jayachandran P.R., Don Xavier N.D., Midhun A.M., Mohan D. Toxicity effects of zinc on two marine diatoms, under varying macronutrient environment // Marine Environmental Research. 2018. No. 142. P. 275–285. doi: 10.1016/j.marenvres.2018.10.013

6. Stravinskene E.S. Problem of heavy metal bioavailability in environmental monitoring of natural waters: dis. ... kand. biol. nauk. Krasnoyarsk, 2012. 119 p. (in Russian).

7. Chen C.Y., Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels // Water Research. 1994. V. 28. No. 4. P. 931–937. doi: 10.1016/0043-1354(94)90101-5

8. Chen C.Y., Lin K.C., Yang D.T. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests // Chemosphere. 1997. V. 35. No. 9. P. 1959–1965. doi: 10.1016/S0045-6535(97)00270-1

9. Methods for estimation of toxicity by growth inhibition of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin and *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve. GOST R 53910-2010 (ISO 10253:2006). Moskva: Standartinform, 2011. 40 p. (in Russian).

10. Stravinskene E.S., Grigor'ev Yu.S. Novel rapid bioassay of sea waters on algae *Dunaliella tertiolecta* // Antropogennoye vliyaniye na vodnyye organizmy i ekosistemy: Sbornik materialov V vsrossiyskoy konferentsii. 2014. P. 177–180 (in Russian).

11. Quantitative chemical analysis of waters. Methods for measuring mass concentrations of potassium, sodium, lithium, magnesium, calcium, ammonium, strontium, barium cations in drinking, natural, and waste water samples by capillary electrophoresis using the “Kapel” capillary electrophoresis system. PND F 14.1:2:4.167-2000. Moskva: State Committee of the Russian Federation for Environmental Protection, 2000. 20 p. (in Russian).

12. Drinking water. Methods for determination of chloride content. GOST 4245-72. Moskva: Standartinform, 2010. P. 487–492 (in Russian).

13. Mass concentration of sulfates in waters. Measurement technique by the gravimetric method. RD 52.24.483-2005. Moskva: Federal Service for Hydrometeorology and Environmental Monitoring, 2005 (in Russian).

14. Kreshchenovskaya M.A., Orlova T.Yu. Ultrastructural changes in marine microalgae under laboratory culture conditions // Voprosy sovremennoy algologii. 2014. No. 2 (6) [Internet resource] <http://algology.ru/545> (Accessed: 15.04.2019) (in Russian).

15. Lustigman B., Korky J., Zabady A., McCormick J.M. Absorption of Cu⁺⁺ by long-term cultures of *Dunaliella salina*, *D. tertiolecta*, and *D. viridis* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1985. No. 35. P. 362–367.

16. Linnik P.N., Nabivanets B.I. Metal migration forms in freshwater bodies. Leningrad: Gidrometeoizdat. 1986. 241 p. (in Russian).

17. Gueguen C., Koukal B., Dominik J., Pardos M. Competition between alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), humic substances and EDTA for Cd and Zn control in the algal assay procedure (AAP) medium // Chemosphere. 2003. No. 53. P. 927–934. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00719-7

18. Davidov L.K., Dmitrieva A.A., Konkina N.G. General hydrology. Leningrad: Hydrometeoizdat, 1973. 464 p. (in Russian).

19. Kozlova T., Wood C.M., McGeer J.C. The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the cladoceran *Daphnia pulex* and the development of a biotic ligand model // Aquatic Toxicology. 2009. V. 91. No. 3. P. 221–228. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.11.005

20. Salinas E.R., Bozich J.S., Kolbenshlag S., Kary-Heinrich M., Hopp P.W., Lukas R., Zok S., Hidding B. Aquatic testing guidelines insufficiently control the influence of dilution water toc and hardness on cationic polymer toxicity – A proposal to improve standardized test procedures // Chemosphere. 2020. V. 259. Article No. 127473. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127473

21. Rocha G.S., Lombardi A.T., Melão M.G.G. Influence of phosphorus on copper toxicity of *Selenastrum gracile* (Reinsch) Korshikov // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2016. No. 128. P. 30–35. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.007