

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Лазарева Анна Максимовна

**Экотоксическое действие соединений и материалов различной природы
при изменении условий альготестирования**

1.5.16. Гидробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., доцент Ипатова В.И.

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. Обзор литературы	17
1.1.Токсичность соединений и материалов разной природы для планктонных организмов.....	17
1.1.1. Влияние микрочастиц пластика на планктонные организмы	17
1.1.2. Влияние наночастиц пластика на планктонные организмы.....	20
1.1.3. Свойства соединений водорастворимых фуллеренов и их влияние на организмы.....	22
1.2. Модели оценки комбинированного действия токсикантов на организмы	25
1.3.Условия постановки эксперимента, влияющие на результат альготестирования	31
1.3.1. Влияние ключевых, контролируемых факторов среды на водоросли в лабораторных условиях при проведении биотестирования.....	31
1.3.2. Влияние времени суток на момент добавления токсиканта на результат альготестирования	33
1.3.3. Влияние концентрации и дозы токсиканта на результат альготестирования	41
1.3.4. Влияние минерализации среды на рост пресноводных микроводорослей	44
Глава 2. Материалы и методы	53
2.1. Характеристика тест-организмов и условий их культивирования	53
2.2. Общие условия проведения токсикологических экспериментов	55

2.2.1. Условия проведения токсикологических экспериментов в зависимости от вида тест-организма.....	56
2.2.2. Подготовка образцов пластика, золы от сжигания пластика и водорастворимых фуллеренов к биотестированию	59
2.2.3. Воздействие наночастиц полистирола в комбинации с метиленовым синим или медью на культуру <i>Scenedesmus quadricauda</i>	62
2.2.4. Воздействие наночастиц полистирола в комбинации с токсикантами различной природы на культуру <i>Chlorella vulgaris</i>	63
2.2.5. Влияние на результат биотестирования концентрации и дозы токсиканта, возраста культуры, состава среды	64
2.2.6. Влияние фактора времени добавления токсиканта на культуру <i>Scenedesmus quadricauda</i>	68
2.2.7. Влияние фактора времени добавления токсиканта на культуру <i>Chlorella vulgaris</i>	70
2.3. Показатели состояния культур в токсикологических экспериментах	72
2.3.1. Основные структурные и функциональные показатели состояния культур.....	72
2.3.2. Оценка комбинированного действия токсикантов: синергизм, антагонизм и аддитивность	74
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	76
3.1. Токсичность соединений и материалов различной природы для зеленых микроводорослей	76
3.1.1. Влияние частиц пластика на микроводоросли	76
3.1.1.1. Воздействие микрочастиц пластика на культуру <i>Scenedesmus quadricauda</i>	76

3.1.1.2. Оценка токсичности золы, полученной при сжигании смеси пластиков.....	84
3.1.1.3. Воздействие наночастиц полистирола на культуру <i>Scenedesmus quadricauda</i>	92
3.1.1.4. Адгезия планктонных водорослей на частицах микропластика.	103
3.1.2. Оценка токсичности водорастворимых фуллеренов C ₆₀ и C ₇₀ с использованием тест-организма <i>Scenedesmus quadricauda</i>	106
3.2. Токсикологический анализ комбинированных эффектов наночастиц полистирола с другими токсикантами различной природы.....	111
3.2.1. Действие наночастиц полистирола в комбинации с хромом на культуру <i>Chlorella vulgaris</i>	111
3.2.2. Действие наночастиц полистирола в комбинации с метиленовым синим на культуры <i>Chlorella vulgaris</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i>	117
3.2.3. Действие наночастиц полистирола в комбинации с фтором на культуру <i>Chlorella vulgaris</i>	130
3.2.4. Действие наночастиц полистирола в комбинации с сульфатом меди на культуры <i>Chlorella vulgaris</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i>	137
3.3. Влияние ключевых, контролируемых факторов среды в лабораторных условиях при проведении альготестирования	159
3.3.1. Влияние времени суток на момент добавления токсиканта на результат альготестирования	159
3.3.1.1. Результаты исследования влияния фактора времени добавления токсиканта на культуру <i>Scenedesmus quadricauda</i>	159
3.3.1.2. Результаты исследования влияния фактора времени добавления токсиканта на культуру <i>Chlorella vulgaris</i>	165

3.3.2. Влияние концентрации и дозы токсиканта на результат альготестирования.....	196
3.3.3. Влияние состава среды на результат альготестирования.....	205
3.3.4. Влияние низких уровней солености среды на рост пресноводных микроводорослей.....	211
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	221
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	234
ПРИЛОЖЕНИЕ	259

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

С освоением человеком природных территорий, ростом населения, развитием промышленности запасы пресной воды уменьшаются, а ее качество стремительно ухудшается. И это одна из самых актуальных и масштабных проблем всего человечества, требующая безотлагательного решения.

Для контроля и улучшения состояния водных ресурсов существуют различные системы мониторинга и нормирования, важную роль в которых играют такие показатели, как полуэффективные концентрации ($ЭК_{50}$), предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочно безвредные уровни воздействия (ОБУВ) веществ, загрязняющих водоемы (Методические указания..., 2011). Ошибки при их определении ведут к трагичным последствиям: нарушению баланса внутри водоема, гибели или вытеснению чувствительных к токсиканту организмов, усилению загрязнения водной среды.

Биотестирование – основной способ определения величин $ЭК_{50}$, ПДК, ОБУВ и других параметров токсичности в оценке опасности загрязнения водной среды. Прогнозы влияния токсикантов на водные экосистемы базируются на лабораторных экспериментах, проводимых в стандартизованных условиях, описанных в многочисленных методиках (Биологические методы ..., 2007; Методические указания ..., 2011; Терехова и др., 2014; Филенко и др., 2015; Терехова и др., 2017 и др.). Однако уже разработанные методики биотеста требуют усовершенствования, поскольку в них прописаны не все возможные условия проведения экспериментов. Кроме того, появление новых загрязняющих веществ и оценка их токсичности также требует обновления методик биотестирования.

Поэтому чрезвычайно важным моментом является выбор основных, подлежащих контролю, условий проведения процедуры биотестирования, для более адекватной с экологической точки зрения оценки токсичности загрязнителей или качества водной среды.

Проведенный в данной работе анализ существующих методик биотестирования выявил недостатки условий проведения биоиспытаний, нуждающиеся в корректировке, что позволит более адекватно оценивать потенциальную токсичность различных веществ и материалов и оптимизировать процедуру биотестирования и нормирования.

Степень разработанности темы

В настоящее время накоплен достаточный массив данных, свидетельствующий о том, что токсичность химических веществ зависит не только от их концентрации, но и других факторов окружающей среды, например, состава воды и температуры (Kholssi et al., 2024; Stone et al., 2024; Miao, Wang, 2006; Ma et al., 2022; Hong et al., 2009; Charles et al., 2002). Состав воды зависит от природной территориальной неоднородности горных пород и почв, атмосферных осадков, климата, рельефа, гидрогеологических условий, состава растительного покрова и уникален для каждого водного объекта.

В существующих методиках (Биологические методы ..., 2007; Методические указания ..., 2011; Терехова и др., 2014; Филенко и др., 2015; Терехова и др., 2017; ГОСТ R 54496-2011, 2012) проведения биотестирования время суток на момент добавки токсиканта никак не регламентировано. Водоросли, в качестве важных и обязательных тест-организмов для биотестирования, являются представителями фотосинтезирующих организмов, поэтому многие их метаболические процессы регулирует присутствие или отсутствие света и его интенсивность. Однако, световое излучение редко исследуют в качестве внешнего фактора, влияющего на токсичность веществ, несмотря на его очевидную роль в метаболизме фотосинтетических организмов и участии в формировании циркадных ритмов живых организмов (Nelson et al., 2021). И если работ, изучающих зависимость токсичности веществ от интенсивности, вида и длины волны светового излучения, мало (Holmstrup et al., 2010, Tanno et al., 2020), то вопрос о влиянии времени суток на момент добавки токсиканта и вовсе остается неизученным. Аналогов

проведенных исследований в рамках данной работы в существующей литературе, описывающей процедуру биотестирования, нет.

Другие факторы, влияющие на результат биотеста, такие как плотность и возраст культуры, состав среды культивирования и др. уже были частично описаны в литературе (Tanno et al., 2020). Однако из-за большого количества потенциальных токсикантов, тест-организмов, разного состава природных вод и еще большего количества комбинаций данных параметров, этот вопрос изучен недостаточно.

С появлением новых чужеродных веществ и материалов в последнее время остро стоит вопрос об опасности пластикового загрязнения и влиянии микро- и наночастиц пластика на живые организмы (Issac, Kandasubramanian, 2021; Kögel et al., 2020). В связи с этим изучение пластикового загрязнения супралиторали Баренцева моря – одного из самых загрязненных морей России, оценка токсичности разных видов пластика и золы от его сжигания для представителей фито- и зоопланктона является наиболее актуальным. В литературе приведены данные краткосрочных опытов с частицами пластика для некоторых видов водных организмов по ограниченному числу показателей (Huang et al., 2021). В связи с этим, необходимо сделать акцент на проведение длительных, хронических экспериментов с пластиком по комплексу показателей, как стандартных общебиологических и физиологических, так и новых показателей неблагополучия состояния популяции тест-организмов при токсическом воздействии.

Совместное действие нескольких токсикантов является важным фактором при оценке их фактической токсичности в окружающей среде (Tunalı et al., 2020; Wang et al., 2021). Поэтому необходимо исследовать комбинированный эффект частиц пластика с другими загрязняющими веществами разной природы, который позволит выявить синергический, аддитивный и антагонистический эффекты их парных комбинаций на тест-организмы в зависимости от их концентраций и срока действия. Такой подход может позволить выявить токсический эффект нетоксичных концентраций загрязняющих веществ, соответствующих уровню

ПДК, для последующей корректировки ПДК отдельных компонентов смеси веществ или материалов.

Сравнительная оценка результатов экспериментов на природной воде и искусственной среде имеет важное значение для экстраполяции данных, полученных в лабораторных условиях, на природные водоемы. Подобные эксперименты необходимы при установлении региональных нормативов, поскольку в каждом регионе имеются свои геохимические особенности водоемов, влияющие на доступность и поведение потенциально токсичных агентов в них.

В настоящее время не существует разработанных и утвержденных методик биотестирования для диапазона солености 1–6 ‰. Поэтому исследование адаптации и подбор видов из числа как уже используемых в биотестировании пресных вод, так и новых пресноводных видов, способных расти в этом диапазоне солености, имеет важное научное и практическое значение для целей биотестирования промышленных отходов и слабосоленых проб.

В связи с этим представляется важным детальное рассмотрение ряда ключевых экспериментальных условий проведения процедуры биотестирования, потенциально влияющих на ее результаты.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы – исследование экотоксического действия соединений и материалов различной природы на микроводоросли при изменении факторов среды.

В задачи работы входило:

1. Изучить токсичность веществ в зависимости от состава среды (природная вода и искусственные среды), начальной численности и возраста культуры *Scenedesmus quadricauda*, концентрации и дозы токсиканта.
2. Исследовать связь циркадных ритмов с изменением токсикочувствительности микроводорослей.

3. Провести сравнительную оценку действия различных токсикантов на микроводоросли.

4. Изучить влияние разных уровней минерализации на рост пресноводных тест-организмов *Scenedesmus quadricauda* и *Monoraphidium arcuatum* с целью оценки их пригодности для биотестирования слабосоленых сред.

5. Исследовать влияние микро- и наночастиц пластика разного типа на структурные и функциональные показатели организмов фитопланктона, изучить комбинированные эффекты пластиков с другими токсикантами, провести сравнительный анализ токсичности пластиковых частиц в зависимости от их размера, состава и состояния.

Объект исследования:

Взаимодействие потенциально токсичных веществ и материалов разной природы с представителями фитопланктона при различных условиях проведения токсикологических испытаний.

Научная новизна

Впервые выявлена зависимость токсичности вещества для тест-организмов от времени начала эксперимента. Это экспериментально обнаруженная находка позволяет без дополнительных затрат значительно повысить точность биотеста. В существующих методиках биотестирования параметр времени суток на момент начала опыта никак не регламентирован, однако его изменение позволило в данной работе получить величины ЭК₅₀ эталонного токсиканта бихромата калия для микроводорослей, отличающиеся более чем в 4 раза при утренних и вечерних добавках токсиканта

Впервые в мировой практике предложено ввести в методики биотестирования параметр «время постановки биотеста», что не потребует дополнительной приборной базы, финансовых или физических затрат, и делает это дополнение к методике доступным для реализации.

Впервые разработан подход к оценке токсичности смеси наночастиц пластика и токсикантов разной природы, учитывающая как случаи угнетения, так и стимуляции показателей роста культур микроводорослей, а также все типы взаимодействий токсикантов в смеси на протяжении хронического эксперимента. Данный подход может быть использован для оценки токсичности смеси любых загрязнителей.

Впервые были определены диапазоны солёности среды и сроки биотестов, позволяющие проводить биотестирование на пресноводных видах микроводорослей *S. quadricauda* и *M. arcuatum*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученная в данном исследовании новая информация о циркадных (суточных) ритмах в жизнедеятельности гидробионтов позволяет разработать оптимальные режимы освещения и времени добавки питательных веществ или корма, которые помогут получить максимальный прирост биомассы за короткий срок, что имеет высокую значимость при выращивании гидробионтов в аквакультуре или в биотехнологии для получения из них ценных продуктов и биотоплива.

Полученные в работе новые данные исследования ключевых, дополнительных и необходимых условий проведения экспериментов, влияющих на результаты биотестирования, помогут избежать ошибок в определении таких ключевых показателей токсичности как ЭК₅₀, ОБУВ, ПДК, повышают точность и воспроизводимость результатов и эффективность процедуры нормирования.

Проверка токсичности микро- и наночастиц пластика по шести показателям состояния растительного тест-организма позволила выявить их токсический эффект при меньших токсических нагрузках. Эти данные помогут избежать недооценки опасности пластикового загрязнения для организмов фитопланктона при стандартном использовании только двух показателей «численность» и «фотосинтетическая активность».

Результаты проведенных экспериментов с алюминием на природной воде и искусственной среде важны для экстраполяции данных, полученных в лабораторных условиях, на природные водоемы и для определения региональных нормативов загрязняющих веществ, с учетом региональных геохимических особенностей водоемов, влияющих на доступность и поведение потенциально токсичных агентов в них.

Результаты настоящей работы позволяют рекомендовать в практику биотестирования слабосоленых сред культуры пресноводных водорослей *S. quadricauda* и *M. arcuatum*. Проведенное сравнительное исследование темпов роста адаптированной и неадаптированной культур *S. quadricauda* к уровню минерализации 2,5 г/л позволяет сократить процедуру подготовки к биотестированию слабосоленых сред с этим видом более чем на 2 недели.

Методология и методы исследования

В работе использовали как классические, так и современные методы изучения состояния микроводорослей в условиях токсической нагрузки. Исследования взаимодействия потенциально токсичных веществ и материалов разной природы с представителями фитопланктона при различных условиях альготестирования проводили с учетом ключевых, контролируемых факторов, влияющих на результат.

Положения, выносимые на защиту

1. Токсичность микро- и нано- частиц пластика зависит от их размера, типа и состояния, происхождения, концентрации, времени воздействия и оцениваемого тест-параметра.

2. Тип взаимодействия токсикантов с нанопластиком (НП) при комбинированном воздействии на культуры микроводорослей зависит от вида тест-организма, измеряемого параметра, природы токсиканта, концентраций токсикантов и НП, длительности воздействия.

3. Ключевые контролируемые факторы эксперимента: состав среды для выращивания культуры, возраст культуры, начальную плотность ее клеток, концентрацию, а не дозу токсиканта, и время суток на момент его добавки следует строго регламентировать в методиках и учитывать при проведении биотестирования.

4. Культуры пресноводных водорослей *S. quadricauda* и *M. arcuatum* могут быть рекомендованы в качестве тест-организмов для оценки соленых проб при низких и средних уровнях минерализации среды.

Личный вклад автора

Диссертантом лично осуществлен информационный поиск и анализ данных литературы, разработана рабочая гипотеза о влиянии времени суток на результат фитотестирования, определена методология постановки опытов, выполнены экспериментальные исследования в полном объеме, обработано 3240 проб и выполнено более 12 тыс. измерений, проведена интерпретация и обсуждение полученных результатов, подготовлены печатные работы.

Результаты совместных исследований представлены в соответствующих публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов основана на использовании общепризнанных методов водной экотоксикологии, комплексном анализе состояния культур при токсической нагрузке (по количественным и физиологическим показателям) и подтверждается использованием различных методов статистики.

Результаты исследования опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах.

Результаты работы были представлены на заседании кафедры общей экологии и гидробиологии Биологического факультета МГУ, на конференциях:

«Современные проблемы экспериментальной ботаники» (Минск-Браслав, Беларусь, 2025), «Морские исследования и образование – MARESEDU 2024» (Москва, 2024), «Биология внутренних вод. Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (пос. Борок, ИБВВ РАН, 2024), «Комплексные исследования Мирового океана. КИМО – 2024» (Владивосток, 2024), «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность», (Севастополь, 2024), «Ломоносовские чтения – 2024» (Москва, 2024), «Всероссийская научно-практическая конференция им. Жореса Алфёрова 2023» (Санкт-Петербург, 2023), «Микропластик в науке о полимерах» (Великий Новгород, 2023), «XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием для молодых учёных по проблемам водных и наземных экосистем «Понт Эвксинский» (Севастополь, ИНБЮМ, 2023 и 2019), «Всероссийская конференция молодых ученых «PLANTAE & FUNGI III» (Владивосток, 2023), «IV Международный симпозиум "Биодиагностика и экологическая оценка окружающей среды: современные технологии, проблемы и решения" (Москва, 2023), «VI Международная (XIX Региональная) Научная конференция «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2023), «Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2023 и 2019, 2018), «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса» (Москва, ВНИРО, 2022 и 2019), «Россия в десятилетии ООН наук об океане» (Москва, РТУ МИРЭА, 2022), «VII Всероссийский молодежный научный форум Наука будущего – наука молодых» (Новосибирск, 2022), «Дни Арктики в Санкт-Петербурге – 2021: Международное научное сотрудничество в Арктике в эпоху изменения климата» (Санкт-Петербург, 2021), «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, ИХФ РАН, 2019), «Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование» (Москва, МПГУ, 2018).

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 11 статей (2 из которых также вышли в переводных изданиях) из них 9 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова по специальности 1.5.16. Гидробиология (биологические науки).

Структура диссертации

Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, включающее выводы, и приложение. Общий объем составляет 262 страницы. Основной текст работы включает 71 рисунок и 55 таблиц. Список литературы содержит 218 источников, из которых 171 на иностранных языках.

Благодарности и финансирование

Автор выражает глубочайшую благодарность к.б.н. Ипатовой Валентине Ивановне за чуткое научное руководство и помощь на всех этапах выполнения работы, к.б.н. Гершкович Дарье Михайловне, как сотруднику группы токсикологов, за ценные советы и поддержку в работе над диссертацией, аспирантке Рак Анне Николаевне и инж. Ильиной Олесе Васильевне за совместное исследование токсичности пластиковых частиц, д.б.н. проф. Азовскому Андрею Игоревичу за консультации по статистической обработке результатов, к.б.н. Воробьевой Ольге Владимировне и к.б.н. Конюхову Ивану Владимировичу за профессиональный инструктаж и помощь в определении эффективности фотосинтеза на приборе Мега-25, к.б.н. Тодоренко Дарье Алексеевне и д.б.н. проф. Маторину Дмитрию Николаевичу за помощь в определении количества ТБК-активных продуктов и эффективности фотосинтеза при изучении токсичности микропластиков, всему коллективу кафедры общей экологии и гидробиологии за предоставленную возможность выполнить эту работу, а также Лазареву Максиму Викторовичу и Севастьяновой Алле Борисовне, Мягкой Александре Валерьевне и

Лазареву Ивану Максимовичу за помощь и поддержку на протяжении всего времени работы над диссертацией.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (Соглашение № 075-15-2024-546).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Токсичность соединений и материалов разной природы для планктонных организмов

1.1.1. Влияние микрочастиц пластика на планктонные организмы

Пластмассы синтезированы и широко используются уже более полвека. В последнее время производство и использование пластика значительно возросло. Негативное воздействие пластикового загрязнения на организмы, особенно в водной среде, стало глобальной проблемой из-за его стойкости, химического состава и биоаккумуляции (Shen et al., 2019).

Свежий пластик и пластиковый мусор попадают в природные системы, подвергаются механической фрагментации, химической деградации и биоразложению, постепенно превращаясь в микро- и наночастицы (Cau et al., 2020; Debroas et al., 2019). Частицы пластика быстро распространяются в водной среде, переносятся в океаны и на морское дно через пищевые сети и процессы агрегации, оказывая неблагоприятное влияние на экосистемы (Michels et al., 2018). Кроме того, микрочастицы пластика (МП) могут являться транспортным средством для трансграничного переноса микроорганизмов (Rosato et al., 2020), эффективно адсорбировать стойкие органические и неорганические загрязнения благодаря высокой площади поверхности и пористости (Alimi et al., 2018), и в конечном итоге оказывать неблагоприятное воздействие на всех обитателей водных экосистем.

В литературе данные о токсическом воздействии МП на первичных продуцентов водных экосистем разрозненны и редки. МП мало влияет на рост микроводорослей (Prata et al., 2019). Микро- и, в особенности, наночастицы пластика могут вызывать как торможение роста (Besseling et al., 2014), так и его стимуляцию (Yokota et al., 2017). В большинстве случаев не удалось найти

значения полуэффективной концентрации ЭК₅₀ для МП из-за высоких концентраций, необходимых для индукции значительной токсичности.

Присутствие МП приводит к снижению у водорослей содержания хлорофилла (Zhang et al., 2017) и фотосинтетической активности (Mao et al., 2018) независимо от задержки роста (Besseling et al., 2014) и эффекта затенения (Zhang et al., 2017), что, возможно, связано с уменьшением экспрессии генов фотосинтеза (Lagarde et al., 2016), увеличением потребности клеток в энергии для подвижности и нарушением газообмена из-за поверхностной адсорбции МП (Bhattacharya et al., 2010). МП может вызывать морфологические изменения у микроводорослей (Mao et al., 2018), интернализироваться во время деления их клеток (Chae et al., 2018) или путем захвата миксотрофными организмами (Long et al., 2017). Он может накапливаться и в экзополимерных веществах, уменьшая доступность света, меняя биодоступность углерода, а также увеличивает частоту и силу вредоносного цветения водорослей из-за доступности МП в качестве субстрата для роста водорослей (Yokota et al., 2017).

На токсичность МП влияет их концентрация, тип и размер полимера, наличие добавок, химический состав и заряд. Как правило, мелкие и положительно заряженные МП более токсичны для микроводорослей (Nolte et al., 2017). Адсорбция загрязняющих веществ МП также может усиливать их воздействие (Besseling et al., 2014).

Для оценки влияния МП на жизненные функции тест-объектов чаще используются промышленные образцы МП. В то же время в окружающей среде содержится значительно больше частиц МП, образованных из макроизделий под влиянием факторов окружающей среды. Потенциальная токсичность сферических образцов и фрагментов вторичного МП различна (Ogonowski et al., 2016). Выживаемость *D. magna* при воздействии вторичных МП оказывается ниже, чем при воздействии первичных МП (An et al., 2021), что, возможно, связано с более длительным нахождением гетерогенных волокон вторичного МП в

пищеварительном тракте дафний, приводящему к уменьшению эффективности питания. Эти данные подтверждаются снижением трофической активности (ТА) дафний при добавлении в среду частиц МП (Ogonowski et al., 2016; Rist et al., 2017).

Мелкие частицы МП микронного размера могут представлять значительный экологический риск для водных организмов. Так, мелкие фрагменты МП (17,23 и 34,43 мкм) снижали питание, длину тела и число потомков у *D. magna*, по сравнению с более крупными, вероятно, из-за их более длительного времени удерживания и большего воздействия на пищеварительный тракт (An et al., 2021). Снимки электронной микроскопии позволили понять возможную причину токсического эффекта МП полистирола на микроводоросль *Chlorella vulgaris*, поскольку частицы МП адсорбировались и внедрялись в клетки водоросли (Tunali et al., 2020). Для оценки токсичности МП необходимо проводить хронические испытания, поскольку в острых опытах можно ее не выявить. Так в острых экспериментах МП частицы полистирола не оказывали токсического воздействия на *D. magna* в течение 48 час, но вызывали дополнительную смертность в течение 120 час (Eltemsah, Vøhn, 2019), при этом молодые особи были на 50% более чувствительны, чем взрослые.

Было исследовано (Aljaibachi, Callaghan, 2018) поглощение, удержание и воздействие частиц PS на *Daphnia magna* в присутствии *Chlorella vulgaris*, при этом размер частиц МП соответствовал размеру клеток водорослей (2 мкм). Дафнии активно поглощали частицы PS, однако в присутствии водорослей этот показатель снижался, что говорит об избирательном потреблении пищевых частиц. При изучении воздействия на дафнию МП или каолина с низкой и высокой концентрацией пищи также показано (Ogonowski et al., 2016), что особенности жизненного цикла дафний в большей степени связаны с концентрацией пищи, чем с микрочастицами.

Исследования влияния МП чаще проводятся в виде острых тестов с использованием первичных МП, что не является реалистичным сценарием

происходящего в окружающей водной среде (Li et al., 2020). В то же время немногочисленные результаты хронических тестов указывают на наличие угнетения репродуктивной способности, накопления питательных веществ и выживаемости кладоцер (Jaikumar et al., 2019).

Промышленное сжигание пластиковых отходов является альтернативой их захоронению или переработке, однако оно сопряжено с воздушными выбросами и концентрированием токсичных продуктов горения в зольных остатках. И хотя этот способ не является распространенной практикой, попадание в водную среду продуктов сжигания пластика после стихийной утилизации и случайных возгораний остается весьма вероятным. В литературе описано образование высокотоксичных соединений в составе воздушных выбросов и зольного остатка, формирующихся при сжигании пластиковых отходов (Nakao et al., 2006; Valavanidis et al., 2008), но практически отсутствуют исследования, направленные на оценку токсичности продуктов горения пластика для водных организмов.

1.1.2. Влияние наночастиц пластика на планктонные организмы

Полистирол (ПС) является одним из наиболее часто используемых пластиков для пищевых продуктов, упаковок для напитков и других розничных товаров (Kik et al., 2020), может сохраняться в окружающей среде сотни лет и является загрязнителем водной среды (Wan et al., 2018), в которой из-за биodeградации, выветривания и фотоокисления УФ-излучением более крупные отходы полистирола подвергаются фрагментации на более мелкие частицы, такие как микро (<5 мкм) и наночастицы (1–1000 нм) (Prata et al., 2019).

Уникальные свойства наночастиц ПС (ПС-НЧ), такие как маленький размер, высокая адсорбционная способность, высокое отношение площади поверхности к объему и кривизна поверхности придают им высокую подвижность, что может увеличить потенциальные риски для окружающей среды и накопление в организмах (Fadare et al., 2019). Их используют в различных потребительских

товарах (например, краски, биосенсоры, нанокompозиты, водонепроницаемые покрытия, наномедицина, фотоника, медицинская диагностика, косметика, а также фармацевтические продукты). Преднамеренное или случайное попадание ПС-НЧ в окружающую среду создает угрозу для живых организмов (Kik et al., 2020).

Источники нанопластика в окружающей среде: эмиссия из сточных вод, машинная стирка синтетических тканей, выветривание и абразия пластиковых изделий. Влияние нанопластика на окружающую среду и биоту практически не изучено. Это связано с тем, что первичный нанопластик, который используют в лабораторных экспериментах, значительно отличается от нанопластика, содержащегося в окружающей среде. Нанопластик в окружающей среде – это гетерогенная масса с различными источниками происхождения, составом и свойствами. На данный момент затруднения возникают уже на этапе детектирования наличия наночастиц в среде. Тем не менее, малый размер этих частиц, сопоставимый с клеточными мембранами и другими клеточными компонентами, создаёт особый риск. Проникновение в клетки мелких гидрофобных нанопластиковых частиц может привести к цитотоксичности (Hernandez et al., 2017).

Исследования показали, что ветвистоусые ракообразные *Daphnia magna* Straus поглощают микро- и нанопластиковые частицы различных размеров (20 нм – 5 мкм (до 1400 мкм в длину)) и форм, включая сферы, фрагменты и волокна (Jemes et al., 2016).

В настоящее время большинство опубликованных данных ограничиваются токсичностью микропластика ПС для микроводорослей (Kik et al., 2020), хотя о токсическом действии наночастиц ПС на микроводоросли также сообщалось. Например, ПС-НЧ вызывают ингибирование роста (Besseling et al., 2014), снижают содержание хлорофилла, фотосинтетическую активность, а также приводят к увеличению концентрации активных форм кислорода (АФК) (Bhattacharya et al., 2010). Более того, наблюдали адгезию положительно заряженных ПС-НЧ на

поверхности водорослей (Nolte et al., 2017; Chae et al., 2018), что приводит к эффекту затенения, блокируя попадание света в хлоропласты и подавляя фотосинтетическая активность (Wu et al., 2019). Данные о механизмах поступления наночастиц полистирола в клетку микроводорослей отсутствуют. На культуре растительных клеток (Тобacco BY-2 cells) показано поглощение клетками полистироловых микросфер с размером частиц менее 100 нм путем эндоцитоза (Bandmann et al., 2012). Предложены возможные три механизма детоксикации ПС-НЧ на клеточном уровне – постепенное утолщение клеточной стенки, интернализация (аутофагические вакуоли) и агрегация клеток микроводорослей (Li et al., 2023 b).

1.1.3. Свойства соединений водорастворимых фуллеренов и их влияние на организмы

Производство фуллеренов неуклонно возрастает, начиная с 1990 г. В настоящее время объём производства фуллереновой сажи составляет несколько тонн в год. Для научно-практических целей используют стабильные, высококонцентрированные водные дисперсии фуллеренов (ВДФ C₆₀ и C₇₀). Они представляют собой коллоидные растворы с размером частиц до 200 нм (Duncan et al., 2008).

Водорастворимые фуллерены C₆₀ и C₇₀ – это молекулярные соединения, состоящие из 60 и 70 углеродных атомов, широко используемые в физических, химических, медицинских и биологических исследованиях в связи с их донорно-акцепторными и антиоксидативными свойствами.

Благодаря своей уникальной геометрической форме и электронной структуре фуллерены и их производные рассматривают в качестве основы для получения новых эффективных лекарственных средств (Фрог, 2006). В настоящее время как применение, так и исследование фуллеренов сдерживает их высокая стоимость, которая связана с низкой экономической эффективностью технологий

получения и самих фуллеренов, и их производных. Однако в связи с высокой вероятностью попадания фуллеренов в окружающую среду особенно актуальной становится задача исследования эффектов их воздействия на биологические системы, в частности, – на водные организмы.

Соединения фуллерена способны проникать через липидные мембраны, модулировать транспорт ионов и, иногда, проявлять биологическую активность (Фрог, 2006). Изучение биологических свойств производных фуллеренов показало, что они способны проникать через биомембраны клетки благодаря их липофильности и обладают следующими видами активности: антиоксидантной, антибактериальной, противораковой, радиозащитной, мембранотропной, а также могут служить ингибиторами биосинтеза белков (Думпис и др., 2018). Фуллерены C_{60} – мощные нейтрализаторы активных форм кислорода.

Водные организмы, в ходе своей предшествующей эволюции никогда не сталкивались со многими синтезированными человеком веществами, в том числе и с ВДФ, поэтому не исключена постепенная аккумуляция фуллеренов в водоёмах, что может иметь непредсказуемые последствия для всей водной экосистемы в целом (Мошарова и др., 2019).

К настоящему времени проведены многочисленные исследования воздействия ВДФ C_{60} на водные микроорганизмы и ракообразных, однако их результаты носят противоречивый характер. Известны работы, в которых показано наличие токсичных свойств у ВДФ C_{60} при их экспонировании с бактериальными культурами штаммов *Escherichia coli* K-12 и *Escherichia coli* B-23 (Aquino et al., 2010; Chae et al., 2009). В то же время имеются исследования об отсутствии угнетающего действия фуллеренов на *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и почвенные микроорганизмы (Hadduck et al., 2010; Tong et al., 2016). Есть данные о стимулирующем воздействии фуллеренов на микробиоценоз сточных вод и рост растений (Huang et al., 2014; Панова и др., 2018).

Изучение влияния водных дисперсий немодифицированного фуллерена C₆₀ (ВДФ C₆₀) в концентрации 5 мг/л на численность и метаболическую активность речного гетеротрофного бактериопланктона *in vitro* показало его стимулирующее влияние на численность бактериопланктона и активность электрон-транспортных цепей в его клетках (Мошарова и др., 2019). Установлено, что присутствие ВДФ C₆₀ снижает бактерицидную активность антибиотиков ванкомицина и бензилпенициллина. Обнаруженное стимулирующее действие фуллерена на природный гетеротрофный бактериопланктон ставит под сомнение целесообразность использования ВДФ C₆₀ в качестве бактериостатического агента.

Также ведутся активные исследования различных соединений на основе C₆₀. Было установлено, что они способны проникать через липидный бислой во внутренний объем липосом, являются эффективными биоантиоксидантами, могут селективно действовать на активность мембраносвязанных ферментов окислительного дезаминирования биогенных аминов и способны повышать противоопухолевую и антиметастатическую активность цитостатиков при комбинированной химиотерапии (Файнгольд, 2008).

Имеются данные о том, что водорастворимый фуллерен C₆₀ работает как регулятор окислительно-восстановительных и свободнорадикальных процессов при низких концентрациях и обладает свойствами балансировки окисления в широком диапазоне концентраций ($2,5 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-19}$ М) (Yablonskaya et al., 2018).

Водоросли являются важным компонентом водных экосистем, неотъемлемым звеном трофических цепей в водных сообществах. Однако данных о влиянии фуллеренов на микроводоросли нет.

Эти соединения могут попадать в окружающую среду и быть компонентами ее загрязнения. В связи с этим в настоящей работе было исследовано влияние ВДФ C₆₀ и C₇₀ как соединений совсем другой природы, чем хорошо известных загрязняющих веществ, в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на общебиологические и

физиологические показатели в накопительной культуре водоросли *Scenedesmus quadricauda*.

1.2. Модели оценки комбинированного действия токсикантов на организмы

Токсическое воздействие поллютантов на людей или окружающую среду обычно тестируют на основе одного вещества, хотя в природе подобная ситуация случается редко. Одновременное или последовательное воздействие двух или более токсикантов может изменить токсичность каждого вещества количественно и качественно (Tomasik et al. 1995; Wang et al. 1995; González-Pleiter et al., 2013).

Было предпринято много попыток предсказать совместные токсические эффекты смесей химических веществ (Tomasik et al. 1995; Wang et al. 1995; González-Pleiter et al., 2013). Совместный эффект многокомпонентных смесей сложно предсказать, он связан не только с составом смеси, но и с организмами, на которые действуют вещества (Tomasik et al. 1995).

Многие исследователи пытались количественно оценить токсичность, возникающую в результате взаимодействия нескольких веществ в биологических системах (Tomasik et al. 1995; Wang et al. 1995; Fargašová, 2001; González-Pleiter et al., 2013). Взаимодействие — это процесс, посредством которого вещества в смеси изменяют эффективную концентрацию рассматриваемого вещества (Nordberg, 1976). Такие изменения считаются взаимодействиями только в том случае, если они отклоняются от аддитивности. Другими словами, взаимодействия следует называть положительными, если они вызывают сверхаддитивные (синергические или синергетические) эффекты, и отрицательными, если они вызывают менее аддитивные (антагонистические) эффекты. Вариант взаимодействия зависит от формы токсикантов (например, для металлов это могут быть комплексы, хелаты и т. д.), вида водорослей, соотношения концентраций токсикант-токсикант и условий окружающей среды (Wang et al., 1995).

Поскольку задача экспериментального определения токсичности всех возможных смесей окружающей среды бесконечна, были предложены прогностические подходы, основанные на математических моделях совместного действия концентраций токсикантов (Concentration Addition, CA) и независимого действия (Independent Action, IA) (Carusso et al., 2018). Эти две модели предсказывают токсичность смеси на основе индивидуальной токсичности ее компонентов (Altenburger et al., 2004).

Экспериментальные результаты сравнивались с анализом, основанным на концепции токсических единиц (toxic unit, TU): $TU = C/IC_{50}$, где C — концентрация токсичного вещества в смеси (Yang et al., 2008). Сумма TU смеси рассчитывалась путем сложения отношений концентраций каждого токсиканта в смеси, деленных на их IC_{50} (концентрацию, ингибирующую измеряемый параметр культуры на 50% от уровня контроля), когда они присутствуют отдельно.

Экспериментальную токсичность бинарных смесей веществ можно рассчитать на основе прогностических уравнений двух наиболее широко используемых моделей аддитивности: CA и IA (Altenburger et al., 2004). Модель CA основана на предположении, что каждое химическое вещество в смеси действует по одному и тому же механизму/способу действия, и расчет проводят по уравнению (1):

$$IC_{x,mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{IC_{xi}} \right)^{224} = 1 \quad (1),$$

где $IC_{x,mix}$ — ингибирующая концентрация смеси, вызывающая $x\%$ эффект, IC_{xi} — концентрация компонента i , вызывающая такое же ингибирование ($x\%$), как и смесь при индивидуальном применении, а C_i — концентрация i -го компонента в смеси (Altenburger et al., 2004).

Модель IA основана на предположении, что компоненты смеси действуют независимо и имеют разные мишени воздействия. Эта концепция подразумевает,

что эффект одного вещества не должен меняться в присутствии другого вещества.

Расчет для модели IA для бинарных смесей проводят по уравнению (2):

$$I_{(C_{mix})} = 1 - [(1 - I_{(c1)})(1 - I_{(c2)})] \quad (2),$$

где $I_{(C_{mix})}$ — ингибирование, вызванное общей смесью при концентрациях c_1 и c_2 , а $I_{(c1)}$ и $I_{(c2)}$ — ингибирование, которое каждый отдельный компонент вызвал бы, если бы был применен по отдельности в той концентрации, в которой они присутствуют в смеси.

Однако ни одна из этих моделей, основанных на гипотезе о сходном или различном механизмах действия токсикантов, не учитывает случаи стимуляции изучаемого показателя состояния организма по сравнению с контролем, что требует разработки новых подходов, моделей или их модификаций для оценки токсичности смесей.

Метод W.S. Abbott (1925) был разработан для оценки ожидаемой эффективности смеси, в которой предполагается независимое действие веществ. Оценку производили в долях погибшей популяции (3):

$$E_{(exp)} = a + (1 - a)b = a + b - ab \quad (3).$$

В данном выражении $E_{(exp)}$ — ожидаемая смертность популяции при обработке смесью фунгицидов, а a и b представляют доли популяции, контролируемые фунгицидами А и В соответственно. Значение ab отражает долю популяции, погибшую от А и В вместе. Если эффективность выражается в процентах, уравнение 3 становится (4):

$$E_{(exp)} = a + b - (ab / 100) \quad (4).$$

Для расчета синергии вычисляется фактор синергизма (SF, synergy factor), как отношение между наблюдаемой экспериментальной эффективностью смеси $E_{(obs)}$ и ожидаемой эффективностью смеси (5):

$$SF = E_{(obs)}/E_{(exp)} \quad (5).$$

Отношение $E_{(obs)}/E_{(exp)}$ от единицы указывает на отклонение от гипотезы о независимом действии, что означает наличие взаимодействия веществ. Если $SF > 1$, то имеет место синергизм; если $SF < 1$, то наблюдаем антагонизм.

Важнейшим преимуществом этого метода является то, что он может оценить без математической обработки взаимодействие между двумя фунгицидами всего с тремя тестовыми элементами, т. е. фунгицидами А и В по отдельности и смесью А+В. Однако, чем выше угнетение изучаемого параметра по сравнению с контролем, тем меньшее значение синергизма можно измерить данным методом. При 100% угнетении изучаемого показателя культуры, вызванного по отдельности каждым из веществ смеси, произойдет снижение максимального SF до 1,0 (Levy et al., 1986).

Метод F.M. Wadley (Wadley, 1945, 1967) построен на противоположной методу W.S. Abbott (1925) гипотезе. Он предполагает, что компоненты действуют совместно на одни и те же мишени и один компонент может заменить другой в постоянной пропорции. Ожидаемая эффективность смеси тогда напрямую предсказывается из эффективности компонентов, если известны их пропорции в смеси. F.M. Wadley разработал сокращенную графическую процедуру для оценки ожидаемой эффективности смеси. В дополнение к графическому методу значения ED (эффективных доз) также могут быть рассчитаны с помощью пробит- или логит- анализа (Finney, 1971).

Основываясь на работе Y.P. Sun и E.R. Johnson (1960), формула, используемая для расчета гипотетических значений (приводящая к уравнениям 9 и 10), может быть установлена следующим образом, изложенным ниже.

Относительная эффективность двух фунгицидов А и В выражается отношением R одинаково эффективных доз ED_A и ED_B . Эффективность второго компонента (В) относительно первого (А) определяется по формуле (6):

$$R_B = ED_A / ED_B \quad (6).$$

Поскольку в случае аналогичного совместного действия в смеси каждый компонент может быть заменен в постоянной пропорции другим, относительная эффективность R_e смеси может быть выражена как (7):

$$R_e = ED_A / ED_{(exp)} = aR_A + bR_B \quad (7),$$

где $ED_{(exp)}$ — ожидаемая равноэффективная доза; a и b — пропорции фунгицидов A и B в смеси, при этом $a + b = 1$.

Из уравнения 7 можно выразить $ED_{(exp)}$ (8):

$$ED_{(exp)} = ED_A / (a R_A + b R_B) \quad (8),$$

откуда следует (9):

$$ED_{(exp)} = 1 / (a / ED_A + b / ED_B). \quad (9).$$

Таким образом, $ED_{(exp)}$ — это среднее ED_A и ED_B , нормированное на их соответствующие пропорции a и b в смеси. Когда a и b — не относительные значения, а абсолютные количества компонентов в смеси, уравнение 9 становится (10):

$$ED_{(exp)} = (a + b) / (a / ED_A + b / ED_B) \quad (10).$$

$ED_{(exp)}$ сравнивается с $ED_{(obs)}$ (эффективная доза, наблюдаемая в эксперименте) для проверки гипотезы о схожем совместном действии. Мерой отклонения от гипотезы снова является фактор синергии (SF) (11):

$$SF = ED_{(exp)} / ED_{(obs)} \quad (11).$$

Если $SF = 1$, то гипотеза о схожем совместном действии (или аддитивности) может быть принята. При SF более 1 наблюдаем синергизм, а если SF меньше 1, то между веществами антагонистическое взаимодействие.

В отличие от метода, основанного на формуле W.S. Abbott, метод F.M. Wadley позволяет определять синергию при любой концентрации вещества (Levy et al., 1986).

Интерактивное воздействие смеси веществ на тест-организмы можно также рассчитать с помощью уравнений, предложенных J. Wang с соавт. (1995). Уравнение клеточного роста для водорослей имеет вид (12):

$$dN / N_0 = r \cdot dt \quad (12),$$

где N_0 — плотность клеток; r — потенциал размножения контрольных водорослей; t — время выращивания. Если добавить токсикант, уравнение изменится на (13):

$$dN / N_0 = (r - R) dt \quad (13),$$

где R — эффективность токсиканта в торможении роста водорослей.

Объединяя два приведенных выше уравнения, получаем (14):

$$R = - \ln(N / N_0) / t \quad (14).$$

Чем выше значение R , тем токсичнее исследуемое вещество. При двух веществах со значениями R_1 и R_2 эффект совместного действия может быть либо:

> $R_1 + R_2$ синергизм,

= $R_1 + R_2$ аддитивность,

< $R_1 + R_2$ антагонизм.

Степень антагонизма двух веществ зависит от значения A , где (15):

$$A (\%) = 100(R_1 + R_2) / R_{1+2} \quad (15).$$

Если имеет место синергизм $A < 1$, при антагонизме $A > 1$. Чем выше значение A , тем сильнее антагонизм.

Однако данный метод, как и все приведенные выше, можно использовать только для случаев угнетения изучаемого показателя относительно контроля, и он не подходит для случаев стимуляции. К тому же, здесь предполагается схожее действие токсикантов в смеси. Именно поэтому для оценки токсичности смесей наночастиц пластика и загрязняющих веществ разной природы в настоящей работе на основе уже имеющихся аналогов была разработана и использована авторская модификация модели W.S. Abbott, допускающая случаи стимуляции изучаемых показателей.

1.3. Условия постановки эксперимента, влияющие на результат альтиотестирования

1.3.1. Влияние ключевых, контролируемых факторов среды на водоросли в лабораторных условиях при проведении биотестирования

Биотестирование с использованием культур микроводорослей по параметру ингибирования их роста традиционно используется для оценки опасности загрязнения водной среды. Прогнозы влияния токсикантов на водные экосистемы базируются на лабораторных экспериментах, проводимых в стандартных экспериментальных условиях для культивирования тест-организмов. Условия содержания тест-организмов и проведения испытаний на них стандартизованы и описаны в многочисленных методиках (Биологические методы ..., 2007; Методические указания ..., 2011 и др.).

Однако уже разработанные методики требуют постоянного усовершенствования, поскольку задать сразу все условия проведения испытаний не представляется возможным. Так, например, при установлении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения возникают проблемы (Медянкина и др., 2017), которые могут быть тесно связаны с неадекватной оценкой в токсичности загрязняющих веществ, в частности, без учета ряда контролируемых факторов в эксперименте. Поэтому необходимо учесть наиболее важные, контролируемые в эксперименте условия, которые будут реально влиять на полученные результаты в оценке токсичности веществ, различных материалов или определении качества анализируемой воды.

Состав среды культивирования влияет на результаты биотестирования. Было изучено токсическое действие соли алюминия $AlCl_3$ на зеленую микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* (Thurp.) Vreb. в зависимости от состава среды (Лазарева и др., 2019). Показано, что на природной воде токсичность $AlCl_3$

ниже вследствие взаимодействия элементов среды по типу антагонизма, приводящего к уменьшению токсичности.

Начальная плотность популяций водорослей является важным условием и фактором, который часто не учитывают при проведении лабораторных испытаний (Kinley et al., 2017). В качестве стартовых используются необоснованно высокие плотности, по сравнению с природными, что может оказаться особенно важным в испытаниях с высокотоксичными веществами при их малых концентрациях. Кроме того, высокая плотность и увеличение длительности теста могут приводить к химическим превращениям токсиканта в среде, изменениям его биодоступности и токсичности.

Имеются противоречивые данные о влиянии плотности особей на проявление токсичности тяжелых металлов для животных (Menezes-Oliveira et al., 2011; Lockyera et al., 2019). Для высшего водного растения ряски *Lemna gibba* показано, что скорость роста и накопление металлов в расчете на одно растение значительно менялись при изменении плотности популяции (Demirezen et al., 2007). В тоже время при повышенной плотности растений свет становится ограничивающим фактором роста, что может приводить к повышению их чувствительности к токсикантам (Dosnon-Olette et al., 2010). Токсичность металлов Cd, Cu, Zn снижалась с увеличением начальной плотности клеток цианобактерии *Microcystis aeruginosa* (Kinley et al., 2017) в связи с уменьшением количества сорбированного металла на клетку. В диапазоне 100 – 400 тыс. кл/мл токсичность Cr и стрептомицина не зависела от начальной плотности клеток *Scenedesmus quadricauda*, а с ее увеличением – существенно уменьшалась (Ипатова и др., 2011). Токсичность алюминия (Al) на морские диатомовые водоросли *Ceratoneis closterium* и *Minutocellus polymorphus* повышалась при увеличении начальной плотности от 10^3 до 10^5 кл/мл (Gillmore et al., 2016), что контрастирует с исследованиями на других металлах (Kinley et al., 2017; Demirezen et al., 2007;

Ипатова и др., 2011) и может быть связано с быстрым истощением питательных веществ в среде при высокой плотности клеток.

Было исследовано влияние плотности лабораторной популяции клеток зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. на токсичность хлорида алюминия (Лазарева, Ипатова, 2021). С увеличением начальной плотности популяции от 25 тыс. до 1 млн. кл/мл и с увеличением срока добавления хлорида алюминия в растущую культуру его токсичность падает. Биотестирование с начальной плотностью 10^5 кл/мл и более может потенциально недооценивать токсичность веществ.

1.3.2. Влияние времени суток на момент добавления токсиканта на результат альготестирования

Понимание и прогнозирование воздействия поллютантов на окружающую среду, испытывающую многочисленные нагрузки, составляет вопрос экотоксикологии. Биодоступность токсиканта и его эффекты могут изменяться в зависимости от различных внешних факторов. К подобным факторам чаще всего относят и изучают температуру, соленость и доступность питательных веществ (Holmstrup et al., 2010). Световое излучение, напротив, редко исследуют в качестве фактора окружающей среды, влияющего на токсичность, несмотря на его очевидную роль в метаболической активности фотосинтетических организмов и участие в формировании циркадных ритмов множества живых организмов. И если работ, изучающих зависимость токсичности веществ от интенсивности, вида и длины волны светового излучения, мало (Cheloni et al., 2014; Tanno et al., 2020), то вопрос о влиянии времени суток на момент добавки токсиканта и вовсе остаётся неизученным (Лазарева, Ипатова, 2022). В существующих методиках проведения биотестирования (Биологические методы ..., 2007; Методические указания ..., 2011 и др.) время суток на момент добавки токсиканта никак не регламентировано.

Время суток является важной, но часто упускаемой из виду биологической переменной в биомедицинских исследованиях. Многие поведенческие тесты на животных проводятся в течение дня, хотя в большинстве работ не указывается точное время тестирования (Лазарева, Ипатова, 2022).

Время суток – ключевая биологическая важная переменная в биомедицинских исследованиях. Важно отметить, что подавляющее большинство животных (например, мышей и крыс), используемых в поведенческих исследованиях, являются ночными грызунами (Nelson et al., 2021). Таким образом, тестирование во время световой фазы и периода ночного отдыха животных может изменить результаты лабораторных исследований. Отсутствие учета времени суток может поставить под угрозу воспроизведение результатов в поведенческих исследованиях на животных и снизить их ценность при экстраполяции результатов на людей (Nelson et al., 2021). Поэтому время суток на момент постановки и проведения опытов является критически важным фактором, который следует учитывать в биомедицинских исследованиях (Nelson et al., 2021) и при проведении биотестирования на водорослях, в частности, для интерпретации полученных данных (Лазарева, Ипатова, 2022).

Вследствие взаимодействия организма и среды под действием ритмических изменений факторов среды (освещённость, температура, режим питания и др.) у разных организмов вырабатывается суточный ритм деления клеток, физиологической активности клеток и изменения обмена веществ (Hunt, Sassone-Corsi, 2007; Serrano-Bueno et al., 2017; Petersen et al., 2022).

Одним из факторов, влияющих на ритмы жизнедеятельности организма, является фотопериодичность (Serrano-Bueno et al., 2017). Суточная периодичность деления клеток широко распространена среди различных представителей растительного и животного мира. В настоящее время отчетливый суточный ритм митозов описан у многих растений, простейших, низших и высших позвоночных животных (Panda et al., 2002; Hunt, Sassone-Corsi, 2007; Záborszky et al., 2007;

Nelson et al., 2021). Почти во всех органах, в которых происходит размножение клеток, обнаружены изменения числа клеточных делений в течение суток (Serrano-Bueno et al., 2017).

Центральное место среди ритмических процессов занимает циркадианный или циркадный ритм (циркадные часы), имеющий наибольшее значение для организма. Циркадные часы — это молекулярные механизмы, которые генерируют ритмические или колебательные сигналы с периодом примерно 24 часа. Период циркадных ритмов длится у растений 23 – 28 часов, у животных 23 – 25 часов. Это вездесущие системы, присутствующие почти во всех эукариотических организмах (Serrano-Bueno et al., 2017).

Циркадный ритм является фундаментальной особенностью живых организмов от цианобактерий до человека. Разнообразные процессы, которые проявляют его присутствие, включают множество показателей, циклично изменяющихся каждые сутки: фотосинтетическая активность, стадии отдыха и активности, а также психомоторные способности и когнитивные функции, фотопериодизм растений и животных (Mohabir, Edmunds, 1999).

Водоросли – вездесущие фотосинтезирующие организмы, на рост которых влияют различные внешние и внутренние факторы. Интенсивность света, смена режимов освещения («день» и «ночь»), а также различные факторы окружающей среды играют важную роль в росте и размножении водорослей, изменении их химического состава (Singh, Singh, 2015). Таким образом, свет регулирует многие метаболические процессы в организмах водорослей (Tanno et al., 2020).

Циркадные ритмы микроводорослей определяют широкий спектр биологических процессов в клетке водорослей, включая размножение, рост и состав клеток. Поэтому понимание биоритмов водорослей имеет решающее значение для дальнейшей оптимизации культивирования микроводорослей (de Winter et al., 2013).

Циркадные часы обеспечивают организмам внутреннюю оценку внешнего времени. Таким образом, организмы могут программировать свою жизнедеятельность в течение дня (de Winter et al., 2013).

Циркадные часы контролируют множество ритмов у зеленых водорослей и наземных растений, регулируя их метаболизм и поведение в соответствии со сменой дня и ночи. (Petersen et al., 2022). Хорошо известно, что фотосинтез находится под контролем циркадных часов (Matsuo, Ishiura, 2010), и существуют суточные колебания скорости фотосинтеза (Gerath, Chisholm, 1989; Post et al., 1985).

В тесной связи с сигналами от циркадных ритмов и фоторецепторов фотопериодическое восприятие также представляет собой точный способ определения смены сезонов и контролем начала процессов цветения или стадии покоя. Фотопериодическое восприятие у фотосинтезирующих организмов является древним, и можно выделить два основных этапа его эволюции: восприятие времени цианобактериями и эволюционный набор инструментов, возникший у зеленых водорослей и развившийся в фотопериодическую систему современных растений (Serrano-Bueno et al., 2017).

Система восприятия фотопериода включает способ обнаружения света (фоторецепторы) и внутреннюю систему измерения времени (циркадные часы). (Serrano-Bueno et al., 2017). Живые организмы используют группу фоторецепторов для измерения качества, количества и направления света, чтобы модулировать физиологические реакции на изменение освещения (Li, Mathews, 2016). Это особенно важно для фотосинтезирующих организмов, которым требуется световая энергия для фотосинтеза и, следовательно, для их роста и развития (Serrano-Bueno et al., 2017).

Чувствительные к УФ-излучению процессы, такие как репликация ДНК, могут происходить ночью. Такой «уход от света» считается одной из основных причин эволюции циркадных ритмов (Nikaido, Johnson, 2000). Действительно,

было показано, что у растений существенное преимущество в фотосинтезе достигается за счет сопоставления периода циркадных ритмов с внешним циклом смены времени суток (Dodd et al., 2005). Среди цианобактерий также более конкурентоспособными оказываются штаммы с ненарушенными циркадными ритмами (Woelfle et al., 2004).

У микроводорослей циркадные часы могут «запускать» клеточное деление ночью (Malinowski et al., 1985; Matsuo et Ishiura, 2010; Lacour et al., 2012), в то время как рост клеток происходит в дневной период. Свет, поступающий во время деления клеток, расходуется впустую, что приводит к снижению эффективности фотосинтеза, когда деление клеток происходит в световой период (de Winter et al., 2013). Действительно, показано, что микроводоросли используют свои внутренние запасы крахмала для деления клеток, даже когда деление происходит на свету (de Winter et al., 2013; Vítová et al., 2011). Следовательно, синхронизация циклов смены времени суток позволит клеткам увеличиваться в размерах в течение дня, когда доступен свет, и подвергаться репликации ДНК и делению клеток в темноте, оптимально используя доступную световую энергию (Bišová, Zachleder, 2014). Это означает, что циркадные ритмы позволяют клеткам водорослей осуществлять клеточное деление в ночное время и помогают повысить эффективность фотосинтеза днем (de Winter et al., 2013).

Эукариотические водоросли, как и цианобактерии, уже долгое время являются модельными системами для анализа циркадных ритмов многих явлений, включая экспрессию генов, время деления клеток, фотосинтез и другие (Suzuki, Johnson, 2001).

У ряда морских водорослей хорошо изучены циркадные ритмы движения хлоропластов, скорости фотосинтеза, уровня м-РНК фотосинтетических белков, деления клеток, скорости роста, вертикальной миграции клеток фитопланктона в толще воды. У многих представителей динофитовых водорослей наблюдаются ритмические процессы биолюминесценции (McMurry, Hastings, 1972).

Отмечено соблюдение циркадных ритмов в клетках водорослей *Neochloris oleoabundans* во время контролируемых лабораторных экспериментов (de Winter et al., 2013; de Winter et al., 2014).

В ходе экспериментов с культурой *N. oleoabundans* по изменению соотношения длительностей периодов освещения и без него («дня» и «ночи») выяснили, что следующие переменные регулируются циркадными часами: максимальная скорость роста, начало синтеза крахмала и репликация ДНК. При этом продолжительность этих процессов не зависела от продолжительности дня (de Winter et al., 2017 a).

Даже в условиях постоянного освещения скорость роста и размеры клеток водорослей изменяются в течение дня и ночи. Ночью происходит деление клеток, поэтому количество более крупных клеток водорослей уменьшается. С раннего утра до позднего вечера количество крупных клеток, напротив, увеличивается (de Winter et al., 2013). Одновременно с ростом размеров клеток происходит увеличение количества липидов, крахмала и белков на клетку. Следовательно, самые высокие концентрации этих компонентов, а также значения сухой массы были обнаружены в конце светового дня (de Winter et al., 2013).

Аналогичные результаты о накоплении в течение дня клетками крахмала и общего количества жирных кислот получили и при повторном исследовании. При этом на циркадные ритмы не влияло ограничение по содержанию азота в культуре. Также интересно, что даже при постоянном освещении сохранялись циркадные ритмы, однако из-за лимитирования по азоту культура разделилась на две субпопуляции, деление клеток которых происходило в ночное время, но через день, а не ежедневно, как при оптимальных условиях содержания *N. oleoabundans* (de Winter et al., 2014).

Дневные и ночные различия в росте и составе клеток ясно указывают на то, что многие биохимические процессы в клетках водорослей контролируются циркадным ритмом, даже в присутствии освещения в ночной период. Те же

циркадные ритмы, что и у лабораторных популяций, отмечены у водорослей, культивируемых на открытом воздухе. Как и в лаборатории, эти водоросли растут и увеличивают свою биомассу в дневное время, при этом концентрации липидов, крахмала и белков достигают пика. Ночью происходит деление. Поэтому, например, сбор биомассы водорослей должен происходить ближе к вечеру, чтобы максимизировать выход ценных компонентов (de Winter et al., 2014).

Культуры водорослей могут быть естественным образом синхронизированы за счет чередования светлых и темных периодов, так что рост клеток происходит на свету, а репликация ДНК, а также ядерное и клеточное деление, происходят в темноте; синхронность в таких культурах составляет почти 100% и может сохраняться сколь угодно долго (Bišová, Zachleder, 2014).

Многие виды микроводорослей синхронизируют деление клеток и при выращивании в лаборатории в условиях смены дня и ночи, и подобная синхронизация влияет на выход и состав биомассы. Например, содержание крахмала в клетках зеленых микроводорослей *N. oleoabundans* было выше при постоянном освещении культуры, так как клетки не расходовали крахмал для поддержания своей жизнедеятельности в темные периоды (de Winter et al., 2013).

Часто исследования микроводорослей проводят в условиях постоянного освещения (Breuer et al., 2012; Gouveia et al., 2009; Kliphuis et al., 2010; Sforza et al., 2012). Исследования, направленные на моделирование внешних условий с изменением циклов освещения, проводятся путем включения или выключения света одномоментно (Popovich et al., 2012) или в форме «синусоидальной» волны, при которой свет медленно включается и выключается (Cuaresma et al., 2011). Однако, как показали исследования, не наблюдаются отличия в темпах прироста биомассы или в химическом составе клеток культуры *N. oleoabundans*, выращенной при постепенном или мгновенном переключении режимов освещения (de Winter et al., 2013). При этом, по результатам экспериментов, световая энергия использовалась на 10–15% эффективнее в течение дня в синхронизированных

культурах, где деление клеток происходило в темный период, чем в культуре под непостоянным освещением, в которой деление клеток происходит случайным образом. Возможное объяснение: при делении несинхронизированной культуры клеток свет используется менее эффективно в течение определенного периода времени (de Winter et al., 2013).

В опытах на *N. oleoabundans* деление клеток начиналось примерно через 3 – 4 ч после выключения света в ночной период с соотношением периодов с освещением (Д) и без освещения (Н) 16Д:8Н и 12Д:12Н. Однако в эксперименте с освещением 20Д:4Н ч деление клеток началось при включенном свете, через 15 ч после включения освещения. Это означает, что деление клеток не регулировалось исключительно количеством полученного света, как это предполагалось ранее (Vítová et al., 2011). Таким образом, вполне вероятно, что в регуляции клеточного цикла у *N. oleoabundans* участвует в том числе и временной механизм (de Winter et al., 2017 b), и, предположительно, именно он помогает синхронизации культур при постоянном освещении.

Микроводорослям для продуктивного фотосинтеза необходим режим со сменой дневного и ночного периодов. Условия освещения и температура напрямую влияют на скорость роста микроводорослей (Singh, Singh, 2015).

Выводы о режиме со сменой дневного и ночного периодов, как об оптимальном режиме освещения культуры микроводорослей, подтверждают и другие исследования, например, на культуре *Scenedesmus quadricauda*. Подобный режим позволяет сохранить максимальный выход биомассы микроводорослей как потенциального источника биоэнергии, ценных биохимических веществ и пищевых продуктов при оптимальных вложениях. При этом фотопериод 1:1 ч (свет:темнота) с умеренной интенсивностью 500 мкмоль фотонов/м²*с был лучшим для эффективной продуктивности (Fettah et al., 2022).

Таким образом, возможность естественного управления составом микроводорослей может принести экономическую выгоду, поскольку можно увеличить выход определенных продуктов (de Winter et al., 2017 a).

1.3.3. Влияние концентрации и дозы токсиканта на результат альготестирования

При токсическом воздействии в процессе роста лабораторной популяции микроводорослей происходит изменение численности клеток; изменение дозы токсиканта, приходящейся на одну клетку водоросли; одновременно меняется и концентрация токсиканта вследствие его накопления клетками, а также различных его превращений при повышении pH и уровня метаболитов в культуральной среде.

Поэтому такие внешние условия и экспериментальные факторы как исходная плотность популяции (количество начального инокулята) и доза токсиканта на клетку в процессе роста культуры также должны приниматься в расчет при проведении биотестирования и оценке полученного результата. В процессе роста тест-культуры плотность популяции увеличивается, при этом доза токсиканта на одну клетку уменьшается, поскольку токсикант традиционно добавляется однократно в начале опыта.

Для биоанализа токсичности веществ протоколы ЕЕС, ISO, OECD и др. обычно включают исследования в культуре микроводорослей с диапазоном исходных концентраций токсиканта для определения значения EC₅₀ рассматриваемого токсиканта и не учитывают его меняющуюся дозу в процессе роста культуры.

Было изучено влияние биогенов, температуры, света на поглощение и токсичность тяжелых металлов для микроводоросли *Selenastrum capricornutum* (Vasseur et al., 1988; McLarnon-Riches et al., 1998). Сравнение четырех сред, рекомендованных стандартными методами различных организаций (Международная организация по стандартизации, Агентство по охране

окружающей среды США, Организация экономического сотрудничества и развития, AFNOR) показало, что на чувствительность водорослей в экспоненциальной фазе роста не влияла концентрация макроэлементов в питательных средах (Vasseur et al., 1988). Поглощение кадмия *Selenastrum capricornutum* Printz увеличивалось при уменьшении количества питательных веществ, температуры и освещения (Simões-Gonçalves et al., 1988).

Начальная плотность популяций клеток микроводорослей является важным экспериментальным фактором, который часто не учитывают (Kinley et al., 2017). Для биотестирования иногда используют необоснованно высокие стартовые клеточные плотности по сравнению с природными, что может повлиять на оценку токсичности, особенно сильнодействующих веществ в малых концентрациях. Высокая плотность клеток в длительных опытах может приводить к химическим превращениям самого токсиканта при повышении pH и экзометаболитов в среде, изменениям его биодоступности и токсичности. Кроме того, при повышенной плотности, особенно для высших растений, свет становится ограничивающим фактором роста, что может приводить к усилению их чувствительности к токсикантам (Dosnon-Olette et al., 2010).

Было показано, что исходное число клеток водорослей оказалось определяющим, так как токсичность кадмия, меди и цинка снижалась при увеличении количества инокулята, что подтверждалось рассчитанными величинами EC₅₀ для разных начальных плотностей. Снижение токсичности авторы объясняют, в частности, изменением форм соединений металла, вызванных быстрым повышением pH (Vasseur et al., 1988).

Показана обратная зависимость фотосинтеза при световом насыщении, скорости клеточного деления и содержания фосфора в клетках от плотности популяции водорослей (Бурлакова и др., 1979). Скорость роста и способность к накоплению металлов у высшего водного растения ряски *Lemna gibba* значительно менялась в зависимости от плотности популяции (Demirezen et al., 2007). При

высокой плотности наблюдалось уменьшение накопления никеля ряской в расчете на одно растение.

Сравнительно мало данных по влиянию плотности популяции на накопление токсических веществ клетками водорослей (Franklin et al., 2002).

Токсичность тяжелых металлов Cd, Cu, Zn снижалась с увеличением начальной плотности клеток цианобактерии *Microcystis aeruginosa* (Kinley et al., 2017) в связи с уменьшением количества сорбированного металла на клетку. А токсичность легкого металла алюминия для морских диатомовых водорослей *Ceratoneis closterium* и *Minutocellus polymorphus*, наоборот, повышалась при увеличении начальной плотности от 10^3 до 10^5 кл/мл (Gillmore et al., 2016), что может быть связано с быстрым истощением питательной среды при высокой плотности клеток. В диапазоне 100 – 400 тыс. кл/мл токсичность стрептомицина не зависела от начальной плотности клеток *Scenedesmus quadricauda*, а с её увеличением – существенно уменьшалась (Ипатова и др., 2011).

Термин доза чаще используется в медицинских исследованиях и в биоиспытаниях на животных. Традиционная оценка лекарственной токсичности ориентирована на дозу. Доза препарата является основой для проявления токсичности, что делает важным правильное установление его максимально переносимой дозы. Это верно для системной внутрисосудистой доставки препарата. При местной же доставке препарата достигается высокая концентрация в местной ткани. Было показано, что для некоторых химиопрепаратов местного применения токсичность следует оценивать исходя из концентрации, а для препаратов внутривенного применения ориентироваться на их дозу. Таким образом, максимально переносимая концентрация может быть даже более важной, чем максимально переносимая доза (Zhang et al., 2014).

Понятие дозовая нагрузка широко используется в литературе и при оценке риска (Kaplan, 2009). Эта концепция основана на экспериментах, в которых животные подвергались воздействию постоянной концентрации в течение

установленного периода времени. Однако чаще организмы подвергаются воздействию токсичных материалов с изменяющейся во времени концентрацией.

1.3.4. Влияние минерализации среды на рост пресноводных микроводорослей

В этом разделе приводится обзор и анализ литературы по влиянию солености на рост пресноводных зеленых микроводорослей с целью возможного их использования для биотестирования проб при низких и умеренных уровнях солености (1 – 6‰).

Пресноводные водоросли часто являются более чувствительными тест-организмами (имеют более низкие значения EC_{50}), чем морские водоросли (Lewis, Thursby, 2018). Однако высокая соленость в культуре пресноводных микроводорослей сопровождается более медленным ростом клеток и снижением биомассы (Pancha et al., 2015).

Scenedesmus quadricauda FACHB-1297 является штаммом водорослей, обладающим хорошей устойчивостью к солености сточных вод производства бумаги. Изучали влияние NaCl на рост и накопление липидов этого штамма (Liu et al., 2022). При концентрации NaCl 0,88 – 5,85 г/л биомасса и содержание липидов были в 2,15 – 2,68 и 1,19 – 1,80 раза выше, чем в контрольной среде BG-11 без соли соответственно. При концентрации 2,63 г/л было достигнуто самое высокое содержание липидов. На среде с максимальной соленостью 11,70 г/л биомасса быстро возрастала с 4-х суток и постепенно стабилизировалась через 8 суток, но микроводоросли по-прежнему демонстрировали пик УФ-поглощения на длине волны 680 нм.

Производство липидов, вызванное солевым стрессом, может быть вызвано повышением уровня окислительного стресса или накоплением активных форм кислорода (АФК), заставляющих микроводоросли адаптироваться к окружающей среде посредством метаболических изменений. Экстрагированные липиды можно

в дальнейшем использовать для производства биодизельного топлива. Увеличение объема клеток, вызванное соленостью, повышает их седиментацию, что полезно для процесса сбора клеток микроводорослей.

Микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* подвергалась воздействию 200 мМ NaCl (11,6 г/л) в течение 8 сут для изучения физиологических, биохимических и метаболических изменений (Fal et al., 2022). Концентрация 11,6 г/л NaCl вызывала значительное снижение скорости роста и уровней хл *a* и *b*, индуцировала образование АФК у *C. reinhardtii* при увеличении содержания H₂O₂. Это вызывало перекисное окисление липидов. При этом для поддержания выживания микроводорослей в условиях NaCl увеличивалось накопление углеводов и липидов в качестве запасных молекул в клетках. Кроме того, NaCl увеличивал содержание каротиноидов, полифенолов и осмопротекторных молекул, таких как пролин. Активность энзимов SOD и APX снижалась, а количество ферментов-поглощителей АФК (POD и CAT) уменьшалось. Метаболический ответ показал накопление молекул, участвующих в ремоделировании мембран и устойчивости к стрессу, таких как олеиновая кислота (40,29%), линоленовая кислота (19,29%), алканы, алкены и фитостеролы.

Наиболее заметной физиологической реакцией на солевой стресс одноклеточных зелёных водорослей *Dunaliella*, обитающих преимущественно в солёной морской воде, является снижение фотосинтеза и выработка каротиноидов (Kim et al., 2016).

Однако штамм пресноводных микроводорослей *Chlorella sorokiniana* HS1 растёт и гипераккумулирует липиды в гиперсоленых условиях, превышающих соленость морской воды, при этом увеличиваются размеры клеток (200%), что приводит к увеличению биомассы и продуктивности липидов (Kim et al., 2016).

Desmodesmus sp.УТ может хорошо расти в морской и пресной воде. Культивируемый в пресной воде этот вид может применяться в качестве кормовой добавки, поскольку пресная вода была бы более подходящей средой для более

высокого выхода биомассы, в то время как эти микроводоросли, выращенные в морской воде, могут использоваться для массового культивирования в биотехнологии (Li et al., 2023 a).

Солевой стресс является очень эффективным методом регулирования синтеза активных веществ микроводорослей. Исследования показали, что концентрации белков, растворимых сахаров, крахмала, хл *a* и *b* у *Scenedesmus obliquus* Kutz. увеличивались при 0,2 моль NaCl (11,6‰) по сравнению со средой с отсутствием соли (El-Katon, El-Adl, 2020), а у *Desmodesmus* sp. WC08 при этой солености максимальный выход биомассы и липидов микроводорослей составил 5,35 и 1,26 г/л соответственно (Zhang et al. 2016). Виды р. *Desmodesmus* из семейства Scenedesmaceae демонстрирует сильную устойчивость к различным условиям окружающей среды, таким как пресная вода, соленая вода и морская среда (океаны, приливные зоны и полярные регионы) (Shetty et al., 2019; Cheng et al. 2019; Gan et al., 2016). *Desmodesmus* обладает большой солеустойчивостью и способностью приспосабливаться к изменяющимся условиям за счет регуляции накопления метаболитов (Figler et al., 2019) при солевом стрессе, как и другие зеленые микроводоросли (например, *Chlorella vulgaris* PKVL 7422, *Chlamydomonas reinhardtii* GY-D55, *Dunaliella salina* FACHB-847).

Сообщалось также, что при увеличении солености до 200 мМ (11,6‰) биомасса *Scenedesmus obliquus* снижалась до 85% и до 65% у *Chlorella vulgaris* YH703 (Yun et al., 2019), возможно, из-за выработки АФК, влияния на синтез ДНК и деление клеток при солевом стрессе.

Высокий солевой стресс 400 мМ (23,2‰) вызывал физиологические и биохимические изменения *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 и приводил к увеличению содержания углеводов и липидов (Pancha et al., 2015).

Результаты комбинированного влияния солевого стресса и перекиси водорода на накопление липидов у *Monoraphidium* sp. QLY-1 показали, что максимальная липидная продуктивность была достигнута при комбинированной

обработке 1 мМ перекисью водорода и 171,12 мМ (10 г/л) NaCl и подтверждают высокую устойчивость *Monoraphidium sp.* QLY-1 к солевому стрессу (Qiao et al., 2021).

Штамм *Chlorella sp.* показал высокий рост при добавлении 0,2 М NaCl (11,6‰). Однако максимальное содержание липидов отмечено при 0,5 М NaCl, с небольшим нарушением роста (Rai et al., 2015).

Исследовали влияние солености до 100 мМ NaCl (до 5,8‰) на рост пресноводных видов *Chlamydomonas mexicana* и *Scenedesmus obliquus* (Salama el et al., 2013). Добавление 25 мМ NaCl (1,45‰) привело к увеличению содержания липидов, а также к улучшению роста микроводорослей. Состав жирных кислот также зависел как от солености, так и от штамма водорослей. Увеличение концентрации NaCl с 0,43 до 25 мМ привело к увеличению продукции липидов.

Chlorella vulgaris YH703 является видом, устойчивым к окислительному стрессу, вызванному высокой соленостью (Yun et al., 2019). Так, его биомасса увеличилась в 1,3 раза в среде с добавкой 30 мМ NaCl (1,74‰) по сравнению с контрольной. А при 500 мМ NaCl (29 ‰) соленый стресс приводил к образованию до 24,5% липидов (12,7% в контроле).

Оценивалось комбинированное воздействие засоления (0, 3, 6‰) и тяжелого металла Cd^{2+} (0; 0,2; 0,4 мг/л) на формирование колоний и рост популяции пресноводного вида *Scenedesmus obliquus* (Jia et al., 2023). Увеличение солености приводило к нарушению фотосинтеза и снижению скорости роста популяции. Засоление смягчило негативное влияние Cd^{2+} на формирование защитной колонии *S. obliquus* с более толстым внешним слоем клеточной стенки.

Исследовали влияние засоления и стресса сточных вод на рост, общее количество растворимых белков, углеводов, состав нуклеиновых кислот и аминокислот и ультраструктуру *Scenedesmus bijugatus* (Al-Enazi, 2020). Обработка NaCl в дозах 10 и 50 мг/л значительно увеличивала рост этой водоросли, в то время

как более высокие концентрации ингибировали рост. Полученные данные свидетельствовали о том, что вид *S. bijugatus* чувствителен к засолению.

В ответ на солевой стресс в клетках водорослей синтезируются совместимые осмолиты, такие как глицерин, глицин-бетаин, холин и пролин, чтобы снизить окислительное повреждение, вызванное свободными радикалами, образующимися в ответ на стресс высокой солености (Hong et al., 2000).

Chlorella vulgaris является подходящим кандидатом для обработки сточных вод с высоким содержанием соли (Church et al., 2017). Концентрация соли (45 г/л) оказывает большее влияние, чем тип соли на ее метаболизм. Солевой стресс увеличивает содержание липидов и насыщенных жирных кислот у *C. vulgaris*. Кроме того, соленость увеличивает скорость оседания водорослей.

Штамм *Chlorella sp.* показал хорошую скорость наращивания биомассы в среде с добавлением 0,2 М NaCl (11,6‰) (Rai, 2015).

Черноморский клон диатомовой водоросли *Ardissonea crystallina* 3.0722-D оказался нежизнеспособным в среде с соленостью 4‰ (Давидович и др., 2016)

Согласно стандартным условиям проведения биотестирования, в лабораторных условиях культуры микроводорослей необходимо поддерживать длительное время на средах с определенным уровнем солености. И если верхняя граница значения солености определена особенностями гидрохимического режима того или иного района моря, то вопрос о нижней допустимой границе остается пока открытым.

В.В. Хлебович (1974) считает, что если организм прошел ступенчатую адаптацию к выбранной солености и выживает в ней в течение некоторого времени, то адаптация состоялась.

При этом вопрос о существовании лабораторных культур в области «критической границы» на уровне 5 – 8‰ (Хлебович, 1974) является весьма важным. Это необходимо для оценки токсичности сточных вод пресноводного происхождения, сбрасываемых в прибрежные акватории.

Нормативными документами (КНД 211.1.4.047-95..., 1995; ГОСТ 31960-2012 (ISO 10253:2006)..., 2014 и др.) предусмотрено использование тест-культур, выживание которых в нижнем диапазоне черноморской солености является проблематичным.

Культивирование каспийских и черноморских клонов диатомовых водорослей на беломорской воде, близкой по составу к типично морской, показало, что общий характер роста культур в этих условиях не изменился, но темпы деления клеток заметно снижались (Джафарова, 1992). Эти морские виды в опресненных морях функционируют в зоне более узкой, чем позволяет генотип. Черноморский клон диатомовой водоросли *Ditylum brightwellii* хорошо переносил соленость 19 – 29‰, но погибал при 4‰ (Джафарова, 1992).

Диатомовая морская водоросль *Thalassiosira weissflogii* широко используется в качестве живого корма в аквакультуре. Оценивали влияние различной солености (25, 30, 35, 40, 45 и 50‰) на рост и химический состав *T. weissflogii* на трех фазах культивирования в лабораторных условиях (García et al., 2012). Самая высокая скорость роста и максимальная плотность клеток были обнаружены при 25‰. Уменьшение размеров и резкие изменения морфологии клеток наблюдались при более высокой солености, а резкие изменения происходили при 50‰. Содержание белков и углеводов было выше при низкой солености (25 и 30‰) во время стационарной фазы. Производство липидов было выше при низкой солености, но уменьшалось по мере того, как происходили фазовые изменения; напротив, на содержание липидов не влияла фаза роста при более высокой солености ($\geq 35‰$). Более высокая скорость роста и лучший биохимический состав были получены при 25 и 30‰.

Есть информация о влиянии солености на токсичность гаптофита *Prymnesium parvum* (Caron et al., 2023). pH (диапазон 6,5 – 8,5) оказал значительное влияние на токсичность водоросли *P. parvum*. И наоборот, снижение солености (диапазон 1,50 – 7,50‰) снизило токсичность, хотя и менее эффективно по

сравнению с рН, а клетки *P. parvum* оставались токсичными при самых низких проверенных значениях солености (1,50‰ при рН 7,5). Также низкая соленость в сочетании с низким рН привела не только к снижению токсичности, но и замедлила темп роста *P. parvum*.

Разработаны два биотеста, основанных на ингибировании роста красных морских водорослей *Ceramium strictum* и солоноватоводного вида *C. tenuicorne*. Оба метода являются надежными и воспроизводимыми биоанализами при солености от 4 до 30‰. (Bruno, Eklund, 2003).

Для биотестирования морской среды, водных вытяжек из солевых отходов или других соленых проб с высокой соленостью, токсичности загрязняющих морскую среду веществ и соединений используют альгологически чистую культуру морской диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. В настоящее время данный вид используется в российском и международном стандартах оценки качества воды ГОСТ 31960-2012 (ISO 10253:2006) (2014).

Этот стандарт ГОСТ 31960-2012 (ISO 10253:2006) (2014) распространяется на природные морские воды и воды эстуариев, а также сточные воды с минерализацией от 6 до 33 г/дм³ и устанавливает определение их токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin или *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve.

Диапазон солености для обеспечения нормальной жизнедеятельности морских водорослей *Phaeodactylum tricornutum* в природных условиях составляет от 25 до 35‰. Поскольку соленость водных вытяжек из промышленных отходов и глинисто-солевых шламов, образующихся при производстве калийных удобрений, может выходить за пределы солености (25 – 35‰), обеспечивающей нормальную жизнедеятельность водорослей, проводится предварительная адаптация маточной культуры водорослей с постепенным изменением солености культивационной воды. Для адаптации культуры к разным уровням солености может потребоваться

до трех последовательных пересевов культуры в среды с повышенным или пониженным уровнями солености маточной культуры.

В работе С.Е. Дятлова и А.Г. Петросян (Дятлов, Петросян, 2001) изучали диапазон 0, 5, 8, 10 и 15‰ соленостной резистентности лабораторной культуры морской микроводоросли *Ph. tricornutum* после 14 последовательных пересевов каждые 4 суток в течение 60 суток. Показано, что адаптация этого эвригалинного вида к пресной воде не происходит. В диапазоне солености 5 – 15‰ культуры жизнеспособны. При этом прирост численности при 10 и 15‰ был близок, а при 5 – значительно снижен. Поэтому при биотестировании типично солоноватых вод (5 – 8‰) необходимо предварительно провести адаптацию культур на средах соответствующей солености для закрепления фенотипических адаптаций.

Таким образом, эвригалинный вид *Ph. tricornutum* как тест-организм больше подходит для сред с соленостью выше 10‰. Причем этот вид лучше переносит очень высокую соленость более 35, чем низкую 5 – 8‰.

Анализ данных литературы и существующих методик биотестирования в России и мировой практике позволяет заключить, что для сред с соленостью в диапазоне 1 – 6‰ для целей биотестирования следует подбирать другие чувствительные виды микроводорослей, чем стандартные морские виды *Ph. tricornutum* или *Skeletonema costatum*.

В существующих российских и международных методиках и стандартах при оценке качества пресной воды или несоленых жидких, или твердых сред с использованием пресноводных видов микроводорослей отсутствуют рекомендации по использованию этих видов в качестве тест-организмов при низких уровнях минерализации среды. Эти методики разработаны для пресной воды или несоленых проб (OECD GUIDELINE..., 1984; EPA-822-R-02-047..., 2002; EPA Test Method..., 2002; EPA-712-C-96-164..., 1996; Биологические методы ..., 2007; Методические указания..., 2011).

Однако до сих пор не разработаны методики использования пресноводных микроводорослей для целей биотестирования при солевом стрессе для низкого и умеренного уровня солености.

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что пресноводные виды из р. *Scenedesmus* (в частности, *S. quadricauda* и др.) и родственные ему некоторые другие виды зеленых хлорококковых микроводорослей из р. *Desmodesmus* или р. *Chlorella* хорошо переносят низкую и умеренную соленость и поэтому могут быть использованы для биотестирования сред с минерализацией в диапазоне 1 – 6‰. Однако для выращивания маточной культуры *Chlorella vulgaris*, адаптации ее к разным уровням солености и проведения испытаний требуется отдельное помещение, поскольку виды этого рода быстро заражают культуры других видов водорослей. Кроме того, клетки *C. vulgaris* имеют малый размер, что осложняет их подсчет методом прямого счета под микроскопом в счетных камерах.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Характеристика тест-организмов и условий их культивирования

Scenedesmus quadricauda

Одним из основных тест-организмов данного исследования для хронических экспериментов была альгологически чистая культура зелёной хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.), широко распространённая в пресных водоёмах Южного и Северного полушария и являющаяся важным звеном в трофических цепях.

S. quadricauda получена из коллекции культур водорослей кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова (DMMSU, штамм S-3). Данный вид водорослей относится к ценобиальным организмам. Чаще встречаются 2- и 4-клеточные ценобии, реже – 8–16-клеточные. При размножении в каждой клетке образуются автоспоры, которые внутри материнской клетки слагаются в молодую колонию. Этот вид широко используют в биотестировании качества водной среды в мировой практике.

Культуру выращивали на среде Успенского № 1 (состав, г/л: 0,025 KNO₃, 0,025 MgSO₄, 0,1 KH₂PO₄, 0,025 Ca (NO₃)₂, 0,0345 K₂CO₃, 0,002 Fe₂(SO₄)₃; pH 7,0–7,3) в культиваторе при освещённости 3 клк со сменой дня и ночи (12:12 ч), температуре 24±1 °С и перемешивали 2 раза в сут во избежание оседания клеток.

Monoraphidium arcuatum

В качестве тест-организма для хронических экспериментов также использовали альгологически чистую культуру зелёной хлорококковой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind.

M. arcuatum – одноклеточная водоросль с дуговидно изогнутыми клетками, размножается бесполо, образуя 4 – 8 автоспор внутри материнской клетки,

которые выходят при разрыве ее оболочки. Введена в культуру на кафедре гидробиологии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова и рекомендована как новый тест-организм для биотестирования различных веществ и водной среды (Спиркина и др., 2014).

M. arcuatum выращивали на среде Успенского №1 в тех же условиях как и культуру *S. quadricauda*.

Chlorella vulgaris

Для проведения некоторых острых экспериментов использовали термофильный штамм *Chlorella vulgaris* Beijer., соответствующий всем требованиям, предъявляемым к тест-организмам: легкость культивирования, высокая чувствительность и скорость размножения, хорошая воспроизводимость результатов (Филенко и др., 2015). Как и *S. quadricauda*, *C. vulgaris* это широко используемый тест-организм при проведении биотестирования.

За сутки до процедуры биотестирования проводили активацию культуры в культиваторе КВ-05 при постоянном освещении, перемешивании и температуре 36°C с начальной оптической плотностью $0,010 \pm 0,002$; для чего в 95 мл 50% среды Тамия вносили 5 мл суспензии водорослей с оптической плотностью 0,200. А биотестирование с *C. vulgaris* проводили в многоюветном культиваторе КВМ-05 при тех же условиях освещения и температуры, согласно утвержденной экспресс-методики, допущенной для целей государственного экологического контроля (ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004..., 2004).

Thalassiosira weissflogii

Альгологически чистую культуру диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hastle выращивали на среде Гольдберга-Кабановой (состав, г/л: 0.2024 KNO₃, 0.007105 Na₂HPO₄; мг/л: 0.1979 MnCl₂, 0.2379 CoCl₂, 0.2703 FeCl₃) в люминостане при освещённости 3 клк со сменой дня и ночи

(12:12 ч), температуре 22 ± 2 °С и перемешивали 2 раза в сут во избежание оседания клеток.

2.2. Общие условия проведения токсикологических экспериментов

Эксперименты по изучению влияния условий постановки экспериментов на исход биотестирования проводили согласно существующим методикам (ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004..., 2004; Биологические методы ..., 2007; Методические указания ..., 2011; Терехова и др., 2014; Филенко и др., 2015), регламентирующим проведение процедуры биотестирования с некоторыми авторскими модификациями.

Обобщающая схема всех экспериментов в данной работе представлена на рис. 1.

Конкретные характеристики и концентрации используемых токсикантов, и авторские модификации методик проведения биотестирования (при их наличии) для удобства будут приведены в **Главе 3. Результаты и обсуждение** в начале описания каждого эксперимента.



Рисунок 1. Общая схема проведенных экспериментов по влиянию условий постановки опытов на результат биотестирования веществ и материалов с использованием культур микроводорослей (черным шрифтом выделены условия экспериментов, на стрелках даны названия токсикантов, на фото представлены используемые тест-организмы, зеленым цветом отмечены показатели состояния культур в ходе экспериментов: QY – эффективность фотосинтеза, N – общая численность, N_{alive} – доля живых клеток, $R^{2\text{cell}}/4\text{cell}$ – соотношение 2х- и 4х- клеточных ценобиев, Size – ширина клеток).

2.2.1. Условия проведения токсикологических экспериментов в зависимости от вида тест-организма

Scenedesmus quadricauda и *Monoraphidium arcuatum*

Для приготовления среды Успенского № 1 в экспериментах по изучению влияния токсикантов на культуры *S. quadricauda* и *M. arcuatum* использовали дистиллированную воду, а для опытных повторностей в экспериментах по изучению влияния состава среды на результат биотестирования – растворы с

заданным уровнем минерализации или природную воду после фильтрации, в которые производили добавки питательных солей по прописи среды Успенского № 1 и пастеризовали в течении 30 мин в колбах с ватными пробками, чтобы избежать заражения среды микроорганизмами. Все дальнейшие манипуляции с готовыми средами проводили в ламинарном шкафу в стерильных условиях как при постановке, так и в процессе опытов, отливая аликвоты для каждого нового измерения.

Острые и хронические и опыты на культурах *S. quadricauda* и *M. arcuatum* проводили в конических колбах ёмкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл среды, в трех-четырёх повторностях для каждого исследуемого уровня минерализации среды, концентрации или времени добавки токсиканта и контроля.

Начальная численность клеток культур *S. quadricauda* и *M. arcuatum* в большинстве экспериментов составляла 35 тыс. клеток/мл. При этом культуры находились в логарифмической фазе роста. Исключение составили эксперименты по изучению влияния начальной плотности, дозы и возраста культуры на результат биотестирования.

Chlorella vulgaris

Опыты с *C. vulgaris* проводили в люминостане в течение трех суток при температуре 20°C или в культиваторе КВМ-05 при 36°C в течение 24–48 ч. Освещение зависело от плана эксперимента. Опыты в многокуветном культиваторе КВМ–05 проводили согласно методике биотестирования по изменению оптической плотности клеток этого вида (ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004..., 2004).

Благодаря высокой скорости роста численность клеток *C. vulgaris* в норме увеличивается за сутки в 25–35 раз, при этом проходит 5 поколений, что дает возможность этим экспресс-методом быстро оценить токсический эффект. При этом все опыты с *C. vulgaris* проводили в закрытых пенициллиновых флаконах в

трех-четырёх повторностях для каждой исследуемой концентрации или времени добавки токсиканта и контроля, на 2% среде Тамия, объем среды составлял 8–10 мл. Начальная оптическая плотность культуры *C. vulgaris* в экспериментах, согласно методике (ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004..., 2004) составляла 0,002.

Thalassiosira weissflogii

В эксперименте с *T. weissflogii* начальная численность клеток составляла $5 \cdot 10^3$ кл/мл. Токсикант добавляли однократно в день постановки эксперимента в контрольные повторности и многократно на 3, 6, 10 и 13 сут опытные повторности. Средняя скорость роста культуры без токсиканта составляла 0.33 деления/сут. Опыты проводили в стерильных условиях в конических колбах ёмкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл среды, в трех повторностях в люминостате при стандартных условиях освещения и температуры согласно методам проведения биотестирования с морским видом диатомовых водорослей *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (Руководство по определению..., 2002; ГОСТ Р 53910-2010..., 2011).

Статистическая обработка результатов экспериментов

Оценку токсического действия проводили на основании достоверности различий опытных значений по сравнению с контролем.

Статистическую обработку результатов на всех тест-организмах проводили в зависимости от плана экспериментов, в программе STATISTICA Version 10 (StatSoft Inc., USA) и с применением пакета Microsoft Office Excel 2019. Доверительный интервал для средних значений в экспериментах рассчитан как 2σ .

Нормальность распределения значений параметров оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок проводили с использованием одного из следующих критериев, в зависимости от плана эксперимента: двухвыборочный

t-тест с различными дисперсиями (критерий Стьюдента), критерий Манна-Уитни (U-критерий), критерий Даннета. Различия считали значимыми при $p < 0,05$ и при $q_{\text{критич}} < q$.

2.2.2. Подготовка образцов пластика, золы от сжигания пластика и водорастворимых фуллеренов к биотестированию

Исследования токсичности микропластика

Развитие *S. quadricauda* изучали в норме и при добавлении в среду 5 образцов микропластика, отобранных на супралиторали Баренцева моря, и одного свежего образца при концентрации 3 мг/л.

Виды исследуемых пластиков:

1. EPS (материал – вспененный полистирол или пенополистирол, expanded polystyrene, происхождение – упаковочный пенопласт).

Место отбора: Баренцево море, супралитораль (верхняя граница зимних штормов), материковая часть, напротив западной оконечности о. Кильдин.

Дата отбора: 30.08.2020. Размер частиц: $18,9 \pm 12,6$ мкм.

2. PU (материал – пенополиуретан, происхождение – монтажная пена).

Место отбора: Баренцево море, супралитораль (верхняя граница зимних штормов), материковая часть, напротив западной оконечности о. Кильдин.

Дата отбора: 30.08.2020. Размер частиц: $76,7 \pm 18,9$ мкм.

3. HDPE белый пищевой (материал – полиэтилен низкого давления или полиэтилен высокой плотности, ПНД, ПЭВП, ПВП, происхождение – тара из-под молочных продуктов). Место отбора: Баренцево море, супралитораль (верхняя граница зимних штормов), материковая часть, напротив западной оконечности о. Кильдин.

Дата отбора: 30.08.2020. Размер частиц: $208,3 \pm 72,3$ мкм.

4. HDPE красный пищевой (происхождение – тара из-под пищевых продуктов). Место отбора: Баренцево море, супралитораль (верхняя граница зимних штормов), материковая часть, напротив западной оконечности о. Кильдин.

Дата отбора: 30.08.2020. Размер частиц: 220 ± 74 мкм.

5. PP (материал – полипропилен, происхождение – судовой канат). Место отбора: Баренцево море, супралитораль (верхняя граница зимних штормов), материковая часть, напротив западной оконечности о. Кильдин.

Дата отбора: 30.08.2020. Диаметр волокон: $171,3 \pm 17,7$ мкм.

6. EPS (свежий, чистый). Происхождение: упаковка от бытовой техники.

Год производства: 2019. Размер частиц: $130,2 \pm 35,9$ мкм.

Микропластик получали из макро-образцов, обрабатывая их поверхность напильником «Зубр 33390-200-120» (зернистость P120) и просеивая полученные фрагменты через сито из нержавеющей стали с размером ячеек 300 мкм. Микропластик отделяли от остатков абразивного материала методом плотностной сепарации в дистиллированной воде: всплывшие частицы пластика отбирали пипеткой, переносили в чашку Петри и высушивали. Размеры частиц определяли на микрофотографиях с помощью ПО «КОМПАС-3D v14».

Действие зола, полученной при сжигании смеси микропластиков, на культуру *S. quadricauda* оценивали в интервале концентраций 0,01–1000 мг/л. Зольный остаток получен при сжигании в печи типа булерьян при температуре около 400 °С смеси морского пластика (табл. 1) в соотношениях, близких к наблюдаемым на побережье Баренцева моря.

Таблица 1. Состав смеси микропластиков для получения зольного остатка.

Наименование	Материал	Масса, г	% массовая доля
Сеть рыболовная промышленная	Полипропилен	191,7	24,2%
Упаковка пищевая, пленка	Полипропилен	77,6	9,8%
Пенопласт куски	Полистирол крупнозернистый	48,7	6,1%
Буй	Полистирол плотный	114,1	14,4%
Монтажная пена	Полиуретан	18,8	2,4%
Пленка, пакеты	Полиэтилен высокого давления	38,4	4,8%
Упаковки пищевые "тетрапак"	Полиэтилен высокого давления, картон	36,3	4,6%
Бутылочка пищевая	Полиэтилен низкого давления	26,1	3,3%
Пленка, пакеты	Полиэтилен низкого давления	22,6	2,8%
Фрагменты (канистры, ящики, другая тара)	Полиэтилен низкого давления	178,5	22,5%
Бутылка напитков	ПЭТ	40,2	5,1%
Всего		793	100,0%

Исследования токсичности водорастворимых фуллеренов

Действие фуллеренов C_{60} и C_{70} на культуру *S. quadricauda* оценивали при концентрациях 1, 5 и 10 мг/л.

Получение водной дисперсии фуллерена C_{60} и C_{70} проводили по методике замены растворителя — толуола на воду с помощью ультразвука (Mikheev et al., 2017). В работе использовали коммерчески доступный образец C_{60} и C_{70} (ООО “НеоТекПродакт”, Россия). Отсутствие функционализации поверхности доказывали с помощью метода МАЛДИ-МС (матричноактивированная лазерная десорбция/ионизация). Содержание остаточного толуола и летучих органических

компонентов в дисперсиях фуллерена контролировали с помощью статического парофазного газохроматографического анализа, содержание этих примесей не превышало 0,1 мкг/л. Средний кластер фуллерена составил 130 ± 5 нм с величиной электрокинетического потенциала – $33,2\pm 0,5$ мВ (измерения проводили в среде деионизованной воды). С помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой установлено, что содержание в дисперсии As составляло не более 5 мкг/л, а Pb, Cd, Zn и Cu — не более 1 мкг/л. Работы по получению ВДФ C_{60} и C_{70} были выполнены на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

2.2.3. Воздействие наночастиц полистирола в комбинации с метиленовым синим или медью на культуру *Scenedesmus quadricauda*

В качестве модельного тест-организма использовали альгологически чистую культуру *S. quadricauda*. Наночастицы полистирола использовали в качестве модельного НП для исследования его влияния на фототоксичность растворимого красителя метиленового синего (МС) для микроводорослей.

Для приготовления суспензии наночастиц полистирола использовали образец первичного полистирола (EPS) с размером частиц 100 нм, поставляемый Sigma Aldrich, Germany в виде 10% водной суспензии с содержанием наночастиц $1,05$ г/см³.

При изучении влияния НП и второго токсиканта как в отдельности (частный эффект), так и в различных бинарных комбинациях (комбинированный эффект) на культуру *S. quadricauda*, были взяты концентрации НП с содержанием 10 и 50 мг/л наночастиц, не вызывающих угнетения ее роста, и заведомо токсичные концентрации 0,1 и 0,5 мг/л МС или 0,0025, 0,0125, 0,025 и 0,075 мг Cu /л, выбранные по результатам предварительных опытов.

Чтобы учесть возможные взаимодействия между изучаемыми токсикантами, был поставлен опыт по плану полнофакторного эксперимента 2^2 (ПФЭ 2^2) – два

фактора (2 токсиканта НП и МС) на двух уровнях (2 концентрации) по следующей схеме на табл. 2 (на примере МС).

Таблица 2. Схема полнофакторного эксперимента по изучению комбинированного действия наночастиц полистирола и метиленового синего (N – численность (абсолютная и относительная (в % от контроля), QY – эффективность фотосинтеза, условные единицы).

ПФЭ 2 ² : концентрации, мг/л				
№ линии эксперимента	НП	МС	НП+МС	Параметр
1	10	0,1	10+0,1	N и QY
2	50	0,1	50+0,1	N и QY
3	10	0,5	10+0,5	N и QY
4	50	0,5	50+0,5	N и QY

Проведен хронический эксперимент длительностью 14 сут в климатостате на среде Успенского №1 при температуре 24 °С согласно методике биотестирования по изменению численности клеток данного вида (Биологические методы..., 2007). Опыты проводили в конических колбах ёмкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл культуральной среды, в трёх-четырёх повторностях для каждой концентрации НП, МС (или Cu) или их комбинаций в смеси и контроля.

2.2.4. Воздействие наночастиц полистирола в комбинации с токсикантами различной природы на культуру *Chlorella vulgaris*

Изучали совместное действие наночастиц полистирола с различными токсикантами (солями хрома, меди, фтора и с метиленовым синим) на микроводоросли. Для приготовления суспензии наночастиц брали образец первичного полистирола с размером частиц 100 нм, полученный из коммерческих источников поставляемый в виде 10% водной суспензии с содержанием частиц 1,05 г/см³.

В качестве модельного тест-организма использовали альгологически чистую культуру зеленой хлорококковой микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. С культурой *C. vulgaris* были поставлены краткосрочные эксперименты длительностью 2 сут в многоцветном культиваторе КВМ–05 на 2% среде Тамия при температуре 36°C согласно методике биотестирования по изменению оптической плотности клеток этого вида (ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004 ..., 2004).

При изучении влияния НП и другого токсиканта как в отдельности (частный эффект), так и в различных бинарных комбинациях (комбинированный эффект) на культуру *C. vulgaris*, были взяты концентрации НП с содержанием 10 и 50 мг/л наночастиц, не вызывающих угнетения их роста, и действующие концентрации другого исследуемого токсиканта, выбранные по результатам предварительных опытов.

Основными структурными показателями для оценки состояния популяции служили изменение численности клеток водоросли (измеренной с помощью фотоэлектроколориметра ИПС-03) в динамике ее развития.

2.2.5. Влияние на результат биотестирования концентрации и дозы токсиканта, возраста культуры, состава среды

В экспериментах эффект токсиканта или состава среды на *S. quadricauda*, *M. arcuatum* и *T. weissflogii* оценивали по показателям численности клеток, доле живых и мертвых клеток в течение времени экспозиции.

Тест на токсичность хрома в условиях постоянной дозы

Исследовали токсическое действие хрома в форме бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$), известного как международный стандартный токсикант (Wang, 1987), в долгосрочных экспериментах. Культуры водорослей подвергались действию токсиканта в условиях повышения его концентрации в течение экспериментов при сохранении постоянной дозы на одну клетку, чтобы перейти от концентрационной

зависимости к дозовой. Опыты проводили как с однократным добавлением токсиканта на исходный день постановки эксперимента, так и с множественными добавками в течение времени экспозиции. Периоды между добавками соответствовали времени удвоения численности, так чтобы доза токсиканта на одну клетку была такой же, как и на начальный день эксперимента.

Для экспериментов с *S. quadricauda* испытывали концентрации 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 и 10 мг/л (в расчете на хром). Исходная численность после инокуляции составляла 25 тыс. кл/мл. Токсикант добавляли в культуру на 0 сут эксперимента (однократная добавка) и в дальнейшем на 3, 6, 10 и 17 сут до достижения необходимых концентраций (многократные добавки). Частота добавления токсиканта определялась скоростью клеточного деления. Средняя скорость роста культуры (без хрома) составляла 0,33 деления/сут.

В экспериментах с *T. weissflogii* испытывали следующие концентрации хрома: 0,001; 0,01; 0,1 и 1 мг/л. Начальная численность клеток составляла $5 \cdot 10^3$ кл/мл. Токсикант добавляли на 0 сут эксперимента (однократное добавление). В дальнейшем, в одной серии опыта токсикант больше не добавляли (условно названной нами контрольной), а в другой – добавляли на 3, 6, 10 и 13 сут (многократные добавки). Средняя скорость роста культуры (без токсиканта) составляла 0,33 деления/сут.

Все изменения в процессе роста культур сравнивали с их ростом в среде при однократном добавлении соответствующей концентрации хрома в начале эксперимента, а также с ростом культур в среде без хрома (чистый контроль).

Тест на токсичность хрома в зависимости от исходной плотности популяции

Провели четыре варианта опыта с различной исходной плотностью культуры *S. quadricauda* 200, 500 тыс. кл/мл, 1, 2 млн кл/мл. Опыты проводили с однократным добавлением хрома 1 мг/л на исходный день постановки

эксперимента длительностью 21 сут. Развитие культуры в опыте сравнивали с ее ростом с тем же исходным количеством клеток, но без добавления токсиканта.

Тест на токсичность алюминия в зависимости от исходной плотности популяции

Влияние начальной плотности популяции 25, 100, 500 и 1000 тыс. кл/мл на токсичность алюминия в форме $AlCl_3$ в концентрации 50 мг/л в расчете на соль, что соответствует концентрации 5,6 мг/л алюминия в расчете на ион Al^{3+} , на культуру *S. quadricauda* оценивали в течение 21 сут. Развитие культуры в опыте сравнивали с ее ростом с тем же исходным количеством клеток, но без добавления токсиканта.

Тест на токсичность алюминия в зависимости от времени добавки алюминия в культуру в процессе ее роста

Добавки токсиканта в концентрациях 50 и 100 мг/л $AlCl_3$ производили на 0, 7, 14, 21 и 28 сут развития культуры *S. quadricauda* без регулирования численности клеток на момент внесения токсиканта. Контролем служил рост культуры без токсиканта с момента его добавки в опытные культуры. Общая длительность опыта – 49 сут.

Тест на токсичность алюминия на природной озерной воде из региона Южных Хибин

Развитие культуры *S. quadricauda* изучали в норме и при добавлении хлорида алюминия в двух опытах – на среде Успенского №1 (дистиллированная вода с добавками питательных солей) и природной озерной воде М. Вудьявр из региона Южных Хибин (с аналогичными добавками питательных солей).

Действие хлорида алюминия на культуру *S. quadricauda* оценивали на среде Успенского №1 при концентрациях 0,1; 0,4; 0,75; 1; 5; 10; 20 мг/л и природной воде

при концентрациях 0,4; 1; 10; 25; 50 и 100 мг/л в расчете на соль, что соответствует концентрациям иона Al^{3+} – 0,01; 0,04; 0,08; 0,1; 0,6; 1,1; 2,2 для среды Успенского и 0,04; 0,1; 1,1; 2,8; 5,6; 11,2 для природной воды. Длительность опытов составила 21 сутки. Исходная численность клеток в первых двух опытах – 35 тыс. кл/мл.

Изучение влияния низкой минерализации среды на рост и развитие Scenedesmus quadricauda

Для приготовления среды Успенского № 1 для контрольных повторностей использовали дистиллированную воду, для опытных повторностей – исследуемые растворы с заданным уровнем минерализации, в которые производили добавки питательных солей по прописи среды Успенского № 1 и пастеризовали в течении 30 мин в колбах с ватными пробками, чтобы избежать заражения среды микроорганизмами.

Длительность хронического опыта – 14 суток. Основными показателями для оценки состояния популяции микроводорослей служили изменение численности клеток и величина эффективности фотосинтеза.

Изучение влияния низкой минерализации среды на рост и развитие Monoraphidium arcuatum

Эксперимент проводили на культуре *Monoraphidium arcuatum* в условиях, аналогичных для *Scenedesmus quadricauda*.

Оценка чувствительности Scenedesmus quadricauda к эталонному токсиканту бихромату калия на среде с низкой соленостью

Эксперимент проводили в течение 72 ч с добавками бихромата калия в концентрациях 0,5; 1; 5 и 10 мг/л на среде с соленостью 2,5‰.

2.2.6. Влияние фактора времени добавления токсиканта на культуру *Scenedesmus quadricauda*

На первом этапе исследования влияния фактора времени добавки токсиканта на результат биотестирования тест-организмом служила альгологически чистая культура микроводоросли *S. quadricauda*.

Культуру выращивали на среде Успенского №1 в люминостате при освещенности 3,5 клк со сменой дня и ночи (12:12 ч), температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$ и перемешивали 2 раза в сутки во избежание оседания клеток.

Влияние времени суток на момент добавки эталонного токсиканта бихромата калия, широко используемого в биотестировании, на результаты биотеста оценивали при концентрациях 0.1, 1, 5 и 10 мг/л $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Было проведено два опыта – острый и хронический, в которых оценена токсичность бихромата калия в зависимости от времени добавления его в культуральную среду – вечером во время, совпадающее с окончанием светового периода, и утром во время, совпадающее с началом светового периода.

Длительность острого опыта для каждого времени добавления токсиканта составила 3 сут. Время постановки эксперимента – 20:00. Добавки токсиканта производили по схеме, представленной на рис. 2. В первую половину колб токсикант был добавлен в момент выключения освещения («Вечер»). Во вторую половину опытных повторностей добавки токсиканта производили в момент включения освещения в люминостате (через 12 часов, в 8:00, «Утро»).

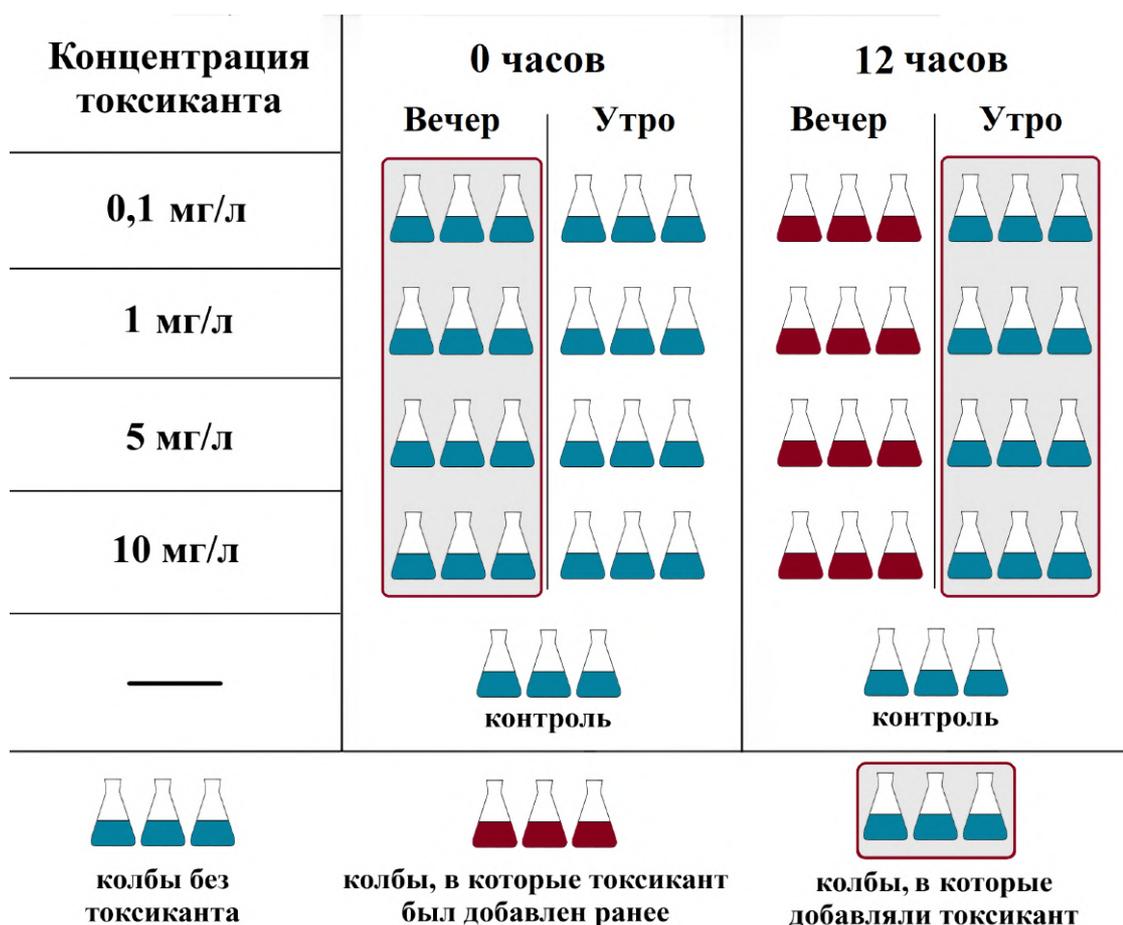


Рисунок 2. Схема добавки бихромата калия в остром опыте с культурой *S. quadricauda* по изучению влияния времени суток на момент добавки токсиканта на его токсичность.

Хронический эксперимент длительностью 21 сут представлял собой два параллельных опыта, каждый со своим контролем. Постановка каждого опыта была проведена непосредственно перед добавлением токсиканта, поэтому ни для утреннего, ни для вечернего варианта не было выделено времени на адаптацию культуры после посева и начальные условия постановки этих двух вариантов хронического эксперимента были максимально унифицированы (за исключением времени добавки токсиканта).

Основными показателями для оценки состояния культуры служили изменение численности клеток (абсолютной и по сравнению с контролем) и соотношения живых и мёртвых клеток в динамике её развития.

2.2.7. Влияние фактора времени добавления токсиканта на культуру *Chlorella vulgaris*

Для проведения эксперимента использовали термофильный штамм *Chlorella vulgaris* Beijer., соответствующий всем требованиям, предъявляемым к тест-организмам.

Исследовали токсичность различных веществ $K_2Cr_2O_7$; $CuSO_4$; $AlCl_3$ и Na_2HPO_4 в зависимости от времени суток на момент добавки токсиканта в культуру. Влияние токсикантов оценивали по показателям численности и интенсивности фотосинтеза клеток. С каждым токсикантом проведено по два опыта – в люминостате и в культиваторе, в которых исследовали влияние времени суток на момент добавления токсиканта в культуру – утром в 9.00 (начало светового периода в люминостате) и вечером в 21.00 (конец светового периода в люминостате).

Первый эксперимент проводили в люминостате в течение 3 сут при температуре $20^{\circ}C$, который включал в себя два варианта, отличавшиеся только временем начала постановки эксперимента и, соответственно, добавки токсиканта: в 9:00 (включение света) и в 21:00 (выключение света). Эксперимент проводили на 2% среде Тамия в 24 пенициллиновых флаконах (по 12 штук для утреннего и вечернего вариантов опыта), в которые добавляли по 8 мл культуры с оптической плотностью $D=0,005$ в трех повторностях для каждой концентрации токсиканта и контроля. Общая схема эксперимента приведена на рис 3.

Условия Токсикант	Люминолат (Т: 24°C, свет: 12:12ч.) или культиватор (Т: 36°C, свет: 24ч.)					
	Начало в 9:00			Начало в 21:00		
Концентрация 1						
Концентрация 2						
Концентрация 3						
Контроль						

Рисунок 3. Схема добавки токсикантов в острых опытах по изучению влияния времени суток на момент добавки токсиканта в культуру *Chlorella vulgaris* на результат биотестирования.

Также был проведен опыт в многоцветном культиваторе КВМ-05 при постоянной температуре (36.0°C) и постоянном освещении (длительностью 24 ч с утренними и вечерними добавками токсиканта) во флаконах с 8 мл культуры и начальной оптической плотностью $D=0,05$ культуры в трех повторностях для каждой концентрации токсиканта и контроля.

Оптическую плотность измеряли с помощью фотоэлектрокалориметра ИПС-03 (длина волны – 560 нм). Перед каждым опытом была измерена оптическая плотность каждого пенициллинового флакона. Эти фоновые значения вычитали из соответствующих значений результатов опыта.

Для определения эффективности фотосинтеза F_v/F_m использовали импульсный флуориметр Мега-25 (И.В. Конюхова), позволяющий регистрировать индукционную кривую флуоресценции $x_l a$ после темновой адаптации культуры (30 мин) и рассчитывать величины F_0 и F_v/F_m .

2.3. Показатели состояния культур в токсикологических экспериментах

2.3.1. Основные структурные и функциональные показатели состояния культур

Биотестирование проводили, используя как общепринятые общебиологические интегральные показатели, так и физиологические показатели состояния культуры, руководствуясь рекомендациями, описанными в литературе (Фокина, 2017; Олькова, 2018).

Основными структурными и функциональными показателями для оценки состояния популяций служили изменение численности клеток (абсолютной и по сравнению с контролем), соотношения живых и мёртвых клеток и эффективности фотосинтеза в динамике развития популяций.

Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом, все повторности каждой концентрации подсчитывали по 4 раза. В некоторых экспериментах вместо численности проводили измерение оптической плотности суспензии клеток в культуре. Оптическую плотность измеряли с помощью фотоэлектрокалориметра ИПС-03 (длина волны – 560 нм).

Определение живых и мёртвых клеток осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Axioscop 2 FS Plus (Carl Zeiss, Германия) на препарате «раздавленная капля» в камере Горяева, подсчитывая по 200 клеток в каждой повторности каждой концентрации. При облучении объекта коротковолновым сине-фиолетовым светом и наблюдали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, отмирающие – от оранжевого до жёлтого, а мертвые – зелёное.

Функциональное состояние клеток водорослей оценивали по флуоресценции хлорофилла, измеренной с помощью флуориметра AquaPen-C AP-C 100 (Photon System Instruments, Brno, Чехия) или использовали импульсный флуориметр «Мега-25» И.В. Конюхова (Россия, МГУ) (Погосян и др, 2009).

Флуоресценцию индуцировали красным светом с длиной волны 630 нм в течение 2 с при плотности потока квантов $1000 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Перед измерениями пробы адаптировали к темноте в течение 30 мин. На основании измерений интенсивностей флуоресценции хлорофилла при открытых (F_0) и закрытых (F_M) реакционных центрах фотосинтетического аппарата определяли эффективность фотосинтеза суспензии клеток водоросли по безразмерному параметру $F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ (Strasser et al, 2004).

Отношение выхода переменной и максимальной флуоресценции (F_v/F_m) соответствует максимальной эффективности первичных процессов утилизации света в процессе фотосинтеза. Эффективность процессов фотосинтеза представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма (Strasser et al., 2004).

Также в некоторых экспериментах использовали такие дополнительные показатели состояния культуры, как изменение размеров клеток, соотношение 2-х и 4-х клеточных ценобиев в популяции, содержание ТБК-активных продуктов.

Количество ценобиев с разным числом клеток, как и общую численность клеток, подсчитывали под световым микроскопом в камере Горяева. Ширину клеток измеряли в самом широком месте с помощью окуляр-микрометра, откалиброванного объект-микрометром. Длина клеток практически не изменялась.

Содержание ТБК-активных продуктов определяли согласно (Stewart, Bewley, 1980) с небольшими модификациями. К 200 мкл суспензии клеток добавляли 1 мл раствора 0,25% тиобарбитуровой кислоты в 10% трихлоруксусной кислоте. Полученные пробы инкубировали в течение 30 минут при температуре 95°C на водяной бане, после чего пробирки охлаждали 5 минут при температуре 0°C . Затем пробы центрифугировали в течение 15 минут при 8000 об./мин. Поглощение измеряли при 532 нм и 600 нм. Концентрацию ТБК-активных

продуктов рассчитывали с учётом коэффициента молярной экстинкции $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Robert et al., 1980).

2.3.2. Оценка комбинированного действия токсикантов: синергизм, антагонизм и аддитивность

Примененный в настоящей работе новый подход к оценке комбинированного действия токсикантов учитывает данные комбинированного действия добавок на измеряемый показатель культуры на все сроки испытаний. По вертикальной оси откладывают значения оценок комбинированного воздействия добавок (например, метиленового синего (МС) и нанопластика (НП)) на изменение численности клеток (1):

$$\frac{N_{\text{контроль}}}{N(\text{МС+НП})} \quad (1).$$

Однако это может быть и другой количественный параметр состояния культуры, например, величина эффективности фотосинтеза QY. А по горизонтальной оси откладывают произведение оценок при действии их порознь (2):

$$\frac{N_{\text{контроль}}}{N(\text{МС})} \times \frac{N_{\text{контроль}}}{N(\text{НП})} \quad (2).$$

Точки, лежащие на биссектрисе или вблизи нее, указывают на аддитивность действия добавок в указанном нами ранее смысле. Отклонение точек от биссектрисы вниз свидетельствует об антагонизме или ослаблении совместного отрицательного действия добавок. Отклонение вверх указывает на синергизм или усиление отрицательного действия добавок относительно их аддитивного действия.

Данный метод оценки комбинированных эффектов является модификацией метода W.S. Abbott (1925). Отличие состоит в том, что вместо отклонения опытных значений от контроля (угнетение в %) в нашей работе для такой оценки мы предлагаем использовать отношение абсолютных значений измеряемого

параметра в контроле к абсолютным значениям в опыте. Это позволяет учитывать случаи, в которых токсикант вызывает стимуляцию измеряемого параметра, а не только случаи угнетения.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Токсичность соединений и материалов различной природы для зеленых микроводорослей¹

3.1.1. Влияние частиц пластика на микроводоросли

3.1.1.1. Воздействие микрочастиц пластика на культуру *Scenedesmus quadricauda*

Предварительные испытания с пенополистиролом EPS (свежий образец) показали отсутствие его токсичности в концентрациях от 1 до 1000 мг/л. Достоверной разницы с контролем обнаружено не было (рис. 1 и 2, приложение). Поэтому в новый опыт были взяты 6 образцов микропластика в концентрации 3 г/л.

Все виды пластика оказывали достоверное влияние на рост культуры (табл. 3, рис. 4А).

Таблица 3. Изменение абсолютной численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в дес. тыс. кл/мл) и относительной численности (в % от контроля) в присутствии разных видов микропластика.

Срок, сутки	Образцы пластика						
	контроль	EPS	PU	HDPE (белый)	HDPE (красный)	PP	EPS (свежий)
3	39,7±1,3 100%	27,8±2,5 70,17%	17,7±2,1 44,54%	23,5±1,1 59,24%	39,5±1,1 99,58%	38,7±1,4 97,48%	41,7±2,9 105,04%
7	120±3,8 100%	102,5±9,4 85,42%	25±2,6 20,83%	122,5±7,5 102,08%	75,2±4,4 62,64%	110±11,3 91,67%	155±7,5 129,17%
14	308,3±2,5 100%	345±26,4 111,89%	226,7±6,3 73,51%	391,7±12,6 127,03%	305±18,9 98,92%	306,7±35,2 99,46%	315±7,5 102,16%
21	316,7±2,5 100%	331,7±8,8 104,74%	225±11,3 71,05%	388,3±6,3 122,63%	325±7,5 102,63%	336,7±8,8 106,32%	320±3,8 101,05%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

¹ При подготовке подраздела 3.1 использованы результаты, ранее опубликованные автором в следующих статьях: Ильина и др., 2024; Лазарева и др., 2024; Lazareva et al., 2024; Лазарева и др. 2023, Лазарева, Ипатова, 2021; Lazareva et al., 2021.

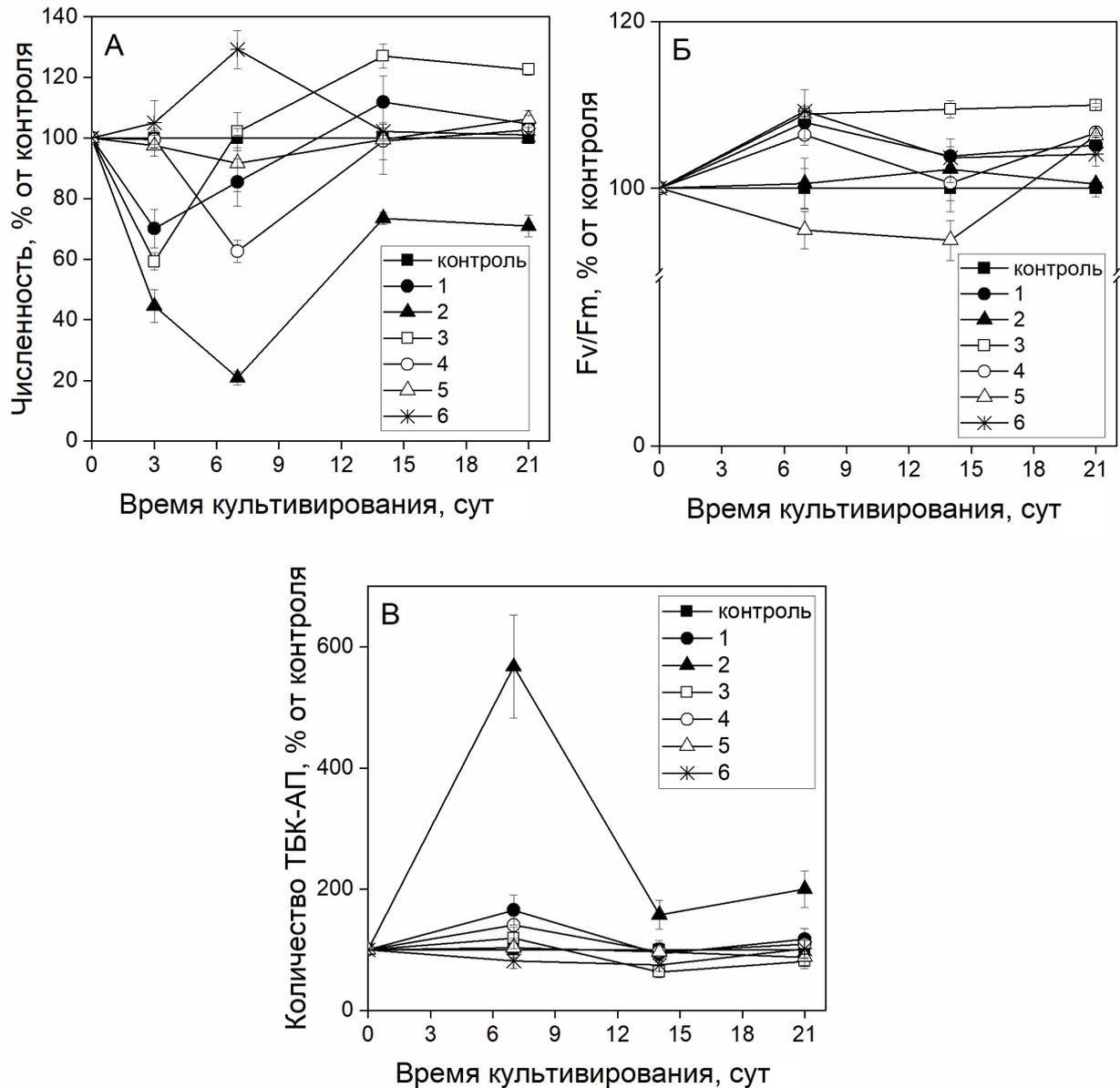


Рисунок 4. Изменение численности клеток (**A**), максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_v/F_m) (**Б**) и количества ТБК-активных продуктов в клетках (**В**) *Scenedesmus quadricauda* (в % от контроля) в присутствии разных видов микропластика: 1. – EPS (Баренцево море); 2. – PU; 3. – HDPE белый; 4. – HDPE красный; 5. – PP; 6. – EPS (свежий).

Значимое угнетение роста отмечено для 4 видов пластика: для EPS (Баренцево море) на 30% на 3 сут, PU (монтажная пена) на 27–79% в течение всего опыта, HDPE (белый) на 41% на 3 сут, HDPE (красный) на 37% на 7 сут. А достоверная стимуляция наблюдалась однократно для PP на 6% на 21 сут, для EPS (свежий) на 29% на 7 сут и для HDPE (белый) на 23–27% к концу опыта на 14 и

21 сут. В остальные сроки наблюдений численность клеток 6 видов микропластика находилась на уровне контроля.

Однократной и незначительной стимуляцией роста на 6% в присутствии РР (канат) можно пренебречь. Можно считать, что рост культуры при добавлении 3 г/л каната находился практически на уровне контроля на протяжении всего хронического эксперимента длительностью 21 сутки. А EPS (свежий) вызывал хотя и однократную, но довольно значительную, достоверную стимуляцию роста (на 29%), что может указывать на его слабую токсичность.

Следовательно, по показателю ингибирования роста водоросли самой токсичной оказалась монтажная пена, далее в порядке убывания токсичности были HDPE (белый), HDPE (красный) и EPS (Баренцево море).

РР (канат) (Баренцево море) был нетоксичен.

Разницу в токсичности между пробой EPS, отобранной на литорали Баренцевого моря, и EPS (свежий продукт) можно объяснить большей токсичностью первой пробы вследствие ее изменения в естественных условиях литорали моря (окисление, адсорбция веществ).

А продолжительная и достоверная (в течение всего опыта) токсичность PU (монтажная пена) для исследуемого тест-объекта, вероятно, связана с высокой токсичностью ее органических компонентов и продуктов их окисления. Острая токсичность многих марок монтажной пены для беспозвоночных, растений и водорослей составляет $EC_{50} > 100$ мг/л (данные из паспорта продукта).

Таким образом, исследование токсичности 5 образцов микропластика, отобранных на литорали Баренцева моря, и одного свежего образца микропластика по показателю численности клеток культуры *S. quadricauda* позволило установить следующий ряд токсичности в порядке ее убывания:

PU (монтажная пена) > HDPE (полиэтилен низкого давления) (белый) > HDPE (красный) > EPS (пенополистирол) > EPS (свежий) > РР (полипропилен) (канат).

В частицах МП могут содержаться токсичные химические вещества. Согласно данным литературы, химическая опасность пластикового загрязнения может быть связана как с компонентами, входящими в состав синтетических материалов (Lithner et al., 2011), так и с токсичными соединениями, присутствующими в морской среде и сорбируемыми на поверхности пластиковых частиц (Ogata et al., 2009). К первой группе могут относиться мономеры, технологические добавки или побочные продукты производства, ко второй – стойкие органические загрязнители или тяжелые металлы. Токсичность МП зависит от размеров частиц, времени их пребывания в воде, характеристик биопленки, а также от химического состава частиц (Rochman, 2015). Так, полиэтилен, полипропилен и полистирол имеют достаточно высокие сорбционные свойства по ряду органических загрязнителей, при этом мономеры полиэтилена и полипропилена достаточно инертны по отношению к биологическим объектам (Ogata et al., 2009), в то время как мономер полистирола – стирол, обладает острой токсичностью. Возможно, токсическое действие исследованных нами образцов полиэтилена связано, в том числе, с сорбированными из воды соединениями, учитывая, что образцы пластика были собраны на акватории с интенсивным судоходством и соответствующей токсической нагрузкой в виде нефтепродуктов, ГСМ (горюче-смазочные материалы) и др.

Согласно справочным данным (Гуричева и др., 1977; Шефтель, 1991), полиолефины (в т.ч. полиэтилен и полипропилен) могут выделять в окружающую среду низкомолекулярные соединения, представляющие собой предельные и непредельные углеводороды, а также остатки катализаторов и различные вносимые в полимер добавки. Среди остатков катализаторов и растворителей идентифицируются ионы хлора, алюминия и ванадия, бензин, метиловый и изопропиловый спирты. Соединения выделяются главным образом в начале контакта с водой, но поскольку состаренный морской пластик имеет прогрессирующие механические повреждения, миграция может происходить

скачкообразно по мере разрушения материала. Тем не менее, ПЭ и ПП считаются наиболее безопасными видами пластика. В то же время из-за их гидрофобных свойств они показывают высокую способность к адсорбции СОЗ (стойкие органические загрязнители) из водной среды, концентрация которых может возрасти до 1000 раз (Rochman, 2015).

Токсичные свойства полистирола в основном связаны с миграцией в среду его высокотоксичного мономера – стирола, которая происходит не только с поверхности материала, но и со всего его объема в течение контакта с водной средой. Причем с повышением температуры и увеличением продолжительности контакта миграция мономера усиливается.

Опасность монтажной пены связана, прежде всего, с выделением в окружающую среду высокотоксичных отвердителей – изоцианатов, присутствующих в ее составе.

Исходя из этого, можно было бы ожидать другой ряд токсичности: полиуретан > полистирол > полиолефины. Возможно, токсические эффекты полиэтилена связаны, в том числе, с сорбированными из воды соединениями, учитывая, что собраны они были на акватории с интенсивным судоходством и соответствующей нагрузкой в виде нефтепродуктов, ГСМ (горюче-смазочные материалы) и др.

Доля живых и мертвых клеток в культуре в процессе ее роста в присутствии исследованных видов микропластика изменялась по-разному (табл. 4).

Таблица 4. Доля живых клеток (в % от общего числа) *Scenedesmus quadricauda* в присутствии разных видов микропластика.

Срок, сут	Виды микропластика						
	контроль	EPS Баренцево море	PU Баренцево море	HDPE белый Баренцево море	HDPE красный Баренцево море	PP Баренцево море	EPS свежий
3	99±1	97±1	62±4	97±1	85±3	95±2	99±1
7	99±1	98±1	58±5	97±1	82±4	96±1	99±1
14	99±1	98±1	67±4	97±2	92±3	98±1	99±1
21	98±1	97±1	87±3	98±1	96±2	97±1	98±1

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Так, в присутствии PU (монтажная пена) доля мертвых клеток в процессе роста колебалась в пределах 13–42% и была максимальной на 7 сут опыта. В присутствии HDPE (красный) доля мертвых клеток составляла 15–18% до 7 сут опыта. В остальных случаях жизнеспособность культуры была близкой к уровню контроля.

В настоящей работе в оценке токсичности исследуемых образцов микропластика были использованы не только структурные показатели состояния лабораторной популяции, но и функциональные показатели, характеризующие физиологическое состояние тест-объекта при токсическом воздействии.

Максимальный квантовый выход фотохимии ФСII (F_V/F_M) *S. quadricauda* при добавлении в культуральную среду исследуемых образцов микропластика на протяжении всего опыта изменялся незначительно – в пределах до 7% в сторону угнетения и до 10% в сторону стимуляции роста. Тем не менее, эти отличия оказались достоверными и носили продолжительный характер на протяжении всего опыта, что указывает на слабое токсическое действие большинства образцов на тест-культуру. Исключение составляла монтажная пена, в присутствии которой значения F_V/F_M были на уровне контроля (табл. 5, рис. 4Б).

Таблица 5. Изменение максимального квантового выхода фотохимии ФСII (F_V/F_M) *Scenedesmus quadricauda* (в отн. ед. и в % от контроля) в присутствии разных видов микропластика.

Срок, сут	Образцы пластика						
	Контроль	EPS	PU	HDPE (белый)	HDPE (красный)	PP	EPS свежий
7	0,607±0,015 100%	0,655±0,006 107,9%	0,611±0,048 100,6%	0,661±0,020 108,89%	0,646±0,015 106,42%	0,577±0,014 95,01%	0,664±0,003 109,28%
14	0,579±0,016 100%	0,601±0,012 103,86%	0,592±0,009 102,3%	0,634±0,006 109,5%	0,583±0,012 100,63%	0,543±0,014 93,78%	0,600±0,008 103,68%
21	0,565±0,006 100%	0,595±0,007 105,19%	0,568±0,002 100,53%	0,622±0,001 109,96%	0,603±0,003 106,66%	0,601±0,002 106,37%	0,589±0,008 104,13%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Следовательно, все образцы микропластика, за исключением монтажной пены, оказывали слабое токсическое влияние на изменение максимального квантового выхода фотохимии ФСII – величину эффективности фотосинтеза (F_V/F_M). А монтажная пена по этому показателю оказалась нетоксичной.

Таким образом, вещества в составе монтажной пены вызывают продолжительное угнетение роста культуры и влияют на темп деления клеток, при этом величина эффективности фотосинтеза клеток остается в пределах нормы.

Окислительный стресс оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов в клетках, в состав которых входит ряд высокореакционных соединений, которые действуют на все компоненты клетки, включая ДНК, и приводят к дезорганизации мембранной структуры клеток.

Наблюдения за изменением количества ТБК-активных продуктов в суспензии микроводорослей показали, что именно присутствие монтажной пены в среде культивирования приводит к образованию очень высокого уровня этих продуктов от 158 до 567% по отношению к контролю в течение всего опыта. В остальных случаях повышение было кратковременным (только в начале опыта на

7 сут) для EPS (Баренцево море) и HDPE (красный) и величина этого показателя составляла соответственно 166 и 140% (табл. 6, рис. 4B).

Таблица 6. Изменение количества ТБК-активных продуктов в клетках микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (в фМ/кл и в % от контроля) в присутствии разных видов микропластика.

Срок, сут	Образцы пластика						
	контроль	EPS	PU	HDPE (белый)	HDPE (красный)	PP	EPS свежий
7	0,483±0,052 100%	0,8±0,067 165,52%	2,74±0,448 566,9%	0,576±0,045 119,27%	0,678±0,059 140,32%	0,5±0,043 103,45%	0,394±0,029 81,42%
14	0,262±0,032 100%	0,245±0,029 93,57%	0,413±0,045 157,71%	0,166±0,021 63,43%	0,252±0,027 96,45%	0,254±0,025 96,91%	0,197±0,023 75,2%
21	0,081±0,025 100%	0,096±0,023 117,42%	0,163±0,031 200,18%	0,066±0,019 81,04%	0,089±0,022 108,93%	0,071±0,020 87,63%	0,083±0,025 102,03%

Примечание: фМ — фемто (10^{-15}) Моль. **Полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Следовательно, влияние микропластика на культуру *S. quadricauda* носит неоднозначный характер и вызывает мозаичную ответную реакцию, оцениваемую по разным структурным и функциональным показателям состояния тест-объекта. А именно, сильное угнетение роста культуры может сопровождаться значительным повышением ТБК-активных продуктов в клетках, при этом величина эффективности фотосинтеза не меняется.

3.1.1.2. Оценка токсичности золы, полученной при сжигании смеси пластиков

Также исследовали токсичность общего зольного остатка, полученного при сжигании смеси разных видов макропластика, отобранного на литорали Баренцева моря, в интервале концентраций 0,01–1000 мг/л золы.

Данные по влиянию зольного остатка разных видов пластика на изменение численности культуры *S. quadricauda* приведены в табл. 7, на рис. 5.

Таблица 7. Изменение абсолютной численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в дес. тыс. кл/мл) и относительной численности (в % от контроля) в присутствии зольного остатка смеси разных видов пластика.

Срок, сут	Концентрация зольного остатка, мг/л						
	контроль	0,01	0,1	1	10	100	1000
3	18,3±1,7	20,3±2,1	19,3±3,5	15±2,8	15±2,8	17±1,4	18±2,3
	100%	110,91%	105,46%	81,82%	81,82%	92,73%	98,18%
7	66,3±2,4	65±6,4	63,7±2,9	63,7±7	64,7±4,2	62±3,7	68,7±3,5
	100%	97,99%	95,98%	95,98%	97,49%	93,47%	103,52%
14	255±22,6	265±6,9	250±13,9	250±6,9	278,3±10,6	256,7±10,6	303,3±8,6
	100%	103,92%	98,04%	98,04%	109,15%	100,65%	118,95%
21	276,7±11,8	288,3±28	285±6,9	266,7±14,4	293,3±21,2	291,7±10,6	320±5,7
	100%	104,22%	103,01%	96,39%	106,02%	105,42%	115,66%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

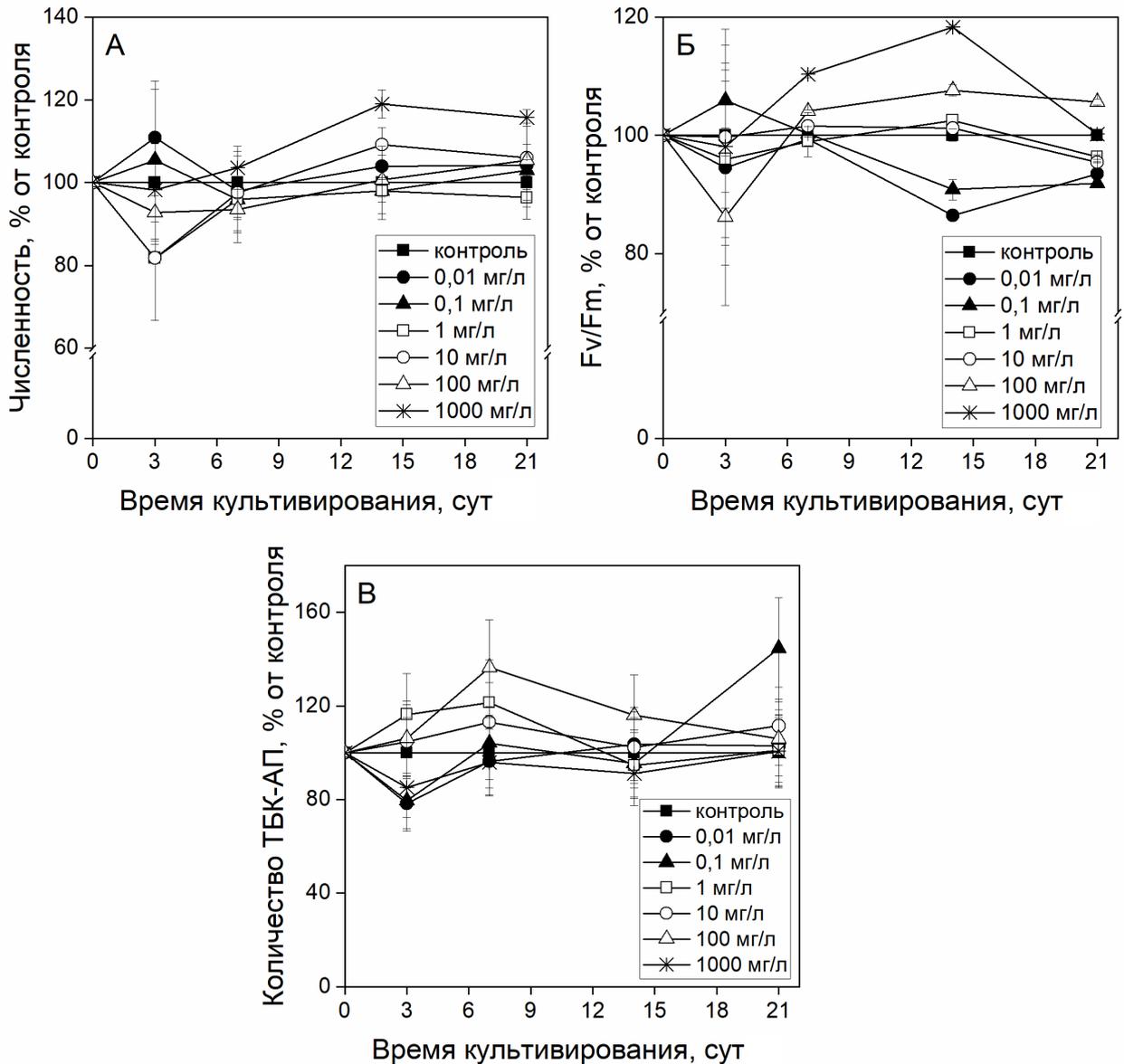


Рисунок 5. Изменение численности клеток (А), максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_v/F_m) (Б) и количества ТБК-активных продуктов в клетках (В) *Scenedesmus quadricauda* (в % от контроля) в присутствии зольного остатка смеси разных видов макропластика.

При всех концентрациях зольного остатка в широком интервале исследованных концентраций от 0,01 до 1000 мг/л достоверного ингибирования роста тест-культура обнаружено не было (табл. 7, рис. 5А).

Достоверная стимуляция на 16–19% отмечена только при самой высокой из всех концентраций 1000 мг/л к концу опыта на 14 и 21 сут. Такая стимуляция роста культуры может указывать на присутствие в золе компонентов, влияющих на темп деления клеток. Поэтому концентрации от 0,01 до 100 мг/л следует рассматривать как нетоксические, а концентрацию 1000 мг/л зола можно признать как слаботоксическую.

Доля живых клеток в присутствии разных концентраций зола изменялась мало и находилась на уровне контроля (табл. 8).

Таблица 8. Доля живых клеток (в % от контроля) *Scenedesmus quadricauda* в присутствии разных концентраций зольного остатка смеси разных видов пластика.

Срок, сут	Концентрация токсиканта, мг/л						
	Контроль	0,01	0,1	1	10	100	1000
3	99±1	97±2	99±1	98±1	98±1	99±1	97±2
7	98±1	99±1	98±1	97±1	98±1	97±1	96±3
14	99±1	99±1	99±1	99±1	97±2	98±1	98±1
21	98±1	98±1	97±1	99±1	98±1	98±1	99±1

Отсутствие выраженного токсического эффекта зола и угнетения роста в интервале исследованных концентраций на изучаемую культуру по показателю численности клеток, по-видимому, связано с рядом причин.

Во-первых, пластик на литорали подвергается деградации и окислению. Это может приводить к образованию окисленных продуктов иной токсичности, чем у свежих, исходных образцов.

Во-вторых, при сжигании пластика улетучиваются некоторые токсичные компоненты (например, диоксины и фураны). Кроме того, при производстве пластиков используют токсичные добавки, такие как бисфенол А и фталаты, которые могут выделяться в окружающую среду в процессе деградации пластика. Возможно, в отобранных на литорали Баренцева моря образцах пластика такие токсические компоненты либо выделились из них еще до их сжигания или

улетучились в процессе сжигания, что и не позволило выявить высокую токсичность анализируемой золы по показателю изменения численности клеток культуры.

В-третьих, соотношение массовой доли разных видов пластика, использованных при сжигании для получения золы, показывает небольшой процент монтажной пены (2,4%) в смеси морского пластика. Большую часть пластикового мусора на литорали Баренцева моря составляет различная тара и рыболовные сети. Вероятно, именно поэтому при данном соотношении разных видов пластика в исследованном зольном остатке мы не получили значимого ингибирования роста.

Изменение максимального квантового выхода фотохимии ФСII (F_V/F_M) *Scenedesmus quadricauda* в присутствии разных концентраций зольного остатка смеси различных видов пластика было незначительным (табл. 9, рис. 5Б). При этом максимальная и достоверная разница с контролем для всех случаев составляла 14% в случае снижения и 18% в случае увеличения значения этого показателя (табл. 9).

Следует отметить, что при малых уровнях воздействия золы 0,01–0,1 мг/л наблюдали достоверное снижение этого показателя (на 14 и 21 сут) до 14%, при средних 1 и 10 мг/л – однократное и более слабое угнетение до 5%, а при высоких 100 и 1000 мг/л золы – достоверную стимуляцию до 18 %, начиная с 7 сут.

Обнаруженный нами эффект в литературе носит название «парадоксального», когда малые концентрации или уровни воздействия факторов оказывают большее негативное влияние, чем более высокие, и может проявляться при воздействиях различных факторов (металлы, антибиотики, ионизирующая радиация, пестициды и др.) (Дмитриева и др., 2006; Prokhotskaya et al., 2000; Подколзин, Гуревич, 2002; Ипатова и др., 2018).

Таблица 9. Изменение максимального квантового выхода фотохимии ФСII (F_V/F_M) *Scenedesmus quadricauda* (в отн. ед. и в % от контроля) в присутствии зольного остатка смеси разных видов пластика.

Срок, сут	Концентрация зольного остатка, мг/л						
	контроль	0,01	0,1	1	10	100	1000
3	0,591±0,056 100%	0,559±0,075 94,55%	0,626±0,043 105,89%	0,567±0,061 95,97%	0,589±0,084 99,7%	0,51±0,069 86,23%	0,579±0,035 98,04%
7	0,613±0,002 100%	0,609±0,006 99,29%	0,615±0,001 100,27%	0,607±0,016 98,97%	0,623±0,006 101,58%	0,638±0,001 104,08%	0,677±0,004 110,33%
14	0,558±0,006 100%	0,482±0,002 86,44%	0,507±0,01 90,8%	0,572±0,001 102,51%	0,565±0,006 101,19%	0,6±0,005 107,59%	0,66±0,002 118,28%
21	0,591±0,003 100%	0,553±0,001 93,46%	0,543±0,003 91,88%	0,57±0,002 96,34%	0,564±0,001 95,43%	0,625±0,003 105,64%	0,592±0,001 100,17%

Примечание: полужирным отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

По мнению разных авторов, в присутствии низких концентраций токсиканта в клетках его удерживается больше и меньше выводится, чем при более высоких концентрациях (Дмитриева и др., 2006; Ипатова и др., 2018). Поскольку пластик в окружающей среде адсорбирует различные загрязняющие вещества и, в частности, токсичные металлы, то в золе могут присутствовать их остаточные количества, которые накапливаются клетками и со временем могут вызывать токсический эффект. Поэтому угнетение эффективности фотосинтеза при добавках золы 0,01 и 0,1 мг/л можно объяснить накопительным эффектом малых доз токсичных компонентов золы.

При сжигании разных видов пластика в составе золы часто обнаруживаются диоксины (Nakao et al., 2006), а также свинец (Valavanidis et al., 2008). При сжигании смеси исследованных нами видов пластика в печи «Булерьян» в выбросах были обнаружены многие летучие вещества, особенно бенз[а]пирен $0,74 \pm 0,19$ мкг/м³, монооксид углерода (CO) 453 ± 32 ppm (566 мг/л), диоксид серы (SO₂) 77 ± 24 ppm (220 мг/л), хлористый водород (HCl) $4,39 \pm 1,10$ мг/м³, а также

взвешенные вещества, в частности тяжелый металл свинец $0,091 \pm 0,023$ мг/м³ (по данным, любезно предоставленным сотрудником кафедры общей экологии и гидробиологии О.В. Ильиной) (табл. 1, приложение).

Поэтому угнетение максимального квантового выхода фотохимии ФСII (F_V/F_M) при добавках золы 0,01 и 0,1 мг/л можно объяснить накопительным эффектом малых доз токсичных компонентов золы. Последние со временем вызывают токсическое действие вследствие накопления клетками малых доз токсиканта и низкой степени выведения его из клеток, в отличие от более высоких концентраций золы, при которых выведение токсикантов из клеток может происходить более активно.

Значительное увеличение количества ТБК-активных продуктов (более 20% по сравнению с контролем) в клетках микроводоросли *S. quadricauda* в присутствии зольного остатка смеси разных видов пластика было выявлено только однократно при концентрациях 0,1 (на 45% на 21 сут); 1 (на 21%) и 100 мг/л золы (на 37% на 7 сут) (табл. 10, рис. 5В).

Таким образом, токсичность зольного остатка была выявлена по показателю изменения численности клеток только при максимальной, испытанной в опыте, концентрации 1000 мг/л, по показателю максимального квантового выхода фотохимии ФСII (F_V/F_M) – уже при минимальной из всех концентраций – 0,01 мг/л, а по изменению количества ТБК-активных продуктов в клетках – при 0,1 мг/л и выше.

Нами было отмечено значительное увеличение ТБК-АП, являющихся вторичными продуктами перекисного окисления липидов, как при токсическом воздействии микропластиков на 40–470%, так и зольного остатка до 45% по сравнению с контролем.

Таблица 10. Изменение количества ТБК-активных продуктов в клетках микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (в фМ/кл и в % от контроля) в присутствии зольного остатка смеси разных видов пластика.

Срок, сут	Концентрация зольного остатка, мг/л						
	контроль	0,01	0,1	1	10	100	1000
3	3,635±0,664 100%	2,844±0,427 78,24%	2,893±0,414 79,59%	4,231±0,564 116,4%	3,808±0,322 104,76%	3,857±0,275 106,13%	3,095±0,413 85,15%
7	0,675±0,064 100%	0,651±0,075 96,43%	0,703±0,082 104,19%	0,820±0,071 121,42%	0,763±0,068 113,08%	0,921±0,092 136,47%	0,647±0,056 95,84%
14	2,254±0,211 100%	2,337±0,241 103,66%	2,154±0,207 95,55%	2,132±0,248 94,59%	2,304±0,215 102,22%	2,614±0,256 115,96%	2,055±0,174 91,15%
21	1,528±0,181 100%	1,573±0,127 102,98%	2,211±0,249 144,69%	1,545±0,184 101,11%	1,703±0,313 111,44%	1,62±0,141 106,03%	1,54±0,134 100,78%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Анализируя характер изменения такого показателя, как ТБК-АП, необходимо учитывать его приоритетное значение по сравнению с другими показателями перекисного окисления липидов (ПОЛ), поскольку в состав ТБК-АП входит ряд высокореакционных соединений, которые действуют на все компоненты клетки, включая ДНК, и приводят к дезорганизации мембранной структуры клеток (Герасимов и др., 1998). Эти соединения обеспечивают многофакторное явление, которое определяется как эндогенная интоксикация.

Следовательно, зола была намного токсичнее исследованных видов МП, поскольку токсический эффект золы по физиологическому показателю обнаружен уже при 0,01 мг/л, по численности клеток при 1 г/л, а для МП по разным показателям развития тест-культуры токсический эффект выявлен при 3 г/л.

Таким образом, наши исследования показали, что разные виды МП в концентрации 3 г/л негативно воздействуют на микроводоросли, подавляя рост, изменяя активность фотосинтеза и вызывая окислительный стресс в клетках. Сочетание разных структурных и функциональных показателей развития и

состояния популяции клеток микроводоросли *S. quadricauda* в хроническом эксперименте позволяет выявить токсический эффект золы, полученной при сжигании смеси пластиков, при меньших токсических нагрузках и более адекватно давать оценку токсического действия исследуемого образца.

Исходя из анализа данных литературы, современные концентрации микропластика в окружающей среде, по-видимому, не вызовут значительную токсичность у микроводорослей. Тем не менее, микропластик может нарушить популяцию микроводорослей за счет сокращения доступных питательных веществ, за счет подавления первичных потребителей или выступая в качестве субстрата. Все эти изменения зависят от конкретных свойств микропластика, таких как тип полимера, размер и заряд поверхности, которые все еще недостаточно изучены и поэтому требуют дополнительных исследований. Даже небольшие изменения жизнедеятельности популяций микроводорослей, как первичных продуцентов, могут привести к серьезным нарушениям пищевой сети и последствиям для функционирования водных экосистем в целом (Casado et al., 2013).

Современные экспериментальные данные по токсичности микропластика не дают единого мнения в оценке их токсичности. Поэтому необходимы дальнейшие исследования самих свойств микропластиков, их влияния на токсичность для микроводорослей, взаимодействия микропластика с другими веществами в окружающей среде и выявление потенциальных основных механизмов их токсичности.

3.1.1.3. Воздействие наночастиц полистирола на культуру *Scenedesmus quadricauda*

При концентрациях 1 и 5 мг/л ПС-НЧ на 1 сут хронического 14 сут опыта отмечена достоверная стимуляция роста культуры с разницей по сравнению с контролем на 38 и 49% соответственно. При 10 мг/л обнаружены достоверное угнетение на 20% на 3 сут и стимуляция роста на 7 сут на 22%, а при 50 мг/л значимых отличий по сравнению с контролем не выявлено (табл. 11).

Таблица 11. Изменение численности (в дес. тыс. кл/мл и в % от контроля) *Scenedesmus quadricauda* в среде с наночастицами полистирола.

Срок, сут	Численность				
	контроль	1 мг/л	5 мг/л	10 мг/л	50 мг/л
1	2,6±0,3 100%	3,6±0,5 138,3%	3,8±0,3 149,4%	3,3±0,5 128,6%	2,6±0,6 101,3%
2	11±1,5 100%	13,5±1,1 122,7%	12,3±1,7 112,1%	11,2±1,4 101,5%	12,7±2 115,2%
3	26±1,1 100%	24,3±2,9 93,6%	22±4,1 85,9%	20,7±1,7 79,5%	24,5±3,4 94,2%
7	116±8,8 100%	128,3±10,7 110,6%	114±5,2 98,3%	142±7,8 122,4%	117,3±18,4 101,2%
10	210,3±21,7 100%	213±26,8 101,3%	194±21,8 92,2%	190,7±15,9 90,7%	206±14,1 97,9%
14	303,0 100%	321,0 105,9%	294,0 97,0%	291,7 96,3%	309,0 102,0%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Такая кратковременная значимая стимуляция роста культуры при малых концентрациях ПС-НЧ может служить показателем интенсификации обменных процессов и ускорения деления клеток в ответ на стресс, вызванный добавкой ПС-НЧ. Некоторые исследователи рассматривают стимуляцию как реакцию на стресс, связанную со специфическими сигнальными путями. Так, ПС-НЧ нарушают экспрессию генов, участвующих в регуляции окислительного стресса, и

запускают экспрессию сигнального пути, регулируемого Nrf фактором (транскрипционный фактор передачи сигналов) (Qu et al., 2018).

Гормезис — это биологический ответ на низкую дозу токсиканта, при котором наблюдают положительный стимулирующий эффект (например, улучшение приспособленности клеток, устойчивость к стрессу, увеличение темпов роста или продолжительности жизни). Это малоизученное явление, по-видимому, связано с активацией глобальных механизмов восстановления клеток, которые компенсируют воздействие токсиканта (Calabrese et al., 2001). Было показано, что гормезис происходит в клетках человека и млекопитающих, подвергшихся воздействию наночастиц, включая нанотрубки, квантовые точки, оксид цинка и серебро (Iavicoli et al., 2014). Воздействие на бактерии сублетальных концентраций противомикробных наночастиц серебра может вызывать различные механизмы адаптации, которые оказывают контрпродуктивное гормезисное действие на бактерии, например, стимулируют образование биопленки и повышают устойчивость к антибиотикам (Yang, Alvarez, 2015).

Такая же кратковременная стимуляция роста была отмечена и другими авторами (Li et al., 2023 b) при воздействии высокой концентрации 200 мг/л ПС-НЧ с размером частиц 100 нм (Shanxi Heng Xue Material Technology Co., Ltd., China) на микроводоросль *Scenedesmus quadricauda*.

Сравнение полученных нами данных по численности клеток в присутствии ПС-НЧ в исследованном диапазоне концентраций 1–50 мг/л с данными по численности клеток в присутствии микропластика (МП) полистирола в концентрации 3 г/л (Лазарева и др., 2021), свидетельствует о том, что ПС-НЧ на 3 порядка токсичнее частиц МП, поскольку значимый эффект на ростовые и физиологические показатели состояния популяции клеток микроводоросли *S. quadricauda* был обнаружен при высоких концентрациях 3 г/л частиц МП, а в случае с ПС-НЧ при 1 мг/л.

Достоверное снижение величины эффективности фотосинтеза обнаружено в начале опыта уже на 1 сут при 5, 10 и 50 мг/л в пределах 10–20% и на 6% на 10 сут при 10 мг/л ПС-НЧ. В остальные сроки наблюдения значимых отличий от контроля не было (табл. 12).

Таблица 12. Изменение величины эффективности фотосинтеза (QY, усл. ед. и % от контроля) культуры *Scenedesmus quadricauda* в среде с наночастицами полистирола.

Срок, сут	QY				
	контроль	1 мг/л	5 мг/л	10 мг/л	50 мг/л
1	0,65±0,011 100%	0,65±0,017 100,5%	0,54±0,04 83,6%	0,52±0,04 80,5%	0,58±0,024 89,7%
2	0,51±0,033 100%	0,51±0,023 100,7%	0,52±0,03 102,6%	0,52±0,023 102,6%	0,55±0,007 107,9%
3	0,49±0,024 100%	0,48±0,011 98,6%	0,51±0,007 104,1%	0,46±0,007 95,2%	0,49±0,007 100%
7	0,50±0,024 100%	0,49±0,013 98%	0,51±0,011 102,7%	0,47±0,007 95,3%	0,50±0,017 99,3%
10	0,50±0,011 100%	0,49±0,007 98,7%	0,50±0,026 99,3%	0,47±0,011 94,0%	0,50±0,017 99,3%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Таким образом при воздействии ПС-НЧ ответная реакция популяции клеток микроводоросли происходит сразу и отмечена в эксперименте уже на 1 сут или в виде стимуляции численности клеток при малых дозах 1 и 5 мг/л (в результате ускоренного деления клеток при стрессе) или снижением работы фотосинтетического аппарата клеток, начиная с 5 мг/л.

Параллельно в ходе тестирования проводилась оценка токсикологических эффектов частиц нанопластика по таким важным тест-параметрам, как изменение доли ценобийев с нетипичным количеством клеток в культуре, а также изменение встречаемости клеток различных размерных групп.

В норме в ценобиальной культуре *S. quadricauda* преобладают 4-клеточные ценобии, а доля остальных 2-, 8- и 16-клеточных ценобийев невелика. Увеличение

доли 2-х клеточных ценобиев может служить индикатором неблагополучия популяции в целом.

Проанализирована доля 2- и 4- клеточных ценобиев в контроле и при 1, 5, 10 и 50 мг/л ПС-НЧ в динамике развития культуры (рис. 6). В контроле доля 2-клеточных ценобиев на 1 сут составляла 16%, а в дальнейшем - 27-28% вплоть до 10 сут опыта. При малой концентрации 1 мг/л ПС-НЧ доля 2- клеточных ценобиев была ниже по сравнению с контролем во все соответствующие сроки наблюдения, но особенно на 1 сут опыта. При 5 мг/л подобная тенденция сохранялась, за исключением 7 сут опыта, когда доля 2-клеточных ценобиев немного увеличивалась по сравнению с контролем на этот же срок. При 10 мг/л до 7 сут опыта доля 2- клеточных ценобиев была выше, а на 10 сут значительно ниже уровня контроля, что свидетельствует об адаптивной реакции популяции и улучшении состояния популяции к концу опыта. Однако при самой высокой концентрации 50 мг/л со временем с 1 по 10 сут наблюдалось постепенное увеличение доли 2- клеточных ценобиев, что свидетельствует о неблагоприятном состоянии популяции клеток микроводоросли в течение 10 сут наблюдений.

Сравнивая разные уровни воздействия ПС-НЧ на определенный срок наблюдения с контролем, можно отметить, что на 1 сут опыта доля 2-х клеточных ценобиев была выше контроля при 10 и 50 мг/л, на 3 сут – при 10 мг/л, на 7 сут – при 5, 10 и 50 мг/л, а на 10 сут – только при 50 мг/л, т.е. в большинстве дат наблюдения при самой высокой концентрации 50 мг/л ПС-НЧ доля 2-х клеточных ценобиев превосходила уровень контроля (рис. 7).

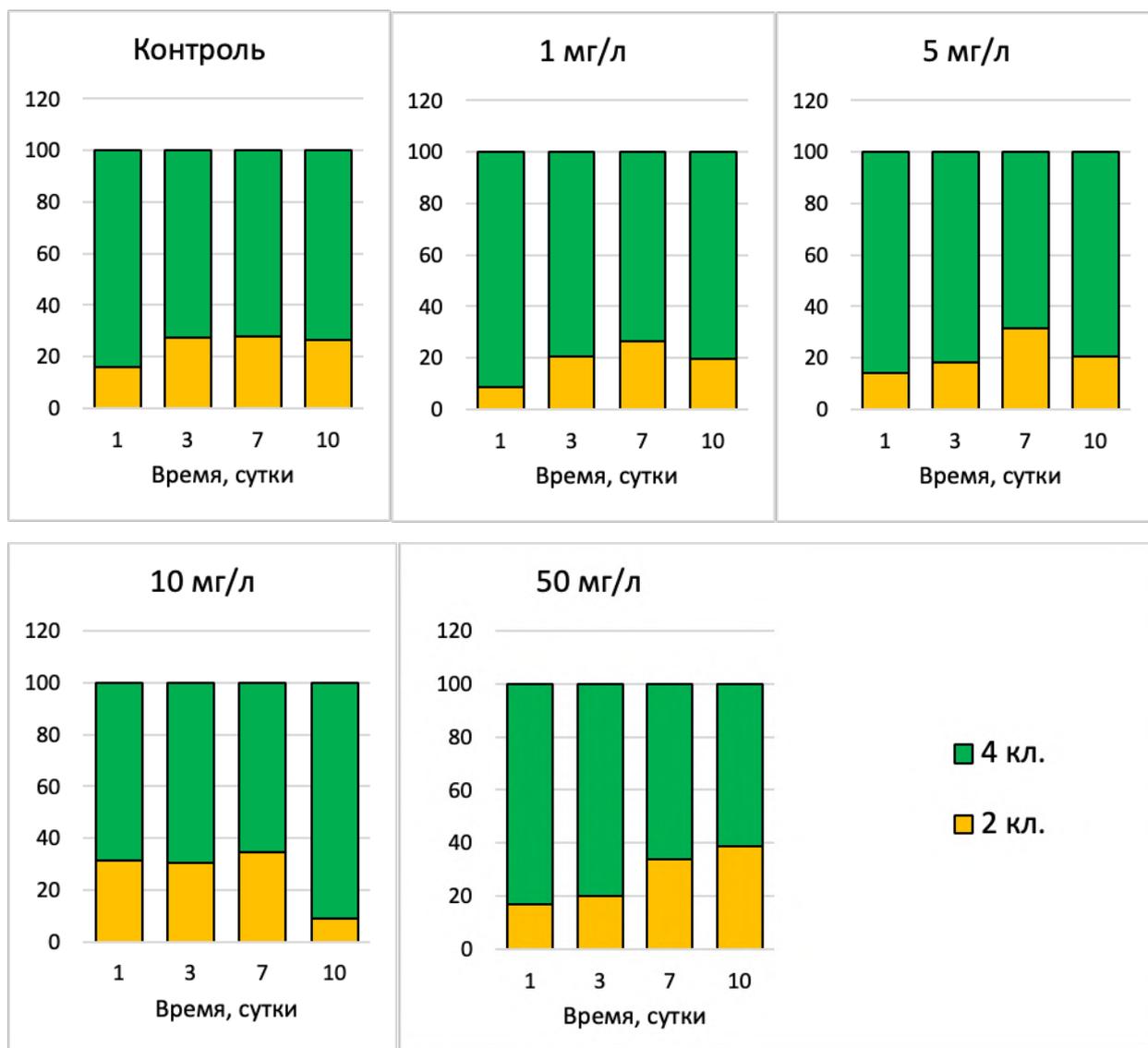


Рисунок 6. Изменение соотношения 2- и 4-клеточных ценобиов в культуре *Scenedesmus quadricauda* в среде с наночастицами полистирола в динамике развития культуры.

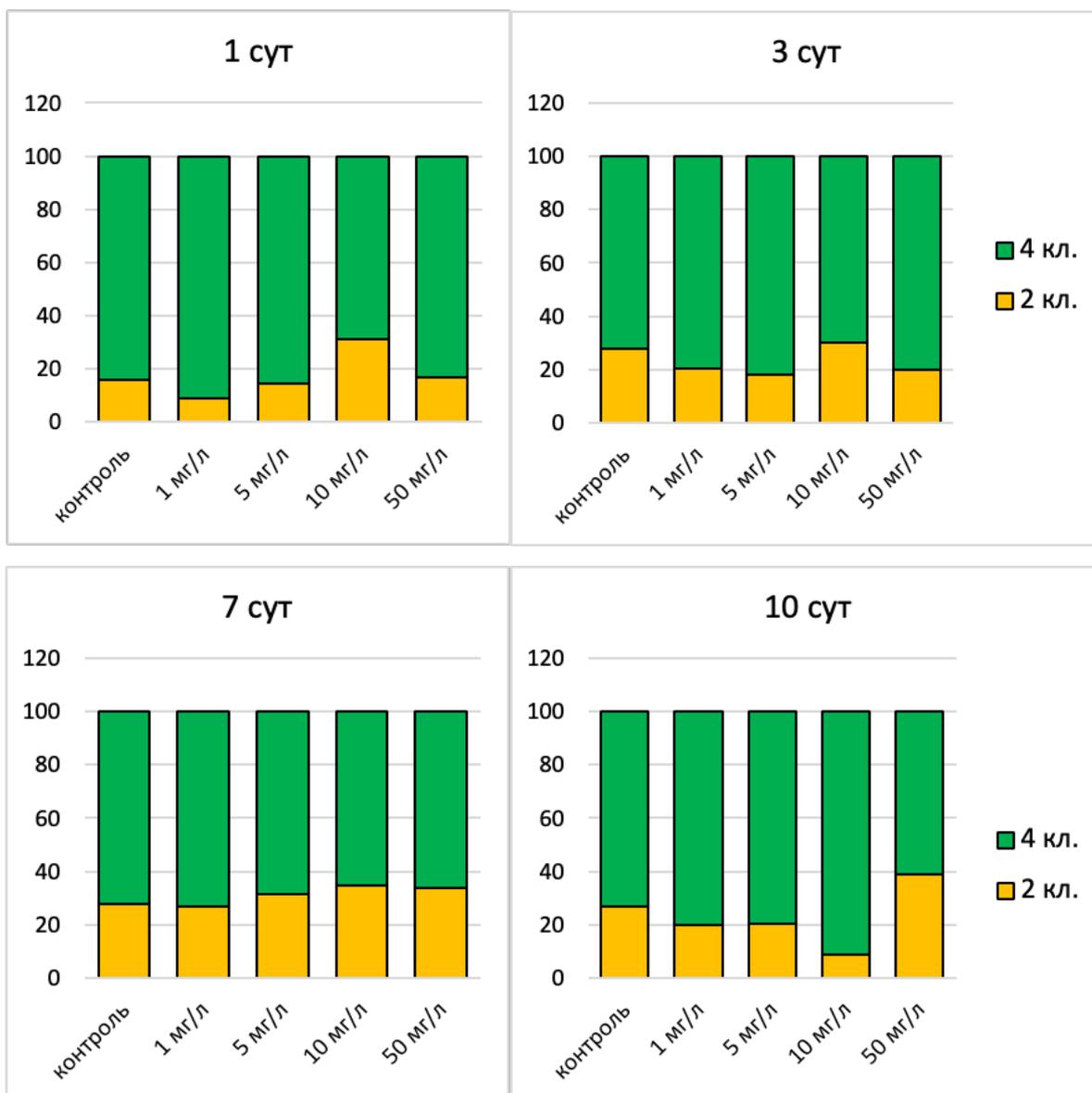


Рисунок 7. Влияние разных уровней воздействия наночастиц полистирола на изменение соотношения 2- и 4-клеточных ценобиев в культуре *Scenedesmus quadricauda* на определенный срок наблюдения.

Дополнительно была рассчитана встречаемость клеток с разной шириной в присутствии ПС-НЧ на 2 сут (рис. 8), 4 сут (рис. 9) и 7 сут опыта (рис. 10). А длина клеток практически не менялась как в опыте, так и в контроле.

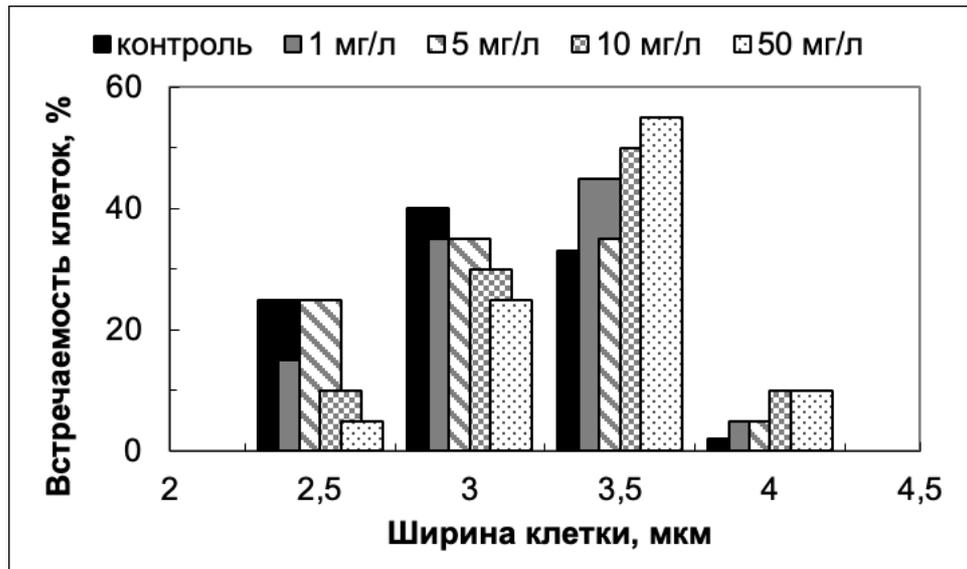


Рисунок 8. Влияние разных уровней воздействия наночастиц полистирола на изменение ширины клеток в культуре *Scenedesmus quadricauda* на 2 сут.

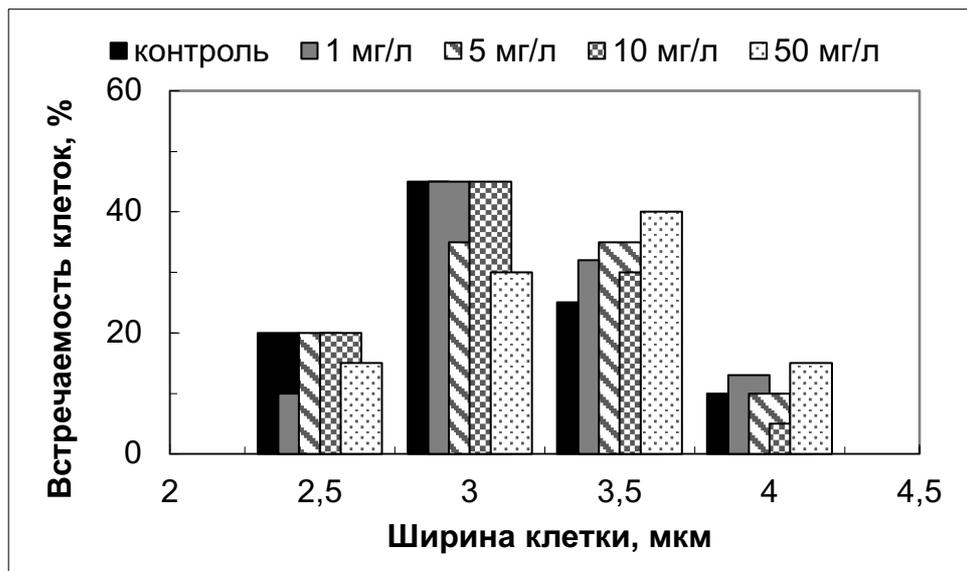


Рисунок 9. Влияние разных уровней воздействия наночастиц полистирола на изменение ширины клеток в культуре *Scenedesmus quadricauda* на 4 сут.

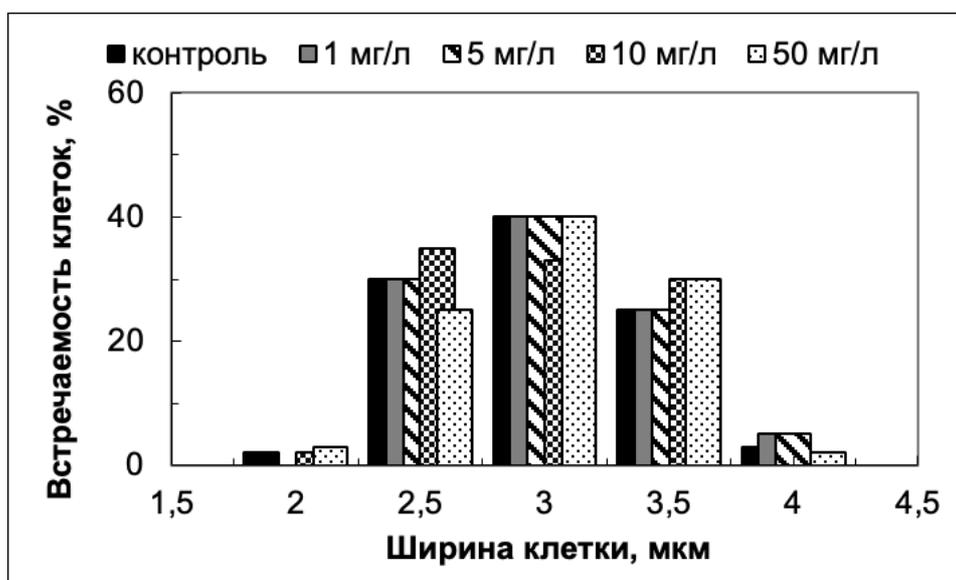


Рисунок 10. Влияние разных уровней воздействия наночастиц полистирола на изменение ширины клеток в культуре *Scenedesmus quadricauda* на 7 сут.

На 2 сут опыта как в контроле, так и в опыте отмечена наибольшая встречаемость клеток шириной 3–3,5 мкм. Однако в контроле обнаружено больше всего клеток с шириной 3 мкм, а при всех концентрациях ПС-НЧ по сравнению с контролем увеличивалась доля более крупных клеток размерного ряда 3,5 и 4 мкм, что свидетельствует о задержке деления клеток на 2 сут опыта в присутствии всех концентраций ПС-НЧ. Сравнение этих данных с данными по численности клеток свидетельствует о том, что сразу после добавления ПС-НЧ культура при малых концентрациях 1 и 5 мг/л отвечает стимуляцией роста вследствие ускоренного деления части клеток в популяции, но в дальнейшем уже на 2 сут в популяции увеличивается доля крупных клеток и их деление происходит несинхронно с контролем.

На 4 сут опыта максимальная и близкая встречаемость клеток шириной 3 мкм отмечена в контроле и при 1 и 10 мг/л ПС-НЧ. При этом, как и на 2 сут, при всех концентрациях ПС-НЧ по сравнению с контролем увеличивается доля крупных клеток 3,5 мкм, и 4 мкм за исключением концентрации 10 мг/л, при которой доля клеток 4 мкм была в 2 раза меньше уровня контроля. Таким образом,

укрупнение клеток в популяции на 4 сут опыта при токсическом воздействии ПС-НЧ говорит о том, что задержка деления клеток сохраняется.

На 7 сут опыта доля самых крупных клеток 3,5–4 мкм уменьшается, а доля мелких клеток 2,5 мкм увеличивается. Появляется также новая размерная группа клеток 2 мкм как в контроле, так и при 10 и 50 мг/л ПС-НЧ, что свидетельствует об уже произошедшем делении у части клеток в популяции.

Таким образом, встречаемость клеток разной размерной группы может служить хорошим показателем размерной структуры популяции в норме и при токсическом воздействии. Полученные нами данные свидетельствуют о задержке деления у части клеток в популяции в присутствии исследованных концентраций ПС-НЧ в начале опыта на 2 и 4 сут и последующем восстановлении размерной структуры популяции к 7 сут опыта.

Полученные нами данные о влиянии ПС-НЧ на размеры клеток согласуются с результатами работы (Khoshnamvand et al., 2021), в которой оценивали токсические эффекты нанопластиков полистирола с размером частиц 90, 200 и 300 нм на зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris*. Мелкие частицы оказались более токсичными, чем крупные, и вызывали морфологические изменения, так что плотность/размер водоросли уменьшалась. При высоких концентрациях НЧ-ПС за счет электростатического взаимодействия с полисахаридной стенкой водоросли образовывались крупные агрегаты. Такая адсорбция их на клетках водорослей ограничивает перенос веществ, газообмен и энергии между водной средой и клетками, что указывает на серьезные экологические последствия, поскольку микроводоросли являются важными первичными продуцентами.

Доля живых клеток в популяции микроводоросли *S. quadricauda* мало менялась в присутствии ПС-НЧ по сравнению с контролем и в большинстве случаев разница не превышала 1–6%. (табл. 13). Лишь при 10 мг/л на 1 сут наблюдали однократное уменьшение количества живых клеток на 10% по сравнению с контролем. Уменьшение доли живых клеток в начале опыта

свидетельствует об адаптивной реакции популяции на такое воздействие, что в дальнейшем приводит к восстановлению популяции к концу опыта на 10 сут и было подтверждено нами также данными по численности клеток и уменьшения доли 2-х клеточных ценобиев.

Таблица 13. Доля живых клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии наночастиц полистирола в интервале концентраций 1–50 мг/л.

Срок, сут	Доля живых клеток, %				
	контроль	1	5	10	50
3	99±1	99±1	96±2	89±4	97±1
7	99±1	99±1	96±2	93±3	96±2
10	99±1	99±1	99±1	97±1	97±1
14	99±1	97±2	99±1	98±1	97±2

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Как показали наши исследования, токсичность наночастиц полистирола зависит от его концентрации, времени воздействия и оцениваемого тест-параметра.

Используя разные структурные и функциональные показатели состояния лабораторной популяции клеток *S. quadricauda* нами обнаружена неоднозначная мозаичная ответная реакция тест-культуры на присутствие 100 нм частиц интактного полистирола в культуральной среде в интервале исследованных концентраций 1–50 мг/л. Общебиологические интегральные показатели численность клеток и выживаемость популяции (доля живых клеток), а также такие структурные показатели, как размер клеток и количество клеток в ценобии, меняются несинхронно как между собой, так и с физиологическим показателем (эффективностью фотосинтеза).

Согласно ранее опубликованным нами данным (Лазарева и др., 2021), в присутствии частиц 6 видов состаренного и интактного МП, численность клеток в

процессе роста культуры меняется как в сторону угнетения, так и в сторону стимуляции, при этом процесс фотосинтеза изменяется незначительно, но происходят сильные нарушения в клетках на молекулярном уровне, вызванные окислительным стрессом. Причем микрочастицы состаренного полистирола более токсичны интактного.

В связи с этим в эксперименте необходимо применять сочетание структурных и функциональных показателей состояния популяции клеток *S. quadricauda*, используемой в качестве тест-организма, для более адекватной оценки токсичности нанопластика.

По данным литературы современные уровни МП в окружающей среде не оказывают значительного воздействия на рост микроводорослей (Suaria et al., 2016). Большинство испытанных концентраций МП в экспериментах, описанных в литературе, в значительной степени превосходят те, которые встречаются в окружающей среде.

К сожалению, аналитические измерения уровней наноматериалов в реальных экологических системах практически отсутствуют (Lead et al., 2018).

В настоящее время известно, что существуют наноспецифические эффекты биодоступности и токсичности наноматериалов (НМ), но это относится не ко всем НМ, организмам и соответствующим процессам. Наблюдается значительная разница в скорости биопоглощения (Khan et al., 2012, Thit et al., 2015) и молекулярного поведения (Taylor et al., 2016), когда один и тот же элемент находится в наноразмерной фазе по сравнению с растворенной формой или более крупной фазой частиц. Возникает парадигма, согласно которой НМ менее токсичны, чем эквивалентные растворимые материалы, но более токсичны, чем соответствующие сыпучие материалы (Lead et al., 2018).

Индустрия нанотехнологий продолжает расти, так что выбросы и нагрузка на окружающую среду быстро увеличиваются. Инновации в области нанотехнологий продолжают быстрыми темпами благодаря разработке более

сложных и полезных наноматериалов и продуктов, обладающих физико-химической и биологической активностью. Более новые НМ, вероятно, будут более устойчивыми и стабильными, меньшими по размеру и многофункциональными, что подчеркивает необходимость понимания их потенциального непреднамеренного воздействия. Эти неопределенности и быстрые изменения означают, что существует потенциальный риск для окружающей среды и здоровья человека, который нельзя игнорировать.

Как свидетельствуют наши данные по оценке токсичности наночастиц полистирола на пресноводный вид зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, являющийся важным звеном в пищевой сети пресноводных экосистем, и ответственным за производство кислорода в водной среде, многие структурные и физиологические показатели состояния популяции видов сообществ фитопланктона могут быть нарушены, что в дальнейшем может привести к серьезным нарушениям пищевой сети и последствиям для функционирования водных экосистем в целом.

3.1.1.4. Адгезия планктонных водорослей на частицах микропластика

Для изучения адгезии планктонных одноклеточных водорослей на частицах микропластика (МП) в качестве тест-организма была выбрана пресноводная микроводоросль *S. quadricauda*. Для обеспечения визуализации МП при его нахождении и поведении в среде с клетками микроводоросли использовали образец полиэтилена (ПЭТ) красного цвета с добавлением флуоресцентного красителя.

МП был получен с помощью механической фрагментации исходного образца – пищевой ПЭТ бутылки красного цвета. Средний размер частиц составил 110–150 мкм, форма частиц – нерегулярная, плавучесть – близка к отрицательной. Массовая доля частиц в эксперименте – 50 мг/л.

Для проведения эксперимента культуру водоросли *S. quadricauda* выращивали на среде Успенского № 1 в климатостате. Численность культуры водорослей в эксперименте – 50 тыс. кл/мл. Оценку адгезии клеток на частицах МП проводили через 60 мин, 24 и 48 ч с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Микромед № 1709393 (класс I) с объективом 4х и окулярами 10х, оснащенного системой визуализации TourCam 5.1 MP под УФ светом.

Через 60 мин инкубации наблюдали редкие случаи присутствия единичных клеток на частицах МП (рис. 11). При падающем УФ свете живые клетки микроводоросли светятся красным светом.

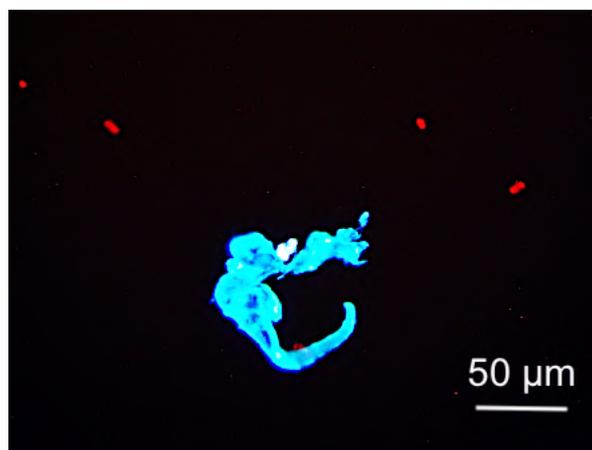


Рисунок 11. Единичные случаи адгезии клеток водоросли *Scenedesmus quadricauda* на частицах МП в культуральной среде через 60 мин инкубации (под люминесцентным микроскопом Микромед, оснащенного системой визуализации TourCam 5.1 MP под УФ светом).

Спустя 24 ч пребывания МП в среде с клетками водоросли наблюдали увеличение числа случаев адгезии клеток на частицах МП (рис. 12). При этом заметно, что в большинстве случаев клетки контактируют не с пластиком напрямую, а со взвесью, осевшей на частицах МП.

Эта тенденция сохраняется и спустя 48 ч пребывания МП в среде с клетками водоросли (рис. 13).

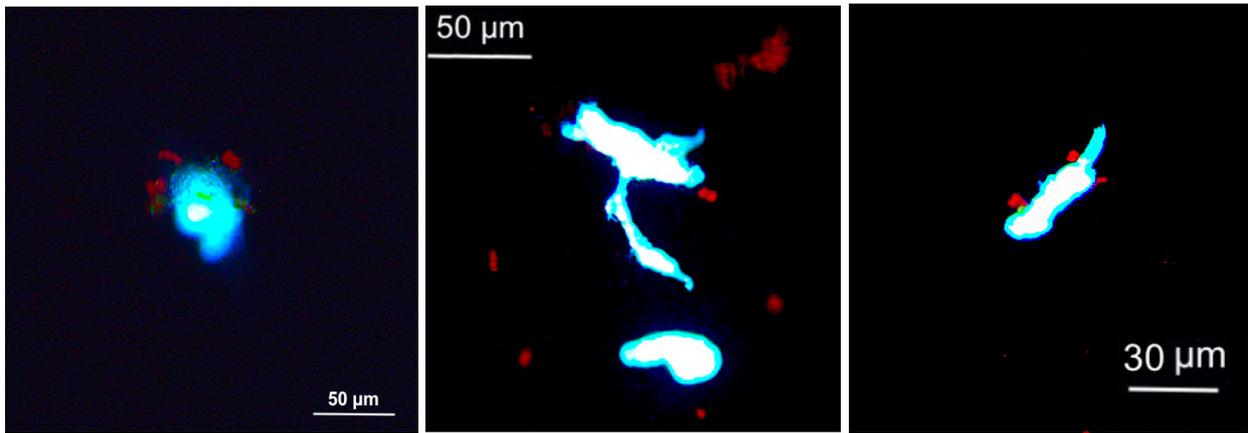


Рисунок 12. Адгезия клеток водоросли *Scenedesmus quadricauda* на частицах МП через 24 ч инкубации.

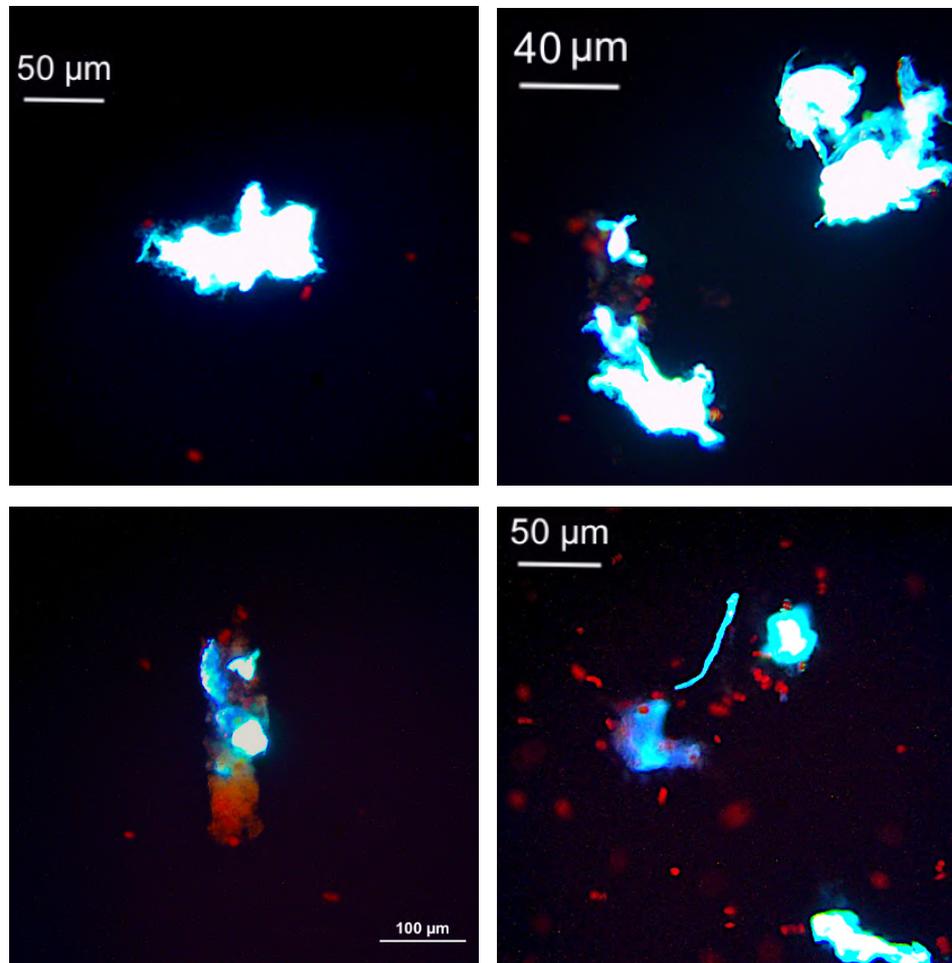


Рисунок 13. Адгезия клеток водорослей на частицах МП через 48 ч инкубации.

Через 48 ч, как и через 24 ч, большая часть клеток контактируют не с пластиком напрямую, а со взвесью, осевшей на частицах МП. При этом встречаются одиночные клетки, которые контактируют напрямую с частицами МП.

Таким образом, результаты 48-ч эксперимента свидетельствуют о достаточно быстрой адгезии клеток и частиц МП в водной среде уже через один час после добавления в среду частиц МП и усилении налипания клеток на эти частицы со временем. Полученные данные поведения клеток микроводорослей и МП при их совместном присутствии в жидкой питательной среде согласуются с данными литературы. Известно, что МП может накапливаться в экзополимерных соединениях водорослей (EPS), выделяемых водорослями, уменьшая доступность света, меняя биодоступность углерода (Chen et al., 2011; Long et al., 2017; Yokota et al., 2017; Canniff, Hoang, 2018; Mao et al., 2018). Частицы МП могут использоваться в качестве транспортного средства для трансграничного переноса микробных видов (Rosato et al., 2020). Кроме того, из-за их уникальных свойств – высокой площади поверхности и пористости (Alimi et al., 2018), МП эффективно адсорбирует стойкие органические загрязнители и неорганические загрязнения (Rochman et al., 2015; Fernando et al., 2021), поэтому может быть переносчиком опасных загрязнителей и в конечном итоге оказывать неблагоприятное воздействие на все организмы водных экосистем.

3.1.2. Оценка токсичности водорастворимых фуллеренов C₆₀ и C₇₀ с использованием тест-организма *Scenedesmus quadricauda*²

Действие фуллеренов C₆₀ и C₇₀ на культуру *S. quadricauda* оценивали при концентрациях 1, 5 и 10 мг/л. Длительность хронического опыта составила 17 сут.

² При подготовке подраздела 3.1.2 использованы результаты, ранее опубликованные автором в статье Даллакян и др., 2021.

Основные показатели для оценки состояния культуры: изменение численности клеток, соотношения живых и мёртвых клеток, эффективности фотосинтеза в динамике её развития.

Численность клеток *S. quadricauda* во всех пробах с фуллереном C₆₀ во время роста культуры была на уровне или выше, чем в контроле (рис. 14). Начиная с 10 сут опыта, отмечена достоверная стимуляция роста тест-культуры в пределах 8–12% при 5 мг/л и в пределах 12–27% при 10 мг/л фуллерена C₆₀. А в присутствии 1 мг/л рост культуры находился на уровне контроля на протяжении всего опыта.

При концентрации 10 мг/л фуллерена C₆₀, начиная с 3-х сут роста культуры, величина эффективности фотосинтеза увеличивалась и достигала максимума на 14 сут (20% по отношению к контролю), а при концентрациях 1 и 5 мг/л достоверных различий не обнаружено (рис. 15).

Таким образом, фуллерен C₆₀ оказывает стимулирующее действие как на изменение численности клеток водоросли, так и на величину эффективности фотосинтеза.

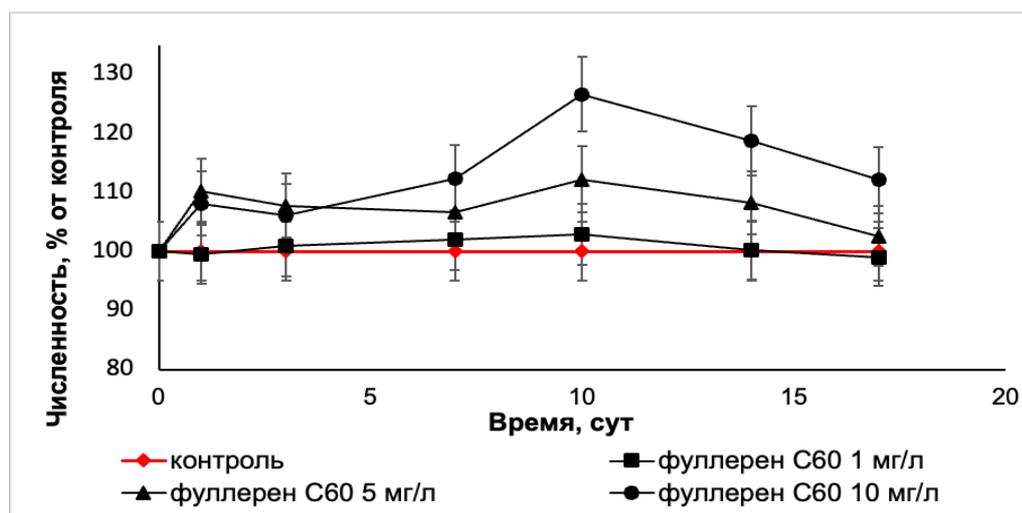


Рисунок 14. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в процессе роста в присутствии фуллерена C₆₀.

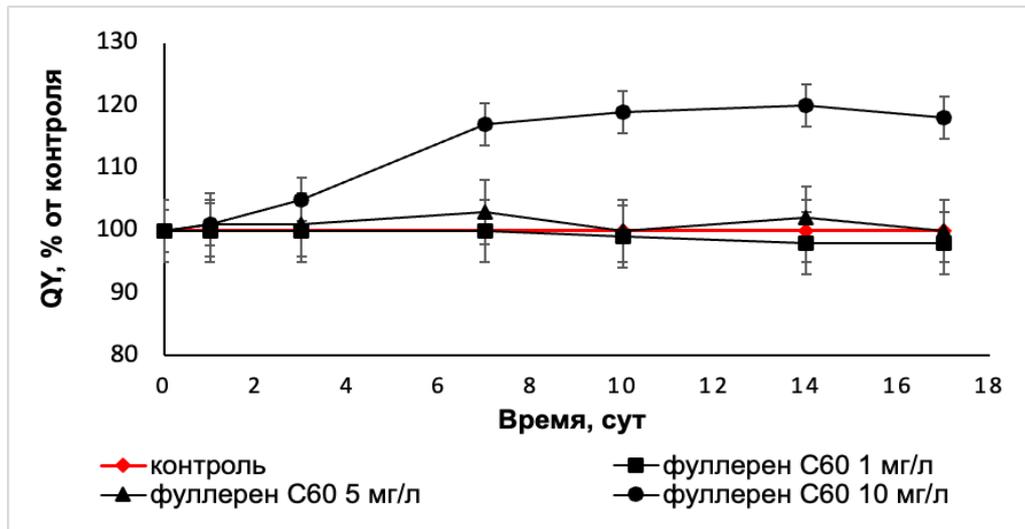


Рисунок 15. Влияние фуллерена C_{60} на эффективность фотосинтеза (F_v/F_m , %) в процессе роста культуры *Scenedesmus quadricauda*.

Влияние фуллерена C_{70} на численность клеток было исследовано в таком же диапазоне концентраций (1–10 мг/л) (рис. 16). Концентрации 1 и 5 мг/л не оказали значимого влияния на изменение численности клеток. А при 10 мг/л в процессе роста наблюдали достоверную стимуляцию роста культуры на 4–20%, начиная с 3-х сут опыта.

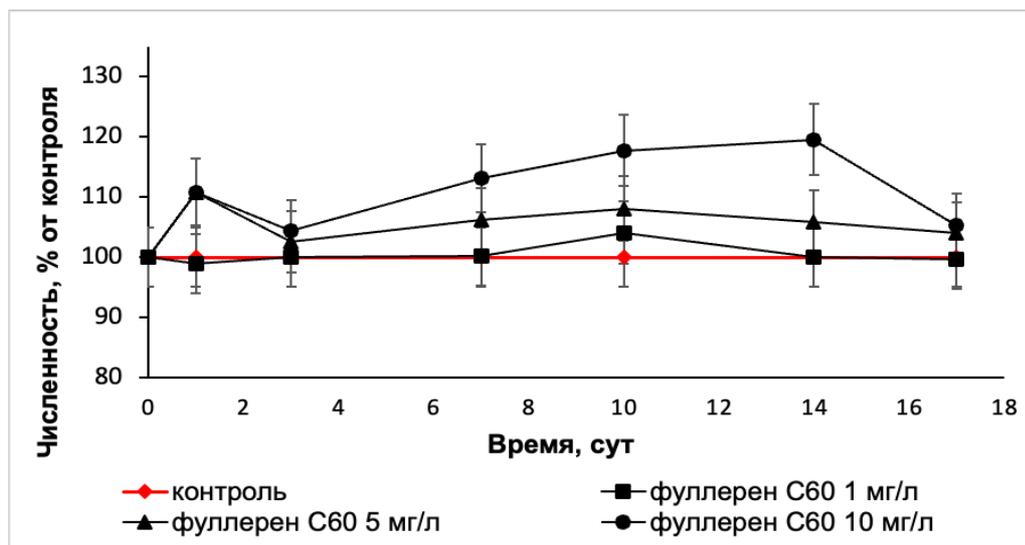


Рисунок 16. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в процессе роста в присутствии фуллерена C_{70} .

При концентрации 10 мг/л фуллерена C_{70} , начиная с 3-х сут роста культуры, эффективность фотосинтеза увеличивалась и достигала своего максимума (14% по отношению к контролю) на 14 сут роста (рис. 17), а в концентрациях 1 и 5 мг/л достоверных различий по эффективности фотосинтеза не обнаружено. Полученные данные по действию фуллеренов на величину эффективности фотосинтеза во время роста культуры свидетельствуют о том, что действие фуллерена C_{70} слабее, чем фуллерена C_{60} .

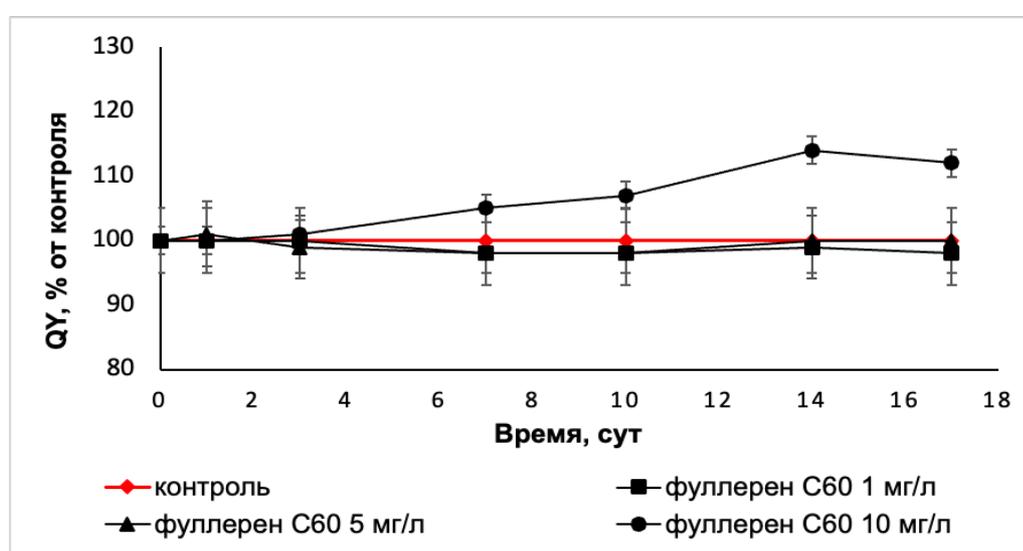


Рисунок 17. Влияние фуллерена C_{70} на эффективность фотосинтеза (F_v/F_m , %) в процессе роста культуры *Scenedesmus quadricauda*.

Таким образом, данные по численности клеток хорошо согласуются с данными по эффективности фотосинтеза.

Результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии, при добавлении в среду в диапазоне исследованных концентраций 1–10 мг/л как фуллерена C_{60} , так и фуллерена C_{70} , показали, что на протяжении двух экспериментов в контроле доля мертвых клеток составляла всего 1–2%, а во всех опытных образцах была на уровне контроля.

Таким образом, было показано, что добавка фуллеренов C_{60} и C_{70} в среду культивирования приводит к лучшему росту культуры, как по интегральному общебиологическому показателю численности клеток, так и по функциональному показателю величине эффективности фотосинтеза, характеризующему физиологическое состояние изучаемого тест-организма. При этом фуллерен C_{60} оказывает более сильное стимулирующее действие на рост культуры, уже начиная с концентрации 5 мг/л, в отличие от фуллерена C_{70} , который оказывает стимулирующее действие при концентрации 10 мг/л.

На основании данных литературы можно предположить, что одна из возможных причин стимуляции роста водорослей связана с антиоксидативной активностью фуллеренов (Думпис и др., 2018), которые стабилизируют свободнорадикальные процессы в клетке и инактивируют активные формы кислорода, образующиеся в среде культивирования во время роста культуры. Кроме того, фуллерены, проникая в клетку благодаря своим мембранотропным свойствам (Панова и др., 2018), по-видимому, влияют на темп деления клеток, способствуя усиленному росту клеток водорослей. Ранее было показано, что фуллерен C_{60} стимулировал рост природного и аквариального бактериопланктона (Мошарова, 2019). Стимуляция бактериальной флоры в питательной среде водорослей может также способствовать росту клеток водорослей.

Необходимы дальнейшие биохимические исследования влияния фуллеренов на рост водорослей для установления возможных причин их благоприятного воздействия на первичное звено водных экосистем. Проведение биотестирования вновь синтезированных веществ и соединений на стандартных тест-организмах с целью установления их токсичности или стимуляции роста позволит в будущем защитить водные экосистемы от их загрязнения.

3.2. Токсикологический анализ комбинированных эффектов наночастиц полистирола с другими токсикантами различной природы

3.2.1. Действие наночастиц полистирола в комбинации с хромом на культуру *Chlorella vulgaris*

Данные отдельного и совместного действия изучаемых добавок в парных комбинациях их концентраций на тест-культуру *C. vulgaris* приведены в табл. 14–15 и на рис. 18–19.

Таблица 14. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (по оптической плотности OD) в присутствии в среде культивирования хрома (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (опыт 1).

Срок, сут	OD								
	контроль	НП 10	НП 50	Cr 0,5	Cr 2,5	Cr 0,5 + НП 10	Cr 2,5 + НП 10	Cr 0,5 + НП 50	Cr 2,5 + НП 50
1	0,038±	0,041±	0,047±	0,037±	0,029±	0,044±	0,033±	0,031±	0,056±
	0,004	0,008	0,004	0,003	0,001	0,001	0,001	0,002	0,009
	100%	107,9%	123,6%	97,4%	74,8%	114,8%	86,1%	81,7%	145,2%
2	0,165±	0,162±	0,181±	0,152±	0,114±	0,173±	0,117±	0,176±	0,164±
	0,017	0,014	0,017	0,010	0,004	0,015	0,012	0,014	0,012
	100%	98,2%	109,7%	91,9%	69,3%	104,6%	70,9%	106,5%	99,6%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$, **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, **оранжевым** цветом – по типу нейтрализма, **красным** – по типу синергизма.

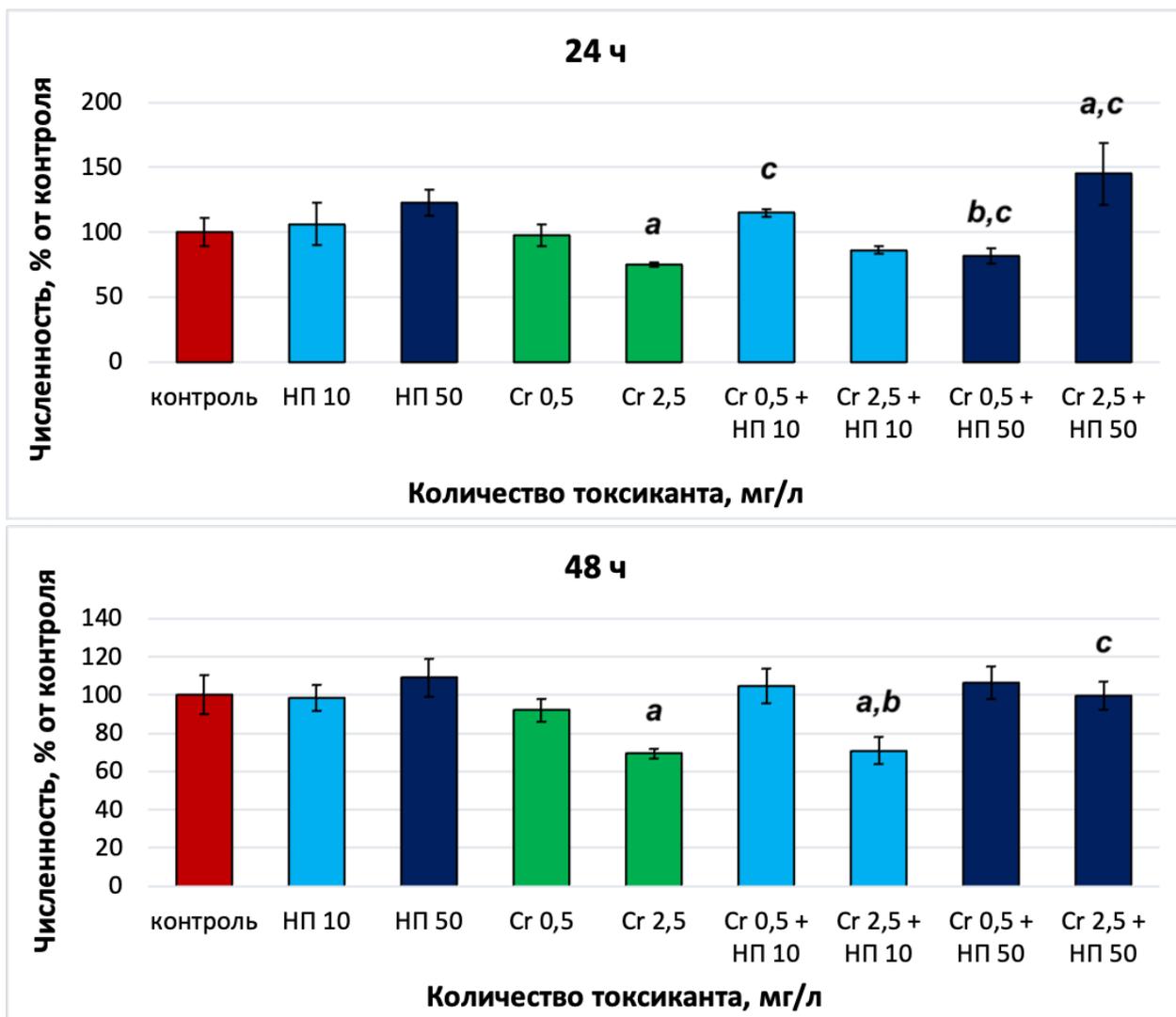


Рисунок 18. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (в % от контроля) через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования хрома и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (опыт 1) (*a*, *b*, *c* – значимые отличия опытных значений по критерию Даннета при $p < 0,05$: *a* – от чистого контроля, *b* – от значений в опыте с нанопластиком в соответствующей концентрации, *c* – от значений в опыте с токсическим веществом в соответствующей концентрации).

Таблица 15. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (по оптической плотности OD) в присутствии в среде культивирования хрома и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (опыт 2).

Срок, сут	OD								
	контроль	НП 10	НП 50	Cr 1	Cr 5	Cr 1 + НП 10	Cr 1 + НП 50	Cr 5 + НП 10	Cr 5 + НП 50
1	0,041± 0,002	0,043± 0,009	0,047± 0,007	0,039± 0,003	0,020± 0,001	0,044± 0,002	0,062± 0,04	0,016± 0,001	0,059± 0,007
	100%	104,9%	114,6%	94,4%	47,6%	105,6%	150,0%	37,9%	143,5%
2	0,125± 0,008	0,120± 0,011	0,138± 0,009	0,105± 0,002	0,023± 0,003	0,128± 0,001	0,147± 0,012	0,022± 0,001	0,065± 0,008
	100%	96,0%	110,4%	83,8%	18,6%	101,9%	117,0%	17,3%	51,6%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$, **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, **оранжевым** цветом – по типу нейтрализма, **красным** – по типу синергизма.

Как видно из табл. 14, концентрация 10 мг/л НП не оказывала значимого влияния на культуру *C. vulgaris*, а 50 мг/л вызывала достоверное стимулирующее действие на 24% на 1 сут. Эти данные согласуются с результатами нашей предыдущей работы по влиянию НП на изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (Лазарева и др., 2023).

Концентрация хрома 0,5 мг/л была нетоксичной (табл. 14), а концентрации 1; 2,5 и 5 мг/л (табл. 14, 15) вызывали угнетение роста. При этом максимальная концентрация (5 мг/л), из всех испытанных в опыте, вызывала сильное достоверное угнетение роста на 81% ко 2 суткам опыта.

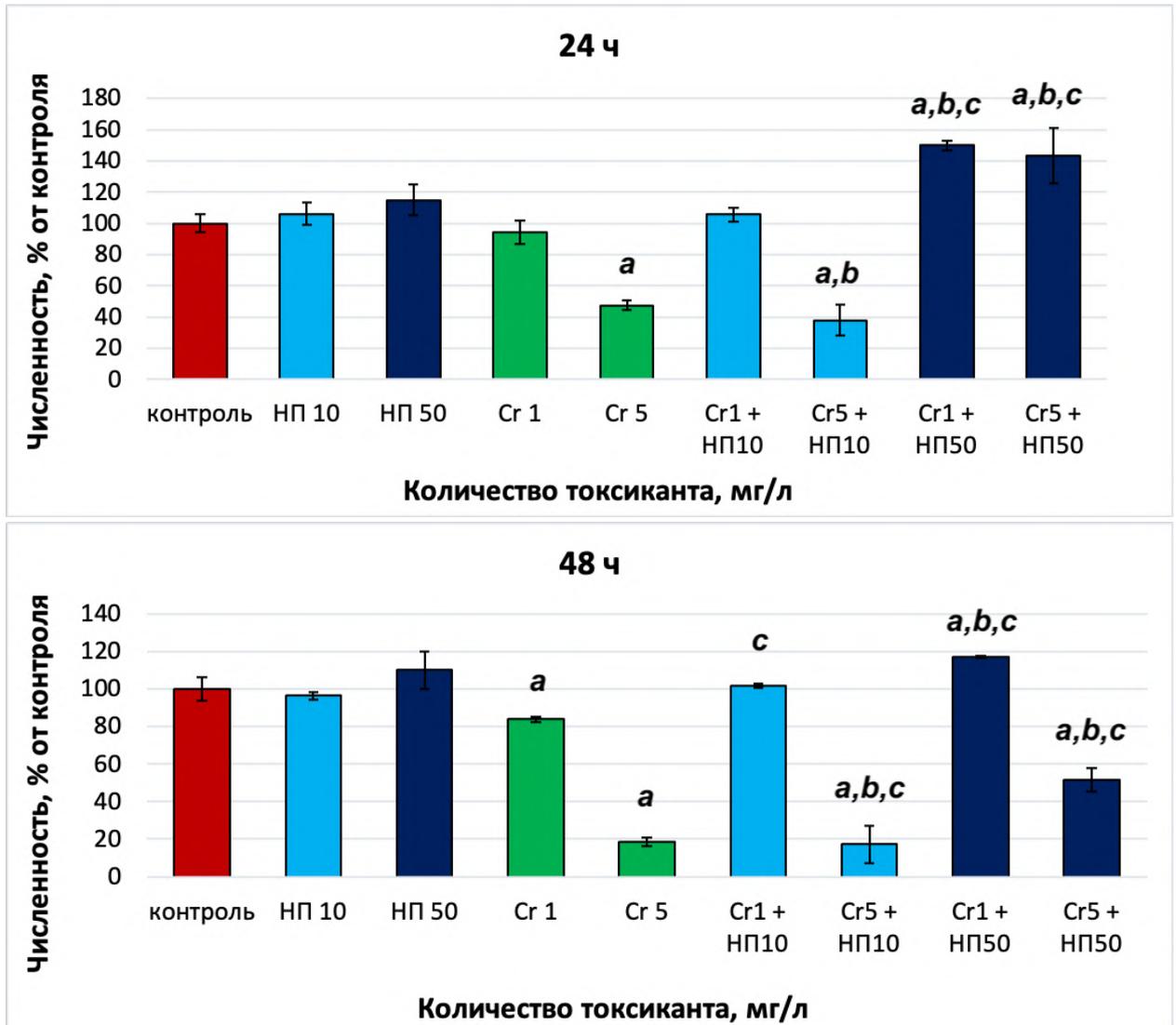


Рисунок 19. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (в % от контроля) через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования хрома и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (опыт 2) (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

По показателю численности клеток в % по отношению к контролю больше всего случаев (12 случаев из 16 комбинаций) отмечено для взаимодействия исследуемых добавок по типу антагонизма (в табл. 14 и 15 эти случаи выделены зеленым цветом). Два значимых случая синергизма обнаружены только при комбинациях Cr 0,5 + НП 50 мг/л и Cr 5 + НП 10 мг/л однократно и только на 1 сут, т.е. при сочетаниях максимальной концентрации НП и минимальной концентрации хрома, а также при максимальной концентрации хрома и минимальной концентрации НП.

Независимое действие токсикантов (нейтрализм, аддитивность) отмечено при комбинациях малой концентрации НП и высоких концентраций хрома Cr 2,5 + НП 10 и Cr 5 + НП 10 мг/л только на 2 сут (в табл. 14 и 15 отмечено оранжевым цветом).

Дополнительно нами было оценено комбинированное и отдельное воздействие изучаемых добавок на рост культуры по следующему расчетному показателю – отношению численности клеток в контроле к численности при одной из добавок и их комбинаций. Такая оценка воздействия показывает, во сколько раз по сравнению с контролем изменилась численность при внесении определенной комбинации токсикантов. Следует отметить, что, если оценка совместного воздействия НП и хрома равна произведению оценок при воздействии их порознь, такое комбинированное действие можно считать аддитивным.

На рис. 20 для *C. vulgaris* (по результатам опытов 1 и 2) представлены данные комбинированного действия добавок НП и хрома на изменение численности клеток на все сроки испытаний. По вертикальной оси отложены оценки комбинированного воздействия добавок на изменение численности клеток ($N_k/N_{(Cr, НП)}$, где N_k – численность клеток в контроле, а $N_{(Cr, НП)}$ – численность клеток в присутствии НП и Cr), а по горизонтальной оси – произведение оценок при действии их порознь $(N_k/N_{(Cr)}) \cdot (N_k/N_{(НП)})$. Точки, лежащие на биссектрисе или вблизи нее, указывают на аддитивность действия добавок в указанном нами ранее смысле. Отклонение точек от биссектрисы вниз свидетельствует об антагонизме или ослаблении совместного отрицательного действия добавок. Отклонение вверх указывает на синергизм или усиление отрицательного действия добавок относительно их аддитивного действия.

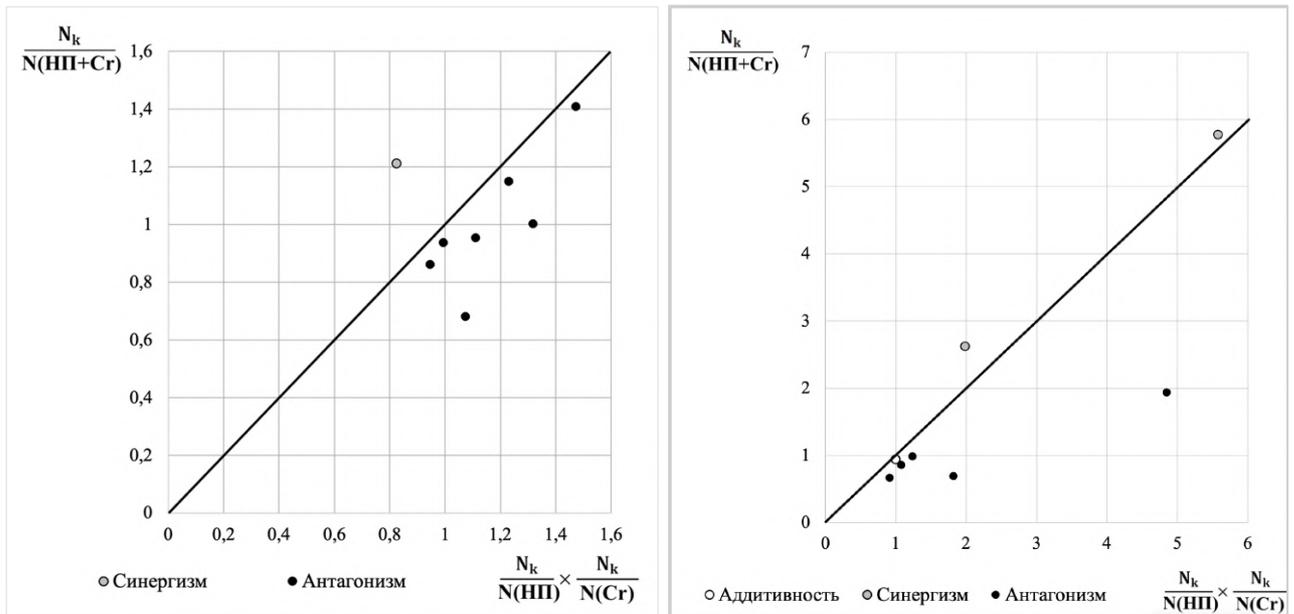


Рисунок 20. Зависимость между оценками комбинированного и раздельного действия хрома и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водоросли *Chlorella vulgaris* (опыт 1 – слева, опыт 2 – справа). N_k – контроль.

Полученные графики наглядно иллюстрируют отмеченные нами все три типа взаимодействия добавок в среде культивирования тест-объекта при комбинированном действии хрома и наночастиц полистирола по показателю изменения численности клеток водорослей.

Такая оценка комбинированного действия изучаемых добавок в 2 опытах свидетельствует о преобладании случаев антагонизма при их взаимодействии в культуральной среде в присутствии клеток культуры *C. vulgaris*.

Результаты данного исследования показывают, что комбинированный эффект хрома и наночастиц полистирола на культуру *C. vulgaris* по показателю численности клеток зависит как от концентраций этих добавок, так и от различных комбинаций их концентраций и времени действия. Взаимодействие этих токсикантов в среде культивирования чаще всего приводит к ослаблению токсического действия наиболее токсичного компонента среды на культуру в процессе ее роста. Тем не менее, при действии хрома и НП в бинарных комбинациях на численность клеток тест-культуры *C. vulgaris* были обнаружены

все три типа взаимодействий этих добавок в культуральной среде – антагонизм, нейтрализм и синергизм. По параметру численности клеток *C. vulgaris* антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП и хрома и дат наблюдения.

3.2.2. Действие наночастиц полистирола в комбинации с метиленовым синим на культуры *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda*

Данные отдельного и совместного действия изучаемых добавок НП и МС в парных комбинациях их концентраций на изменение численности клеток *C. vulgaris* приведены в табл. 16 и на рис 21. Контролем служил рост культур в чистой среде без НП и МС.

НП в концентрации 50 мг/л вызывал значимую стимуляцию роста *C. vulgaris* на 1 и 2 сут опыта (табл. 16), что выше 30% порога токсического действия, установленного методикой в случае стимулирующего эффекта, поэтому эту концентрацию следует рассматривать как токсическую.

Таблица 16. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (по оптической плотности OD) в присутствии в среде культивирования метиленового синего (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно.

Срок, сут	OD								
	контроль	НП 10	НП 50	НП 0,1	МС 0,5	МС 0,1 + НП 10	МС 0,1 + НП 50	МС 0,5 + НП 10	МС 0,5 + НП 50
1	0,06±0,01 100%	0,06±0,01 97,1%	0,14±0,01 216,9%	0,06±0,01 87,3%	0,04±0,01 64,6%	0,06±0,01 98,4%	0,05±0,01 74,6%	0,06±0,01 91,0%	0,06±0,01 89,4%
2	0,34±0,04 100%	0,40±0,04 117,8%	0,45±0,04 131,6%	0,34±0,02 99,5%	0,36±0,03 104,2%	0,36±0,03 106,3%	0,36±0,02 105,8%	0,33±0,01 97,9%	0,34±0,02 98,4%

Примечание: полужирным отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; светло-серым цветом – антагонизм, без выделения – нейтрализм, темно-серым цветом – синергизм взаимодействия добавок.

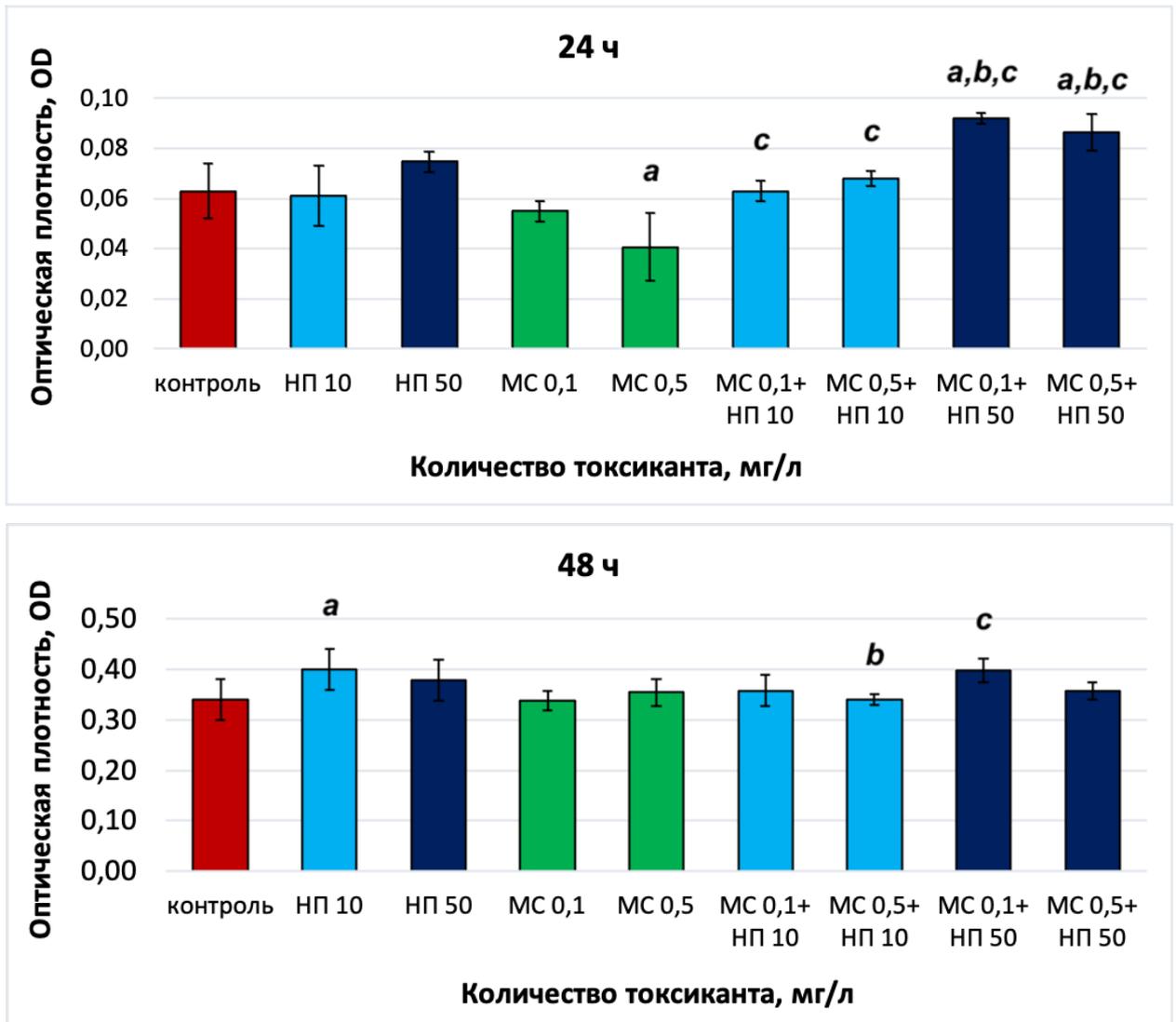


Рисунок 21. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования метиленового синего и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

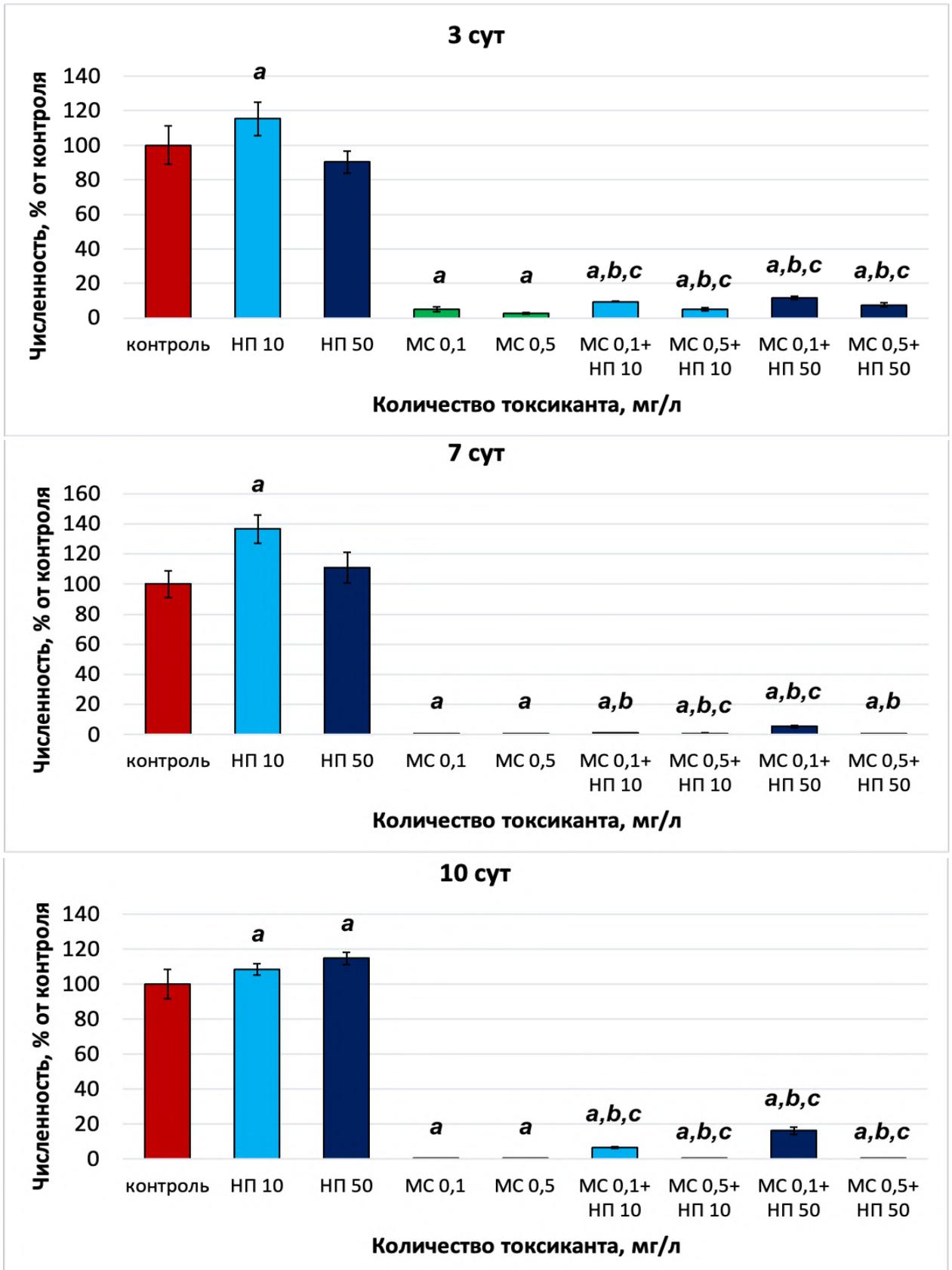
Такую сильную стимуляцию роста *C. vulgaris* в ответ на добавку НП можно объяснить реакцией культуры на стресс. А МС в концентрации 50 мг/л оказывал значимое угнетение роста на 1 сут на 35%, что выше 20% порога токсического действия, установленного методикой в случае угнетения роста. Фоновые значения оптической плотности самих частиц в среде с НП без клеток были приняты в расчет путем их вычитания из соответствующих значений с клетками.

Совместное присутствие обоих токсикантов в среде культивирования *C. vulgaris* приводило к достоверному угнетению роста на 25% только при

комбинации МС 0,1+НП 50 мг/л на 1 сут. Во всех остальных случаях отличия от контроля без токсикантов были незначимы. При этом следует отметить, что при совместном присутствии 10 и 50 мг/л НП и 0,1 и 0,5 мг/л МС в различных 8 комбинациях наблюдали улучшение роста (на 6–26%) в 4 случаях из 8 на 1–2 сут по сравнению с ростом в среде с соответствующими концентрациями МС без НП (в табл. 16 эти случаи отмечены светло-серым цветом).

Таким образом, можно говорить о тенденции ослабления токсического действия МС в присутствии НП в культуральной среде *C. vulgaris* вследствие взаимодействия этих токсикантов по типу антагонизма.

Результаты хронического опыта с культурой *S. quadricauda* представлены в табл. 17 и на рис. 22. НП при 10 и 50 мг/л вызывал достоверную стимуляцию роста на 14–37% только в 3 случаях из всех дат наблюдений, а в остальные сроки стимуляция была незначима. Достоверного угнетения роста при этом отмечено не было. Эти данные согласуются с результатами нашей предыдущей работы по влиянию НП на изменение численности клеток *S. quadricauda* (Лазарева и др., 2023). МС при всех испытанных концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л оказывал сильное ингибирование роста культуры на 95–99% на протяжении всего опыта.



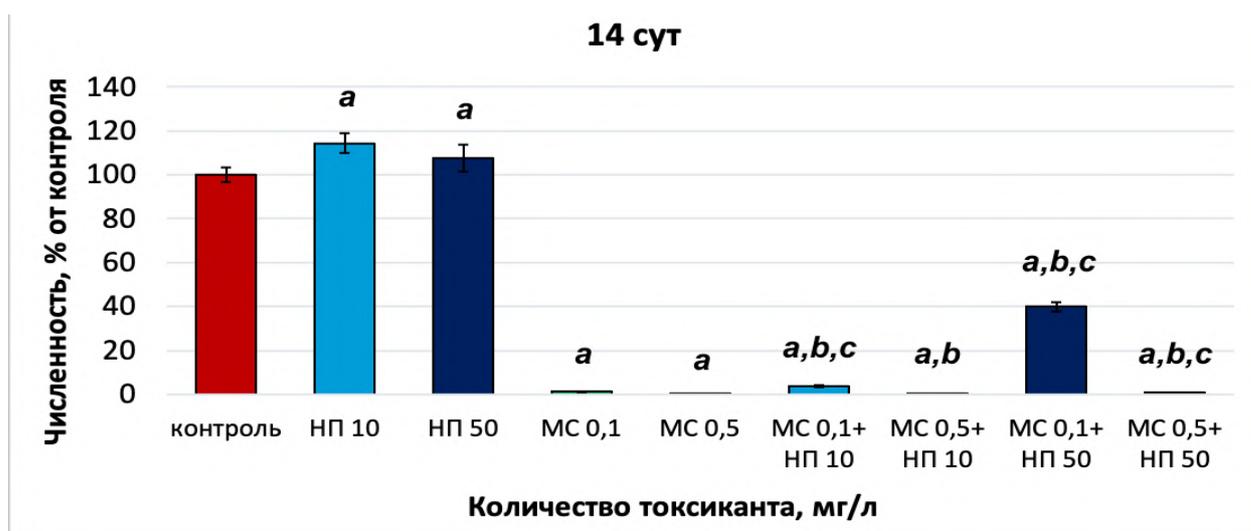


Рисунок 22. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде метиленового синего и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

Таблица 17. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в дес. тыс. кл/мл и в % от контроля) в присутствии в среде культивирования метиленового синего и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно.

Срок, сут	Численность клеток								
	контроль	НП 10 мг/л	НП 50 мг/л	МС 0,1 мг/л	МС 0,5 мг/л	МС 0,1 + НП 10 мг/л	МС 0,1 + НП 50 мг/л	МС 0,5 + НП 10 мг/л	МС 0,5 + НП 50 мг/л
3	24±3 100%	28±3 115,3%	21,7±1,7 90,3%	1,2±0,4 4,9%	0,6±0,1 2,5%	2,3±0,1 9,4%	1,2±0,3 5,0%	2,8±0,2 11,5%	1,8±0,3 7,5%
7	151±15 100%	207±16 136,6%	68,0±17,7 111,0%	1,2±0,1 0,8%	0,6±0,2 0,4%	1,9±0,1 1,3%	1,3±0,4 0,9%	8±1 5,5%	0,4±0,1 0,3%
10	279±27 100%	303±10 108,2%	320±11 114,8%	2,1±0,4 0,7%	1,4±0,2 0,5%	19±2 6,7%	1,4±0,4 0,5%	46±6 16,3%	0,8±0,3 0,3%
14	347±13 100%	397±17 114,4%	373±24 107,7%	5±1 1,4%	0,8±0,2 0,2%	13±1 3,8%	0,7±0,2 0,2%	138±8 39,9%	3±1 0,9%

Примечание: полужирным отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; светло-серым цветом – антагонизм, без выделения – нейтрализм взаимодействия добавок.

При одновременном присутствии НП и МС наблюдали достоверное ослабление токсического действия МС в комбинациях МС 0,1+НП 10 мг/л и МС 0,5+НП 10 мг/л на протяжении всего опыта и в комбинации МС 0,5+НП 50 мг/л на 3 сут вследствие взаимодействия частиц НП и МС в среде по типу антагонизма (в табл. 17 отмечено светло-серым цветом). Такое антагонистическое действие частиц разной природы можно объяснить их физико-химическими свойствами и адгезией наночастиц частиц полистирола и частиц метиленовой сини вследствие их налипания при контакте, что, возможно, и приводило к снижению токсичности наиболее токсичного компонента.

В комбинациях МС 0,1+НП 50 мг/л на все сроки наблюдений и МС 0,5+НП 50 мг/л на 7 – 14 сут антагонистического и синергетического действия частиц НП и МС обнаружено не было. Взаимодействие в этих случаях было нейтральным по типу аддитивности или независимого действия частиц разной природы на культуру *S. quadricauda*.

Дополнительно было оценено комбинированное и раздельное воздействие изучаемых добавок на рост культур по следующему расчетному показателю – отношению численности клеток в контроле к численности при одной из добавок и их комбинаций. Такая оценка воздействия показывает, во сколько раз по сравнению с контролем изменилась численность при внесении определенной комбинации токсикантов. Следует отметить, что, если оценка совместного воздействия НП и МС равна произведению оценок при воздействии их порознь, такое комбинированное действие можно считать аддитивным.

На рис. 23 представлены данные комбинированного действия добавок НП и МС на изменение численности клеток соответственно *C. vulgaris* и *S. quadricauda* на все сроки испытаний. По вертикальной оси отложены оценки комбинированного воздействия добавок на изменение численности клеток, а по горизонтальной оси произведение оценок при действии их порознь. Точки, лежащие на биссектрисе или вблизи нее, указывают на аддитивность действия

добавок в указанном нами ранее смысле. Отклонение точек от биссектрисы вниз свидетельствует об антагонизме или ослаблении совместного отрицательного действия добавок. Отклонение вверх указывает на синергизм или усиление отрицательного действия добавок относительно их аддитивного действия.

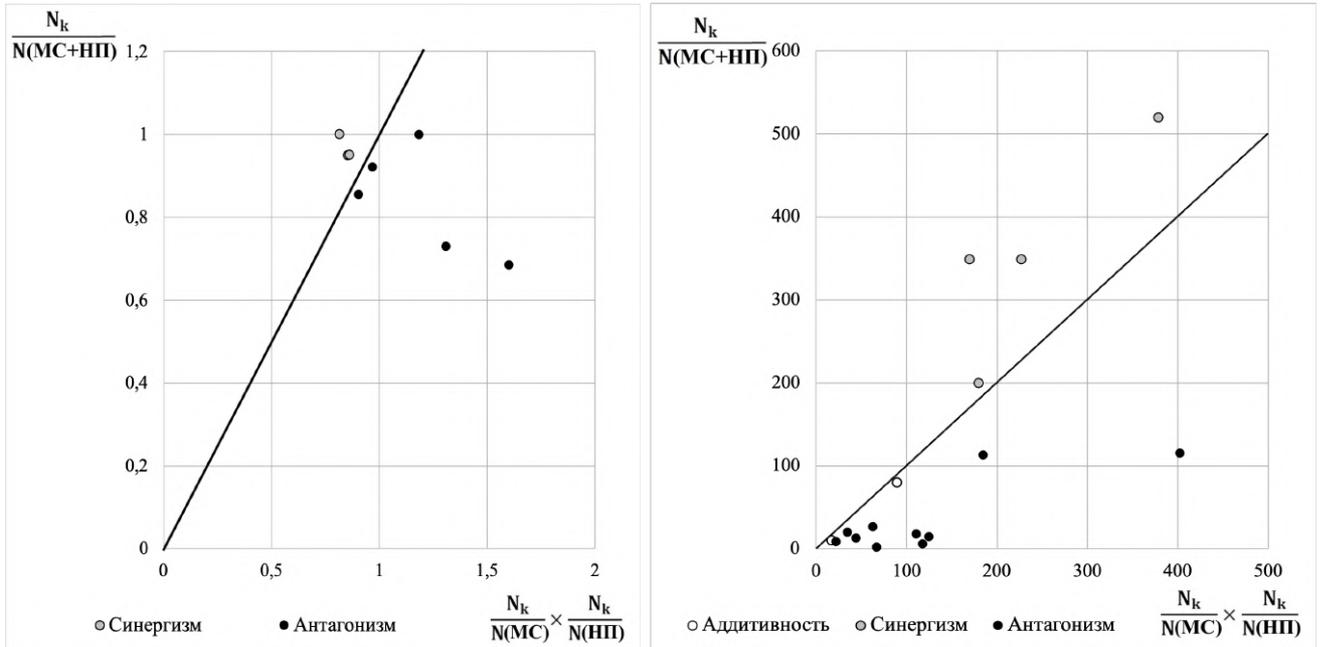


Рисунок 23. Зависимость между оценками комбинированного и раздельного действия метиленового синего и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водорослей *Chlorella vulgaris* в остром опыте (слева) и *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте (справа). N_k – контроль.

Данный метод оценки комбинированных эффектов является модификацией метода W S Abbott (Abbott, 1925). Отличие состоит в том, что вместо отклонения опытных значений от контроля (угнетение в %) в настоящей работе для такой оценки мы предлагаем использовать отношение абсолютных значений измеряемого параметра в контроле к абсолютным значениям в опыте. Это позволяет учитывать случаи, в которых токсикант вызывает стимуляцию измеряемого параметра, а не только случаи угнетения.

Для обеих культур антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП и МС на все сроки наблюдения, а синергизм – в 2 случаях для *C. vulgaris* и в 4 случаях для *S. quadricauda*.

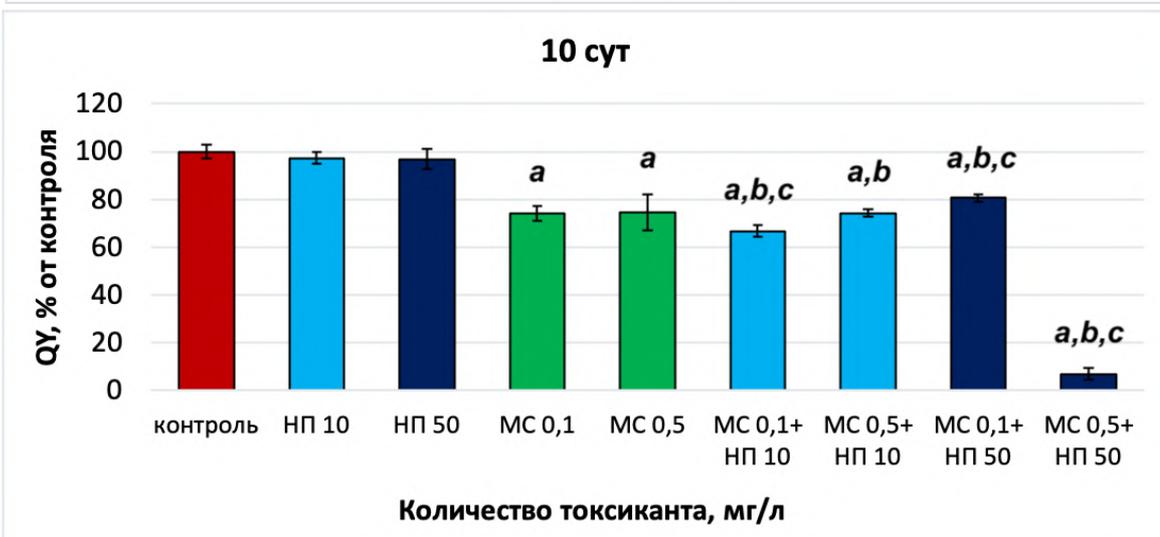
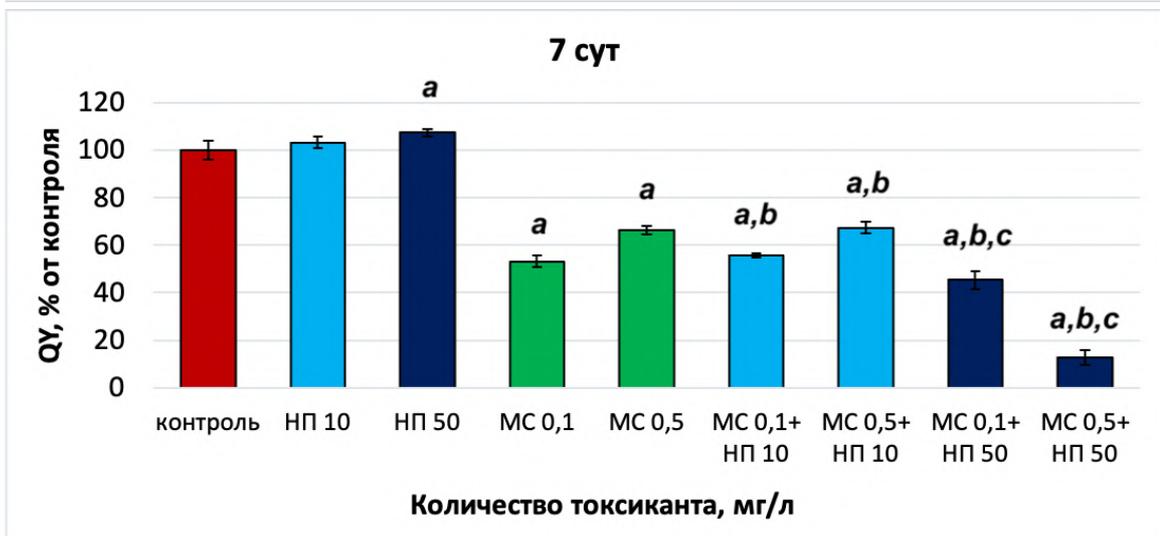
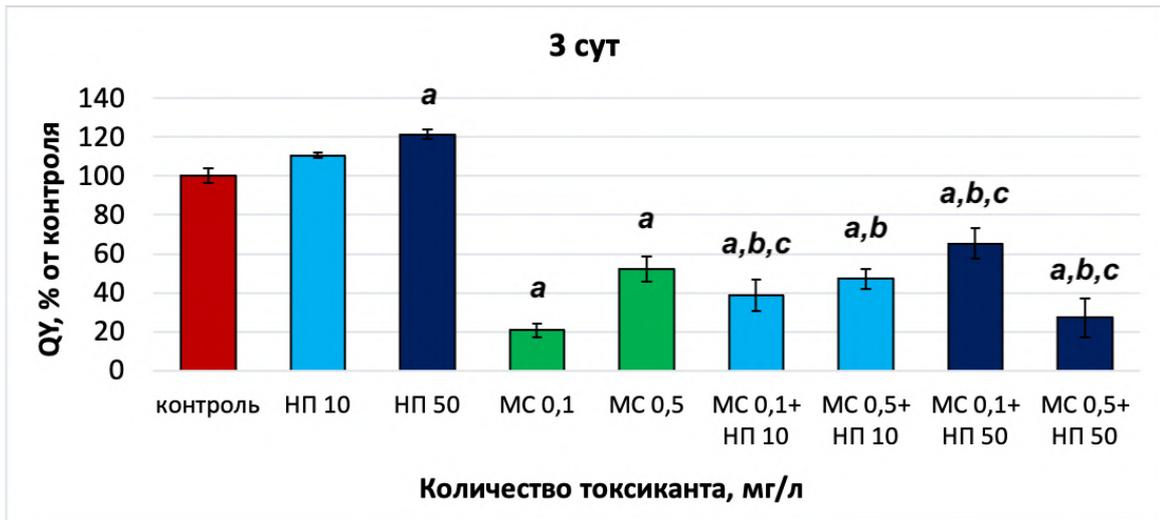
Помимо показателя численности клеток *S. quadricauda* другим тест-параметром при оценке комбинированного действия НП и МС служила величина эффективности фотосинтеза, рассчитанная по характеристикам индукционной кривой флуоресценции хлорофилла (табл. 18, рис. 24 и 25). Этот показатель, оценивающий физиологическое состояние тест-культуры, также широко используется в биотестировании с использованием микроводорослей.

НП в концентрациях 10 и 50 мг/л оказывал значимое стимулирующее действие на фотосинтез *S. quadricauda* на 8 – 21% в первую половину опыта, что ниже 30% порога токсического действия. Однако, при 0,1 и 0,5 мг/л МС отмечали достоверное и длительное угнетение фотосинтеза на 25 – 79% до 10 сут опыта, что указывает на сильный токсический эффект МС.

Таблица 18. Изменение величины эффективности фотосинтеза (QY) клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде культивирования метиленового синего (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно.

Срок, сут	QY								
	контроль	НП 10	НП50	МС 0,1	МС 0,5	МС 0,1 + НП 10	МС 0,1 + НП 50	МС 0,5 + НП 10	МС 0,5 + НП 50
3	0,40±0,02 100%	0,45±0,01 110,7%	0,49±0,01 121,5%	0,08±0,02 20,7%	0,21±0,03 52,1%	0,16±0,04 38,8%	0,19±0,02 47,1%	0,26±0,04 65,3%	0,11±0,05 27,3%
7	0,63±0,03 100%	0,65±0,02 103,2%	0,68±0,01 107,4%	0,34±0,02 53,2%	0,42±0,01 66,3%	0,35±0,01 55,8%	0,43±0,02 67,4%	0,29±0,03 45,3%	0,08±0,02 12,6%
10	0,62±0,02 100%	0,60±0,02 97,3%	0,6±0,03 96,8%	0,46±0,02 74,2%	0,46±0,05 74,7%	0,41±0,02 66,7%	0,46±0,01 74,2%	0,5±0,01 80,6%	0,04±0,02 7,0%
14	0,50±0,02 100%	0,49±0,03 96,7%	0,47±0,01 94%	0,51±0,01 101,3%	0,54±0,02 107,3%	0,43±0,01 85,4%	0,47±0,03 93,4%	0,52±0,02 104,0%	3±0,06 48,3%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; светло-серым цветом – антагонизм, без выделения – нейтрализм, темно-серым цветом – синергизм взаимодействия добавок.



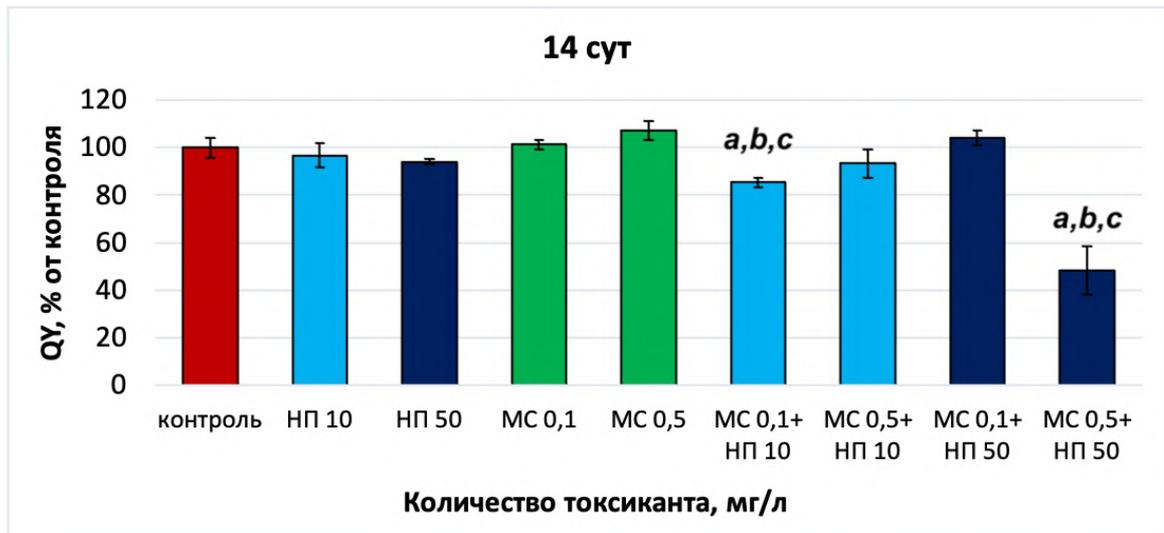


Рисунок 24. Изменение величины эффективности фотосинтеза культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде метиленового синего и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

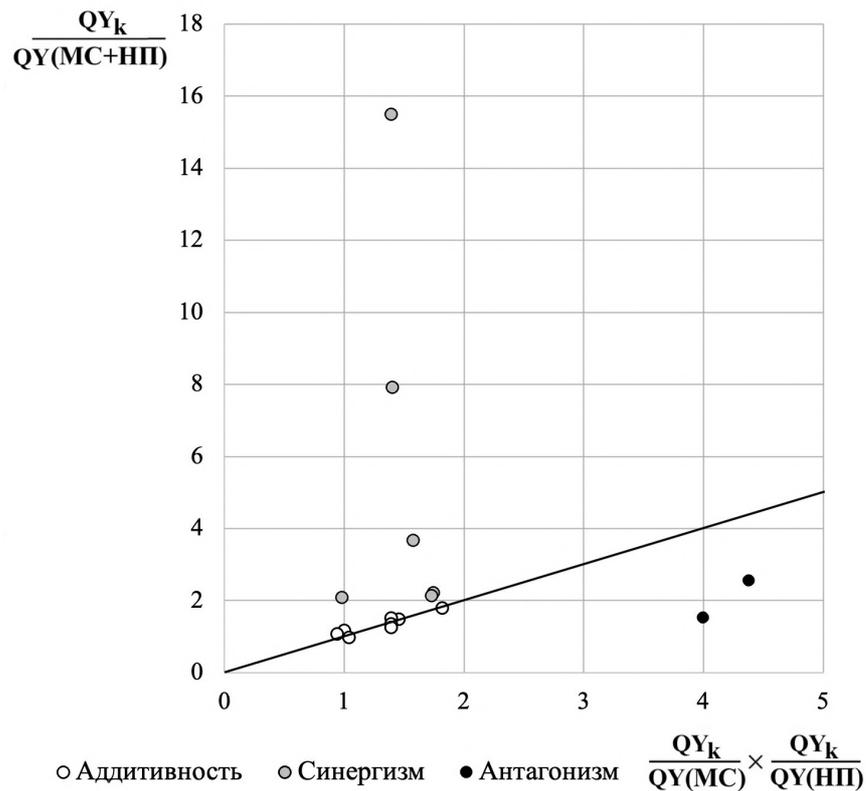


Рисунок 25. Зависимость между оценками комбинированного и раздельного действия метиленового синего и наночастиц полистирола на изменение величины эффективности фотосинтеза (QY) водоросли *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте. N_k – контроль.

Одновременное присутствие НП и МС в среде с *S. quadricauda* приводило к разным результатам в зависимости от комбинаций их концентраций. При этом при комбинациях МС 0,1+НП 10 мг/л, МС 0,1+НП 50 мг/л и МС 0,5+НП 10 мг/л в начале опыта наблюдали ослабление токсического действия МС (по типу антагонизма токсикантов), которое в дальнейшем сменялось или усилением токсического действия (синергизм), или влияние токсикантов было независимым друг от друга (нейтрализм, аддитивность).

Самой опасной оказалась комбинация высоких концентраций МС 0,5+НП 50 мг/л, при которой на протяжении всего хронического опыта происходило значимое угнетения эффективности фотосинтеза на 52 – 93%.

Таким образом, результаты данного исследования показывают, что комбинированный эффект МС и НП зависит как от их концентраций, так и от различных комбинаций их концентраций, времени действия и оцениваемого тест-параметра. Взаимодействие токсикантов в среде культивирования может приводить как к ослаблению, так и к усилению токсического действия наиболее токсичного компонента. При действии МС и НП в бинарных комбинациях на тест-культуры были обнаружены все три типа взаимодействий (синергизм, антагонизм и аддитивность). Результаты опытов по совместному действию 0,5 МС+50 мг/л НП на величину эффективности фотосинтеза *S. quadricauda* показали наличие взаимодействия их между собой по типу синергизма при достаточно высоких концентрациях, что приводит к значительному и продолжительному усилению токсичности среды, что можно объяснить разной природой этих добавок, их концентрацией и особенностями их действия на растительную клетку.

Для обеих культур *S. quadricauda* и *C. vulgaris* по параметру численности клеток антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП и МС и дат наблюдения. Однако, по показателю эффективности фотосинтеза клеток в процессе роста культуры *S. quadricauda* обнаружены продолжительные эффекты усиления токсического действия среды при совместном присутствии в ней

высоких концентраций 0,5 мг/л метиленового синего и 50 мг/л наночастиц полистирола и их взаимодействие по типу синергизма, в то же время бинарные комбинации их низких концентраций 0,1 мг/л МС и 10 мг/л НП приводят к усилению токсичности среды со временем.

В нашем случае антагонистическое действие частиц разной природы можно объяснить их физико-химическими свойствами и адгезией наночастиц полистирола и кристаллов метиленовой сини вследствие их налипания при контакте, что, возможно, и приводило к снижению токсичности наиболее токсичного компонента.

Использованные в работе разные подходы в оценке комбинированного действия НП и МС в бинарных комбинациях на культуры микроводорослей позволили получить сходные результаты, свидетельствующие о зависимости токсичности разных комбинаций от концентраций добавок и срока их действия на культуру. Стоит подчеркнуть, что МС в отдельности действует сильнее на изменение численности клеток, чем на величину эффективности фотосинтеза, а смесь МС+НП оказывает большее токсическое действие на физиологическое состояние клеток микроводорослей, оцененное по показателю величины эффективности фотосинтеза. Поскольку фитопланктон является основой пищевой сети, поэтому любое изменение в популяциях фитопланктона со временем может изменить структуру и функционирование экосистемы в целом.

Токсичность смеси может зависеть и меняться в процессе роста водорослей не только от исходных концентраций веществ, нано- или микрочастиц в культуральной среде, но и от заряда этих частиц, заряда поверхности растительной клетки, состава и количества выделяемых экзометаболитов, рН и ряда других причин. В настоящей работе наблюдали образование осадка в виде хлопьев при смешивании НП и МС в среде без клеток водорослей (рис. 26) и адгезию клеток водоросли *Scenedesmus quadricauda* на частицах микропластика.



Рисунок 26. Хлопья наночастиц полистирола и метиленового синего в смеси в среде без клеток.

По данным литературы (Xiang et al., 2022) известно, что частицы МП могут эффективно и быстро адсорбировать МС, что приводит к увеличению концентрации МС на поверхности МП. Поверхностная адсорбция таких фоточувствительных загрязнителей, как метиленовый синий, может превратить инертные частицы пластика в стойкие твердые источники продукции синглетного кислорода и стать новой потенциальной смертельной угрозой для водных мелких организмов и экологического равновесия.

Кроме того, наноразмерные пластмассы вызывают высокий уровень клеточного стресса в клетках морского фитопланктона и дополнительно запускают их секрецию экзометаболитов с высоким содержанием белка (Shiu et al., 2020). Природные органические вещества (НОМ) образуют короны на поверхности искусственных наночастиц (НЧ), влияя на их стабильность, биопоглощение и токсичность (Zhao et al., 2020). НОМ связываются с поверхностью НЧ посредством гидрофобных, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, хелатирования, лигандного обмена, мостиков и водородных связей (Amde et al., 2017; Yu et al., 2018). Нано- и микропластики также могут эффективно поглощать некоторые стойкие органические загрязнители (СОЗ) и другие неорганические загрязнители благодаря своим уникальным свойствам большой площади поверхности и пористости (Alimi et al., 2018), а также используются в качестве

транспортного средства для трансграничного переноса микробных видов (Rosato et al., 2020).

В конечном счете, условия окружающей среды определяют ключевые свойства наночастиц полистирола, включая гидрофобность, липкость и способность к агрегации, тем самым влияя на жизнеспособность водорослей или микроорганизмов, колонизирующих пластик, и на формирование агрегатов, которые являются важными звеньями в судьбе и переносе пластика в окружающей водной среде.

Таким образом, в настоящей работе показан синергический, аддитивный и антагонистический эффекты парных комбинаций метиленового синего и наночастиц полистирола на культуры *S. quadricauda* и *C. vulgaris* в зависимости от их концентраций и срока действия. Для обеих культур по параметру численности клеток антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП и МС на все сроки наблюдения. По показателю эффективности фотосинтеза клеток в процессе роста культуры *S. quadricauda* обнаружены продолжительные эффекты усиления токсического действия среды при совместном присутствии в ней высоких концентраций 0,5 мг/л метиленового синего и 50 мг/л наночастиц полистирола и их взаимодействие по типу синергизма, в то же время бинарные комбинации их низких концентраций 0,1 мг/л МС и 10 мг/л НП приводят к усилению токсичности среды со временем. Поэтому токсичность фоточувствительных загрязнителей требует особого внимания для понимания неопределенного экологического риска, связанного с пластиковым загрязнением водной среды.

3.2.3. Действие наночастиц полистирола в комбинации с фтором на культуру *Chlorella vulgaris*

Опыт поставлен по плану полнофакторного эксперимента ПФЭ $2^2 - 2$ фактора на 2 уровнях концентраций. При изучении влияния наночастиц

полистирола (НП) и фтора как в отдельности (частный эффект), так и в различных бинарных комбинациях (комбинированный эффект) на культуру *C. vulgaris*, были взяты концентрации НП с содержанием 10 и 50 мг/л наночастиц, не вызывающих угнетения их роста, и токсичные концентрации фтора 250 и 1500 мг F/л (в составе фторида натрия), выбранные по результатам предварительных опытов.

Основными структурным показателем для оценки состояния популяции служило изменение численности клеток водорослей – абсолютной и относительной (по сравнению с контролем) в динамике развития культуры. Численность клеток *C. vulgaris* оценивали по оптической плотности культуры, измеренной с помощью фотоэлектроколориметра ИПС-03. Функциональное состояние клеток *S. quadricauda* оценивали по флуоресценции хлорофилла, измеренной флуориметром AquaPen–С AP–С 100 (Photon System Instruments, Brno, Чехия).

Данные отдельного и совместного действия изучаемых добавок в парных комбинациях их концентраций на изменение численности тест-культуры *C. vulgaris* приведены на рис. 27 и в табл. 19.

Как видно из табл. 19 и рис. 27, концентрации 10 и 50 мг/л НП не оказывала значительного влияния на культуру *C. vulgaris*. Максимальное угнетение роста культуры на 10% на 2 сут опыта было только при 50 мг/л НП. Эти данные согласуются с результатами нашей предыдущей работы по влиянию НП на изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (Лазарева и др., 2023).

Концентрация фтора 250 мг/л была токсичной и вызывала угнетение роста до 22%, а концентрация 1500 мг/л вызывала сильное угнетение роста на 92% ко 2 суткам опыта (табл. 19).

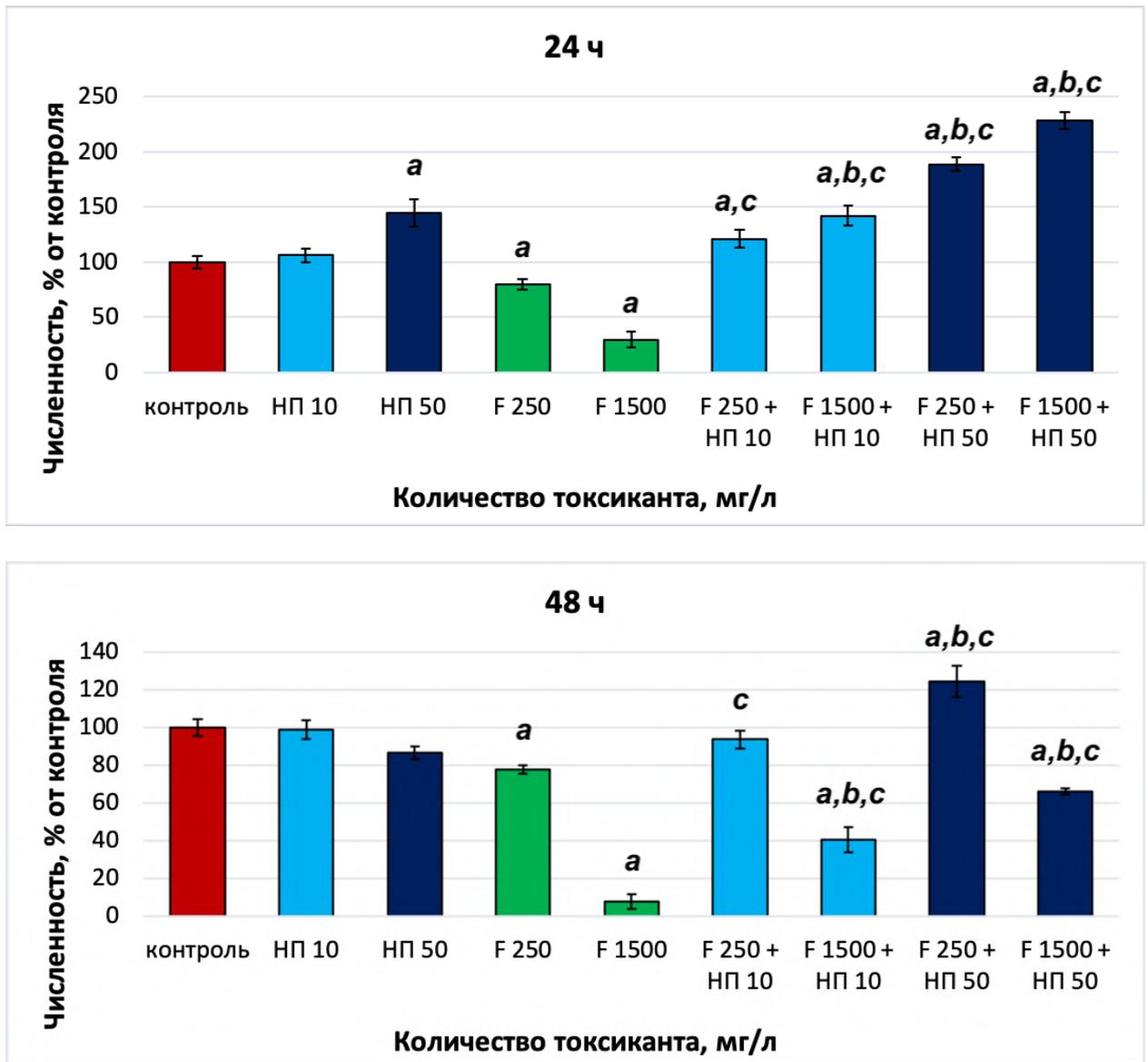


Рисунок 27. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (в % от контроля) через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования фтора (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

При комбинированном воздействии НП и фтора в разных комбинациях их концентраций наблюдали ослабление токсического действия фтора на все сут наблюдения в опыте и для всех комбинаций токсикантов в смеси. При этом в процессе роста культуры в целом наблюдали один тип взаимодействий токсикантов – антагонизм (ослабление токсического действия среды) (в табл. 19 эти случаи выделены зеленым цветом).

Таблица 19. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (по оптической плотности OD) в присутствии в среде культивирования фтора (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно.

Срок, сут	OD								
	контроль	НП 10	НП 50	F 250	F 1500	F 250 + НП 10	F 1500 + НП 10	F 250 + НП 50	F 1500 + НП 50
1	0,038±	0,041±	0,045±	0,030±	0,011±	0,046±	0,054±	0,066±	0,081±
	0,002	0,006	0,005	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003
	100%	106,1%	117,5%	79,8%	29,8%	121,1%	142,1%	172,8%	212,3%
2	0,142±	0,140±	0,128±	0,111±	0,011±	0,113±	0,057±	0,177±	0,091±
	0,005	0,011	0,003	0,006	0,006	0,007	0,010	0,012	0,002
	100%	98,6%	90,2%	77,8%	7,5%	93,7%	40,3%	124,4%	63,7%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма.

Дополнительно нами было оценено комбинированное и раздельное воздействие изучаемых добавок на рост культуры по отношению численности клеток в контроле к численности при одной из добавок и их комбинаций.

На рис. 28 представлены данные комбинированного действия добавок НП и фтора на изменение численности клеток *C. vulgaris* на все сроки испытаний. По вертикальной оси отложены оценки комбинированного воздействия добавок на изменение численности клеток ($N_k/N_{(F, НП)}$, где N_k – численность клеток в контроле, а $N_{(F, НП)}$ – численность клеток в присутствии НП и F), а по горизонтальной оси – произведение оценок при действии их порознь ($N_k/N_{(F)} \cdot (N_k/N_{(НП)})$). Точки, лежащие на биссектрисе или вблизи нее, указывают на аддитивность действия добавок в указанном нами ранее смысле. Отклонение точек от биссектрисы вниз свидетельствует об антагонизме или ослаблении совместного отрицательного действия добавок. Отклонение вверх указывает на синергизм или усиление отрицательного действия добавок относительно их аддитивного действия.

Используя эту модель для оценки комбинированного действия НП и фтора можно отметить, что все точки, полученные на все сроки наблюдения опыта, находятся на рис. 28. ниже биссектрисы, что свидетельствует об антагонизме

взаимодействия изучаемых добавок при одновременном нахождении их в культуральной среде в присутствии клеток культуры. Тем не менее, можно выделить группу из 4 точек (рис. 28), находящихся ближе всего к биссектрисе и эти случаи можно условно рассматривать как случаи аддитивности. Интересно отметить, что эти 4 случая вызваны добавками малой концентрации 250 мг F/л в присутствии разных концентраций НП. В то же время случаи антагонизма вызваны большими концентрациями 1500 мг F/л в сочетании с разными концентрациями НП.

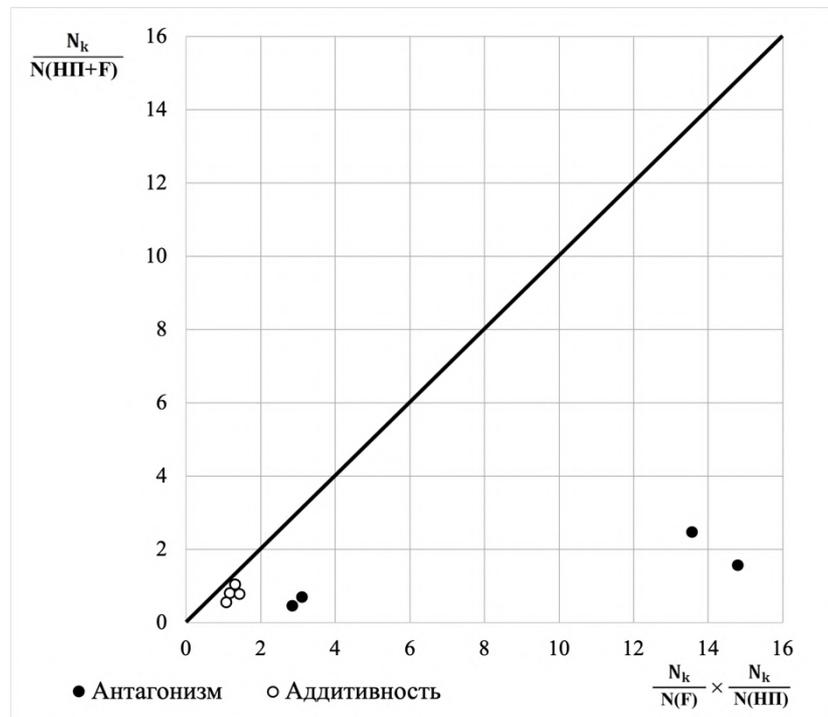


Рисунок 28. Зависимость между оценками комбинированного и отдельного действия фтора и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водоросли *Chlorella vulgaris*. N_k – контроль.

Такая оценка комбинированного действия изучаемых добавок в опыте свидетельствует о преобладании случаев антагонизма при их взаимодействии в культуральной среде в присутствии клеток культуры *C. vulgaris*.

Данные отдельного и совместного действия изучаемых добавок в парных комбинациях их концентраций на величину эффективности фотосинтеза тест-культуры *C. vulgaris* приведены на рис. 29 и 30, в табл. 20.

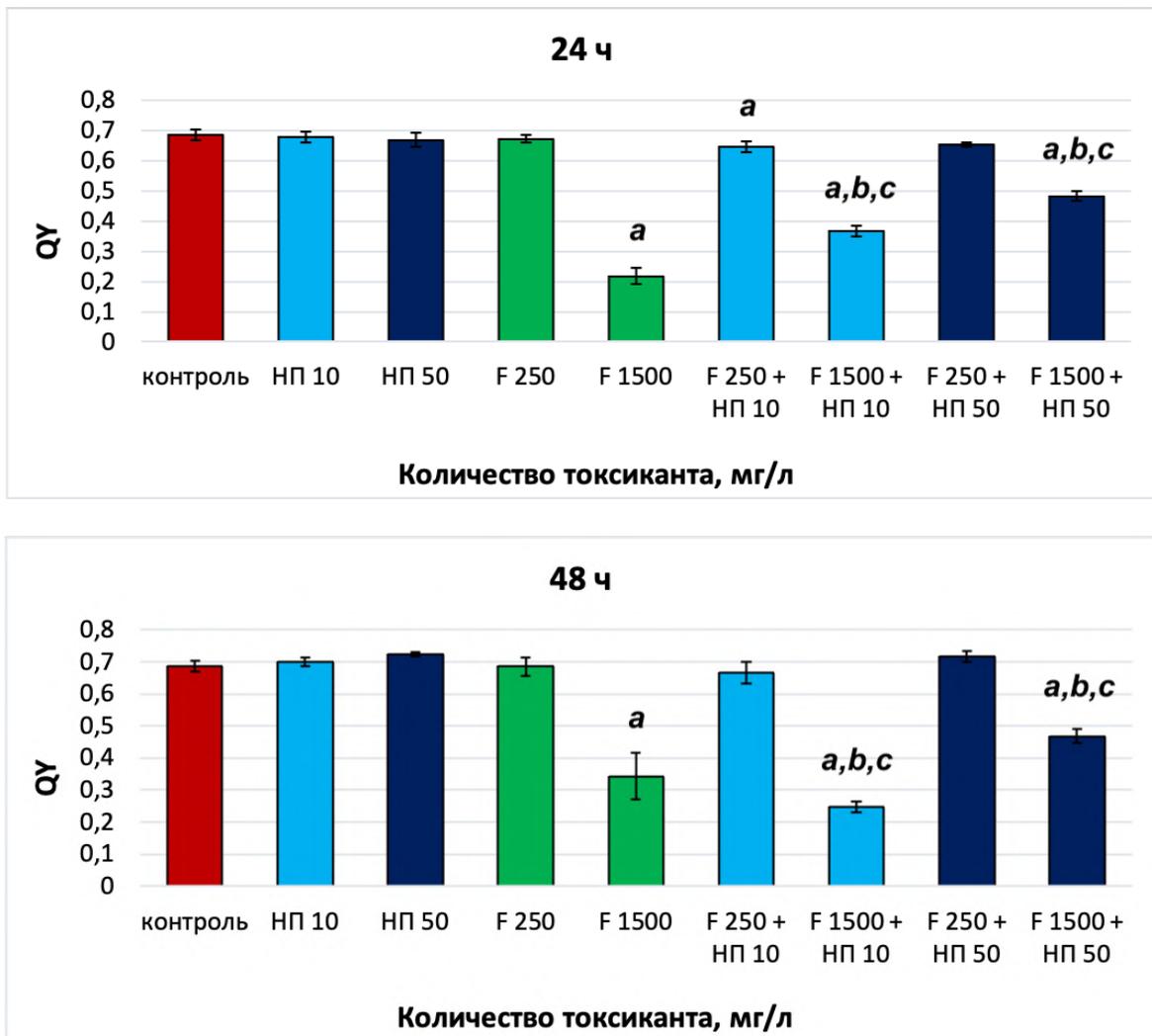


Рисунок 29. Изменение эффективности фотосинтеза клеток (QY) *Chlorella vulgaris* через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования фтора (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

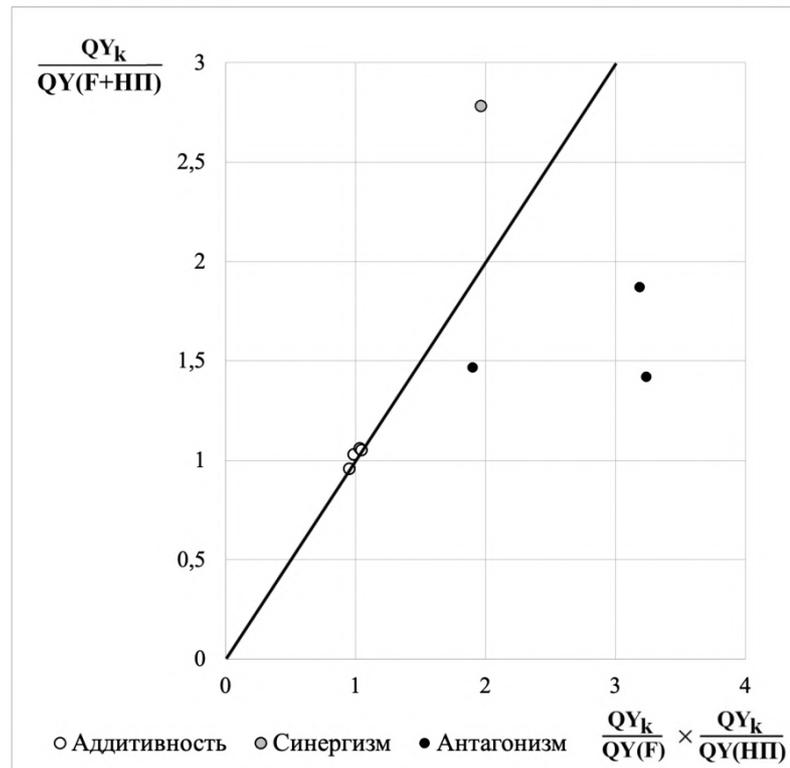


Рисунок 30. Зависимость между оценками комбинированного и раздельного действия фтора и наночастиц полистирола на изменение эффективности фотосинтеза клеток водоросли *Chlorella vulgaris*. N_k – контроль.

Таблица 20. Изменение эффективности фотосинтеза (QY) клеток *Chlorella vulgaris* в присутствии в среде культивирования фтора (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно.

Срок, сут	QY								
	контроль	НП 10	НП 50	F 250	F 1500	F 250 + НП 10	F 1500 + НП 10	F 250 + НП 50	F 1500 + НП 50
1	0,69±	0,68±	0,67±	0,67±	0,22±	0,65±	0,37±	0,65±	0,48±
	0,017	0,019	0,023	0,013	0,027	0,017	0,017	0,007	0,017
	100%	98,6%	97,6%	98,1%	31,7%	94,2%	53,4%	95,1%	70,4%
2	0,69±	0,70±	0,72±	0,69±0,	0,34±	0,67±	0,25±	0,72±	0,47±
	0,017	0,014	0,007	028	0,072	0,035	0,017	0,017	0,023
	100%	101,4%	105,3%	99,8%	50,0%	97,1%	35,9%	104,4%	68,2%

Примечание: полужирным отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; зеленым цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, красным цветом - по типу синергизма, оранжевым цветом – по типу нейтрализма.

При комбинированном действии фтора и НП на величину эффективности фотосинтеза отмечены: 1 случай синергизма при комбинации F 1500 + НП 10 мг/л, 3 случая антагонизма при комбинации высоких концентрациях фтора и НП, а также высокой концентрации фтора и малой концентрации НП, и 2 достоверных случая независимого действия (нейтрализм).

На рис. 30 точками отмечены все случаи взаимодействия изучаемых комбинаций добавок.

Таким образом, комбинированный эффект фтора и наночастиц полистирола на культуру *C. vulgaris* по показателю численности клеток зависит как от концентраций этих добавок, так и от различных комбинаций их концентраций и времени действия. Взаимодействие этих токсикантов в среде культивирования по двум показателям численности клеток и эффективности фотосинтеза чаще всего приводит к ослаблению токсического действия наиболее токсичного компонента среды на культуру в процессе ее роста.

Антагонистическое действие частиц разной природы можно объяснить их физико-химическими свойствами и адсорбцией фтора на наночастицах полистирола при их контакте, что, возможно, и приводит к снижению токсичности наиболее токсичного компонента. По параметру численности клеток антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП и фтора и дат наблюдения.

3.2.4. Действие наночастиц полистирола в комбинации с сульфатом меди на культуры *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda*

*Комбинированный эффект наночастиц полистирола и сульфата меди на культуру *Chlorella vulgaris**

При изучении комбинированного эффекта наночастиц полистирола с ионами меди на микроводоросли были взяты концентрации полистирола с содержанием 10 и 50 мг/л наночастиц, не вызывающих угнетения роста, и концентрации меди в

составе медного купороса, выбранные по результатам предварительных опытов (Лазарева и др., 2023). Контролем служил рост культуры в чистой среде без токсикантов.

Чтобы учесть возможные взаимодействия между токсикантами, опыты поставлены по плану полнофакторного эксперимента. Получены данные отдельного и совместного действия изучаемых добавок в парных комбинациях их концентраций на тест-культуру.

Как видно из табл. 21 и 22 и рис. 31 и 32, НП в концентрациях 10 и 50 мг/л вызывал незначимую стимуляцию роста *C. vulgaris* на 1 и 2 сут опыта.

А медь в концентрациях 0,01 и 0,05 мг/л вызывала значимое угнетение роста в пределах от 20 до 30%, что выше 20% порога токсического действия, установленного методикой в случае угнетения роста, поэтому эти концентрации были токсическими. Самой токсичной оказалась концентрация меди 0,15 мг/л, при которой угнетение роста культуры по сравнению с контролем на 2 сут составляло 89%.

Совместное присутствие обоих токсикантов в среде культивирования *C. vulgaris* приводило к разному результату в зависимости как от концентраций, так и срока их действия.

Так, в присутствии минимально исследованных концентраций 0,01 мг/л меди и 10 мг/л НП наблюдали небольшое, но значимое улучшение роста культуры на 2 сут опыта по сравнению с ростом чистого контроля (табл. 22). С увеличением концентрации меди (0,05 и 0,15 мг/л) в присутствии малой концентрации 10 мг/л НП наблюдали независимое действие обоих токсикантов по типу нейтрализма (табл. 21, 22).

Таблица 21. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (по оптической плотности OD) в присутствии в среде культивирования ионов меди (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (опыт 1).

Срок, сут	OD							
	контроль	НП 10	Cu 0,05	Cu 0,15	Cu 0,05 + НП 10	Cu 0,15 + НП 10	Cu 0,05 + НП 50	Cu 0,15 + НП 50
1	0,034± 0,002	0,036± 0,003	0,026± 0,001	0,016± 0,002	0,028± 0,002	0,015± 0,001	0,0043± 0,004	0,023± 0,003
	100%	105,9	77,5%	46,1%	81,4%	44,1%	125,5%	66,7%
2	0,239± 0,011	0,258± 0,014	0,168± 0,007	0,027± 0,005	0,195± 0,016	0,023± 0,005	0,184± 0,013	0,108± 0,020
	100%	108,2%	70,4%	11,5%	81,7%	9,8%	77,1%	45,1%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, **оранжевым** цветом – по типу нейтрализма.

Таблица 22. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* (по оптической плотности OD) в присутствии в среде культивирования ионов меди (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (опыт 2).

Срок, сут	OD							
	контроль	Cu 0,01	Cu 0,05	НП 50	Cu 0,01 +НП 50	Cu 0,05 +НП 50	Cu 0,01 +НП 10	Cu 0,05 +НП 10
1	0,039± 0,002	0,032± 0,004	0,031± 0,002	0,052± 0,009	0,058± 0,018	0,052± 0,005	0,044± 0,010	0,031± 0,005
	100%	81,2%	80,3%	133,3%	149,6%	132,5%	112,8%	78,6%
2	0,287± 0,011	0,282± 0,010	0,232± 0,009	0,308± 0,019	0,420± 0,017	0,258± 0,014	0,346± 0,019	0,218± 0,019
	100%	98,1%	80,7%	107,1%	146,3%	89,7%	120,5%	75,8%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, **оранжевым** цветом – по типу нейтрализма.

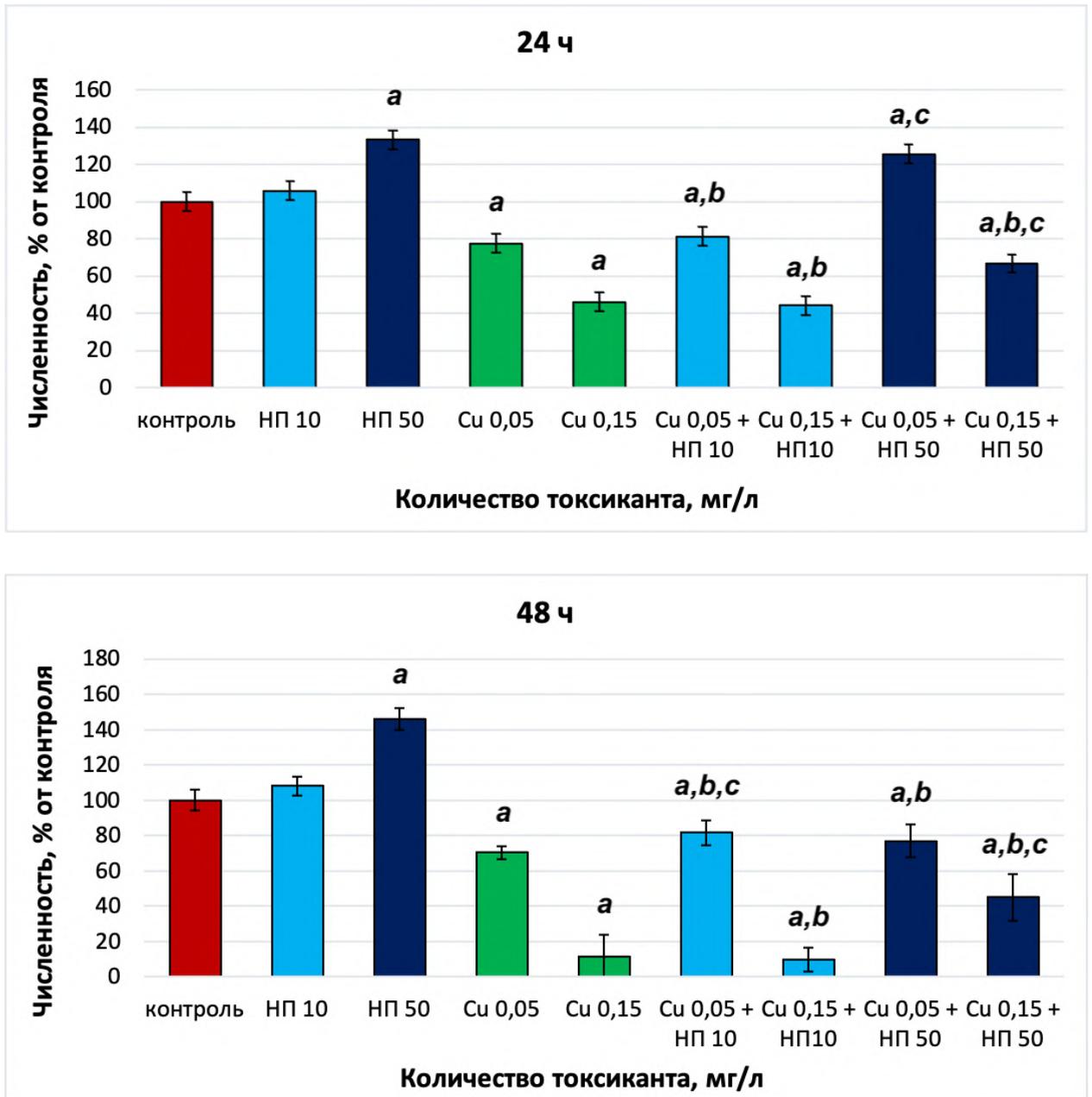


Рисунок 31. Изменение относительной численности клеток *Chlorella vulgaris* через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования сульфата меди (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (опыт 1) (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

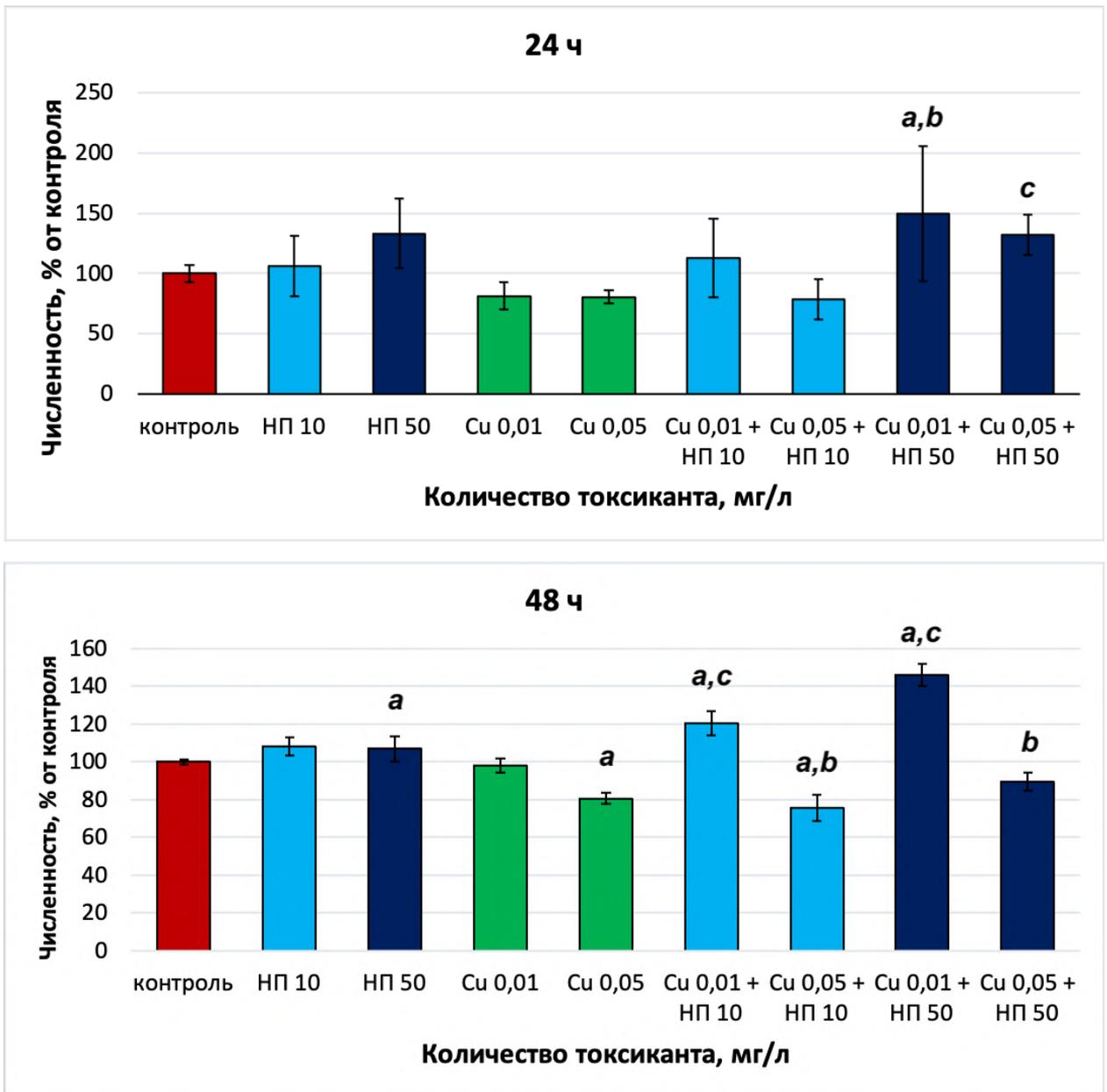


Рисунок 32. Изменение относительной численности клеток *Chlorella vulgaris* через 24 и 48 ч в присутствии в среде культивирования сульфата меди (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга и совместно (опыт 2) (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

А в присутствии высокой концентрации 50 мг/л НП при всех исследованных концентрациях меди на все сроки наблюдали ослабление токсического действия меди и взаимодействие токсикантов по типу антагонизма. (табл. 22). Исключение составляла комбинация Cu 0,01 + НП 50 мг/л на 1 сут опыта, когда полученное значение оптической плотности клеток было недостоверным.

Таким образом, присутствие высоких концентрации наночастиц пластика вызывает протекторный эффект от токсического действия меди, что может быть связано с адсорбцией меди на частицах нанопластика, которая приводит к уменьшению концентрации меди в среде и снижению ее токсического действия на клетки *C. vulgaris*.

Полученные нами данные по показателю изменения численности клеток водорослей *C. vulgaris* при действии НП и Cu совместно и отдельно, были дополнительно обработаны математически, рассчитаны по определенным формулам и представлены на графиках (рис. 33), наглядно отображающих все три типа взаимодействия этих добавок в культуральной среде на все сроки наблюдения опытов.

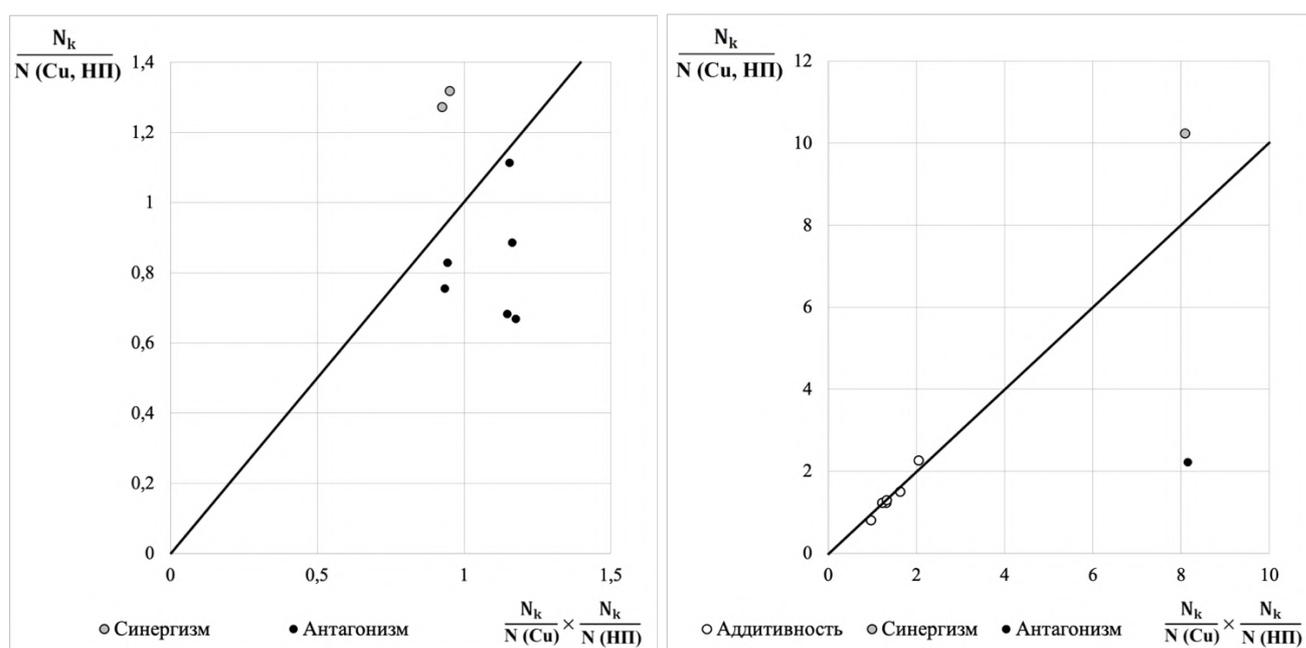


Рисунок 33. Зависимость между оценками комбинированного и отдельного действия ионов меди и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водоросли *Chlorella vulgaris* в краткосрочном эксперименте (опыт 1 – слева, опыт 2 – справа). N_k – контроль.

Было оценено комбинированное и раздельное воздействие изучаемых добавок на рост культуры по расчетному показателю – отношению численности клеток в контроле к численности при одной из добавок и их комбинаций.

На рис. 33 для *C. vulgaris* (по результатам двух краткосрочных опытов 1 и 2) представлены данные комбинированного действия добавок НП и Cu на изменение численности клеток на все сроки испытаний. По вертикальной оси отложены оценки комбинированного воздействия добавок на изменение численности клеток ($N_k/N_{(Cu,НП)}$), где N_k – численность клеток в контроле, а $N_{(Cu,НП)}$ – численность клеток в присутствии НП и Cu), а по горизонтальной оси – произведение оценок при действии их порознь ($N_k/N_{(Cu)} \cdot (N_k/N_{(НП)})$). Точки, лежащие на биссектрисе или вблизи нее, указывают на аддитивность действия добавок. Отклонение точек от биссектрисы вниз свидетельствует об антагонизме или ослаблении совместного отрицательного действия добавок. Отклонение вверх указывает на синергизм или усиление отрицательного действия добавок относительно их аддитивного действия.

В первом опыте (рис. 33, слева) в большинстве случаев токсиканты взаимодействовали по типу антагонизма, а во втором (рис. 33, справа) – чаще отмечены случаи нейтрального взаимодействия НП и меди, что может быть связано с понижением концентраций меди во втором эксперименте.

Полученные графики наглядно иллюстрируют отмеченные нами все три типа взаимодействия добавок в среде культивирования тест-организма при комбинированном действии ионов меди и наночастиц полистирола по показателю изменения численности клеток водорослей.

Таким образом, совместное присутствие обоих токсикантов в среде культивирования *C. vulgaris* приводило к разному результату в зависимости как от концентраций, так и срока их действия.

Присутствие высоких концентрации наночастиц пластика вызывает протекторный эффект от токсического действия меди, что может быть связано с

адсорбцией меди на частицах нанопластика, которая приводит к уменьшению концентрации меди в среде и снижению ее токсического действия на клетки *C. vulgaris*.

Комбинированный эффект наночастиц полистирола и сульфата меди на Scenedesmus quadricauda

С культурой *S. quadricauda* был поставлен хронический эксперимент длительностью 14 сут в климатостате на среде Успенского №1 при температуре 24 °С согласно методике биотестирования по изменению численности клеток данного вида (Биологические методы ..., 2007).

Результаты этого опыта представлены в табл. 23 и 24, на рис. 34.

Таблица 23. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде культивирования ионов меди (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) отдельно друг от друга.

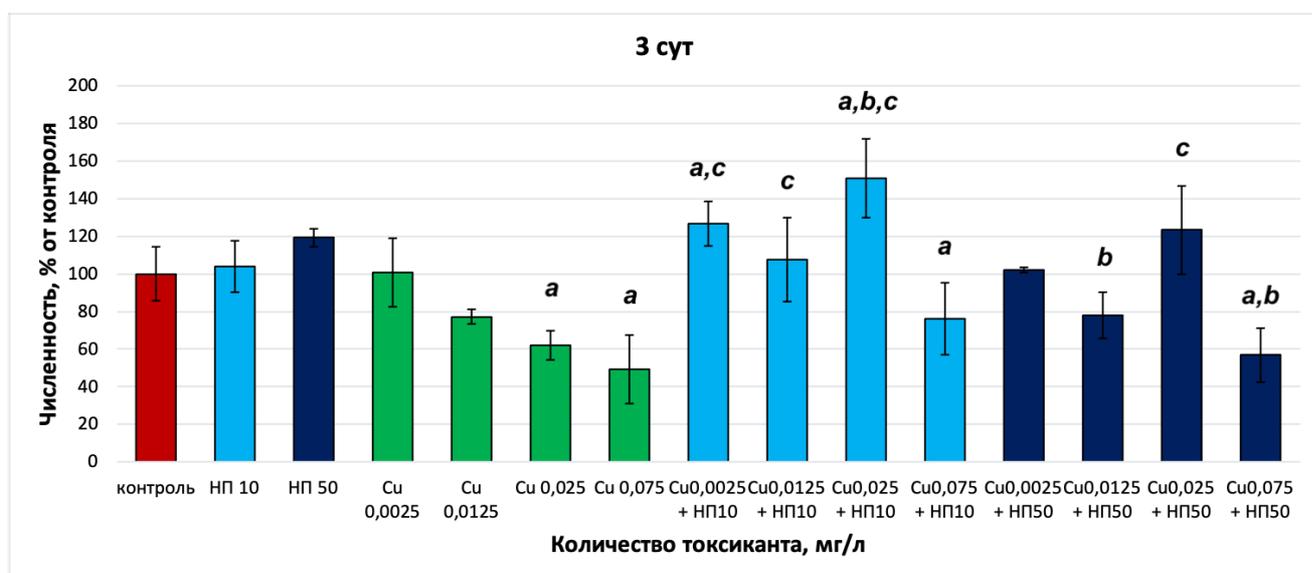
Срок, сут	Численность, 10 ⁴ кл/мл						
	контроль	НП 10	НП 50	Cu 0,0025	Cu 0,0125	Cu 0,025	Cu 0,075
3	24,3± 3,5 100%	25,3± 3,3 104,1%	29,0± 1,1 119,2%	24,5± 4,5 100,8%	18,8± 1,0 77,3%	15,1± 1,9 62,1%	12,0± 4,4 49,3%
7	134,0± 14,1 100%	137,3± 11,6 102,5%	168,0± 24,5 125,4%	127,3± 10,2 95,0%	128,3± 10,3 95,8%	104,7± 15,1 78,1%	84,0± 9,1 62,7%
10	313,3± 18,3 100%	336,0± 34,2 107,2%	305,3± 36,6 97,4%	327,3± 16,1 104,5%	268,0± 24,0 85,5%	382,7± 15,7 122,1%	432,7± 21,0 138,1%
14	364,7± 41,1 100%	445,3± 20,9 122,1%	559,3± 39,7 153,4%	458,7± 29,1 125,8%	435,3± 24,4 119,4%	252,0± 35,4 96,1%	295,3± 40,0 81,0%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$.

Таблица 24. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде культивирования ионов меди (мг/л) и наночастиц полистирола (мг/л) совместно.

Срок, сут	Численность, 10 ⁴ кл/мл							
	Cu 0,0025 + НП 10	Cu 0,0125 + НП 10	Cu 0,025 + НП 10	Cu 0,075 + НП 10	Cu 0,0025 + НП 50	Cu 0,0125 + НП 50	Cu 0,025 + НП 50	Cu 0,075 + НП 50
3	30,8±2,9 126,7%	26,2±5,4 107,5%	36,7±5,1 150,7%	18,5±4,6 76,0%	24,8±0,3 102,1%	19,0±3,0 78,1%	30,0±5,7 123,3%	13,8±3,5 56,9%
7	153,3±3,5 114,4%	147,3±24,2 110,0%	116,0±19,3 86,6%	82,9±11,0 61,8%	132,7±1,3 99,0%	176,0±19,7 131,3%	149,3±13,6 111,4%	88,0±17,7 65,7%
10	245,7±6,4 78,4%	309,7±16,6 98,8%	298,0±15,8 95,1%	230,0±36,4 73,4%	341,3±22,7 108,9%	302,7±17,1 96,6%	260,0±19,7 83,0%	238,7±22,3 76,2%
14	380,0±20,7 104,2%	549,3±29,1 150,6%	544,0±27,5 149,2%	443,3±36,1 121,6%	334,0±20,1 91,6%	432,0±4,5 118,5%	385,0±13,1 105,6%	386,0±11,3 105,9%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, **оранжевым** цветом – по типу нейтрализма, **красным** цветом – по типу синергизма.



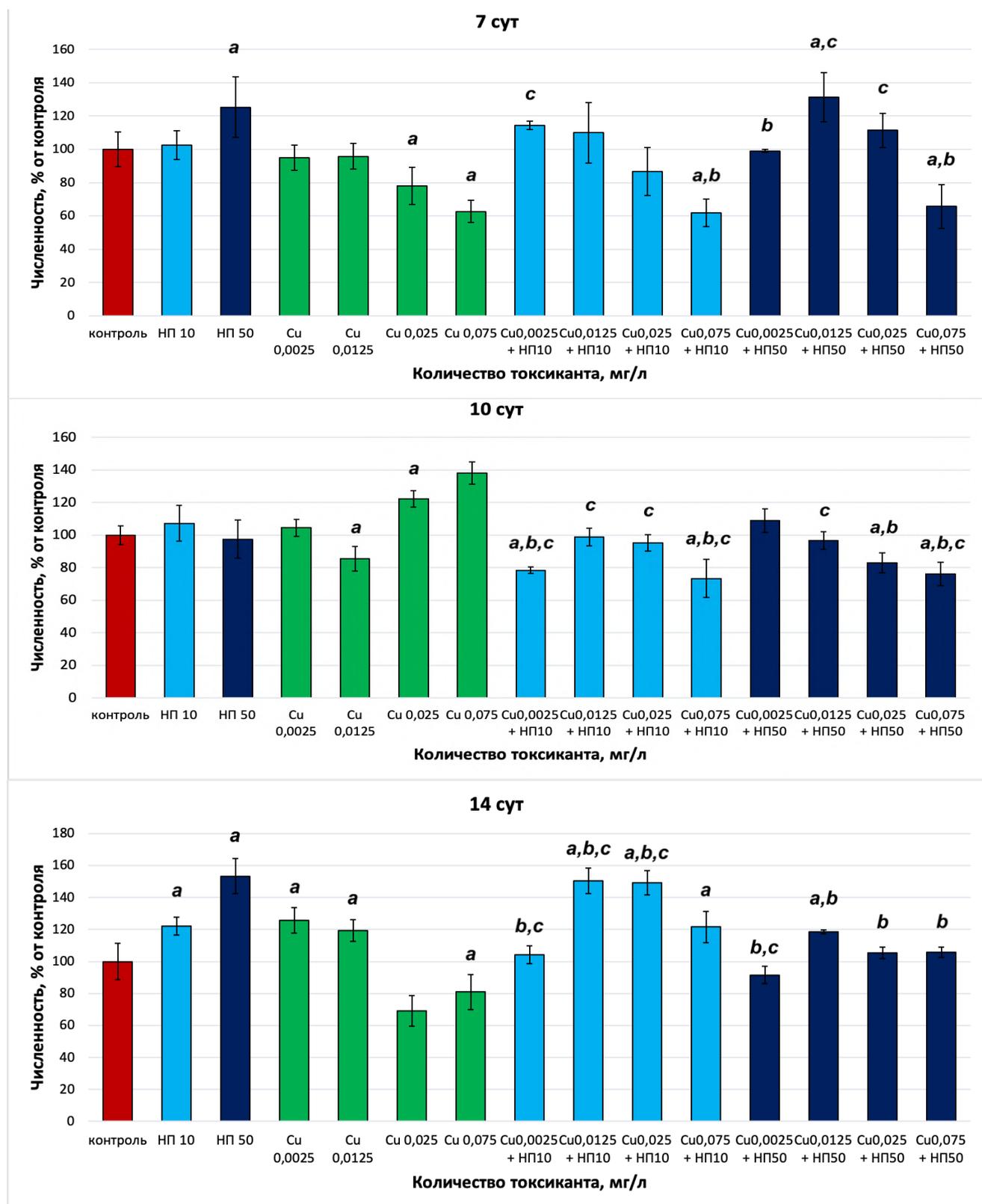


Рисунок 34. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде сульфата меди и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b* и *c* те же, что на рис.18).

Как видно из табл. 23 и рис. 34, концентрации НП 10 и 50 мг/л вызывали значимое стимулирующее действие на культуру *S. quadricauda* только на 14 сут, а в остальные сроки наблюдений хронического опыта рост культуры находился на уровне контроля. Эти данные согласуются с результатами нашей предыдущей работы по влиянию НП на изменение численности клеток *S. quadricauda* (Лазарева и др., 2023).

Концентрация меди 0,0025 мг/л также к концу опыта на 14 сут вызывала значимый стимулирующий эффект. А концентрации 0,0125 и 0,025 мг/л в процессе роста культуры вызывали как угнетение, так и стимуляцию роста. Максимальная концентрация, из всех испытанных в опыте, вызывала сильное значимое угнетение роста до 7 сут опыта, а в дальнейшем изменения роста по сравнению с контролем были незначимыми.

При комбинированном воздействии НП и меди в разных комбинациях их концентраций (табл. 24, рис. 34) наблюдали неоднозначную ответную реакцию культуры *S. quadricauda* на такое воздействие. При этом в процессе роста культуры в целом могли наблюдать все три типа взаимодействий токсикантов – синергизм (усиление токсического действия), антагонизм (ослабление токсического действия) и нейтрализм (независимое действие токсикантов в смеси).

Улучшение роста культуры можно отметить на 3 и 14 сут при комбинациях малой концентрации 10 мг/л НП с добавками меди в разных концентрациях и однократно на 7 сут только для случая Cu 0,0125 + НП 50 мг/л.

Угнетение роста культуры наблюдали однократно только на 10 сут при 4 комбинациях токсикантов – высокой концентрации 50 мг/л НП и двух высоких концентраций меди, а также при малой концентрации 10 мг/л НП и минимальной и максимальной концентрациях меди.

Независимое действие токсикантов отмечено при высоких концентрациях токсикантов на 3 и 7 сут и однократно для случаев Cu 0,075 + НП 10 мг/л (7 сут) и Cu 0,0125 + НП 50 мг/л (14 сут).

Такая сложная мозаичная ответная реакция культуры *S. quadricauda* на воздействие различных комбинаций исследованных токсикантов вызывает трудности в интерпретации токсичности токсикантов или их смеси.

Стимуляцию роста культуры *S. quadricauda* в начале опыта как при комбинированном воздействии, так и отдельно друг от друга можно объяснить реакцией культуры на стресс после добавки токсикантов вследствие интенсификации процессов в клетках на токсическое воздействие.

Улучшение роста к концу хронического эксперимента при комбинированном действии токсикантов на культуру *S. quadricauda* может происходить как в результате адаптации культуры после длительного токсического воздействия, так и в результате адсорбции меди на наночастицах пластика и частичного ухода меди из среды.

Таким образом, результаты данного исследования показывают, что комбинированный эффект меди и наночастиц полистирола на культуры *S. quadricauda* и *C. vulgaris* зависит как от концентраций этих токсикантов, так и от различных комбинаций их концентраций и времени действия. Взаимодействие токсикантов в среде культивирования может приводить как к ослаблению, так и к усилению токсического действия на культуры в процессе их роста наиболее токсичного компонента. При действии меди и НП в бинарных комбинациях на тест-культуру *S. quadricauda* были обнаружены все три типа взаимодействий (синергизм, антагонизм и нейтрализм), а на тест-культуру *C. vulgaris* – два типа взаимодействий (антагонизм и нейтрализм). Разницу в ответной реакции двух видов микроводорослей можно объяснить их видовой спецификой, условиями культивирования, разными размерами и морфологией клеток.

Другим показателем токсического действия отдельных добавок или их смеси в опыте с культурой *S. quadricauda* служила величина эффективности фотосинтеза, по которой оценивают физиологическое состояние тест-организма. Данные отдельного и совместного действия изучаемых добавок в парных комбинациях их

концентраций на тест-культуру *S. quadricauda* по этому показателю приведены в табл. 25, 26, и на рис. 35. Как видно из табл. 26, концентрация НП 10 мг/л вызывала слабое незначимое угнетающее действие на величину эффективности фотосинтеза *S. quadricauda* в пределах 2–6%, а концентрация НП 50 мг/л – достоверное угнетение в пределах 7–12% в процессе 14 сут опыта. Максимальное достоверное угнетение фотосинтеза было отмечено при концентрации Cu 0,0025 мг/л до 9% на 7 сут, а при 0,0125 мг/л и 0,025 мг/л – до 10–12% на 1 и 10 сут. Достоверное и продолжительное угнетение фотосинтеза в течение всего опыта вызывала концентрация Cu 0,075 мг/л до 14%.

Таблица 25. Изменение величины эффективности фотосинтеза (QY) клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде культивирования ионов меди (мг/л) и наночастиц полистирола (НП) (мг/л) совместно.

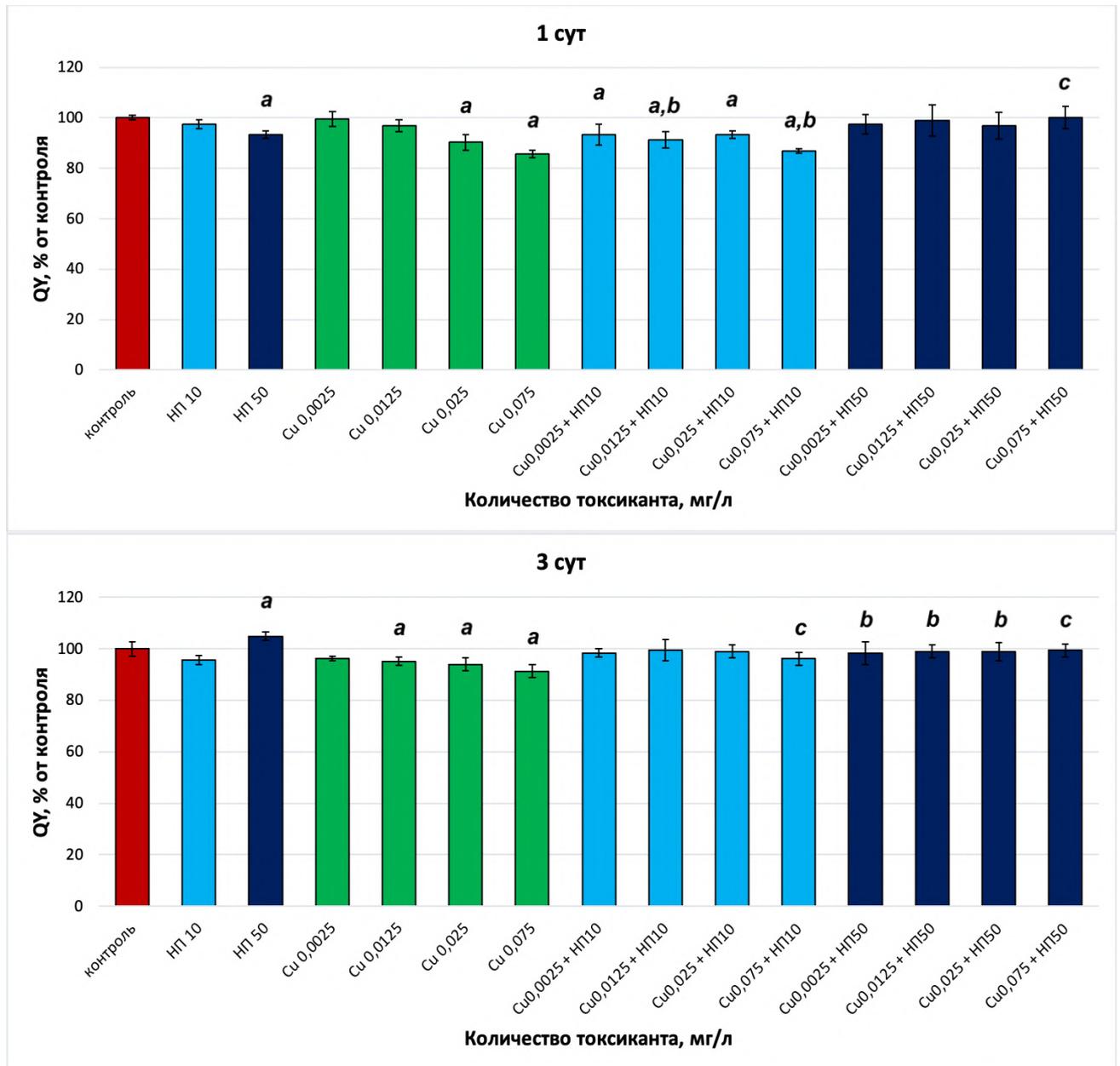
Срок, сут	QY							
	0,0025+ 10	0,0125+ 10	0,025+ 10	0,075+ 10	0,0025+ 50	0,0125+ 50	0,025+ 50	0,075+ 50
1	0,61± 0,030 93,4%	0,60± 0,024 91,3%	0,61± 0,011 93,4%	0,57± 0,007 86,7%	0,64± 0,028 97,4%	0,65± 0,046 99,0%	0,63± 0,040 96,9%	0,65± 0,033 100,0%
3	0,60± 0,011 98,4%	0,61± 0,028 99,5%	0,60± 0,017 98,9%	0,59± 0,017 96,2%	0,60± 0,030 98,4%	0,60± 0,017 98,9%	0,60± 0,024 98,9%	0,61± 0,017 99,5%
7	0,60± 0,011 96,8%	0,60± 0,017 96,2%	0,60± 0,007 96,2%	0,56± 0,011 90,3%	0,61± 0,017 98,9%	0,64± 0,011 103,2%	0,58± 0,017 94,1%	0,60± 0,011 96,8%
10	0,59± 0,024 98,9%	0,60± 0,017 100,6%	0,58± 0,017 97,2%	0,57± 0,017 94,4%	0,60± 0,007 99,4%	0,61± 0,017 102,2%	0,59± 0,011 98,3%	0,58± 0,013 96,1%
14	0,61± 0,017 105,7%	0,56± 0,011 96,6%	0,58± 0,017 100,6%	0,58± 0,017 99,4%	0,57± 0,017 97,7%	0,57± 0,007 97,7%	0,60± 0,028 102,9%	0,54± 0,017 92,5%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$; **зеленым** цветом – взаимодействие токсикантов по типу антагонизма, **оранжевым** цветом – по типу нейтрализма, **красным** цветом – по типу синергизма.

Таблица 26. Изменение величины эффективности фотосинтеза (QY) клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде культивирования ионов меди (мг/л) и наночастиц полистирола (НП) (мг/л) отдельно друг от друга.

Срок , сут	QY						
	контроль	НП 10	НП 50	Cu 0,0025	Cu 0,0125	Cu 0,025	Cu 0,075
1	0,65± 0,007 100%	0,64± 0,013 97,4%	0,61± 0,011 93,4%	0,65± 0,023 99,5%	0,63± 0,017 96,9%	0,59± 0,023 90,3%	0,56± 0,011 85,7%
3	0,61± 0,022 100%	0,58± 0,013 95,6%	0,64± 0,011 104,9%	0,59± 0,007 96,2%	0,58± 0,011 95,1%	0,57± 0,017 94,0%	0,56± 0,017 91,3%
7	0,62± 0,023 100%	0,60± 0,007 97,3%	0,55± 0,017 89,2%	0,57± 0,017 91,4%	0,57± 0,007 91,4%	0,60± 0,028 96,2%	0,54± 0,017 86,6%
10	0,60± 0,011 100%	0,57± 0,028 94,4%	0,53± 0,013 87,8%	0,58± 0,020 96,7%	0,53± 0,020 88,3%	0,55± 0,011 91,7%	0,53± 0,011 88,3%
14	0,58± 0,011 100%	0,57± 0,011 98,3%	0,53± 0,007 92,0%	0,60± 0,011 103,4%	0,54± 0,011 93,1%	0,53± 0,011 91,4%	0,52± 0,011 89,7%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля по критерию Даннета при $p < 0,05$.



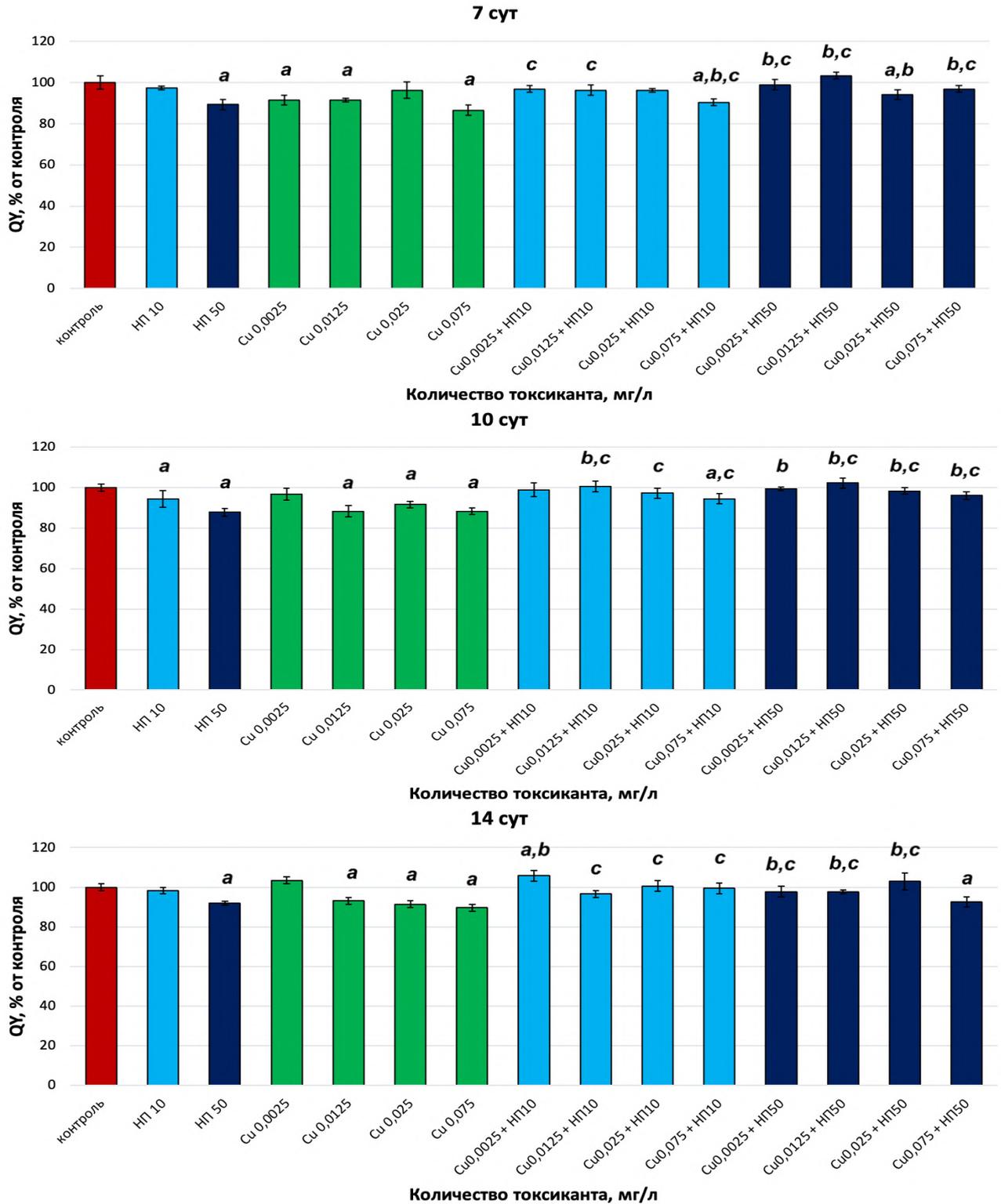


Рисунок 35. Изменение относительной величины эффективности фотосинтеза культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии в среде сульфата меди и наночастиц полистирола отдельно друг от друга и совместно (обозначения *a*, *b*, и *c* те же, что на рис.18).

Совместное действие малой концентрации НП 10 мг/л и Cu в разных концентрациях на культуру *S. quadricauda* (табл. 25) по показателю эффективности фотосинтеза приводило или к эффекту по типу независимого действия этих добавок (нейтрализм), или даже к значимому ослаблению токсического действия высокой концентрации меди 0,075 мг/л при взаимодействии Cu+НП по типу антагонизма после 10 сут. Слабый значимый синергический эффект отмечен однократно только при комбинации 0,0125 Cu+10 НП мг/л и только на 1 сут опыта.

При комбинации высокой концентрации 50 мг/л НП и разных концентраций меди наблюдали антагонистический эффект, т.е. ослабление токсического действия среды только при максимальной концентрации меди 0,075 мг/л на протяжении 14 сут, однако, статистическая значимость этого эффекта была подтверждена только на 14 сут.

Таким образом, комбинированный эффект меди и наночастиц полистирола на культуру *S. quadricauda* по показателю эффективности фотосинтеза зависит как от концентраций этих добавок, так и от различных комбинаций их концентраций и времени действия. Взаимодействие токсикантов в среде культивирования может приводить к ослаблению токсического действия наиболее токсичного компонента на культуру в процессе ее роста. При действии меди и НП в бинарных комбинациях на фотосинтез клеток тест-культуры *S. quadricauda* были обнаружены все три типа взаимодействий этих добавок в культуральной среде – антагонизм, нейтрализм и синергизм.

Полученные нами данные по показателю изменения численности клеток водорослей *S. quadricauda* при действии НП и Cu совместно и отдельно, были дополнительно обработаны математически, рассчитаны по определенным формулам и представлены на рис. 36, наглядно отображающих все три типа взаимодействия этих добавок в культуральной среде на все сроки наблюдения опытов.

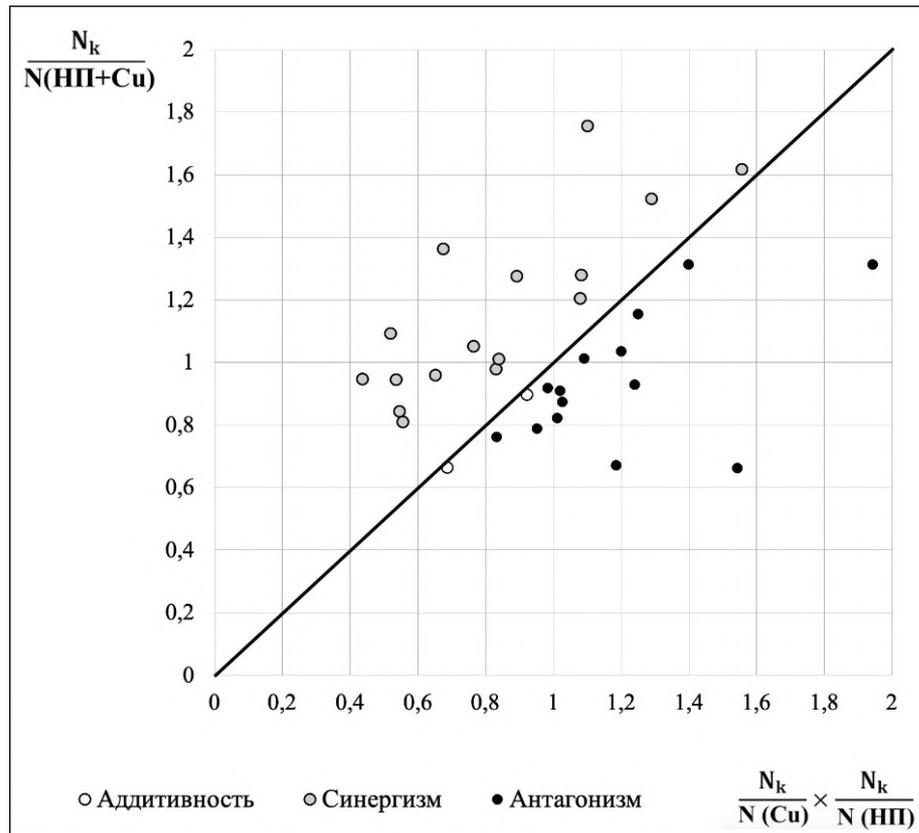


Рисунок 36. Зависимость между оценками комбинированного и отдельного действия ионов меди и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водоросли *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте. N_k – контроль.

Сравнение результатов хронических опытов по исследованию комбинированного действия этих добавок на культуру *S. quadricauda* показало, что физиологическое состояние культуры, оцениваемое по величине эффективности фотосинтеза, также изменяется при совместном действии этих добавок, и может либо улучшаться, не меняться или незначительно ослабевать по сравнению с действием токсикантов по отдельности. Однако для показателя эффективности фотосинтеза число статистически значимых случаев таких эффектов на все сроки наблюдения было меньше, чем для показателя численности клеток. Тем не менее обнаруженный достоверный кратковременный эффект ослабления токсического действия высокой концентрации меди в присутствии нанопластика по показателю эффективности фотосинтеза свидетельствует о сходной тенденции в реакции культуры на токсическое воздействие по обоим показателям.

В случае острых экспериментов с НП и медью на культуре *C. vulgaris* характер реакции, по-видимому, зависел от концентрации меди. Для проверки данного предположения по результатам опытов на культуре *S. quadricauda* была составлена точечная диаграмма, отображающая распределение различных типов взаимодействия токсикантов в зависимости от концентрации меди (рис. 37). Однако на культуре *S. quadricauda* данную зависимость отследить не удалось. Подобные диаграммы были составлены также для оценки зависимости от длительности эксперимента (рис. 38) и от концентрации НП (рис. 39 и 40). При изменении длительности эксперимента определённых тенденций изменения типа взаимодействия не наблюдали. При этом, на рис. 39 и 40, построенных для всех испытанных концентраций меди с добавками 10 и 50 мг НП/л соответственно, заметно, что при повышении концентрации НП до 50 мг/л чаще встречающиеся в более ранний период времени случаи антагонистического взаимодействия токсикантов впоследствии сменялись синергизмом.

Таким образом, при комбинированном воздействии НП и меди в разных комбинациях их концентраций наблюдали неоднозначную ответную реакцию культуры *S. quadricauda* на такое воздействие. При этом в процессе роста культуры в целом могли наблюдать все три типа взаимодействий токсикантов – синергизм (усиление токсического действия), антагонизм (ослабление токсического действия) и нейтрализм (независимое действие токсикантов в смеси).

Улучшение роста культуры можно отметить на 3 и 14 сут при комбинациях малой концентрации 10 мг/л НП с добавками меди в разных концентрациях и однократно на 7 сут только для случая Cu 0,0125 + НП 50 мг/л.

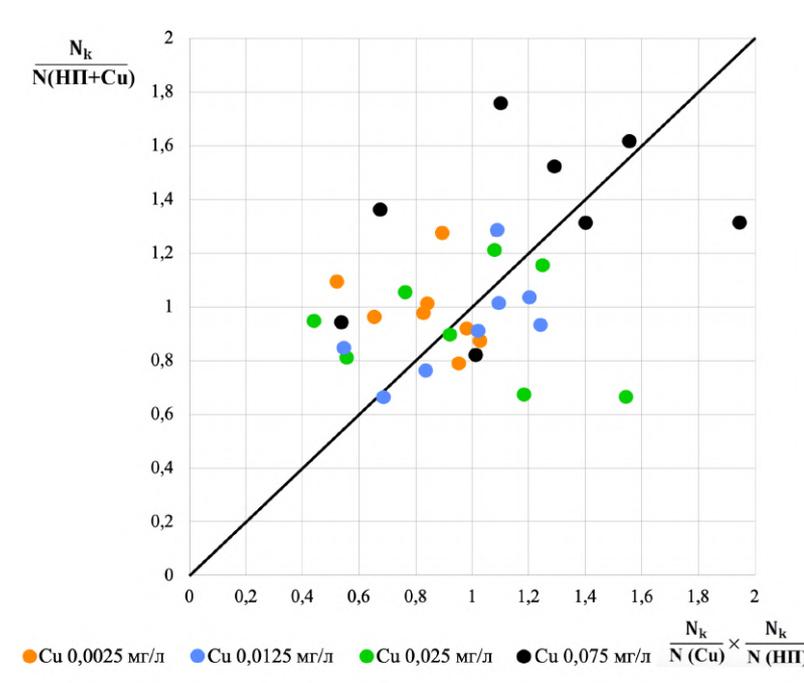


Рисунок 37. Распределение значений оценок комбинированного и отдельного действия ионов меди и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водоросли *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте в зависимости от концентрации меди. N_k – контроль.

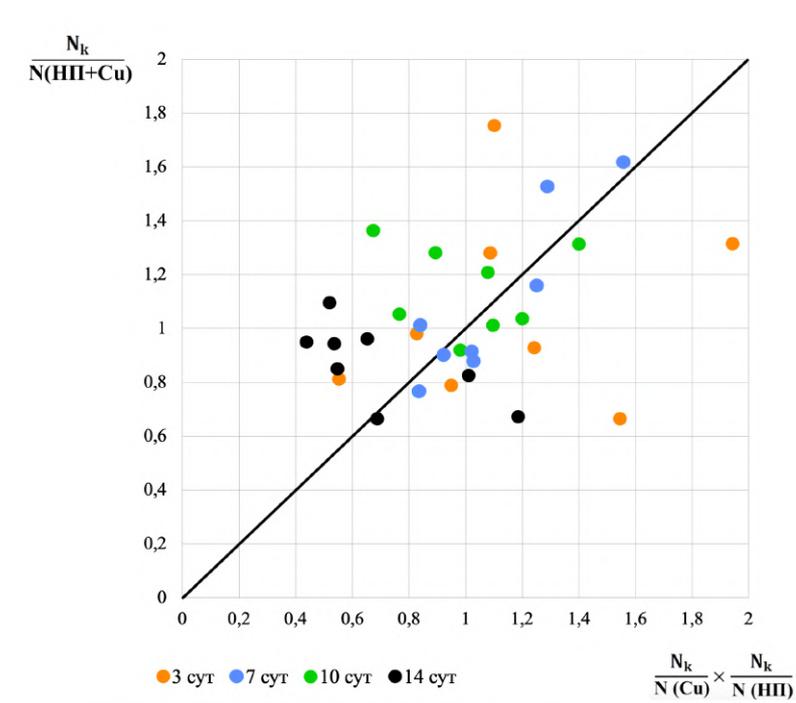


Рисунок 38. Распределение значений оценок комбинированного и отдельного действия ионов меди и наночастиц полистирола на изменение численности клеток (N) водоросли *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте в зависимости от сроков эксперимента. N_k – контроль.

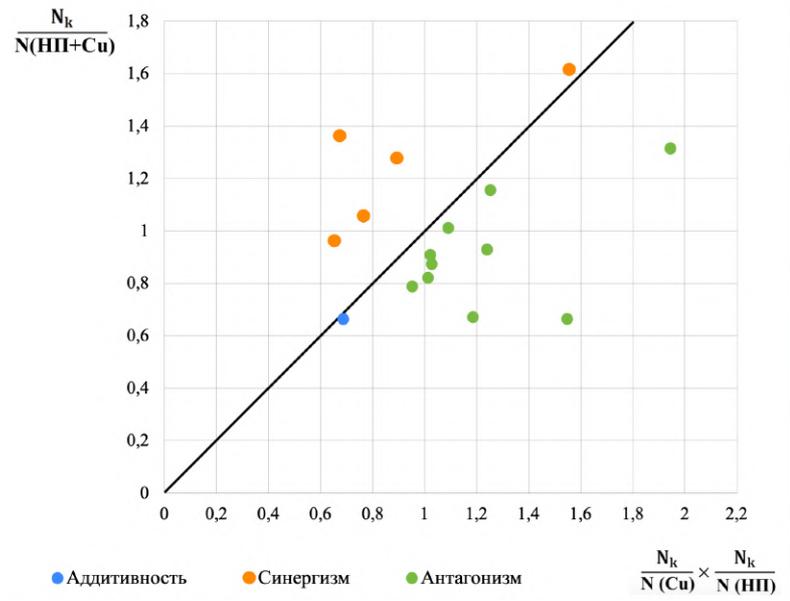


Рисунок 39. Распределение значений оценок комбинированного и раздельного действия ионов меди и наночастиц полистирола в концентрации 10 мг/л на изменение численности клеток (N) водоросли *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте. N_k – контроль.

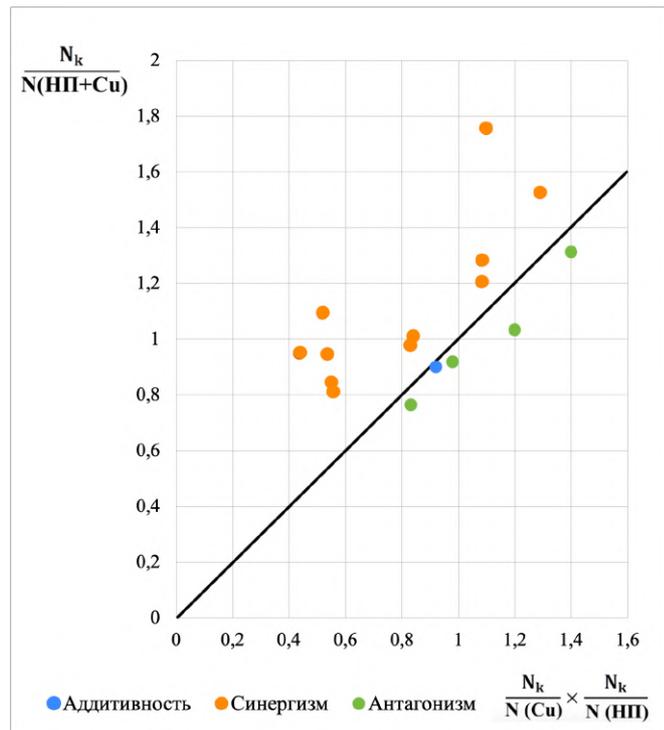


Рисунок 40. Распределение значений оценок комбинированного и раздельного действия ионов меди и наночастиц полистирола в концентрации 50 мг/л на изменение численности клеток (N) водоросли *Scenedesmus quadricauda* в хроническом опыте. N_k – контроль.

Угнетение роста культуры наблюдали однократно только на 10 сут при 4 комбинациях токсикантов – высокой концентрации 50 мг/л НП и двух высоких концентраций меди, а также при малой концентрации 10 мг/л НП и минимальной и максимальной концентрациях меди.

Независимое действие токсикантов отмечено при высоких концентрациях токсикантов на 3 и 7 сут и однократно для случаев Cu 0,075 + НП 10 мг/л (7 сут) и Cu 0,0125 + НП 50 мг/л (14 сут).

Такая сложная мозаичная ответная реакция культуры *S. quadricauda* на воздействие различных комбинаций, исследованных токсикантов вызывает трудности в интерпретации токсичности токсикантов или их смеси.

Присутствие невысоких концентраций наночастиц полистирола в среде может вызывать в ряде случаев протекторный эффект от токсического действия высоких концентраций меди, что может быть связано с адсорбцией меди на частицах нанопластика, которая приводит к уменьшению концентрации меди в среде и снижению ее токсического действия на культуру водорослей *S. quadricauda*.

Таким образом, комбинированный эффект меди и наночастиц полистирола на культуры *S. quadricauda* и *C. vulgaris* зависит как от концентраций этих токсикантов, так и от различных комбинаций их концентраций и времени действия. Взаимодействие токсикантов в среде культивирования может приводить как к ослаблению, так и к усилению токсического действия на культуры в процессе их роста наиболее токсичного компонента. При действии меди и НП в бинарных комбинациях на тест-культуру *S. quadricauda* были обнаружены все три типа взаимодействий (синергизм, антагонизм и нейтрализм), а на тест-культуру *C. vulgaris* – два типа взаимодействий (антагонизм и нейтрализм). Разницу в ответной реакции двух видов микроводорослей можно объяснить их видовой спецификой, условиями культивирования, разными размерами и морфологией клеток.

Результаты данного исследования показывают, что для обеих культур по параметру численности клеток антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП с другими токсикантами на все сроки наблюдения, при этом токсиканты при их комбинации с 50 мг/л НП в культуральной среде *S. quadricauda* по сравнению с *C. vulgaris* чаще взаимодействовали по типу синергизма. Однако по показателю эффективности фотосинтеза клеток в процессе роста *S. quadricauda* обнаружены продолжительные эффекты усиления токсического действия среды при совместном присутствии в ней высоких концентраций 0,5 мг/л метиленового синего и 50 мг/л наночастиц полистирола и их взаимодействие по типу синергизма, в то же время бинарные комбинации их низких концентраций 0,1 мг/л МС и 10 мг/л НП приводят к усилению токсичности среды со временем.

3.3. Влияние ключевых, контролируемых факторов среды в лабораторных условиях при проведении альготестирования³

3.3.1. Влияние времени суток на момент добавления токсиканта на результат альготестирования

3.3.1.1. Результаты исследования влияния фактора времени добавления токсиканта на культуру *Scenedesmus quadricauda*

В первом опыте численность клеток *S. quadricauda* во всех повторностях, за исключением контроля, подсчитывали через 72 ч с момента добавления токсиканта. Контроль, соответственно, подсчитывали дважды, во время определения численностей клеток в каждой из линий эксперимента.

³При подготовке подраздела 3.3 использованы результаты, ранее опубликованные автором в следующих статьях: Лазарева и др., 2023 а; Лазарева, Ипатова, 2023 а; Лазарева, Ипатова, 2023 б; Ипатова, Лазарева, 2022; Лазарева, Ипатова, 2022; Лазарева, Ипатова, 2021; Лазарева и др., 2019.

Результаты изменения относительной численности клеток (в % от контроля) представлены на рис. 41.

В повторностях с концентрациями токсиканта 0,1 и 1 мг/л нами была отмечена стимуляция роста культуры до 38%, при условии добавки токсиканта вечером. В колбах с теми же концентрациями токсиканта, добавленными утром, наблюдали только угнетение роста. А в присутствии 5 и 10 мг/л было отмечено значительное угнетение роста культуры, численность клеток в этих повторностях не превышала 22% от уровня контроля, т.е. отклонение от контроля составляло более 88%.

Результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda* (рис. 42), оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии в диапазоне исследованных концентраций 0,1–10 мг/л, также продемонстрировали отличия в зависимости от времени-добавки токсиканта.

При 0,1 мг/л доля живых клеток была на уровне контроля (98–99%) для обоих сроков добавки токсиканта. Однако, уже при 1 и 5 мг/л наблюдали значительное отличие в численности живых клеток. В колбах, в которые токсикант был добавлен утром, численность живых клеток снизилась сильнее, чем в повторностях с вечерними добавками. При концентрации 10 мг/л обнаружено минимальное количество жизнеспособных клеток, близкое для обоих сроков добавки токсиканта.

Оба показателя (численность и доля живых клеток культуры) продемонстрировали большее угнетение при добавлении токсиканта утром, по сравнению с вечерними добавками. Более невероятным делает это отличие тот факт, что в утренних повторностях у тест-организма было 12 ч на адаптацию к новым условиям, тогда как в вечерней линии опыта добавки токсиканта были произведены сразу после постановки эксперимента. А значит и численность клеток на момент добавления токсиканта в утренних пробах могла быть выше, что уменьшает дозу на каждую клетку водоросли.

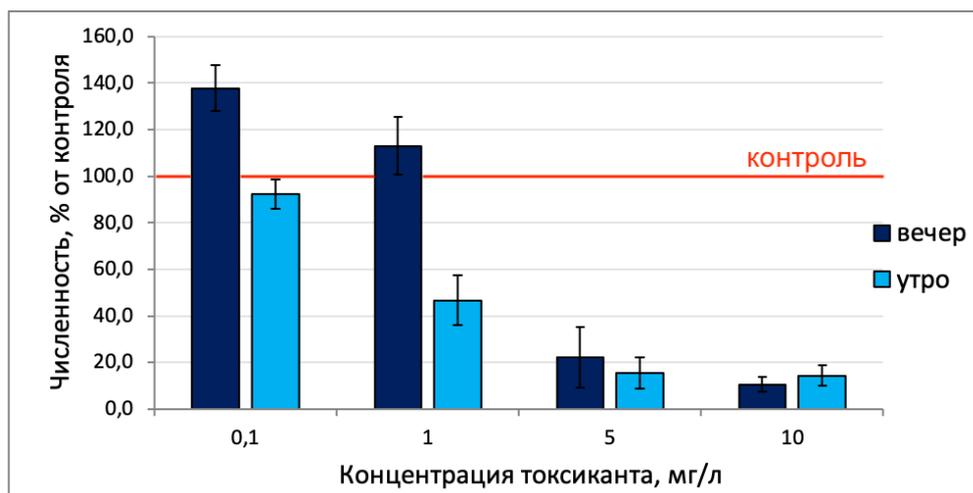


Рисунок 41. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бихромата калия на 3 сут при постановке опыта утром и вечером.

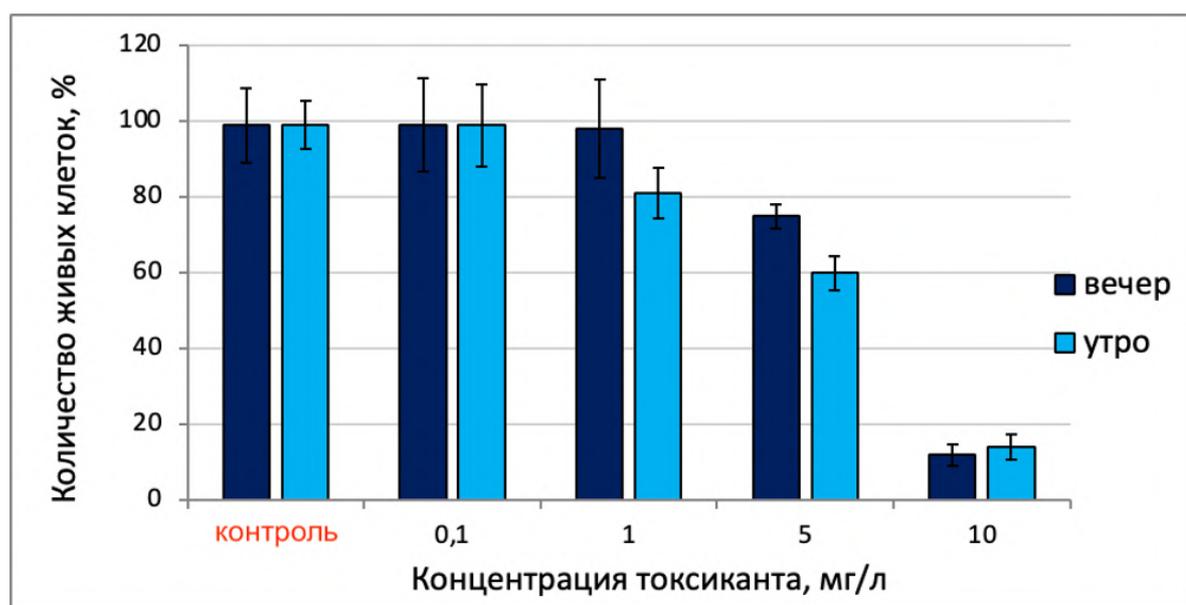


Рисунок 42. Изменение численности живых клеток *Scenedesmus quadricauda* (в % от общего числа клеток) в присутствии бихромата калия на 3 сут при постановке опыта утром и вечером.

Обнаруженная нами зависимость токсичности бихромата калия от времени добавления токсиканта, отражающая влияние времени суток на момент его добавки на результаты биотестирования в остром 3-сут опыте, привело нас к необходимости повторения этого эксперимента с небольшими модификациями. Поэтому был поставлен хронический эксперимент длительностью 21 сут, который

представлял собой два параллельных опыта, каждый со своим контролем. Постановка каждого опыта была проведена непосредственно перед добавлением токсиканта. Результаты хронического опыта представлены на рис. 43 и 44.

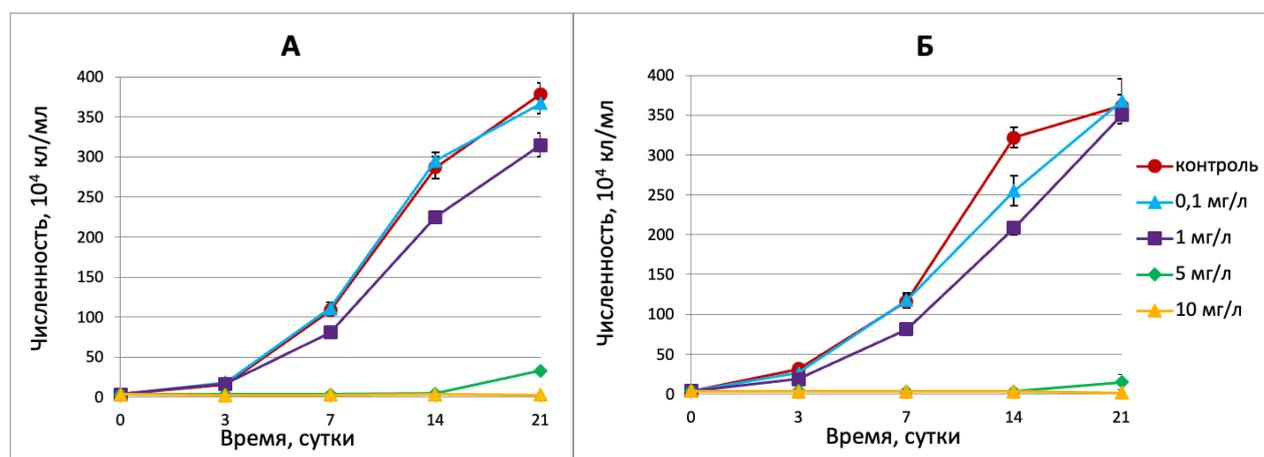


Рисунок 43. Изменение абсолютной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бихромата калия при добавлении токсиканта в 20:00 (А) и в 8:00 (Б).

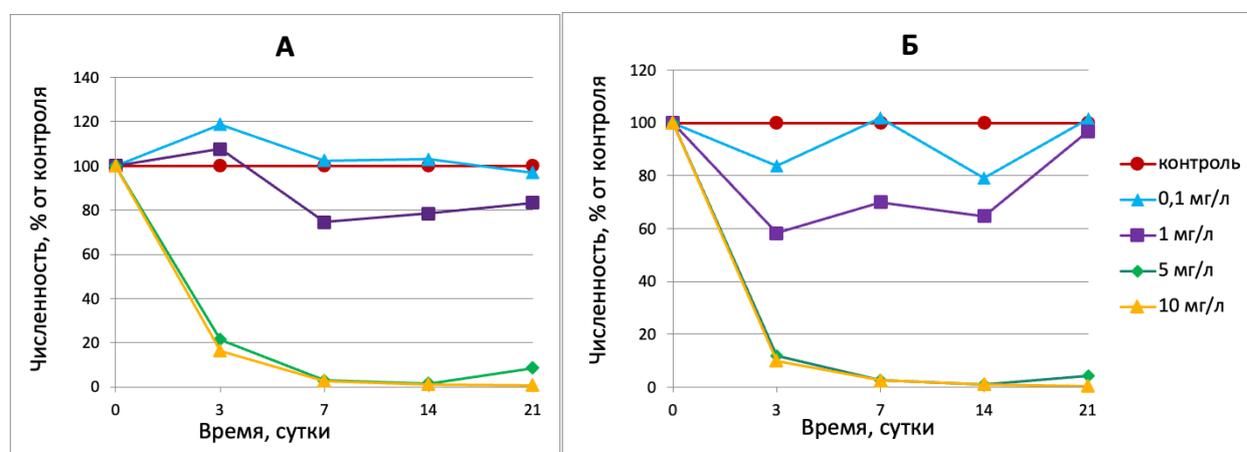


Рисунок 44. Изменение относительной численности клеток (в % от контроля) культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бихромата калия при добавлении токсиканта в 20:00 (А) и в 8:00 (Б).

Тенденция усиления токсичности бихромата калия при утренней его добавке, обнаруженная в остром эксперименте на 3 сут, сохранялась на этот же срок и в хроническом опыте. Сравнение острого и хронического экспериментов по результатам на 3 сут показало, что как в остром опыте (рис. 41), так и в хроническом (рис. 44) на 3 сут при концентрациях 0,1 и 1 мг/л бихромата калия

обнаружена стимуляция при добавлении токсиканта вечером и угнетение роста при добавлении утром. А при высоких концентрациях 5 и 10 мг/л на 3 сут наблюдалось значительное угнетение роста как в остром, так и в хроническом экспериментах, с разницей более сильного угнетения роста в хроническом эксперименте при добавлении утром по сравнению с вечерней добавкой.

В хроническом опыте при добавлении бихромата калия вечером в 20.00 во время, совпадающего с окончанием светового периода роста, минимальная из всех испытанных концентраций 0,1 мг/л бихромата калия была нетоксичной, а концентрации 1, 5 и 10 мг/л оказывали достоверное токсическое действие на изменение численности клеток культуры на протяжении всего опыта длительностью 21 сут.

А при добавлении бихромата калия утром в 8.00 во время, совпадающего с началом светового периода роста, проявилась токсичность малой концентрации 0,1 мг/л на 3 и 14 сут, при этом угнетение роста составляло соответственно 16 и 21% по сравнению с контролем. Токсичность же 1 мг/л усиливалась по сравнению с добавкой вечером при наблюдении на 3, 7 и 14 сут опыта. Подобная тенденция усиления токсичности после утренней добавки токсиканта наблюдалась и при концентрациях 5 и 10 мг/л, при которых тоже происходило продолжительное усиление токсичности по сравнению с добавкой вечером.

Оценка результатов этого опыта по Т-критерию Стьюдента и U-критерию Манна–Уитни показала сходство в оценке полученного эффекта (табл. 27).

Таблица 27. Оценка достоверности результатов хронического эксперимента по U-критерию Манна–Уитни.

Срок, сут	Утро				Вечер			
	0,1 мг/л	1 мг/л	5 мг/л	10 мг/л	0,1 мг/л	1 мг/л	5 мг/л	10 мг/л
3	0	0	0	0	0	0	0	0
7	3	0	0	0	3	0	0	0
14	0	0	0	0	4	0	0	0
21	4	2,5	0	0	2,5	0	0	0

Примечание: полужирным выделены значения U-критерия, демонстрирующие значимые отличия опытных значений от контроля при $p < 0,05$.

Рассчитанные величины ЛК₅₀ на разные сроки наблюдений подтверждают обнаруженное нами усиление токсичности бихромата калия при постанове опыта утром (табл. 28). Так значения ЛК₅₀ до 14 сут для утреннего варианта опыта были ниже по сравнению с таковыми для вечернего опыта.

Таблица 28. Рассчитанные величины ЛК₅₀ бихромата калия для *Scenedesmus quadricauda* на разные сроки наблюдений.

Срок, сут	ЛК ₅₀	
	Утро	Вечер
3	0,80	4,18
7	1,39	1,54
14	0,48	2,48
21	2,49	1,17

Таким образом, в данной работе было показано, что время добавки токсиканта влияет на результаты биотестирования с использованием в качестве тест-организма культуры микроводоросли *S. quadricauda*. По показателям изменения численности и соотношения живых и мёртвых клеток в культуре отмечено большее угнетение при добавлении K₂Cr₂O₇ утром, по сравнению с вечерней добавкой. А рассчитанные величины ЛК₅₀ на разные сроки наблюдений хронического опыта подтверждают факт усиления токсичности бихромата калия при постанове опыта утром по сравнению с таковыми для вечернего опыта. По

материалам данного исследования была опубликована статья (Лазарева, Ипатова, 2022).

Полученные результаты на *S. quadricauda* свидетельствуют о необходимости проведения исследований влияния фактора времени добавления токсиканта на результат биотеста и на других тест-организмах и/или с токсикантами другой природы.

Поэтому были проведены дополнительные эксперименты с культурой *C. vulgaris* с четырьмя токсикантами разной природы. Все эксперименты были острыми, поскольку наибольшая разница в ответной реакции культуры *S. quadricauda* на утренние и вечерние добавки токсиканта была отмечена на ранние сроки (до 3 сут) хронического эксперимента.

3.3.1.2. Результаты исследования влияния фактора времени добавления токсиканта на культуру *Chlorella vulgaris*

Эксперименты с бихроматом калия

В люминостате через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта только при максимальной (5 мг/л) из всех исследованных концентраций как при постановке опыта утром, так и вечером. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены при минимальной (0,1 мг/л) и максимальной (5 мг/л) концентрациях (табл. 29, рис. 45).

Таблица 29. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,1 мг/л	1 мг/л	5 мг/л
24	8:00	0,72±0,01 100%	0,71±0,01 d-stat = 2,12 98,6%	0,71±0,01 d-stat = 0,71 99,5%	0,62±0,01 d-stat = 21,21 86,0%
	20:00	0,72±0,01 100%	0,72±0,01 d-stat = 1,00 100,5%	0,71±0,01 d-stat = 1,00 99,5%	0,66±0,01 d-stat = 17,00 92,1%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 4,00	d-stat = 0,00	d-stat = 13,00

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

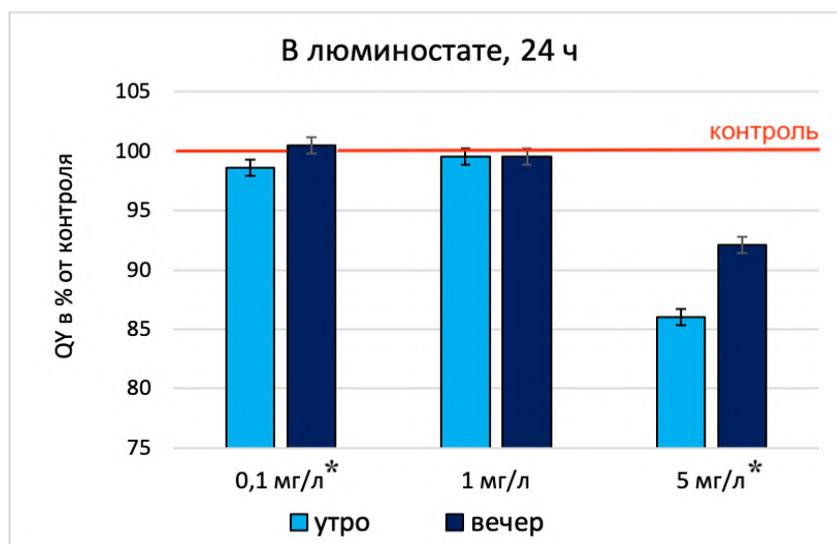


Рисунок 45. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$)).

В культиваторе через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *Chlorella vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при максимальной концентрации (5 мг/л) при постановке опыта утром и при всех исследованных концентрациях – вечером. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены только при среднетоксичной (1 мг/л) концентрации (табл. 30, рис. 46).

Важно отметить, что наиболее сильное угнетение эффективности фотосинтеза клеток культуры отмечено при постановке опыта утром как в люминостате, так и в культиваторе.

Таблица 30. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации $K_2Cr_2O_7$ при проведении опыта в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,1 мг/л	1 мг/л	5 мг/л
24	8:00	0,67±0,01 100%	0,68±0,02 d-stat = 0,18 100,5%	0,71±0,01 d-stat = 1,77 105,0%	0,55±0,03 d-stat = 6,72 81,2%
	20:00	0,65±0,01 100%	0,64±0,01 d-stat = 0,97 98,5%	0,64±0,01 d-stat = 1,62 97,4%	0,56±0,02 d-stat = 8,76 86,2%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 1,09	d-stat = 6,61	d-stat = 1,35

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

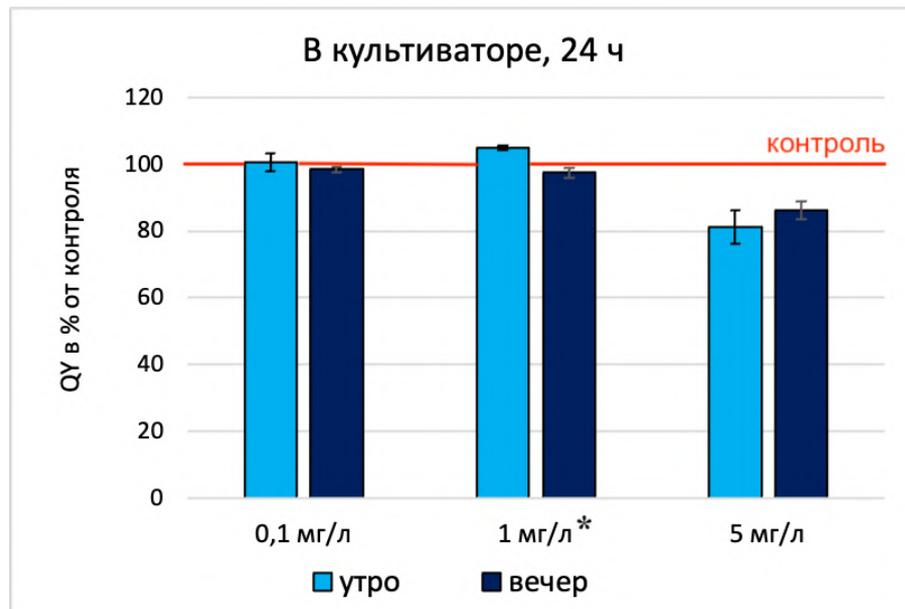


Рисунок 46. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

В культиваторе через 24 ч численность клеток *C. vulgaris* (по величине оптической плотности) была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при 1 и 5 мг/л бихромата калия как при постановке опыта утром, так и вечером, при этом наиболее сильное угнетение роста наблюдали утром. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены при концентрациях 1 и 5 мг/л (табл. 31, рис. 47).

Таким образом, несмотря на круглосуточное освещение в культиваторе, токсичность бихромата калия при его добавлении в культуру утром выше, чем вечером, что, скорее всего, связано с циркадным ритмом размножения клеток и большей чувствительностью к токсиканту молодых клеток, появившихся в большом количестве в ночное время.

Таблица 31. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при проведении опыта в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,1 мг/л	1 мг/л	5 мг/л
24	8:00	90,7±6,3 100%	84,0±1,5 d-stat = 1,49 92,6%	71,0±6,0 d-stat = 4,40 78,3%	17,3±1,3 d-stat = 16,42 19,1%
	20:00	39,0±0,5 100%	40,3±0,8 d-stat = 0,61 103,4%	27,3±1,0 d-stat = 5,34 70,1%	11,0±1,0 d-stat = 12,81 28,2%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 2,95	d-stat = 1,29	d-stat = 5,13

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

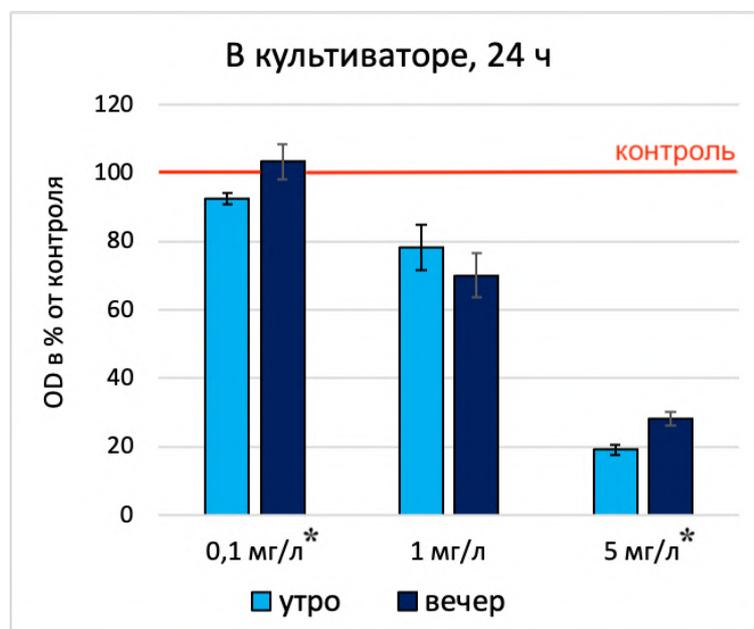


Рисунок 47. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

В люминостате (рис. 48, табл. 32) с ежедневным измерением величины оптической плотности в течение 3 сут численность клеток *C. vulgaris* при 5 мг/л бихромата калия была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при постановке опыта утром на все сроки наблюдения и при 1 мг/л – только на 1 сут. А при постановке опыта вечером – только при 5 мг/л на все сроки наблюдения.

А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены при концентрации 1 мг/л на 1 и 2 сут (рис. 48, табл. 32). При этом наиболее сильное значимое угнетение роста наблюдали при добавлении токсиканта утром.

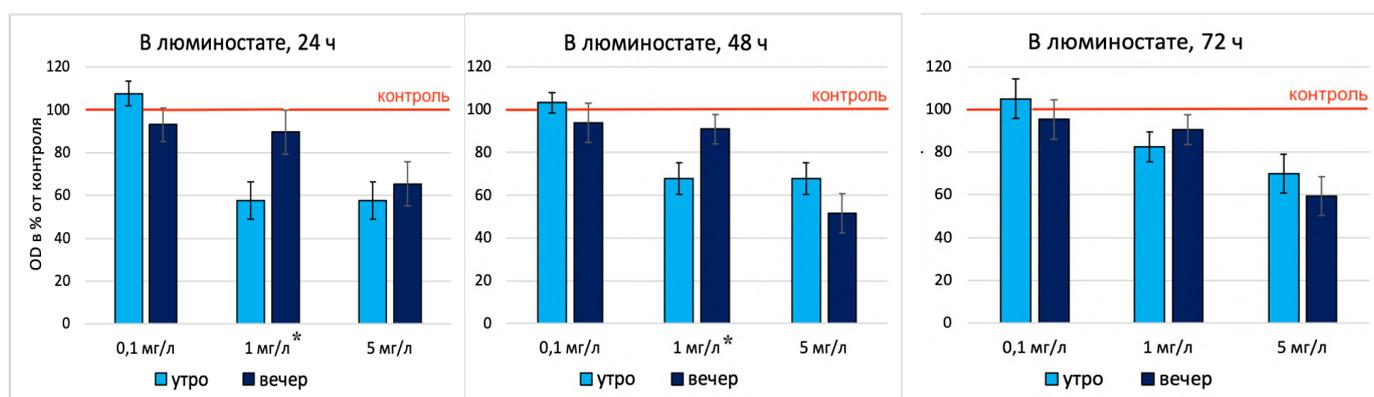


Рисунок 48. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24, 48 и 72 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d -stat превышает d -критическое, при $p < 0,05$)).

Таблица 32. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации бихромата калия при проведении опыта в люминостате в течение 72 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,1 мг/л	1 мг/л	5 мг/л
24	8:00	8,7±0,5 100%	9,3±0,5 d-stat = 0,38 107,7%	5,0±0,8 d-stat = 3,78 57,7%	5,0±0,8 d-stat = 3,78 57,7%
	20:00	9,7±0,5 100%	9,0±0,8 d-stat = 0,82 93,1%	8,7±1,0 d-stat = 1,22 89,7%	6,3±1,0 d-stat = 4,08 65,5%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 2,05	d-stat = 3,33	d-stat = 0,82
48	8:00	10,3±1,3 100%	10,7±0,5 d-stat = 0,00 103,2%	7,0±0,8 d-stat = 0,38 67,7%	7,0±0,8 d-stat = 5,29 67,7%
	20:00	11,0±0,8 100%	10,3±1,0 d-stat = 0,76 93,9%	10,0±0,8 d-stat = 1,13 90,9%	5,7±1,0 d-stat = 6,05 51,5%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 1,35	d-stat = 3,02	d-stat = 1,97
72	8:00	13,3±1,0 100%	14,0±0,8 d-stat = 0,59 105,0%	11,0±0,8 d-stat = 2,06 82,5%	9,3±1,8 d-stat = 3,54 70,0%
	20:00	14,0±0,8 100%	13,3±1,0 d-stat = 0,54 95,2%	12,7±1,8 d-stat = 1,09 90,5%	8,3±1,3 d-stat = 4,63 59,5%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 1,52	d-stat = 0,83	d-stat = 0,95

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

Интересно отметить, что одинаковые добавки бихромата калия при содержании микроводорослей в культиваторе и люминостане оказывали разное влияние на рост культуры. Токсичность исследуемого вещества была выше при содержании культуры в оптимальных условиях в культиваторе (табл. 31, рис. 47), чем при содержании в люминостане при более низкой температуре (табл. 32, рис. 48), что может быть связано с высоким темпом роста культуры в культиваторе.

Расчёт ЭК₅₀ бихромата калия за 24 час в остром опыте с культурой *C. vulgaris* в культиваторе (табл. 33) подтверждает факт ее большей чувствительности к токсиканту при постановке опыта и добавке токсиканта утром (ЭК₅₀=**1,74**) по сравнению с вечерней добавкой (ЭК₅₀=**2,14**).

Таблица 33. ЭК₅₀ бихромата калия в остром опыте с культурой *Chlorella vulgaris* при постановке опыта утром и вечером.

Условия проведения эксперимента	Время начала опыта	
	утро	вечер
культиватор, 24ч	1,74	2,14

Таким образом, проведенные острые опыты с культурой *C. vulgaris* с эталонным токсикантом бихроматом калия в диапазоне концентраций 0,1–5 мг/л по двум показателям состояния лабораторной популяции (численность клеток и эффективность фотосинтеза) показали, что как в люминостане при освещении в режиме смены дня и ночи, так и в культиваторе при круглосуточном освещении токсичность вещества в утренние часы постановки опыта оказывается выше, чем при постановке опыта вечером.

Эксперименты с сульфатом меди

Как в люминостане (табл. 34, рис. 49), так и в культиваторе (табл. 35, рис. 50), через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при концентрациях 0,1 и 0,2 мг/л сульфата меди как при постановке опыта утром, так и вечером. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта в люминостане значимые различия величин этого показателя отмечены при минимальной (0,02 мг/л) концентрации (табл. 34, рис. 49).

В культиваторе через 24 ч при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величины эффективности фотосинтеза клеток *Chlorella vulgaris* отмечены только при концентрации 0,1 мг/л (табл. 35, рис. 50).

В культиваторе через 24 ч численность клеток *C. vulgaris* (по величине оптической плотности) была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при 0,1 и 0,2 мг/л сульфата меди как при постановке опыта утром, так и вечером, при этом наиболее сильное угнетение роста наблюдали утром. При сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта наибольшее различие в оптической плотности культуры отмечены при концентрации 0,1 мг/л (табл. 36, рис. 51).

Таблица 34. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации сульфата меди при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,02 мг/л	0,1 мг/л	0,2 мг/л
24	08:00	0,717±0,005 100%	0,683±0,013 d-stat = 1,08 95,35%	0,493±0,050 d-stat = 7,22 68,84%%	0,223±0,035 d-stat = 15,96 31,16%
	20:00	0,717±0,005 100%	0,713±0,005 d-stat = 0,23 99,53%	0,447±0,013 d-stat = 18,83 62,33%	0,267±0,025 d-stat = 31,39 37,21%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 3,18	d-stat = 1,33	d-stat = 1,38

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

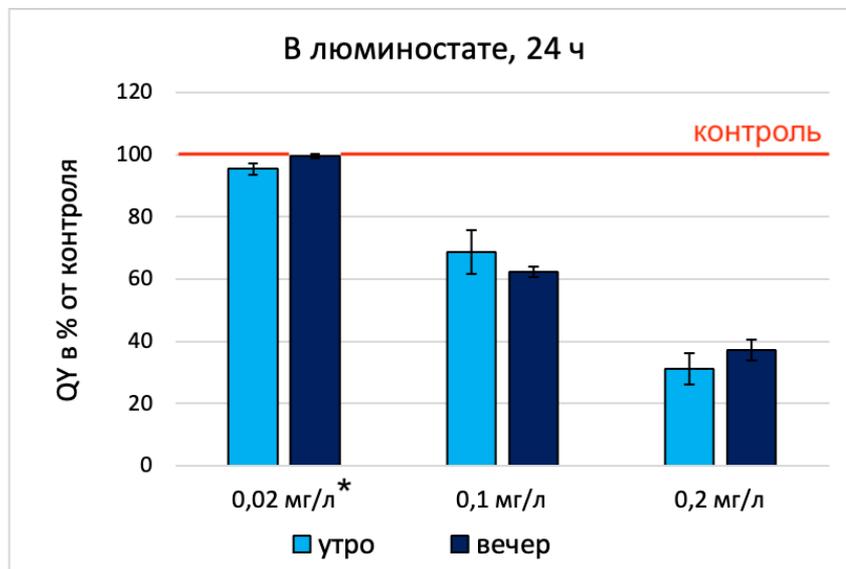


Рисунок 49. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации сульфата меди при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$)).

Таблица 35. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации медного купороса при проведении опыта в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,02 мг/л	0,1 мг/л	0,2 мг/л
24	08:00	0,673±0,005 100%	0,660±0,008 d-stat = 0,45 98,02%	0,543±0,035 d-stat = 4,42 80,69%	0,253±0,043 d-stat = 14,27 37,62%
	20:00	0,697±0,005 100%	0,677±0,005 d-stat = 0,62 97,13%	0,413±0,035 d-stat = 8,79 59,33%	0,243±0,058 d-stat = 14,06 34,93%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 0,91	d-stat = 4,12	d-stat = 0,37

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

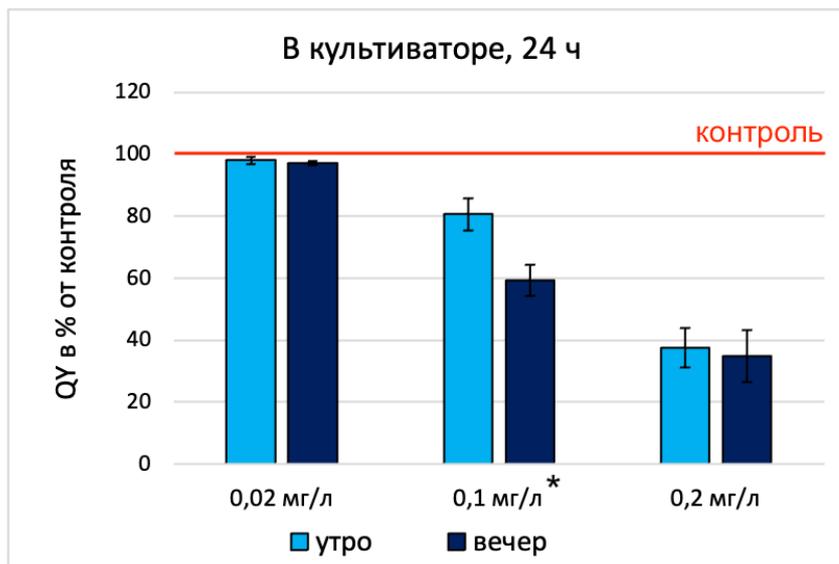


Рисунок 50. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации медного купороса при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$)).

Таким образом, токсичность сульфата меди, как и бихромата калия, при его добавлении в культуру утром выше, чем вечером, что, скорее всего, связано с циркадным ритмом размножения клеток и большей чувствительностью к токсиканту молодых клеток, появившихся в большом количестве в ночное время.

Таблица 36. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации сульфата меди при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,02 мг/л	0,1 мг/л	0,2 мг/л
24	08:00	61,3±2,8	60,7±2,8 d-stat = 0,26	4,7±2,0 d-stat = 22,13	3,7±2,8 d-stat = 22,52
		100%	98,91%	7,61%%	5,98%
	20:00	52,0±5,3	52,0±2,3 d-stat = 0,00	8,7±2,0 d-stat = 13,86	2,3±1,3 d-stat = 15,88
100%		100,00%	16,67%	4,49%	
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 0,26	d-stat = 2,47	d-stat = 0,43

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

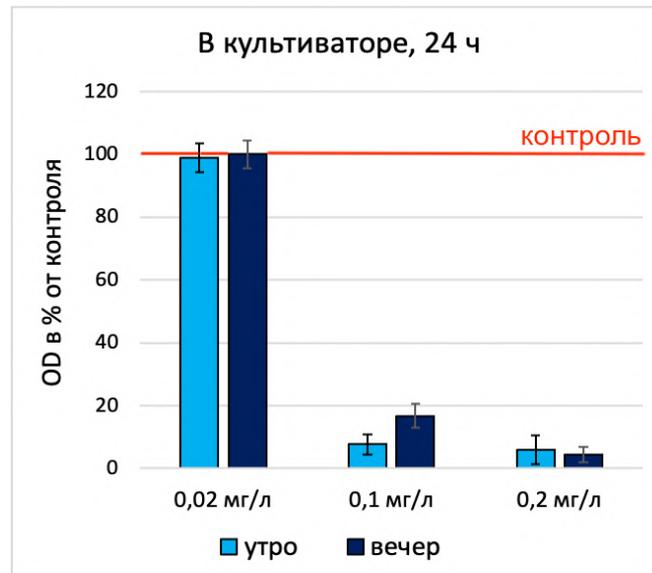


Рисунок 51. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации медного купороса при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч.

В люминостане с ежедневным измерением величины оптической плотности в течение 3 сут численность клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при 0,1 и 0,2 мг/л сульфата меди при постановке опыта как утром, так и вечером на все сроки наблюдения. Наиболее сильное значимое угнетение роста в большинстве дат наблюдения отмечено утром. В тех случаях, когда показатель оптической плотности культуры при утренних добавках был выше, чем при вечерних, показатели оптической плотности культуры были близки с разницей менее 5%. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены при наименьшей испытанной концентрации 0,02 мг/л сульфата меди на 2 сут (табл. 37, рис. 52).

Таблица 37. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации медного купороса при проведении опыта в люминостате в течение 72 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³			
		контроль	концентрация токсиканта		
			0,02 мг/л	0,1 мг/л	0,2 мг/л
24	08:00	8,7±0,5	9,0±0,8 d-stat = 0,58	5,3±0,5 d-stat = 5,77	2,3±0,5 d-stat = 10,97
		100%	103,85%	61,54%	26,92%
	20:00	9,7±0,5	9,7±0,5 d-stat = 0,00	5,7±0,1 d-stat = 5,37	4,3±0,1 d-stat = 7,16
		100%	100,00%	58,62%	44,83%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 0,51	d-stat = 0,37	d-stat = 2,27
48	08:00	10,3±0,5	8,7±1,0 d-stat = 2,13	4,0±0,8 d-stat = 8,10	3,0±0,8 d-stat = 9,38
		100%	83,87%	38,71%	29,03%
	20:00	11,0±0,8	11,7±0,5 d-stat = 0,89	6,0±0,8 d-stat = 6,711	3,0±0,8 d-stat = 10,73
		100%	106,06%	54,55%	27,27%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 3,11	d-stat = 2,07	d-stat = 0,23
72	08:00	13,3±1,0	12,7±0,5 d-stat = 0,71	6,3±1,0 d-stat = 7,42	4,7±1,3 d-stat = 9,19
		100%	95,00%	47,50%	35,00%
	20:00	14,0±0,8	16,7±1,0 d-stat = 1,34	14,0±1,5 d-stat = 8,05	18,0±0,8 d-stat = 12,52
		100%	107,14%	57,14%	33,33%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 2,52	d-stat = 1,49	d-stat = 0,24

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

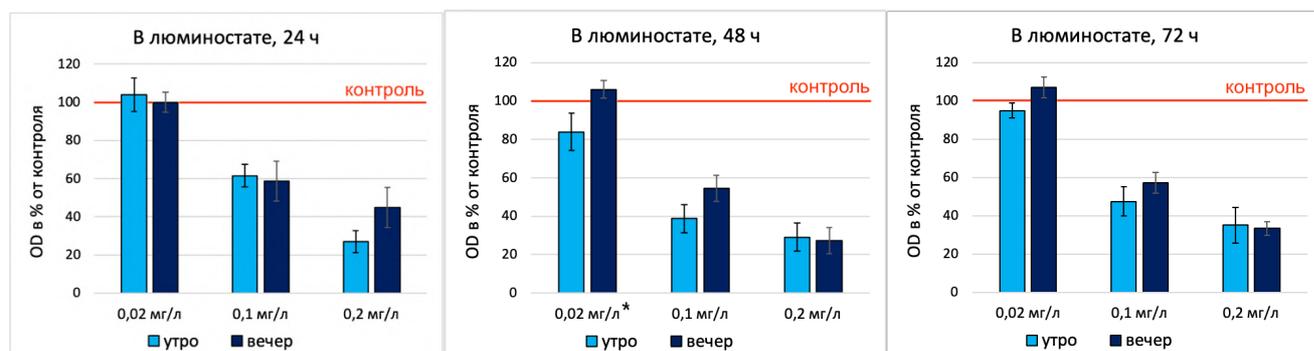


Рисунок 52. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации медного купороса при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24, 48 и 72 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

Расчёт ЭК₅₀ сульфата меди за 24, 48 и 72 ч в остром опыте с культурой *C. vulgaris* в культиваторе и люминостате (табл. 38) подтверждает факт ее большей чувствительности к токсиканту при постановке опыта и добавке токсиканта утром по сравнению с вечерней добавкой.

Таблица 38. ЭК₅₀ сульфата меди в остром опыте с культурой *Chlorella vulgaris* при постановке опыта утром и вечером.

Условия проведения эксперимента	Время начала опыта	
	утро	вечер
культиватор, 24 ч	0,066	0,069
люминостат, 24 ч	0,12	0,16
люминостат, 48 ч	0,08	0,11
люминостат, 72 ч	0,11	0,12

Таким образом, проведенные острые опыты с культурой *C. vulgaris* с сульфатом меди в диапазоне концентраций 0,01–0,2 мг/л по двум показателям состояния лабораторной популяции (численность клеток и эффективность фотосинтеза) показали, что как в люминостате при освещении в режиме смены дня и ночи, так и в культиваторе при круглосуточном освещении токсичность вещества

в утренние часы постановки опыта оказывается выше, чем при постановке опыта вечером, как и в экспериментах с бихроматом калия.

Эксперименты с хлоридом алюминия

В люминостане через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при концентрациях 50 и 100 мг/л как при постановке опыта утром, так и вечером. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены при максимальной (100 мг/л) концентрации (табл. 39, рис. 53).

Таблица 39. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в люминостане через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			10 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
24	08:00	0,717±0,005	0,680±0,008 d-stat = 2,49 94,88%	0,343±0,013 d-stat = 25,36 47,91%	0,223±0,025 d-stat = 30,57 37,21%
		100%			
	20:00	0,717±0,005	0,687±0,005 d-stat = 2,18 95,81%	0,313±0,020 d-stat = 29,35 43,72%	0,193±0,018 d-stat = 38,08 26,98%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 1,00	d-stat = 1,77	d-stat = 3,44

Примечание: полужирным выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

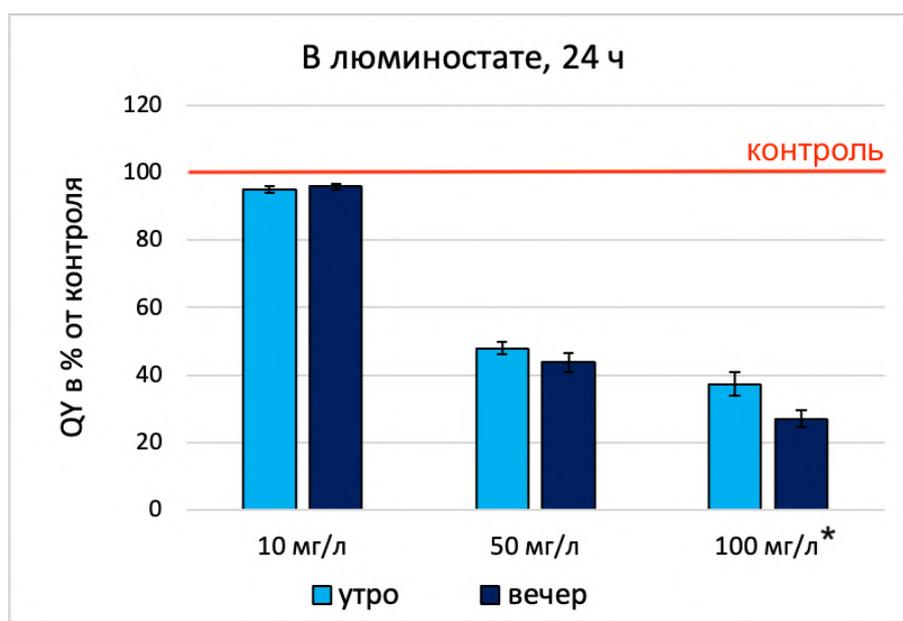


Рисунок 53. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$)).

В культиваторе, как и в люминостате, через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при концентрациях 50 и 100 мг/л как при постановке опыта утром, так и вечером (табл. 40, рис. 54).

При концентрации 50 мг/л хлорида алюминия наиболее сильное угнетение эффективности фотосинтеза клеток культуры отмечено при постановке опыта вечером, однако при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин QY не обнаружены.

Таблица 40. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			10 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
24	08:00	0,723±0,005 100%	0,687±0,028 d-stat = 1,19 94,93%	0,460±0,038 d-stat = 8,57 63,59%	0,220±0,038 d-stat = 16,38 30,41%
	20:00	0,693±0,005 100%	0,640±0,023 d-stat = 2,12 92,31%	0,393±0,043 d-stat = 11,92 56,73%	0,223±0,005 d-stat = 18,68 32,21%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 0,78	d-stat = 1,17	d-stat = 0,45

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

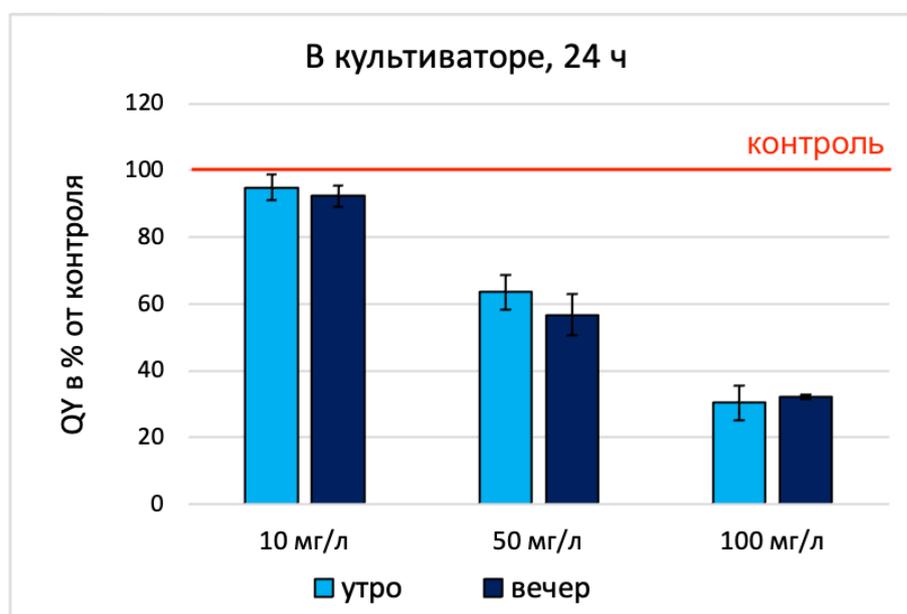


Рисунок 54. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч.

В культиваторе через 24 ч численность клеток *C. vulgaris* (по величине оптической плотности) была значимо снижена по сравнению с контролем при всех испытанных концентрациях хлорида алюминия как при постановке опыта утром, так и вечером, при этом наиболее сильное угнетение роста наблюдали утром. При сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия отмечены также при всех испытанных концентрациях (табл. 41, рис. 55).

Таблица 41. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при проведении опыта в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³			
		контроль	концентрация токсиканта		
			10 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
24	08:00	70,0±1,5	34,7±2,8 d-stat = 20,59	11,0±0,8 d-stat = 34,38	8,7±1,3 d-stat = 35,74
		100%	49,52%	15,71%	12,38%
	20:00	60,7±2,5	46,0±3,0 d-stat = 7,33	18,3±1,3 d-stat = 21,17	10,7±0,5 d-stat = 25,00
		100%	75,82%	30,22%	17,58%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 6,07	d-stat = 8,68	d-stat = 3,78

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

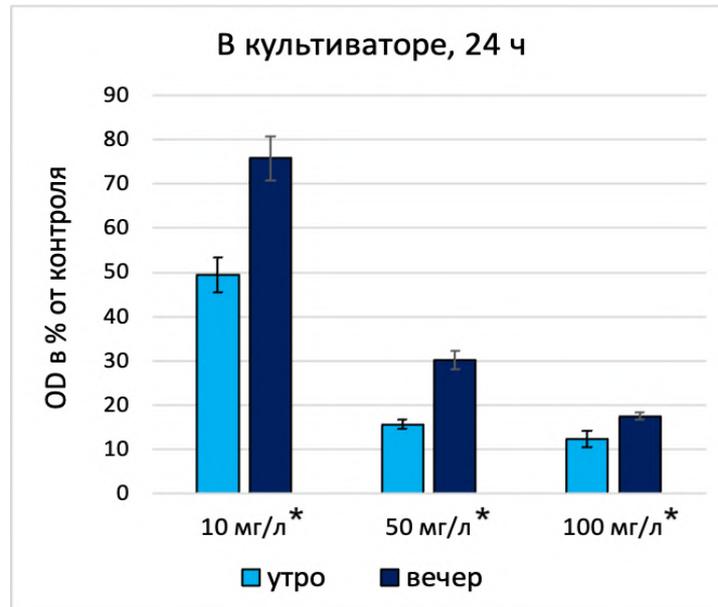


Рисунок 55. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

В люминостане с ежедневным измерением величины оптической плотности на 1 сут численность клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем при 10 мг/л хлорида алюминия при постановке опыта как утром, так и вечером, а также при 100 мг/л токсиканта при добавлении его утром. На 2 и 3 сут численность клеток была значимо снижена по сравнению с контролем при 50 и 100 мг/л хлорида алюминия вне зависимости от времени постановки опыта. Наиболее сильное значимое угнетение роста в большинстве дат наблюдения наблюдали утром. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя отмечены при концентрациях 10 и 100 мг/л на 1 сут и при всех изученных концентрациях на 2 сут. (табл. 42, рис. 56).

Таблица 42. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в люминостате в течение 72 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³				
		контроль	концентрация токсиканта			
			10 мг/л	50 мг/л	100 мг/л	
24	08:00	8,7±0,5	7,0±0,8 d-stat = 2,89	7,3±0,5 d-stat = 2,31	6,3±0,5 d-stat = 4,04	
		100%	80,77%	84,62%	73,08%	
	20:00	9,7±0,5	11,7±0,5 d-stat = 3,21	9,7±1,0 d-stat = 0,00	8,7±0,5 d-stat = 1,60	
		100%	120,69%	100,00%	89,66%	
		сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 5,32	d-stat = 1,95	d-stat = 3,21
48	08:00	10,3±1,3	9,3±0,5 d-stat = 1,34	6,7±0,5 d-stat = 4,92	6,3±0,5 d-stat = 5,37	
		100%	90,32%	64,52%	61,29%	
	20:00	11,0±0,8	11,7±0,5 d-stat = 1,00	8,7±0,5 d-stat = 3,50	9,0±0,8 d-stat = 3,00	
		100%	106,06%	78,79%	81,82%	
		сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 3,56	d-stat = 3,22	d-stat = 3,33
72	08:00	13,3±1,0	13,3±1,3 d-stat = 0,00	7,7±1,3 d-stat = 5,13	7,3±1,0 d-stat = 5,43	
		100%	100,00%	57,50%	55,00%	
	20:00	14,0±0,8	14,7±0,5 d-stat = 0,94	8,7±1,0 d-stat = 7,54	7,3±0,5 d-stat = 9,43	
		100%	104,76%	61,90%	52,38%	
		сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 0,68	d-stat = 0,54	d-stat = 0,47

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

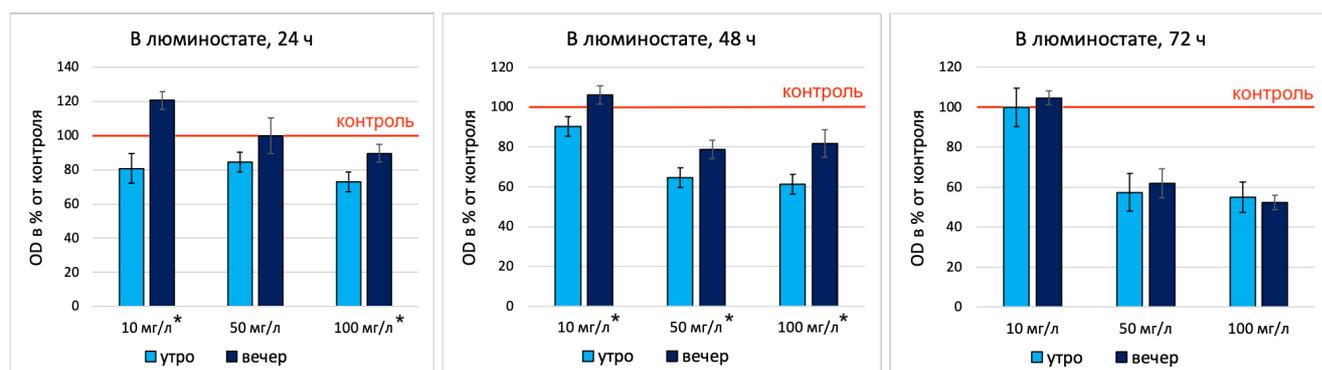


Рисунок 56. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации хлорида алюминия при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24, 48 и 72 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

Расчёт ЭК₅₀ хлорида алюминия и в остром опыте с культурой *C. vulgaris* в культиваторе за 24 ч и люминостате за 48 ч (табл. 43) подтверждает факт ее значительно большей чувствительности к токсиканту при постановке опыта и добавке токсиканта утром по сравнению с вечерней добавкой.

Таблица 43. ЭК₅₀ хлорида алюминия в остром опыте с культурой *Chlorella vulgaris* при постановке опыта утром и вечером.

Условия проведения эксперимента	Время начала опыта	
	утро	вечер
культиватор, 24 ч	8,91	26,25
люминостат, 48 ч	153,65	276,96

Полученные результаты острых экспериментов с культурой *C. vulgaris* с хлоридом алюминия в диапазоне концентраций 10–100 мг/л по двум показателям состояния лабораторной популяции (численность клеток и эффективность фотосинтеза) показали, что как в люминостате при освещении в режиме смены дня и ночи, так и в культиваторе при круглосуточном освещении токсичность вещества в утренние часы постановки опыта оказывается выше, чем при постановке опыта вечером. При этом вне зависимости от времени постановки экспериментов

токсичность хлорида алюминия выше при проведении эксперимента в культиваторе в оптимальных условиях для роста термофильного штамма *C. vulgaris*, чем при проведении эксперимента в люминостате (при температуре 20°C и освещении 12:12).

Эксперименты с фосфатом натрия

В люминостате через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем без токсиканта при всех исследованных концентрациях только при постановке опыта утром. При сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия величин этого показателя также были отмечены при всех испытанных концентрациях (табл. 44, рис. 57).

Таблица 44. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na_2HPO_4 при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			100 мг/л	500 мг/л	1000 мг/л
24	08:00	0,717±0,005 100%	0,687±0,005 d-stat = 5,20 95,81%	0,693±0,005 d-stat = 4,04 96,74%	0,670±0,007 d-stat = 8,08 93,49%
	20:00	0,717±0,005 100%	0,713±0,10 d-stat = 0,47 99,53%	0,720±0,008 d-stat = 0,47 100,47%	0,717±0,005 d-stat = 0,00 100,00%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 3,58	d-stat = 4,00	d-stat = 7,00

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

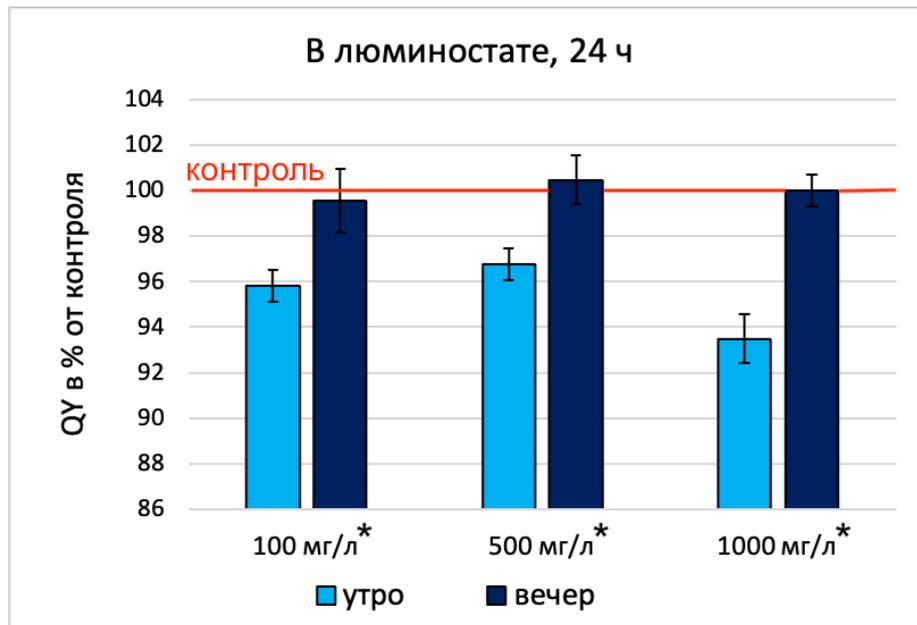


Рисунок 57. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na₂HPO₄ при постановке опыта утром и вечером в люминоstate через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при p < 0,05).

В культиваторе через 24 ч эффективность фотосинтеза клеток *C. vulgaris* была значимо снижена по сравнению с контролем при всех исследованных концентрациях вне зависимости от времени добавления Na₂HPO₄. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия отмечены при добавлении 100 и 500 мг/л (табл. 45, рис. 58).

Наиболее сильное угнетение эффективности фотосинтеза клеток культуры отмечено при постановке опыта утром как в люминоstate, так и в культиваторе.

Таблица 45. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na_2HPO_4 при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	QY			
		контроль	концентрация токсиканта		
			100 мг/л	500 мг/л	1000 мг/л
24	08:00	0,727±0,005 100%	0,683±0,010 d-stat = 5,10 94,04%	0,673±0,005 d-stat = 6,28 92,66%	0,673±0,013 d-stat = 6,28 92,66%
	20:00	0,697±0,005 100%	0,683±0,005 d-stat = 2,83 98,09%	0,673±0,005 d-stat = 4,95 96,65%	0,663±0,005 d-stat = 7,07 95,22%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 3,91	d-stat = 6,02	d-stat = 1,96

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

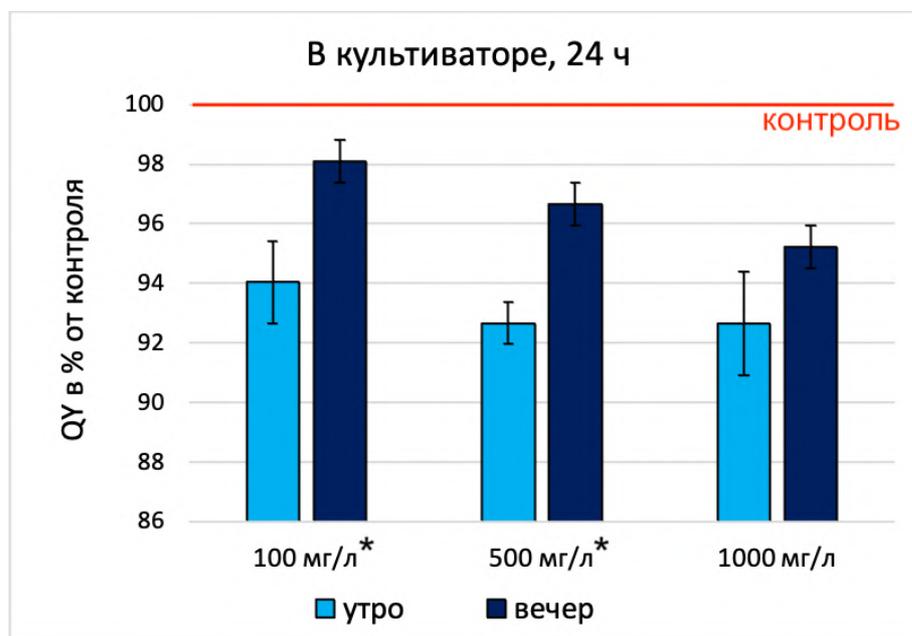


Рисунок 58. Изменение величины эффективности фотосинтеза клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na_2HPO_4 при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$)).

В культиваторе через 24 ч численность клеток *C. vulgaris* значимо превышала контрольные показатели при 1000 мг/л Na₂HPO₄ при постановке опыта утром и при всех испытанных концентрациях при постановке опыта вечером. При сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия также были отмечены при всех изученных концентрациях (табл. 46, рис. 59).

Таблица 46. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na₂HPO₄ при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10 ⁻³			
		контроль	концентрация токсиканта		
			100 мг/л	500 мг/л	1000 мг/л
24	08:00	74,3±4,0	70,7±5,0 d-stat = 0,80	86,3±3,5 d-stat = 2,62	93,7±5,8 d-stat = 4,21
		100%	95,07%	116,14%	126,01%
	20:00	55,7±4,3	65,7±2,5 d-stat = 3,39	71,3±1,3 d-stat = 5,30	85,3±3,3 d-stat = 10,05
		100%	117,96%	128,14%	153,29%
	сравнение одинаковых концентраций		d-stat = 3,84	d-stat = 3,41	d-stat = 4,14

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при p < 0,05).

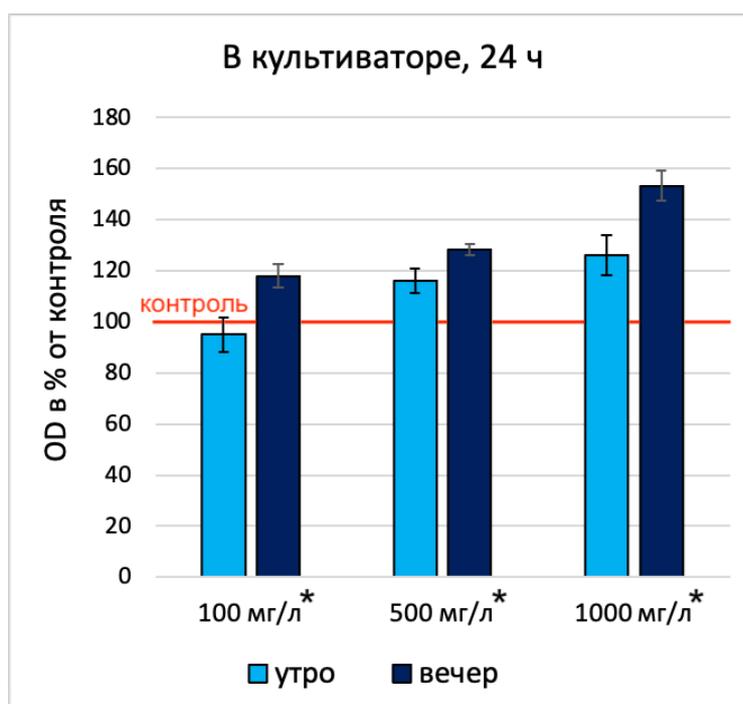


Рисунок 59. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na₂HPO₄ при постановке опыта утром и вечером в культиваторе через 24 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при p < 0,05).

Таким образом, несмотря на то что добавки Na₂HPO₄ стимулируют, а не угнетают рост культуры при добавлении большинства испытанных концентраций, при вечерних добавках Na₂HPO₄ показатели стимуляции роста культуры оказываются выше, чем при утренних добавках. Данные результаты могут быть использованы не только в экотоксикологии, но и для целей биотехнологии и возможности повышения продуктивности культур микроводорослей.

В люминостане с ежедневным измерением величины оптической плотности в течение 3 сут численность клеток *C. vulgaris* была значимо выше по сравнению с контролем на 1 сут при добавлении 100 мг/л Na₂HPO₄, на 2 сут при добавлении утром 100 и 500 мг/л и при вечерней добавке 100 мг/л Na₂HPO₄, а на 3 сут – при постановке опыта утром при 100 и 500 мг/л Na₂HPO₄. В большинстве дат наблюдения при вечерних добавках всех испытанных концентраций фосфата

натрия показатели оптической плотности культуры были ближе к уровню контроля, чем при утренних добавках. А при сравнении одинаковых концентраций утренних и вечерних добавок токсиканта значимые различия отмечены при концентрации 500 мг/л на все сроки наблюдения и при 100 мг/л на 2 и 3 сут (рис. 60, табл. 47).

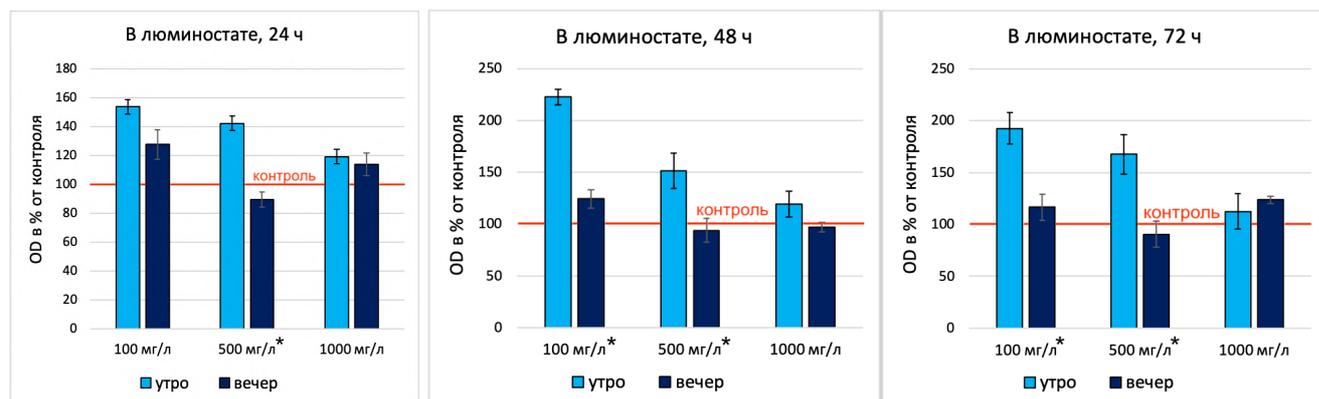


Рисунок 60. Изменение оптической плотности (численности клеток) культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na_2HPO_4 при постановке опыта утром и вечером в люминостате через 24, 48 и 72 ч (* отмечены значимые отличия значений исследуемого показателя в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта по критерию Даннета (d -stat превышают d -критическое, при $p < 0,05$)).

Таблица 47. Изменение величины оптической плотности клеток культуры *Chlorella vulgaris* в зависимости от концентрации Na_2HPO_4 при постановке опыта утром и вечером в люминостате в течение 72 ч.

Срок, ч	Время начала опыта	OD, 10^{-3}			
		контроль	концентрация токсиканта		
			100 мг/л	500 мг/л	1000 мг/л
24	08:00	8,7±0,5	13,3±1,3 d-stat = 2,47	12,3±1,0 d-stat = 1,94	10,3±3,5 d-stat = 0,88
		100%	153,85%	142,31%	119,23%
	20:00	9,7±0,5	12,3±1,0 d-stat = 3,77	8,7±0,5 d-stat = 1,41	11,0±0,8 d-stat = 1,89
		100%	127,59%	89,66%	113,79%
		сравнение одинаковых концентраций	d-stat = 2,14	d-stat = 6,25	d-stat = 0,19
48	08:00	10,3±1,3	23,0±0,8 d-stat = 9,84	15,7±1,8 d-stat = 4,13	12,3±1,3 d-stat = 1,55
		100%	222,58%	151,61%	119,35%
	20:00	11,0±0,8	13,7±1,0 d-stat = 2,92	10,3±1,3 d-stat = 0,73	10,7±0,5 d-stat = 0,37
		100%	124,24%	93,94%	96,97%
		сравнение одинаковых концентраций	d-stat = 11,93	d-stat = 4,08	d-stat = 2,47
72	08:00	13,3±1,0	25,7±2,0 d-stat = 6,17	22,3±2,5 d-stat = 4,50	15,0±2,3 d-stat = 0,83
		100%	192,50%	167,50%	112,50%
	20:00	14,0±0,8	16,3±1,8 d-stat = 1,81	12,7±1,8 d-stat = 1,03	17,3±0,5 d-stat = 2,58
		100%	116,67%	90,48%	123,81%
		сравнение одинаковых концентраций	d-stat = 5,75	d-stat = 5,08	d-stat = 0,86

Примечание: **полужирным** выделены значимые отличия значений исследуемого показателя между опытом и контролем или между повторностями в опытах с утренними и вечерними добавками токсиканта (при сравнении между собой одинаковых концентраций токсиканта, добавленных в разное время) по критерию Даннета (d-stat превышают d-критическое, при $p < 0,05$).

Проведенные острые опыты с культурой *C. vulgaris* в диапазоне концентраций 100–1000 мг/л фосфата натрия по двум показателям состояния лабораторной популяции (численность клеток и эффективность фотосинтеза) показали, что как в люминостате, так и в культиваторе действие вещества в утренние часы постановки опыта угнетает величину эффективности фотосинтеза сильнее, чем при вечерних добавках. При этом, стимулирующее действие фосфата натрия на численность клеток в культиваторе было выше при вечерних добавках, в то время как в люминостате вечерние добавки вызывали меньшее отклонения исследуемого показателя от контроля.

Таким образом, изучение влияния фактора времени добавки токсиканта на результат биотестирования на двух видах водорослей *S. quadricauda* и *C. vulgaris* с солями тяжелых металлов хрома и меди, легкого металла алюминия и биогенного элемента фосфора было показано, что время суток на момент добавки токсиканта является ключевым фактором и влияет на результаты биотестирования. В большинстве случаев утренние добавки токсиканта в большей степени влияют на рост и физиологическое состояние культур, чем вечерние как при постоянном освещении, так и в режиме 12:12 ч. Величины ЭК₅₀ для двух видов водорослей на разные сроки наблюдений подтверждают факт усиления токсичности при постановке опыта утром, по сравнению с вечерней добавкой токсикантов (K₂Cr₂O₇; CuSO₄; AlCl₃).

Некоторые отличия результатов опыта с фосфором, по сравнению с данными по 3 металлам, можно объяснить разной природой исследуемых веществ. Медь и хром являются микроэлементами, необходимыми для роста водорослей. Для алюминия не доказана необходимость его для роста водорослей в качестве микроэлемента и незаменимость другими элементами. Эти 3 металла являются компонентами загрязнения окружающей водной среды. Фосфор является важным биогенным макроэлементом для развития водорослей и входит в состав питательных сред для их культивирования. Однако, при превышении его

концентрации в окружающей среде он часто может вызывать сильную стимуляцию и эвтрофирующее действие на водоросли. Поэтому в наших экспериментах из-за случаев стимуляции нельзя было рассчитать полуэффективную концентрацию для фосфора.

Рассчитанные величины $ЭК_{50}$ для $K_2Cr_2O_7$ на разные сроки наблюдений хронического 21 сут опыта, а также для $CuSO_4$ и $AlCl_3$ на 24–72 ч острых опытов подтверждают факт усиления токсичности исследуемых веществ при постанове опыта утром по сравнению с таковыми для вечернего опыта.

Обнаруженный нами эффект усиления токсичности исследуемых солей металлов (меди, хрома, алюминия) и изменения действия биогенного элемента фосфора на показатели роста и физиологического состояния двух видов водорослей при добавлении этих веществ утром, по сравнению с вечерней добавкой, можно объяснить повышенной чувствительностью к токсиканту молодых клеток, появившихся в результате деления клеток культуры в ночное время. Как известно, основной механизм действия металлов – торможение деления клеток. Днем и вечером (без токсиканта) большинство клеток культуры готовятся к делению, о чем свидетельствует увеличение их размеров. Появление крупных, зрелых клеток в вечернее время неоднократно было нами отмечено при наблюдении за развитием культуры под микроскопом. Металл, после его добавления в культуральную среду вечером, не успевает быстро подействовать на сам процесс деления клеток, т.к. зрелые, крупные клетки практически полностью подготовились к делению. Токсиканту требуется время, чтобы сначала адсорбироваться на поверхности клеток, проникнуть внутрь клеток и оказать токсическое действие, при этом зрелые клетки уже успевают поделиться.

Появившиеся утром в культуре новые, молодые, мелкие клетки оказываются наиболее уязвимыми к токсиканту. Они еще не готовы к новому делению, при этом на них действует токсикант, что и приводит к торможению процесса нового

деления клеток в утренние часы и угнетению роста культуры, вызванного токсикантом.

Полученные результаты хронического и острых экспериментов по показателям роста и состояния (численность клеток и эффективность фотосинтеза) лабораторных популяций двух видов водорослей показали, что как в люминостате при освещении в режиме смены дня и ночи, так и в культиваторе при круглосуточном освещении токсичность вещества в утренние часы постановки опыта оказывается выше, чем при постановке опыта вечером, что, возможно, связано с циркадным ритмом размножения клеток водорослей преимущественно в ночное время. Поэтому время суток, как ключевой и критически важный фактор, следует учитывать как в биомедицинских исследованиях, так и при проведении биотестирования на водорослях, в частности, для интерпретации полученных данных о токсичности исследуемых веществ и воспроизведения результатов биотестирования.

3.3.2. Влияние концентрации и дозы токсиканта на результат альготестирования

Влияние хрома на популяционный рост в условиях постоянной дозы

Используя экспериментальную модель, изучали развитие токсического эффекта во времени при сохранении постоянной дозы хрома на одну клетку в течение всего срока биотестирования.

Бихромат калия вносили в ростовые среды пропорционально увеличению численности *S. quadricauda* и *T. weissflogii*, так чтобы его доза сохранялась в течение эксперимента постоянной. Таким образом, начальные концентрации и суммарные конечные концентрации хрома в конце экспериментов были: 0,001 – 0,0033; 0,01 – 0,034; 0,1 – 0,34; 1 – 2,7; 5 – 7; 10 – 17,5 мг/л для *S. quadricauda* и 0,001 – 0,0055; 0,01 – 0,054; 0,1 – 0,55; 1 – 2,6 мг/л для *T. weissflogii*.

Представленные данные (рис. 61) показывают, что в присутствии высоких концентраций хрома (1 мг/л и выше) численность клеток *S. quadricauda* слегка варьировала или уменьшалась с момента первой добавки хрома и вплоть до конца 28 сут эксперимента по сравнению с исходной и значительно уменьшалась по сравнению с контролем без хрома. При токсическом влиянии такой интенсивности доза хрома на клетку оставалась постоянной в течение всего опыта, а конечные концентрации хрома увеличились всего лишь в 1,4 – 1,7 раза. Поэтому в отношении высоких концентраций вещества можно говорить о совпадении понятий концентрация и доза.

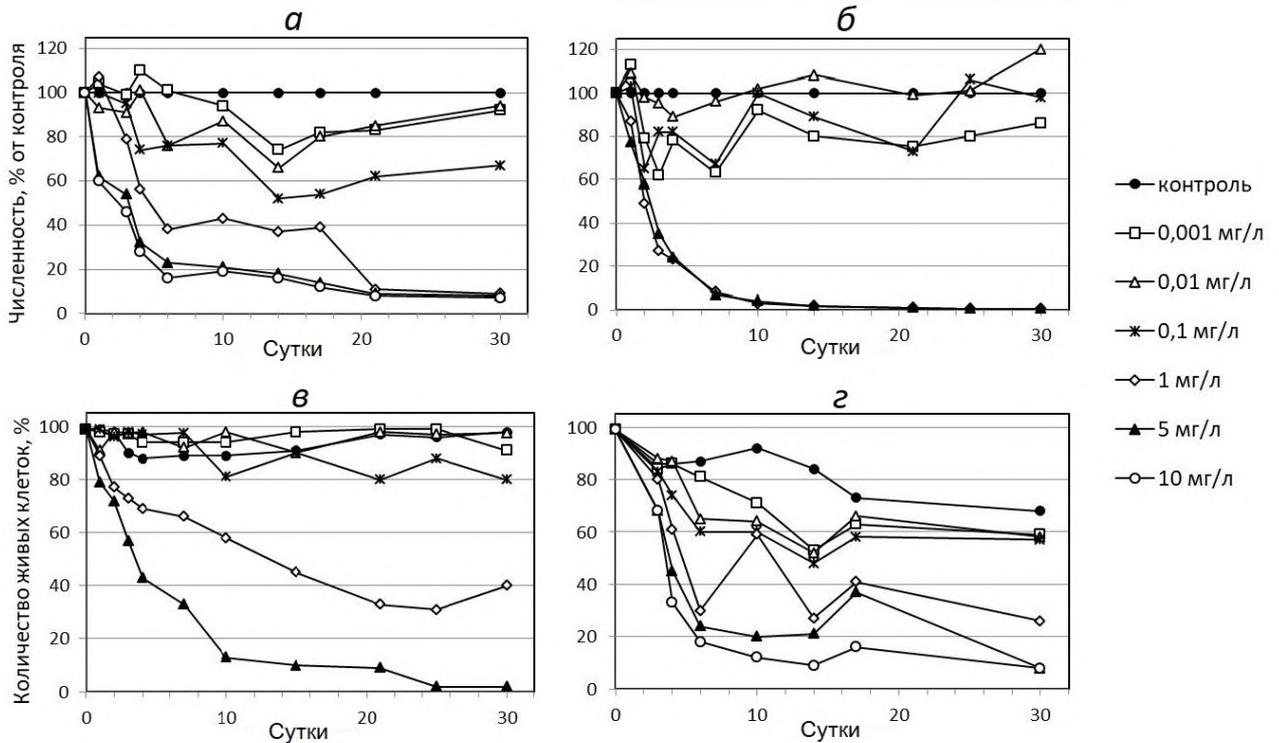


Рисунок 61. Изменение относительной (в % от контроля) численности клеток (а, б) и доли живых клеток (в, г) *Scenedesmus quadricauda* в условиях однократной (б, в) в начале опыта и многократной (а, г) добавки хрома в течение эксперимента.

При средней концентрации хрома 0,1 мг/л численность клеток в целом увеличивалась, по сравнению с исходной, но скорость роста культуры замедлялась по сравнению с контролем без хрома. При низких концентрациях хрома 0,001 и 0,01 мг/л численность клеток *S. quadricauda* соответствовала контрольным

параметрам вплоть до 10 сут эксперимента, затем уменьшалась, а к концу опыта была близка к уровню контроля. Таким образом, наиболее чувствительной стадией культуры при повторных добавках хрома является вторая половина логарифмической фазы роста (10 – 14 сут эксперимента). Поскольку концентрации хрома 0,001 и 0,01 мг/л достаточно низкие, маловероятно, что они провоцировали отбор резистентных клеток. В этом случае токсикант мог вызывать асинхронизацию культуры (полную или частичную) путем задержки клеточного деления на 7 – 10 сут эксперимента, после чего синхронность деления восстанавливалась, и культура в дальнейшем достигала контрольного уровня численности клеток.

Данные численности клеток по однократной добавке хрома в культуру *S. quadricauda* в начале эксперимента приведены на рис. 61 (б, в).

Таким образом, при низких концентрациях хрома 0,001 и 0,01 мг/л в течение экспериментов с периодическими добавками хрома скорость роста *S. quadricauda* была близкой как к уровню контролю без хрома, так и к уровню контроля с однократным добавлением хрома в начале эксперимента, хотя суммарные концентрации хрома в конце экспериментов были в 3,3 – 3,4 раз выше, чем при однократном его добавлении.

Следовательно, периодическое добавление хрома в течение эксперимента при сохранении его постоянной дозы при всех испытанных уровнях токсического воздействия практически мало меняет картину развития токсического эффекта во времени по сравнению с однократной добавкой токсиканта в начале опыта.

Доля мертвых и отмирающих клеток в большинстве случаев была лишь немного выше в ходе эксперимента с многократным добавлением токсиканта (рис. 61, г) по сравнению с однократным внесением (рис. 61, в).

Число клеток *T. weissflogii* в присутствии 0,001 и 0,01 мг/л хрома было незначительно ниже только в самом конце опыта, и достоверно ниже при 0,1 мг/л хрома в половине случаев из всех дат счета клеток в течение эксперимента при

многократной интоксикации по сравнению с однократной (рис. 62). При 1 мг/л рост культуры был сходен в обоих случаях при разных режимах добавок хрома, за исключением кратковременного подъема численности ближе к концу эксперимента при однократном добавлении хрома.

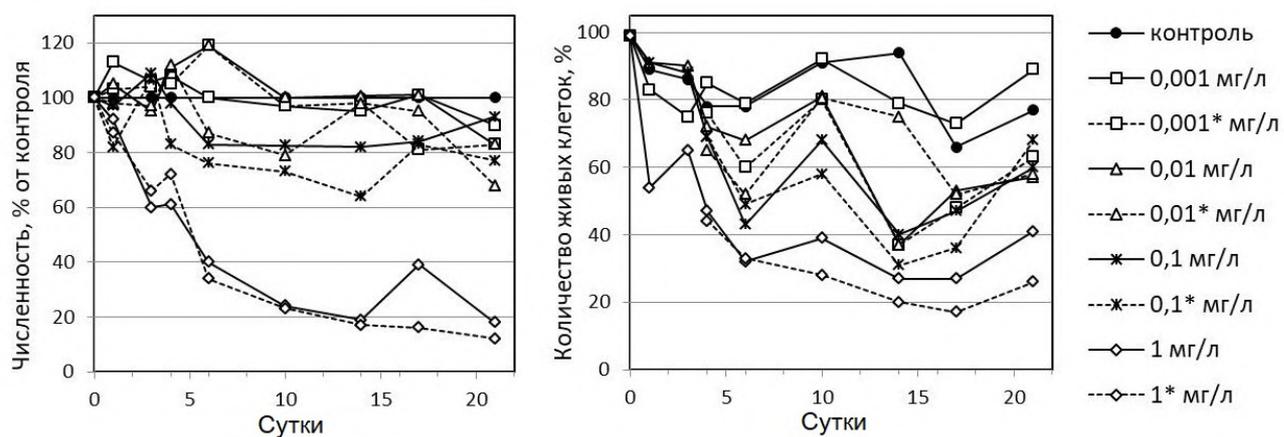


Рисунок 62. Изменение относительной численности клеток и доли живых клеток *Thalassiosira weissflogii* в условиях однократной в начале опыта и многократной (*) добавки хрома в течение эксперимента.

Как и в случае с культурой *S. quadricauda*, доля мертвых и отмирающих клеток в культуре *T. weissflogii* (рис. 62) была немного выше при многократной добавке по сравнению с однократной.

Влияние бихромата калия на рост культуры S. quadricauda в зависимости от исходной плотности популяции (200 тыс. кл/мл, 500 тыс. кл/мл, 1 млн кл/мл, 2 млн кл/мл)

Как видно из рис. 63 (а) относительной численности в % по отношению к соответствующему контролю, с увеличением исходной плотности популяции клеток токсичность 1 мг/л хрома снижается. Таким образом, наибольшая токсичность выявлена при наименьшей исследованной плотности клеток 200 тыс. кл/мл, при которой начальная доза токсиканта на одну клетку была максимальной.

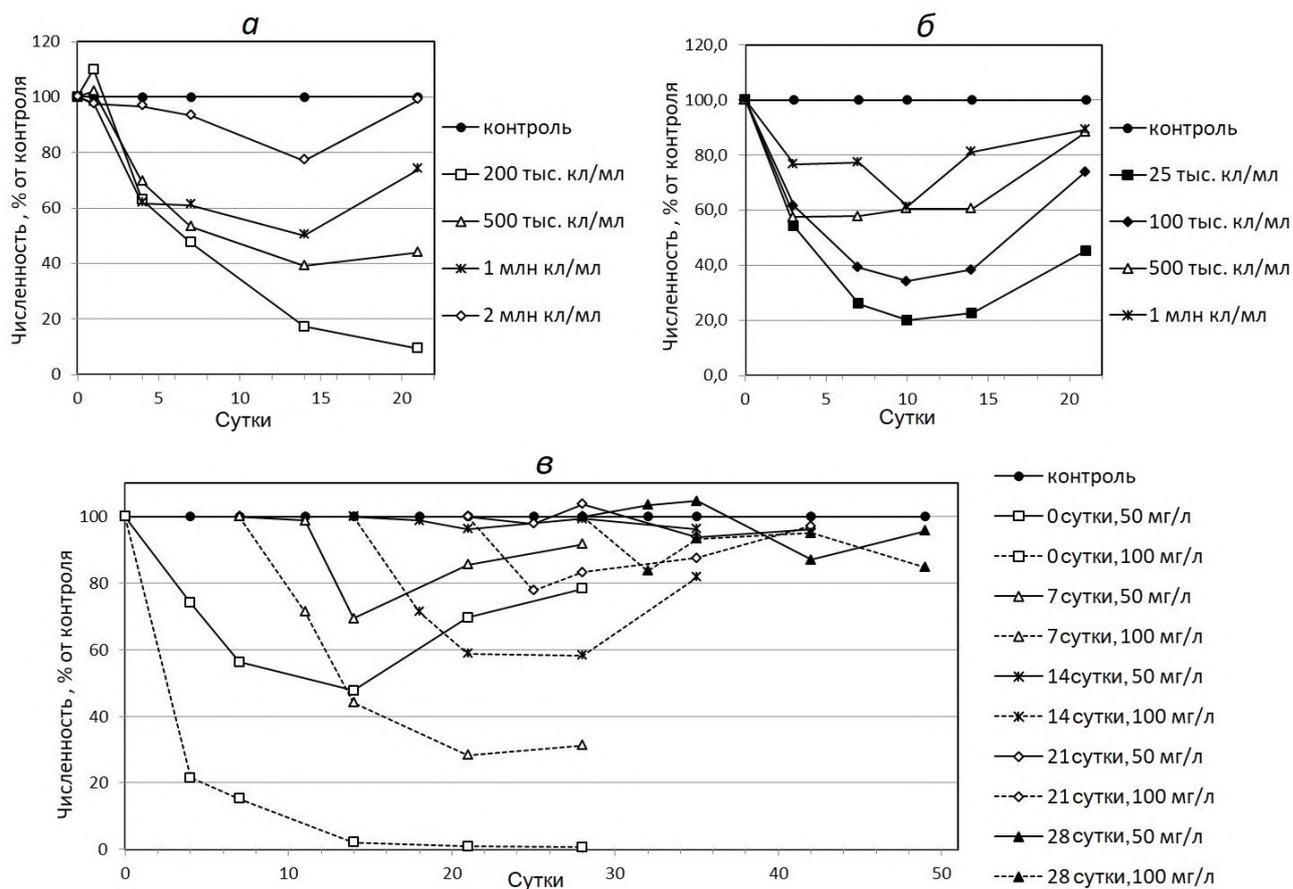


Рисунок 63. Изменение относительной численности клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бихромата калия (а) и хлорида алюминия (б) в зависимости от начальной плотности клеток и от срока добавления (на 0, 7, 14, 21 и 28 сут) хлорида алюминия в культуру (в).

Влияние хлорида алюминия на рост S. quadricauda в зависимости от исходной плотности популяции (25 тыс. кл/мл, 100 тыс. кл/мл, 500 тыс. кл/мл, 1 млн кл/мл)

Действие 50 мг/л $AlCl_3$ (5,6 мг/л Al^{3+}) на культуру оценивали при разной начальной плотности популяции 25, 100, 500 и 1000 тыс. кл/мл в день постановки эксперимента (рис. 63, б). При этом дозы токсиканта в расчёте на клетку при разной исходной плотности популяции составляли соответственно $20 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-7}$ и $5 \cdot 10^{-8}$ мг/кл.

Самая высокая токсичность хлорида алюминия наблюдалась при начальной плотности 25 тыс. кл/мл, с увеличением ее до 1 млн кл/мл доза токсиканта на одну клетку уменьшалась, а токсичность соответственно снижалась. Следовательно,

численность 25 тыс. кл/мл согласно нашим данным и методическим указаниям при проведении биотестирования (Методические указания ..., 2011), позволяет более адекватно оценивать токсичность металла.

Поэтому биотестирование с использованием культур микроводорослей с начальной плотностью более 10^5 кл/мл может потенциально недооценивать токсичность веществ. Однако в природных условиях численность микроводорослей в большинстве случаев ниже 10^5 кл/мл. Учитывая также, что токсичность испытуемых веществ может уменьшаться в результате различных превращений их в растворе, вызванных присутствием в среде метаболитов или увеличением рН, биотестирование следует проводить с еще более низкой начальной численностью клеток популяций микроводорослей порядка $10^2 - 10^4$ кл/мл.

Большинство методик биотестирования рекомендуют начальные плотности популяции $10^4 - 10^6$ кл/мл. Считается, что это компромисс между максимальной чувствительностью испытания и достаточным количеством клеток для определения изменения численности в течение срока биотестирования. Однако численность $10^5 - 10^6$ кл/мл намного выше, чем бывает даже при условии цветения. В последнее время в экотоксикологии начинают применять более современный проточный счет клеток, что делает возможным регистрировать единичные клетки и проводить биотестирование с малой плотностью клеток водорослей $10^2 - 10^3$ кл/мл, которая является наиболее обычной в природных водных системах. Использование сходных с природным уровнем клеточных плотностей в биотестировании поможет уменьшить химические изменения и превращения исследуемых веществ, связанные с их клеточным взаимодействием так, чтобы токсичность, определяемая в биотестировании с применением культур водорослей и цианобактерий, более близко оценивала биодоступность и токсичность веществ в природной среде.

Полученные нами данные о действии бихромата калия и хлорида алюминия на культуру *S. quadricauda* с разной исходной плотностью хорошо согласуются с результатами работ других авторов. Так, работе В.И. Ипатовой с соавт. (Ипатова и др, 2011) обнаружено, что увеличение исходной плотности культуры в 2 – 2,5 раза приводит к снижению токсичности металла хрома и антибиотика стрептомицина на 20 – 25%. Изучение влияния различной исходной плотности клеток для двух видов водорослей на токсичность меди (Franklin et al., 2002) показало, что ее токсичность уменьшалась с увеличением плотности популяций. Данные по внеклеточному (на поверхности клеток) и внутриклеточному содержанию меди подтверждают, что при более высокой начальной плотности клетками связывается меди меньше, что приводит к ее меньшему поглощению внутрь клеток и более низкой токсичности. Сходный эффект был получен и другими авторами (Sunda, Huntsman, 1998; Vasseur et al., 1988).

Для оказания воздействия на клетку металл должен связаться с рецептором на клеточной поверхности, после чего транспортироваться через клеточную мембрану и поступить в цитоплазму. Поверхность клеток водорослей содержит ряд важных отрицательно заряженных функциональных групп (карбоксильные, сульфгидрильные и фосфатные) с высоким сродством к металл-ионам. Первоначальная токсическая нагрузка определяется адсорбцией металл-ионов клетками, зависящей от площади клеточной поверхности и количества связывающих сайтов. Более высокая плотность клеток водорослей при биотестировании создает большую площадь поверхности с большим числом связывающих сайтов, но в расчете на одну клетку (доза металла) при этом приходится меньшее количество металла, что и определяет уменьшение его токсичности.

С увеличением числа клеток водорослей повышается продукция их экзометаболитов (гликолевой кислоты, полисахаридов и углеводов), образующих комплексы с токсикантами, в частности, с металлами (Sunda, Huntsman, 1998), что

приводит к уменьшению биодоступности веществ в растворе, а, следовательно, к уменьшению их токсичности. Развитие водорослей и высокие плотности их популяций могут вызывать изменения рН и последующие химические изменения тестовых веществ (Vasseur et al., 1988). Увеличение рН также может играть роль в понижении токсичности металлов при массовом развитии водорослей путем образования нерастворимых форм металлов. Так, было показано, что повышение рН тестируемой среды, содержащую высокую численность клеток, было вероятным механизмом, ответственным за понижение токсичности Cu, Cd и Zn для *Selenastrum capricornutum* с увеличением инокулята от 10^4 до 10^6 кл/мл (Vasseur et al., 1988).

Влияние хлорида алюминия на рост S. quadricauda в зависимости от возраста культуры на момент внесения токсиканта

Чтобы оценить токсичность хлорида алюминия в концентрациях 50 и 100 мг/л (5,6 и 11,2 мг/л Al^{3+}) в зависимости от возраста культуры в процессе ее развития (без изменения плотности популяции на момент его добавки на разные сроки развития культуры), добавки $AlCl_3$ в растущую культуру производили однократно по схеме (рис. 64) на 0, 7, 14, 21 и 28 сут (рис. 63, в), при этом дозы токсиканта на эти сроки составляли соответственно $(20 \text{ и } 1,2) \cdot 10^{-7}$; $(2,7; 1,4; 1,2) \cdot 10^{-8}$ мг/кл для 50 мг/л, а для 100 мг/л $AlCl_3$ – $(40 \text{ и } 2,8) \cdot 10^{-7}$; $(5,4; 2,8; 2,8) \cdot 10^{-8}$ мг/кл.

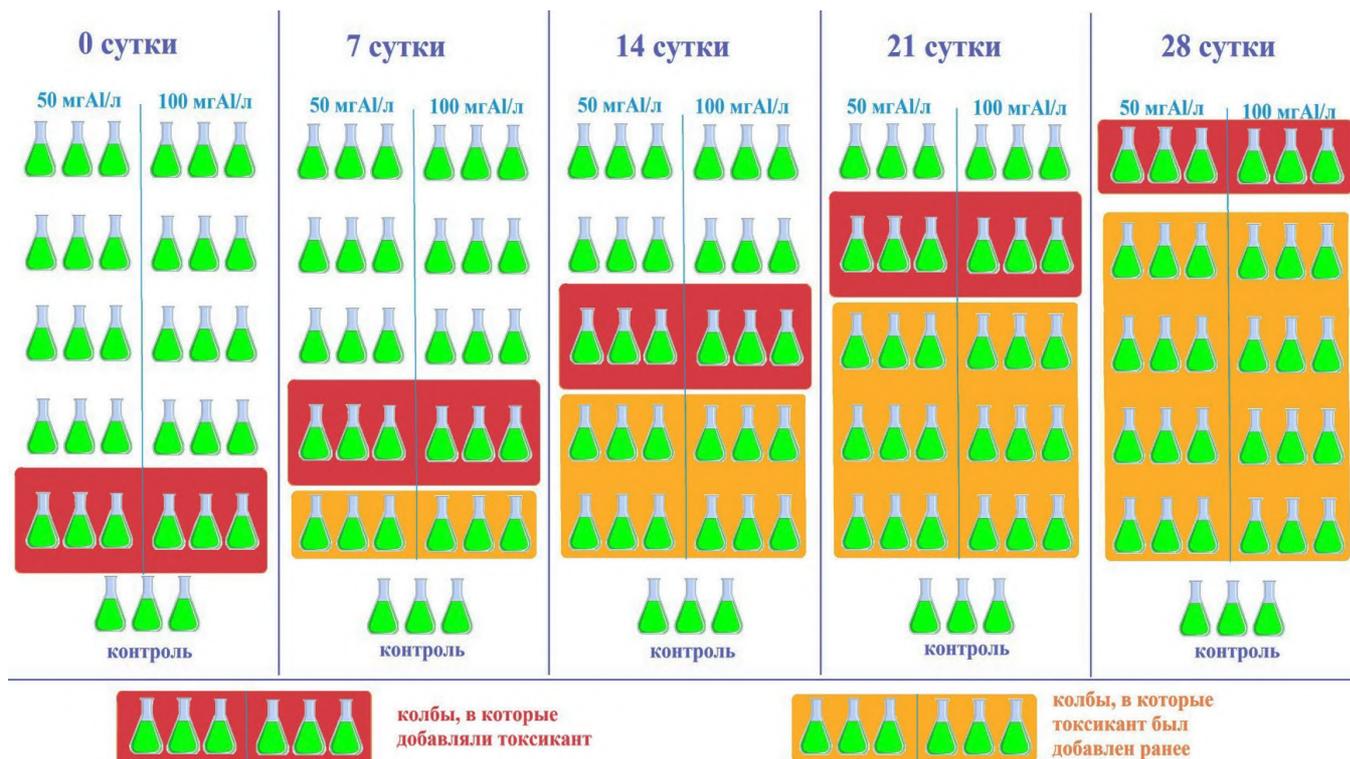


Рисунок 64. Схема добавки хлорида алюминия в растущую культуру *Scenedesmus quadricauda*.

При внесении хлорида алюминия в концентрации 50 мг/л в день постановки опыта на 0 сут рост культуры достоверно отличался от контроля на протяжении всего опыта длительностью 28 сут. А при 100 мг/л культура не росла совсем (рис. 63, в).

С увеличением срока внесения $AlCl_3$ в растущую культуру, совпадающего с ее возрастом, доза токсиканта на клетку и его токсичность снижались. Уже для 14-сут культуры концентрация 50 мг/л становилась нетоксичной, а токсичность 100 мг/л с увеличением возраста культуры постепенно снижалась. Начиная с 28 сут роста культура переходила в стационарную фазу, а с 35 сут – в фазу отмирания. Поэтому при добавках токсиканта в культуру на эти сроки ее роста токсичность $AlCl_3$ была незначительной, при этом разница в численности клеток по сравнению с чистым контролем соответствующего возраста культуры составляла около 20% и менее.

Результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что с увеличением срока добавления токсиканта в растущую культуру, совпадающего с ее возрастом, токсичность соли алюминия падает.

Это может быть связано:

- во-первых, с физиологическим состоянием культуры на разных стадиях ее развития;
- во-вторых, с плотностью популяции на момент добавления токсиканта в культуру, в результате чего доза токсиканта, приходящаяся на клетку, становится меньше;
- в-третьих, с влиянием экзометаболитов, количество которых в культуре со временем возрастает, выступающих в качестве лигандов, связывающих металлы в среде;
- в-четвертых, с повышением рН среды в процессе роста культуры, сильно влияющего на токсичность алюминия.

Следовательно, возраст тест-культуры является определяющим фактором, влияющим на оценку токсичности исследуемого вещества. Зрелая 14-сут и старая 28-сут культуры могут значительно недооценивать токсичность тестируемых веществ, чем молодая 7-сут.

3.3.3. Влияние состава среды на результат альготестирования

Достоверное угнетение роста культуры *S. quadricauda* на среде Успенского №1 отмечено при концентрациях токсиканта 0,75 мг/л и выше (рис. 65). При этом в присутствии 0,75 мг/л угнетение роста отмечено однократно в конце опыта, а с увеличением концентрации наблюдался более ранний и более продолжительный ответ (рис. 65).

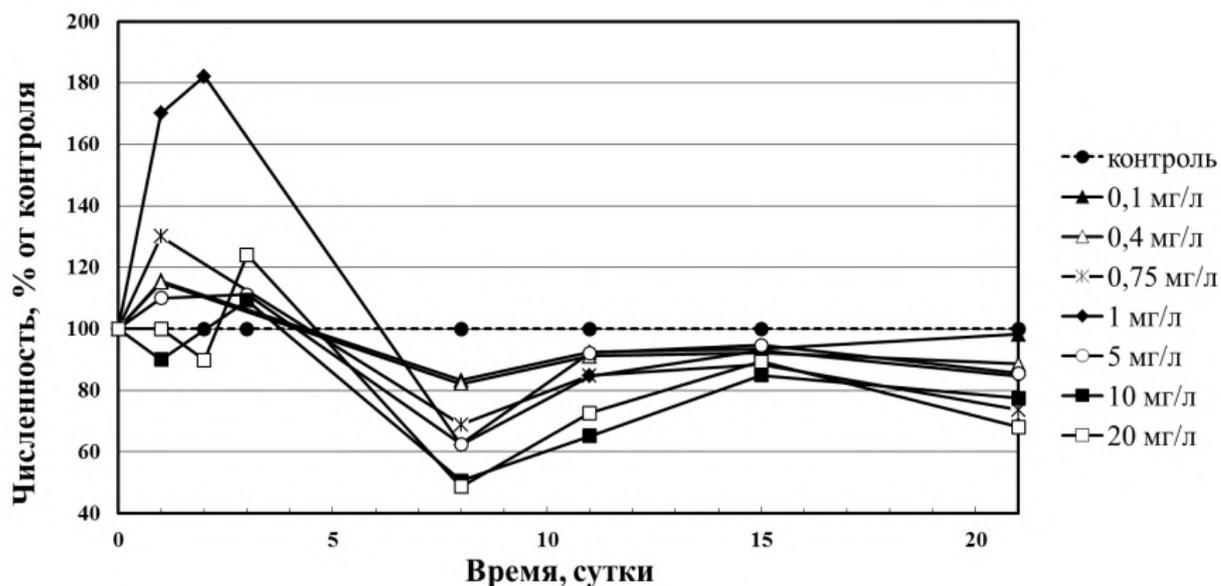


Рисунок 65. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в % от контроля) в присутствии хлорида алюминия (опыт на среде Успенского №1).

Стимуляция роста наблюдалась при всех испытанных концентрациях в начале опыта. Максимальная стимуляция обнаружена при концентрации 1 мг/л, которая в дальнейшем сменилась угнетением роста.

На рис. 65 видно, что реакция культуры на токсическое воздействие хлорида алюминия носит фазный характер с чередованием фаз стимуляции и угнетения роста.

Статическая обработка данных опыта на среде Успенского №1 показала совпадение полученных результатов опыта по двум критериям Стьюдента и Манна-Уитни в случае достоверного угнетения роста. При 0,4 мг/л рост культуры был на уровне контроля.

По данным люминесцентной микроскопии доля живых клеток в процессе роста культуры в интервале 1 – 20 мг/л уменьшалась всего на 6% по сравнению с контролем, а при 0,4 мг/л была на уровне контроля.

Во втором опыте на природной воде (рис. 66) концентрация 0,4 мг/л не оказала достоверного токсического действия на изучаемый тест-организм, как и в опыте на среде Успенского №1.

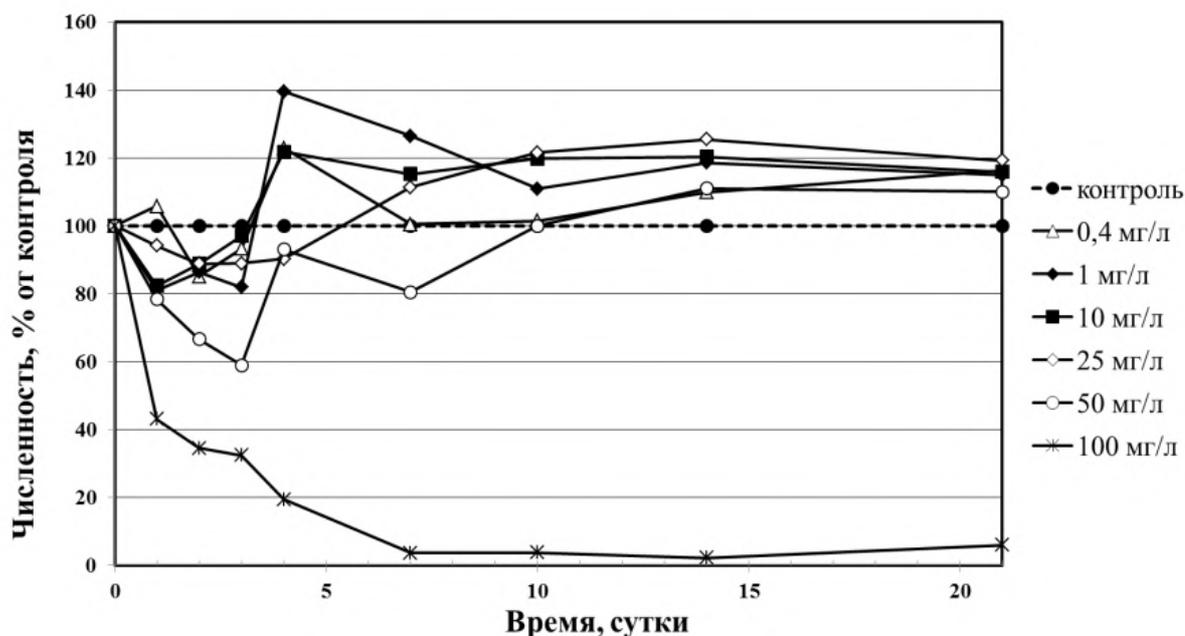


Рисунок 66. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в % от контроля) в присутствии хлорида алюминия (опыт на природной воде).

В присутствии малой дозы 1 мг/л в начале опыта на 3 сут наблюдалось небольшое достоверное угнетение роста водорослей по сравнению с контролем, но не за счет гибели клеток, а в результате временного торможения деления клеток, которые затем начинали синхронно или с большей скоростью делиться и по численности обгонять контроль.

Так уже на 4 сут наблюдалась достоверная стимуляция до 40% выше уровня контроля, устойчивая при повторе опыта. Стимуляция в отдельные периоды роста культуры наблюдалась и при больших концентрациях в интервале от 1 до 25 мг/л. А в концентрации 50 мг/л происходило достоверное угнетение роста на 3 и 7 сут.

Самой токсичной оказалась концентрация 100 мг/л, при которой сильное угнетение роста наблюдалось на протяжении всего опыта, что согласуется с

данными литературы для культуры *Chlorella pyrenoidosa* (Упитис, 1983). При этом доля живых клеток к концу опыта составляла 20%, а в остальных вариантах уменьшалась незначительно. В некоторых повторностях в опыте на природной воде происходила адаптация культуры, что выражалось в возобновлении роста популяции после длительной токсической нагрузки.

В диапазоне концентраций 0,4 – 50 мг/л начальный рН изменялся в пределах 6,5 – 7,2, а в процессе роста увеличивался и практически не отличался от контроля (рис. 67). Начальный рН в среде с добавкой 100 мг/л составлял 4,5 и на протяжении всего опыта увеличивался незначительно (рис. 67).

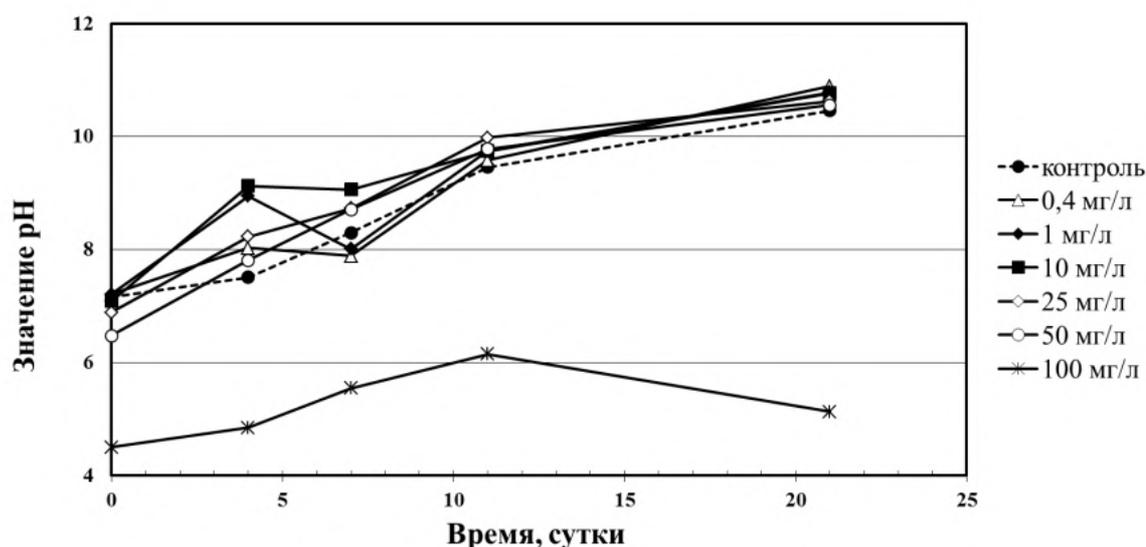


Рисунок 67. Изменение рН в культуре *Scenedesmus quadricauda* в присутствии хлорида алюминия (опыт на природной воде).

По кривой флуоресценции хл *a* тест-культуры рассчитана величина эффективности фотосинтеза и оценена скорость фотосинтеза при разных интенсивностях света в норме и при интоксикации в присутствии $AlCl_3$ (рис. 68, 69).

По результатам опыта на среде Успенского №1 на 4 сут не было обнаружено различий этих величин при максимальной из испытанных концентраций 20 мг/л хлорида алюминия по сравнению с контролем. На 8 сут при 0,4; 1 и 20 мг/л

значения величин эффективности фотосинтеза и скорости фотосинтеза при разных интенсивностях света также были на уровне контроля.

На природной воде скорость фотосинтеза при разных интенсивностях света зависела от концентрации токсиканта в диапазоне 25–100 мг/л. Значительное уменьшение скорости фотосинтеза по сравнению с контролем было обнаружено уже на 4 сутки при концентрациях 50 и 100 мг/л (рис. 68), которое сохранялось и в дальнейшем для концентрации 100 мг/л (на 11 сут опыта) (рис. 69). Следует отметить, что в одной из повторностей при 100 мг/л (на рис. 66 обозначено как 100.1 мг/л), где отмечалось возобновление роста после длительной лаг-фазы, одновременно происходило и увеличение эффективности фотосинтеза и скорости фотосинтеза, тогда как в других повторностях (на рис. 69 обозначено как 100.2 мг/л) эти показатели сильно отличались от уровня контроля.

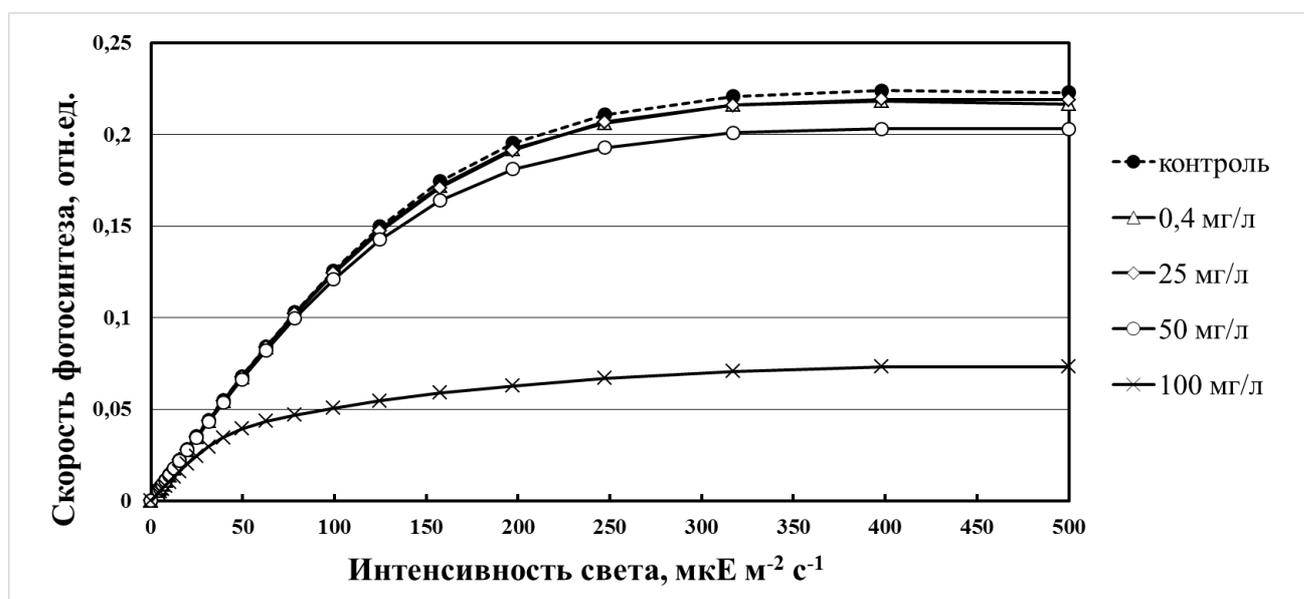


Рисунок 68. Зависимость скорости фотосинтеза *Scenedesmus quadricauda* от интенсивности света на природной воде в присутствии хлорида алюминия (на 4 сут опыта).

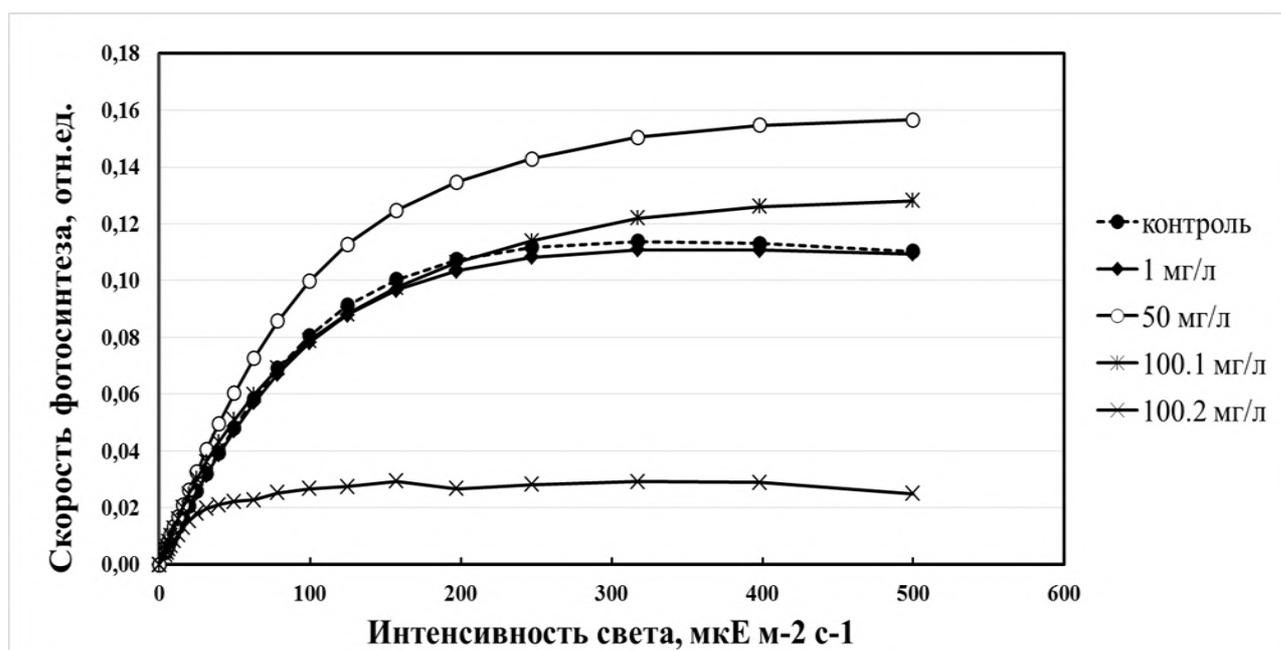


Рисунок 69. Зависимость скорости фотосинтеза *Scenedesmus quadricauda* от интенсивности света на природной воде в присутствии хлорида алюминия (на 11 сут опыта).

Стимуляцию скорости фотосинтеза при 50 мг/л хлорида алюминия можно объяснить повышением обменных процессов для ускорения выведения металла из клеток. Полученный эффект стимуляции согласуется с данными других работ, в которых показано, что увеличение скорости фотосинтеза может служить показателем энергетических затрат при выведении излишка металлов из клеток (Бурдин и др., 1990).

По данным острого опыта была рассчитана ЛК₅₀ за 3 сут, равная 7,9 в расчете на Al³⁺.

В соответствии с принятой классификацией по степени острой токсичности для *S. quadricauda* хлорид алюминия можно отнести к среднетоксичным веществам (для которых эта величина попадает в интервал от 1 до 10 мг/л).

По результатам двух опытов максимально допустимой концентрацией, не оказывающей достоверного действия на рост тест-культуры, следует считать 0,04 мг/л в расчете на ион Al, что соответствует значению ПДК для рыбохозяйственных водоемов. А минимально действующие концентрации токсиканта на 2 средах были близки.

Различие в росте культуры на двух средах состояло в том, что в диапазоне концентраций от 1 до 20 мг/л на среде Успенского №1 после 8 сут наблюдалось угнетение роста, а на природной воде рост культуры был или на уровне контроля, или даже превышал его.

Это может быть связано с присутствием в природной воде фона других макро- и микроэлементов, снижающих токсичность алюминия вследствие взаимодействия элементов по типу антагонизма.

В приложении (табл. 2) представлен состав исследуемой природной воды (26.01.18 г.) по ряду макро- и микроэлементов.

Повышенные количества в анализируемой природной воде таких катионов, как Ca, Mg K и Na, могут снижать токсическое действие Al, причем Ca в большей степени. По данным литературы, защиту от токсичности алюминия (Lion et al., 1988) кальцием можно объяснить конкуренцией Al и Ca за сайты связывания на мембранах клеток.

3.3.4. Влияние низких уровней солености среды на рост пресноводных микроводорослей

Влияние условий низкой солености среды на рост и развитие культуры Scenedesmus quadricauda

На рис. 70 и в табл. 48 приведены данные изменения численности клеток культуры *S. quadricauda* в течение 14-сут хронического опыта. На первые сут опыта наблюдали стимуляцию роста культуры при всех испытанных уровнях минерализации (в интервале 1–6 г/л) в пределах 2–32%. При этом наблюдаемый однократный стимулирующий эффект в 32 % при минерализации 1 г/л был кратковременным и близок к допустимому (30%) уровню эвтрофирующего эффекта. С третьих сут и до конца опыта при всех уровнях минерализации было отмечено слабое снижение численности по отношению к контролю. Такое небольшое снижение численности роста, хотя и было достоверным, однако оно не

превышало порога токсичности в 20% и находилось в пределах уровня контроля. Следует отметить, что рост культуры *S. quadricauda* был достаточно интенсивным при всех исследованных уровнях минерализации, поэтому культура *S. quadricauda* может быть рекомендована для проведения процедуры биотестирования в диапазоне минерализации среды 1–6 г/л. Зафиксированная нами хорошая устойчивость этого вида к условиям низкой и средней минерализации согласуется с данными литературы.

Таблица 48. Изменение абсолютной численности клеток (дес. тыс. кл/мл) и отклонение от контроля (в %) культуры *Scenedesmus quadricauda* при различных уровнях минерализации среды.

Срок, сут	Численность клеток				
	контроль	1 г/л	2,5 г/л	4 г/л	6 г/л
1	4,0±0,2	5,3±0,4 +32,25 %	5,1±0,7 +27,64%	4,6±0,4 +13,82%	4,1±0,3 +2,3%
3	27,9±2,0	24,4±0,7 -12,61%	22,3±0,9 -19,91%	22,7±1,3 -18,58%	22,3±1,3 -19,91%
7	106,8±1,7	90,7±4,8 -15,07%	87,4±1,1 -18,10%	87,2±3,5 -18,36%	85,6±1,5 -19,84%
14	275,5±9,8	232,9±12,6 -15,47%	229,8±7,2 -16,61%	221,3±12,7 -19,67%	225,3±13,7 -18,23%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

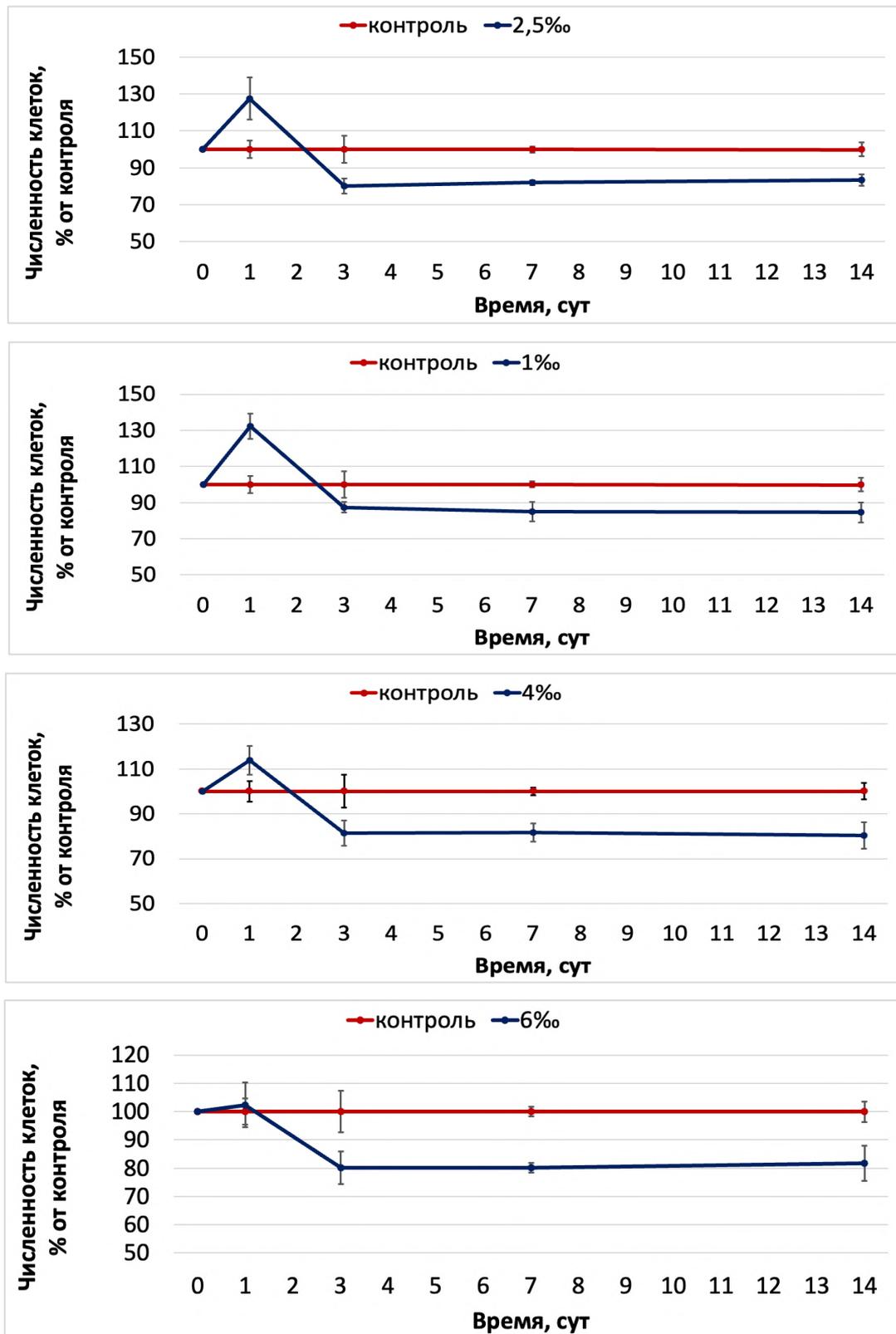


Рисунок 70. Изменение численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* при различных уровнях минерализации среды.

Дополнительно было исследовано физиологическое состояние клеток культуры *S. quadricauda* по показателю эффективности фотосинтеза на 1 и 3 сут эксперимента (табл. 49). На 1 сут при 6 г/л отмечено слабое недостоверное угнетение (на 5,7%), которое на 3 сут эксперимента сменилось небольшой достоверной стимуляцией (на 4,4%). Все остальные исследованные уровни минерализации среды вызывали стимуляцию исследуемого показателя (в пределах 5–13%). Такие небольшие отклонения этого показателя от контроля находились в пределах нормы, что свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии клеток водоросли во всех опытных солевых растворах.

Таблица 49. Изменение величины эффективности фотосинтеза и отклонение от контроля (в %) культуры *Scenedesmus quadricauda* при различных уровнях минерализации среды.

Срок, сут	Эффективность фотосинтеза (QY)				
	контроль	1 г/л	2,5 г/л	4 г/л	6 г/л
1	0,57±0,007	0,60±0,005 +5,14%	0,62±0,012 +8,37%	0,60±0,010 + 5,73%	0,56±0,007 -5,73%
3	0,59±0,020	0,62±0,034 +5,08%	0,65±0,012 +9,75%	0,67±0,010 +12,71%	0,65±0,007 +4,44%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Влияние условий низкой солености среды на рост и развитие культуры Monoraphidium arcuatum

В табл. 50 и на рис. 71 приведены данные изменения численности клеток культуры *M. arcuatum*. Достоверная стимуляция роста культуры на 21,5% была отмечена однократно на 3 сут при минерализации 1 г/л, а также слабая недостоверная стимуляция при 2,5 г/л на 3 сут и при 6 г/л на 1 сут. Однако во всех остальных случаях, как на начальном этапе опыта, так в последующие дни наблюдений, фиксировали достоверное снижение численности по отношению к контролю, которое сохранялось до конца эксперимента. Наблюдаемое угнетение увеличивалось с повышением уровня минерализации, достигая максимального

значения почти на 75% на 7 сут при 6 г/л. Тем не менее, значения численности клеток культуры *M. arcuatum* при уровнях минерализации 1; 2,5 и 4 г/л в остром опыте до 3 сут не превышали пороговых (20%) значений токсичности. По результатам этого эксперимента можно сделать вывод о том, что культура *M. arcuatum* не может быть рекомендована для проведения процедуры биотестирования при испытанных уровнях минерализации среды в хронических опытах, но может быть рекомендована в качестве тест-культуры в острых опытах. Возможно, последовательные пересевы этой культуры в растворы с соответствующими уровнями минерализации (2–3 пассажа) позволят адаптировать эту культуру, которая будет пригодна для проведения биотеста в заданных пределах минерализации в хронических испытаниях. Однако на данном этапе исследований тест-культура *S. quadricauda* представляется гораздо более перспективной, чем культура *M. arcuatum*.

Таблица 50. Изменение абсолютной численности (дес. тыс. кл/мл) и отклонение от контроля (в %) клеток культуры *Monoraphidium arcuatum* при различных уровнях минерализации среды.

Срок, сут	Численность клеток				
	контроль	1 г/л	2,5 г/л	4 г/л	6 г/л
1	8,5±0,2	7,5±0,3 -11,72%	7,6±0,3 -10,94%	7,5±0,3 -11,72%	8,0±0,5 +6,20%
3	14,2±0,5	17,3±0,2 +21,50%	14,7±0,4 +3,27%	13,4±0,7 -5,61%	9,8±0,2 -43,46%
7	237,7±14,8	164,2±8,6 -30,94%	115,3±4,5 -51,49%	103,6±5,4 -56,42%	41,1±1,4 -74,93%
14	678,0±25,5	532,3±32,1 -21,49%	399,9±31,7 -41,02%	296,6±16,9 -56,25%	190,4±8,3 -64,24%

Примечание: полужирным отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

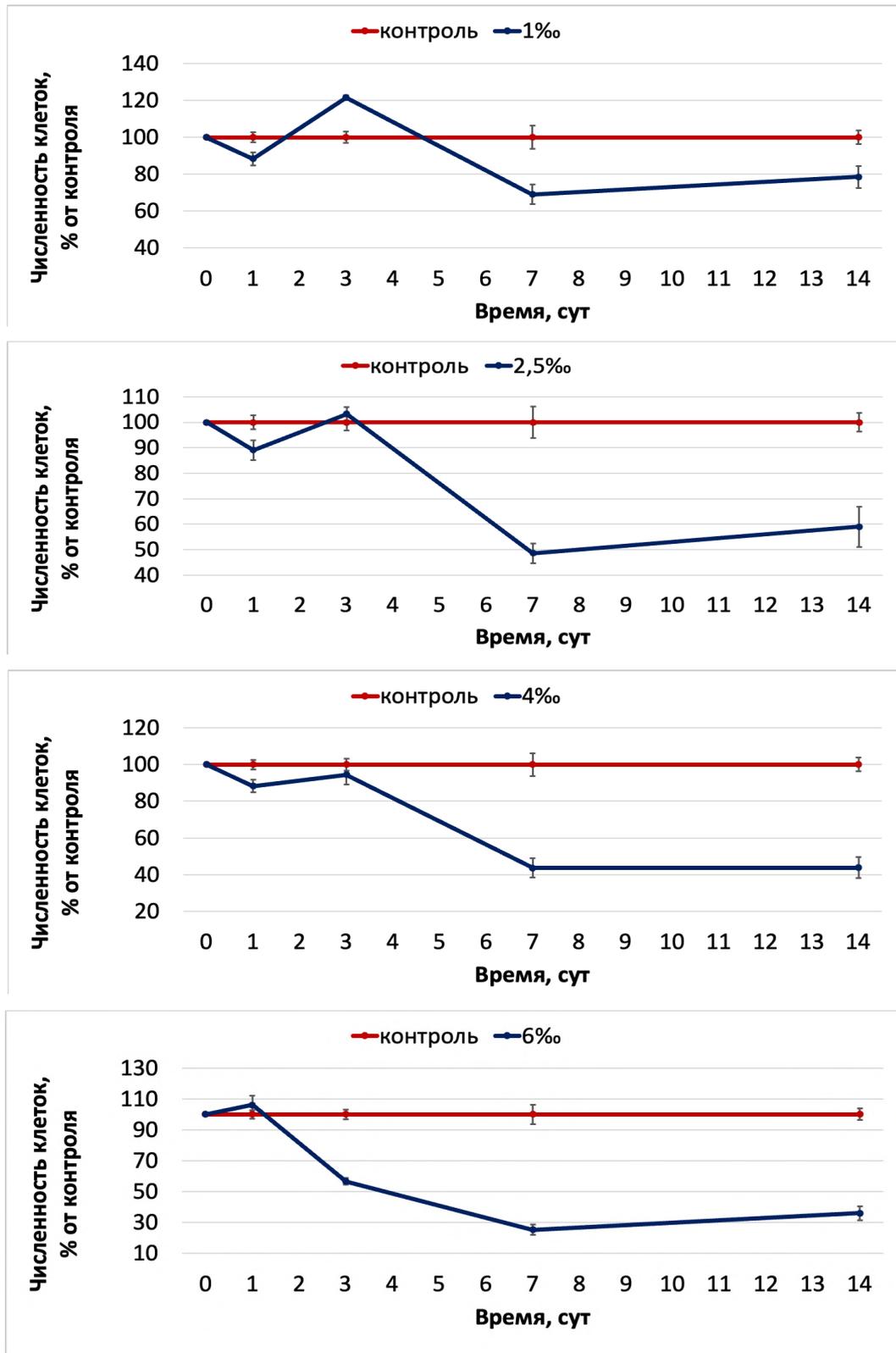


Рисунок 71. Изменение численности клеток культуры *Monoraphidium arcuatum* при различных уровнях минерализации среды.

Величину эффективности фотосинтеза культуры *M. arcuatum* рассчитывали на 1 и 3 сут эксперимента (табл. 51). На 1 сут при 6 г/л отмечено слабое (на 5,7 %), однако достоверное угнетение, которое наблюдали и на 3 сут эксперимента. Все остальные исследованные уровни минерализации среды вызывали стимуляцию величины эффективности фотосинтеза на 1 сут, сменявшеюся слабым, но достоверным угнетением на 3 сут. Однако такое небольшое отклонение величины эффективности фотосинтеза от контроля в пределах 2–8 % не является показателем токсичности и находится в пределах нормы. Следовательно, физиологическое состояние клеток культуры *M. arcuatum* не отличалось от контроля.

Таблица 51. Изменение величины эффективности фотосинтеза и отклонение от контроля (в %) культуры *Monoraphidium arcuatum* при различных уровнях минерализации среды.

Срок, сут	Эффективность фотосинтеза (QY)				
	контроль	1 г/л	2,5 г/л	4 г/л	6 г/л
1	0,59±0,005	0,61±0,005 +3,13%	0,60±0,005 +2,84%	0,60±0,005 +1,42%	0,56±0,008 -5,73%
3	0,67±0,005	0,65±0,004 -1,88%	0,64±0,004 -4,14%	0,63±0,004 -4,89%	0,60±0,004 -7,66%

Примечание: полужирным отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Таким образом, учитывая интенсивный рост и хорошее физиологическое состояние культуры пресноводной микроводоросли *S. quadricauda* при всех испытанных уровнях минерализации среды в интервале 1–6 г/л, эта тест-культура может быть рекомендована для проведения процедуры биотестирования проб в этом диапазоне минерализации как в остром, так и в хронических опытах. А культура пресноводной микроводоросли *M. arcuatum* может быть рекомендована только для проб с минерализацией в интервале 1–4 г/л в острых опытах длительностью до 3 сут.

Результаты оценки чувствительности Scenedesmus quadricauda к эталонному токсиканту бихромату калия на среде с низкой соленостью

Опыты с культурой *S. quadricauda* проводили на среде с соленостью 2,5 г/л с добавками питательных солей по прописи среды Успенского №1 при различных концентрациях $K_2Cr_2O_7$ (табл. 52 и 53).

Таблица 52. Чувствительность культуры *Scenedesmus quadricauda*, адаптированной к уровню минерализации 2,5 г/л, к $K_2Cr_2O_7$ (0,5–10 мг/л) на среде Успенского №1 с минерализацией 2,5 г/л.

Срок, сут	Численность, дес. тыс. кл/мл и в % от контроля				
	контроль	0,5 мг/л	1 мг/л	5 мг/л	10 мг/л
1	3,5±0,6	4±1,1	3,8±0,9	3,5±0,6	3,3±0,7
	100%	114,3%	109,5%	100%	95,2%
2	8,2±1,4	10,5±2,3	10,3±1,2	10±1,7	9±2
	100%	128,6%	126,5%	122,5%	110,2%
3	18,8±0,9	19,5±1,7	17,8±2,1	18,0±2,3	16,2±1,2
	100%	103,5%	94,7%	95,6%	85,8%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Таблица 53. Чувствительность культуры *Scenedesmus quadricauda* без адаптации к уровню минерализации 2,5 г/л к $K_2Cr_2O_7$ (5–50 мг/л) на среде Успенского №1 с минерализацией 2,5 г/л.

Срок, сут	Численность, дес. тыс. кл/мл и в % от контроля				
	контроль	5 мг/л	10 мг/л	20 мг/л	50 мг/л
1	3,5±0,3	3,5±0,1	2,9±0,1	1,8±0,2	0,4±0,1
	100%	101,4%	85,0%	52,5%	10,7%
2	11,8±0,4	13,5±0,2	10,1±0,2	1,4±0,3	0,2±0,1
	100%	114,7%	85,2%	11,5%	1,3%
3	18,2±0,5	16,6±0,6	14,9±0,3	3,5±0,1	0,2±0,1
	100%	91,3%	81,6%	19,2%	1,1%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

По результатам опытов с бихроматом калия (табл. 52, 53) расчетная величина ЭК₅₀ К₂Cr₂O₇ для культуры *S. quadricauda* на среде Успенского №1 с минерализацией 2,5 г/л составила 12,99 мг/л.

Динамика численности клеток водоросли *S. quadricauda* на среде Успенского, приготовленной на дистиллированной воде при различных концентрациях К₂Cr₂O₇ представлена в табл. 54.

Таблица 54. Изменение численности клеток в дес. тыс. кл/мл *Scenedesmus quadricauda* и в % от контроля на среде Успенского № 1 в присутствии бихромата калия.

Срок, сут	Контроль	Концентрации бихромата калия, мг/л				
		0,1	0,5	1	5	10
3	36,11±1,27	35,74±2,93	28,76±2,32	22,07±1,88	8,35±1,13	3,52±0,4
	100 %	98,98 %	79,65 %	61,12 %	23,12 %	9,75 %

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Для культуры *S. quadricauda* на среде Успенского №1 на дистиллированной воде расчетная величина ЭК₅₀ К₂Cr₂O₇ составила 1,7 мг/л.

Сравнение темпов роста культур *S. quadricauda* на среде Успенского с уровнем минерализации 2,5 г/л показало отсутствие отличий в темпах роста адаптированной к заданному уровню минерализации и неадаптированной (стандартной) культур (табл. 55).

Таблица 55. Сравнение темпов роста стандартной и адаптированной к уровню минерализации 2,5 г/л культуры *S. quadricauda* на чистой среде Успенского и на среде Успенского с уровнем минерализации 2,5 г/л.

День, сут	Численность, дес. тыс. кл/мл и в % от контроля		
	Неадаптированная культура на чистой среде Успенского №1	Неадаптированная культура на среде Успенского №1 с минерализацией 2,5 г/л	Адаптированная культура на среде Успенского №1 с минерализацией 2,5 г/л
1	4±0,6 100%	3,7±0,7 92,5%	3,5±0,6 87,5%
2	10±1,1 100%	8±0,6 80%	8,2±1,4 81,7%
3	19,7±1,7 100%	18,3±0,9 93,2%	18,8±0,9 95,8%

Примечание: **полужирным** отмечены значимые отличия от контроля (двухвыборочный Т-тест с различными дисперсиями, $p < 0,05$).

Таким образом в настоящей работе показано влияние целого ряда ключевых факторов, существенно влияющих на результат биотестирования на микроводорослях в оценке токсичности веществ или материалов, поступающих в окружающую водную среду в качестве загрязнителей, а именно: природа токсиканта, его форма и происхождение; концентрация, а не доза токсиканта; комбинация токсикантов в смеси; вид тест-организма, его возраст, начальная плотность посадки в опыт; срок, на который добавляют токсикант (определяющий возраст культуры и ее физиологическое состояние), режим освещения, состав среды, рН, соленость и время добавки токсиканта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения работы исследовано влияние целого ряда условий интоксикации микроводорослей на проявление токсичности соединений и материалов различной природы.

В тестах на экотоксичность микроводоросли рассматриваются как ключевые организмы, благодаря их положению в пищевой цепи в качестве основных производителей, а также по причине их чувствительности к токсикантам, высокой скорости роста, возможности исследования эффекта на поколениях и выявления отдаленных последствий интоксикации.

Методом биотестирования были испытаны соединения тяжелых металлов хрома и меди, легкого металла алюминия, неметалла фтора, фуллеренов; а также разных типов и происхождения твердых материалов микро- и нанопластика отдельно и в смеси с другими загрязнителями, золы от сжигания смеси пластиков.

Эксперименты проводили с лабораторными популяциями клеток микроводорослей разных видов с использованием современных методов экотоксикологии. Водная экотоксикология исследует вопросы, связанные с появлением в экосистемах потенциально токсичных веществ или химических материалов, как экологического фактора (Truhaut et al., 1977; Моисеенко, 2009).

Особую опасность представляют стойкие экотоксиканты, которые длительное время сохраняются в окружающей среде и накапливаются в ее биотических и абиотических компонентах. Международным союзом охраны природы микропластик (МП) признан главным загрязнителем океана, частицы которого могут сохраняться в окружающей среде сотни и тысячи лет и поэтому он может рассматриваться как экологически опасный фактор.

МП являются новыми экотоксикантами как отдельно, так и в смесях с различными загрязнителями. Наши исследования показали, что разные виды МП

способны негативно воздействовать на микроводоросли, подавляя их численность и изменяя функциональные показатели. При этом свежие образцы полимеров и микропластики, полученные из макрообразцов, собранных в природных условиях, воздействовали по-разному. Экологическое старение МП происходит под действием биотических и абиотических факторов.

Разницу в токсичности между пробой EPS, отобранной на супралиторали Баренцева моря, и интактным образцом можно объяснить большей токсичностью первой пробы вследствие ее изменения в естественных условиях супралиторали Баренцева моря в ходе окисления и адсорбции веществ. Для *S. quadricauda* контактный EPS повлиял сильнее как на численность, так и на соотношение живых и мертвых клеток, при этом в обоих случаях наблюдали угнетение роста культуры. Состаренный МП вызывал более сильное ингибирование клеток, чем свежий МП, и у микроводоросли *Chlorella vulgaris* (Wang et al., 2021).

Добавление золы от сжигания смеси пластикового мусора в культуру *S. quadricauda* показало, что сжигание – низкоэффективный и опасный способ утилизации пластикового мусора, так как зола негативно влияла на показатели ее роста.

Снимки электронной микроскопии (Tunali et al., 2020) позволили понять возможную причину токсического эффекта полистирола на микроводоросль *Chlorella vulgaris*, поскольку его частицы адсорбировались и внедрялись в клетки водоросли.

Наши данные согласуются с результатами других работ, в которых показано, что МП, с одной стороны, мало влияет на изменение численности клеток микроводорослей в эксперименте (Prata et al., 2019), а, с другой стороны, влияние на физиологические параметры микроводорослей может быть весьма значительным, поэтому в будущих исследованиях необходимо включать помимо структурных показателей состояния популяций растительных микроорганизмов и функциональные параметры, характеризующие физиологическое состояние тест-

организма, для более реалистичной оценки токсичности МП. Будущие эксперименты с МП с использованием разных тест-объектов в лабораторных условиях, в полевых микро-, и мезокосмах помогут выявить потенциальные экологические риски и разработать реабилитационные меры для конкретных районов.

По данным литературы современные уровни МП в окружающей среде не оказывают значительного воздействия на рост микроводорослей (Suaria et al., 2016). Большинство испытанных концентраций МП в экспериментах, описанных в литературе, в значительной степени превосходят те, которые встречаются в окружающей среде. Однако, по нашим данным МП может сильно изменять физиологические показатели развития микроводорослей даже в малых концентрациях, что в конечном счете представляет потенциальную угрозу для развития фитопланктона и других звеньев пищевой цепи в долгосрочной перспективе.

Согласно результатам наших исследований, токсичность наночастиц полистирола зависит от его концентрации, времени воздействия и оцениваемого тест-параметра. Используя разные структурные и функциональные показатели состояния лабораторной популяции клеток *S. quadricauda* нами обнаружена неоднозначная мозаичная ответная реакция тест-культуры на присутствие 100 нм частиц интактного полистирола в культуральной среде в интервале исследованных концентраций 1–50 мг/л. Общебиологические интегральные показатели численность клеток и выживаемость популяции (доля живых клеток), а также такие структурные показатели, как размер клеток и количество клеток в ценобии, меняются несинхронно как между собой, так и с физиологическим показателем (эффективностью фотосинтеза).

Полученные в настоящей работе данные по оценке токсичности наночастиц полистирола на пресноводный вид зеленой микроводоросли *S. quadricauda*, являющийся важным звеном в пищевой сети пресноводных экосистем, и

ответственным за производство кислорода в водной среде, свидетельствуют о том, что многие структурные и функциональные показатели состояния популяции видов сообществ фитопланктона могут быть нарушены, что в дальнейшем может привести к серьезным нарушениям пищевой сети и последствиям для функционирования водных экосистем в целом (Лазарева и др., 2023).

В настоящем исследовании также были изучены разные типы взаимодействия между наночастицами полистирола, выбранного из наиболее распространенных типов пластика, с токсикантами разной природы и модельными пресноводными микроводорослями *C. vulgaris* и *S. quadricauda*.

В работе были использованы разные подходы для количественной оценки токсичности НП и других токсикантов при их совместном присутствии в среде культивирования водорослей, каждый из которых позволяет оценить в процессе роста культур или тенденцию изменения токсичности среды, или степень взаимодействия этих добавок в парных комбинациях их различных концентраций.

Численность клеток или величина эффективности фотосинтеза в опыте, выраженные в % от контроля, или разница между этими значениями в опыте и контроле, выраженная в %, служат хорошим количественным показателем (индексом токсичности) в оценке токсического действия как отдельных токсикантов, так и их смеси.

Кроме того, для количественной оценки взаимодействия токсикантов при их одновременном присутствии в среде дополнительно в работе применили другой подход с использованием расчетных показателей, отражающих типы взаимодействий токсикантов в среде в виде синергизма, антагонизма или независимого (аддитивного) действия. Разработанная авторская модель оценки комбинированных эффектов загрязняющих веществ и материалов позволила выявить синергический, аддитивный и антагонистический эффекты парных комбинаций наночастиц полистирола с другими исследованными токсикантами на

культуры *S. quadricauda* и *C. vulgaris* в зависимости от типа токсиканта, его концентрации и срока действия.

Обнаруженные в настоящей работе случаи усиления токсического действия среды при совместном присутствии в ней НП, и других токсикантов (МС, хрома, меди и фтора) и их взаимодействие по типу синергизма можно объяснить разной природой этих добавок, их концентрацией и особенностями их действия на растительную клетку.

Механизм интерактивного антагонистического действия токсикантов разной природы изучен крайне недостаточно. Причин проявления антагонизма много и эта тема представляет самостоятельный интерес для исследования.

Антагонистическое действие частиц разной природы можно объяснить их физико-химическими свойствами и, в частности, адгезией наночастиц полистирола и кристаллов метиленового синего вследствие их налипания при контакте, что, возможно, и приводило к снижению токсичности наиболее токсичного компонента. Для обеих культур по параметру численности клеток антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех комбинаций НП и МС и дат наблюдения.

Присутствие наночастиц полистирола в ряде случаев вызывает протекторный эффект от токсического действия высоких концентраций метиленовой сини, хрома, меди и фтора в краткосрочных экспериментах для *C. vulgaris*, что может быть связано с адсорбцией изученных токсикантов на частицах нанопластика, которая приводит к уменьшению концентрации токсикантов в среде и снижению их токсического действия.

Аддитивность воздействия добавок свидетельствует о независимом влиянии токсикантов (нейтрализм) на процессы деления клеток и указывает, вероятно, на то, что в этом случае добавки воздействуют на слабо взаимосвязанные между собой биохимические процессы в клетке. Независимое действие, таким образом, может быть связано с разными механизмами действия различных токсикантов.

Тем не менее, данных литературы о механизме действия исследованных токсикантов (как отдельных, так и в парных или многокомпонентных комбинациях) для организмов фитопланктона недостаточно, чтобы сделать четкие выводы о причинах и типах взаимодействия как самих токсикантов между собой, так и их взаимодействия с клетками водорослей.

Использованные в работе разные подходы в оценке комбинированного действия исследованных токсикантов в бинарных комбинациях на культуры микроводорослей позволили получить сходные результаты, свидетельствующие о зависимости токсичности разных комбинаций от концентраций добавок и срока их действия на культуры. Стоит подчеркнуть, что МС в отдельности действует сильнее на изменение численности клеток, чем на величину эффективности фотосинтеза, а смесь МС+НП оказывает большее токсическое действие на физиологическое состояние клеток микроводорослей, оцененное по показателю величины эффективности фотосинтеза. В естественных условиях со временем это может привести к нарушению развития популяций фитопланктона, а в дальнейшем и нарушению функционирования экосистемы в целом. Поэтому токсичность фоточувствительных загрязнителей требует особого внимания для понимания неопределенного экологического риска, связанного с пластиковым загрязнением водной среды.

По данным литературы, когда частицы пластика встречаются с микроводорослями, могут формироваться агрегаты и влиять на токсичность загрязнителей окружающей среды (Su et al., 2025).

Также было показано быстрое образование гетероагрегатов клеток *Chlorella* и *Scenedesmus*, и наночастиц, когда микроводоросли подвергались воздействию нанопластирола с размером частиц 20 нм при их содержании 80–800 мг/л (Bhattacharya et al., 2010). Гетероагрегация диатомовой водоросли *Chaetoceros neogracile* с микрополистиролом увеличивалась с возрастом культуры (Long et al., 2017).

Следовательно, возможная адсорбция токсиканта на частицах пластика и агрегация клеток и пластиковых частиц также должны быть взяты в расчет при объяснении токсического воздействия смеси частиц пластика и загрязняющего вещества на микроводоросли.

Таким образом, экологическая судьба частиц пластика и связанные с ними риски в значительной степени зависят от их сложных взаимодействий с сопутствующими загрязнителями в окружающей водной среде. Адсорбция на поверхности пластика этих сопутствующих загрязнителей приводит к изменению их токсичности для водных организмов, варьирующейся от аддитивной, синергетической, а иногда и антагонистической. Конечные результаты таких сложных взаимодействий зависят от основных характеристик частиц пластика, свойств сопутствующих загрязнителей и абиотических факторов и должны быть лучше изучены для минимизации экологических рисков. Поэтому такая оценка токсичности частиц пластика, учитывающая эти проблемы, является экологически значимой.

Представленные в настоящей работе результаты комбинированного действия частиц пластика с токсикантами разной природы на микроводоросли могут служить основой для разработки экологически приемлемых методов и способов оценки воздействия микро- и наночастиц пластика и сопутствующих загрязняющих веществ на разные уровни биологической организации.

Разработанная в настоящей работе авторская модель оценки комбинированных эффектов загрязняющих веществ и материалов необходима для более реалистичной экологической оценки токсических эффектов смеси и понимания природы взаимодействия токсикантов в присутствии живых организмов.

В настоящее время процедура биотестирования проводится в стандартизованных условиях, установленных утвержденными многочисленными российскими и зарубежными методиками.

Однако существующие методики биотестирования не учитывают ряд контролируемых в лабораторных условиях ключевых и важных факторов, влияющих на получение адекватного результата. Специалисты токсикологи в своей многолетней практике сталкиваются с трудностями проведения биотестирования, поскольку в ряде методик четко не прописаны необходимые условия и детали этой процедуры, поэтому существующие методики биотестирования с использованием микроводорослей в качестве тест-организмов не лишены недостатков и требуют соответствующей доработки и усовершенствования.

Согласно результатам наших исследований, на проявление токсичности вещества могут влиять множество ключевых, контролируемых условий и факторов: концентрация токсиканта, а не его доза на 1 клетку; состав среды выращивания; начальная плотность популяции при добавлении токсиканта в культуру; срок, на который добавляют токсикант (определяющий возраст культуры, ее физиологическое состояние); рН среды, режим освещения, время суток на момент добавки токсиканта.

Эти факторы поддаются регулированию в лабораторных условиях, поэтому их следует учитывать при проведении биотестирования на микроводорослях с целью получения более адекватного результата в оценке токсичности загрязнения окружающей среды, улучшения воспроизводимости результатов испытаний в разных лабораториях.

Сравнительный анализ данных с однократной и многократными добавками хрома в культуры пресноводного вида *S. quadricauda* и морского вида *T. weissflogii* по показателю численности клеток свидетельствует о том, что в токсикологических исследованиях на водорослях уместно ориентироваться на концентрацию, а не дозу токсиканта в отличие от биотестирования на животных, где необходимо учитывать и дозу.

Выбор оптимальной начальной клеточной плотности водорослей имеет большое значение при проведении токсикологических лабораторных испытаний (Ипатова, 2017), поскольку от этого параметра непосредственно зависит получаемая экспериментальным или расчетным путем величина полуэффективной концентрации ($ЭК_{50}$) веществ, а также другие важные параметры токсичности.

Наши результаты показали, что с увеличением начальной плотности популяции от 25 тыс. до 1 млн кл/мл и с увеличением срока добавления $AlCl_3$ (на 0–28 сут) в растущую культуру *S. quadricauda* его токсичность падает. Биотестирование с начальной плотностью более 10^5 кл/мл может потенциально недооценивать токсичность веществ, а рекомендуемая начальная плотность – 25 тыс. кл/мл.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что хлорид алюминия нецелесообразно использовать в качестве эффективного альгицидного средства для подавления роста и цветения водорослей, поскольку малые концентрации оказывают даже стимулирующее действие на их рост. А высокие – оказывают альгицидный эффект, вызывая гибель большинства клеток и торможение деления оставшихся живых клеток, за счет которых может происходить восстановление численности популяции. При этом высокие концентрации $AlCl_3$ уменьшают pH среды, приводя ее к закислению. Однако ацидификация водной среды увеличивает растворимость, доступность и токсичность не только алюминия, но и других потенциально токсичных металлов (тяжелые металлы), веществ (пестициды) и соединений (нефтепродукты).

Состав среды выращивания культуры, присутствие в природной воде повышенного фона элементов Ca, Mg, K, Si, Na изменяют токсичность алюминия: на среде Успенского №1 токсичность алюминия выше по сравнению со средой, приготовленной на природной воде.

По данным литературы время суток – ключевая биологическая важная переменная в биомедицинских исследованиях (Nelson et al., 2021) и, как было

показано в настоящей работе, является биологически важным фактором при проведении биотестирования (Лазарева, Ипатова, 2022).

Проведенные в работе расчеты ЛК₅₀ для хрома, меди и алюминия свидетельствуют о том, что биотесты без учета фактора времени могут переоценивать или недооценивать токсичность веществ.

Полученные результаты настоящей работы могут быть рекомендованы для включения фактора времени суток на момент добавки токсиканта в культуру в существующие методики биотестирования с целью их дальнейшего и необходимого совершенствования.

До сих пор не разработаны методики биотестирования для слабосоленых сред. Анализ данных литературы и полученные нами результаты позволяют рекомендовать в качестве тест-организмов культуры пресноводных зеленых хлорококковых микроводорослей *S. quadricauda* для оценки соленых проб с уровнем минерализации в диапазоне 1–6 г/л в хронических опытах и *M. arcuatum* – в диапазоне 1–4 г/л в острых опытах до 3 сут.

Результаты настоящей работы имеют важное экологическое значение для экстраполяции данных, полученных в ходе стандартных испытаний на токсичность, на природную среду, где водные организмы испытывают воздействие множества факторов стресса и могут быть использованы для разработки экологически приемлемых методов оценки токсичности различных загрязняющих веществ и материалов отдельно друг от друга и совместно.

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие **выводы**:

1. В присутствии 5 видов микропластика из макрообразцов, отобранных на супралиторали Баренцева моря, и одного интактного образца, по изменению численности клеток *S. quadricauda* получен ряд токсичности в порядке ее убывания: PU > HDPE (белый) > HDPE (красный) > EPS > EPS (интактный) > PP. Влияние МП вызывает неоднозначную ответную реакцию культуры: сильное угнетение роста сопровождается значительным повышением содержания продуктов перекисного окисления липидов в клетках, при этом величина эффективности фотосинтеза не меняется.

2. Токсичность зольного остатка от сжигания смеси разных видов пластика в интервале концентраций 0,01–1000 мг/л выявлена по показателю численности клеток *S. quadricauda* при 1000 мг/л, по изменению количества ТБК–активных продуктов в клетках – при 0,1 мг/л и выше, а по величине эффективности фотосинтеза – при 0,01 мг/л, что на 5 порядков выше, чем по численности клеток.

3. Токсичность наночастиц (100 нм) интактного полистирола (НП) зависит от его концентрации, времени воздействия и оцениваемого тест-параметра. Общебиологические интегральные показатели – численность клеток и выживаемость, а также структурные показатели – размер и число клеток в ценобии *S. quadricauda*, под действием 1–50 мг/л НП изменяются несинхронно как между собой, так и с физиологическим показателем – эффективностью фотосинтеза. При интоксикации показано увеличение доли ценобиев с нетипичным числом клеток и увеличение их размеров. НП по показателю численности клеток на 3 порядка токсичнее МП полистирола. При проведении биотестирования для более адекватной оценки токсичности нанопластика необходимо применять сочетание структурных и функциональных показателей состояния тест-организма.

4. Показан синергический, аддитивный и антагонистический эффекты парных комбинаций 10 и 50 мг/л НП с токсикантами разной природы (хром, медь, метиленовый синий, фтор) на культуры *S. quadricauda* и *C. vulgaris* в зависимости от типа токсиканта, его концентрации и срока действия. Для обеих культур по параметру численности клеток антагонизм отмечен в большинстве случаев из всех использованных комбинаций НП с другими токсикантами и сроков наблюдений. Метиленовый синий (МС), фтор и медь действуют сильнее на изменение численности клеток, чем на величину эффективности фотосинтеза, а в смеси с нанопластиком МС и фтор, в отличие от меди, оказывают большее токсическое действие на физиологическое состояние клеток микроводорослей.

5. При изучении связи циркадных ритмов с изменением токсикочувствительности микроводорослей впервые выявлено, что время суток на момент добавки токсиканта ($K_2Cr_2O_7$, $CuSO_4$, $AlCl_3$, Na_2HPO_4) является ключевым фактором и влияет на результаты биотестирования на культурах микроводорослей *S. quadricauda* и *C. vulgaris*. В большинстве случаев утренние добавки в большей степени влияют на показатели роста и физиологическое состояние культур, чем вечерние. Для повышения воспроизводимости результатов биотестирования необходимо фиксировать и учитывать время добавления токсиканта.

6. При проведении биотестирования на водорослях уместно ориентироваться на концентрацию, а не дозу токсиканта, в то же время следует учитывать возраст культуры, начальную плотность ее клеток и состав сред, поскольку от этих параметров зависит расчетная величина полуэффективной концентрации ($ЭК_{50}$) испытываемых веществ.

7. Впервые установлено, что культура пресноводной микроводоросли *S. quadricauda* может быть рекомендована в качестве тест-организма для оценки токсичности соленых проб при уровнях их минерализации 1–6 г/л, а культура

пресноводной микроводоросли *M. arcuatum* может быть предложена для проведения биотестирования только в острых (3 сут) испытаниях на средах с уровнем минерализации 1–4 г/л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. – М.: Акварос, 2007. – 47 с.
2. Бурлакова З.П., Крупаткина Д.К., Ланская Л.А. и др. Влияние плотности популяции морских одноклеточных водорослей на потребление фосфора и основные физиологические показатели клеток // Взаимодействие между водой и живым веществом: труды Междунар. симпоз., Одесса, 6–10 окт. 1975 г. – М.: Наука, 1979. – Т. 1. – С. 231–235.
3. ГОСТ 31960-2012 (ISO 10253:2006) Вода. Методы определения токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin и *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve. – М.: Стандартинформ, 2014.
4. ГОСТ Р 53910-2010 (ISO 10253:2006) Методы определения токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin и *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve. – М.: Стандартинформ, 2011. – 38 с.
5. ГОСТ Р 54496-2011 (ISO 8692:2004). Определение токсичности с использованием зелёной пресноводной одноклеточной водоросли. – М.: Стандартинформ, 2012.
6. Гуричева З.Г., Петрова Л.И., Сухарева Л.В. Санитарно-химический анализ пластмасс. – Л.: Химия, 1977.
7. Давидович О.И., Давидович Н.А., Подунай Ю.А. и др. Влияние солёности среды на вегетативный рост и половое воспроизведение водорослей из рода *Ardissonaea* De Notaris (Bacillariophyta) // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 6. – С. 796–803.

8. Даллакян Г.А., Ипатова В.И., Михеев И.В. и др. Влияние фуллеренов C₆₀ и C₇₀ на развитие и фотосинтез культуры водоросли *Scenedesmus quadricauda* // Теоретическая и прикладная экология. – 2021. – № 3. – С. 193–197.
9. Джафарова С.К. Рост клоновых культур полигалобных диатомовых водорослей при изменении ионного состава среды // Альгология. – 1992. – Т. 2. – № 2. – С. 20–24.
10. Дмитриева А.Г., Ипатова (Артюхова) В.И., Кожанова О.Н. и др. Реакция *Elodea canadensis* на загрязнение хромом среды обитания // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. – 2006. – № 2. – С. 17–24.
11. Думпис М.А., Николаев Д.Н., Литасова Е.В. и др. Биологическая активность фуллеренов – реалии и перспективы // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16. – № 1. – С. 4–20.
12. Дятлов С.Е., Петросян А.Г. *Phaeodactylum tricornutum* Vohl. как тест-объект. Диапазон солёностной резистенции // Альгология. – 2001. – Т. 11. – № 2. – С. 259–264.
13. Ипатова В.И. Влияние размера популяции тест-объекта *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Gréb. на результаты биотестирования // Вопросы современной альгологии. – 2017. – №. 1. – С. 1–8.
14. Ильина О.В., Сапожников Ф.В., Ильинский В.В. и др. Пластиковое загрязнение гидросферы: судьба пластика в водной среде и его взаимодействие с живыми организмами // Природа. – 2024. – № 6. – С. 50–60.
15. Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф. и др. О некоторых особенностях физиологической гетерогенности популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. в присутствии низких концентраций металлов // Токсикологический вестник. – 2018. – № 2. – С. 34–43.
16. Ипатова В.И., Лазарева А.М. Концентрация или доза токсиканта в биотестировании с использованием микроводорослей // Бюллетень Московского

общества испытателей природы. Отдел биологический. – 2022. – Т. 127, № 5. – С. 54–65.

17. Ипатова В.И., Прохоцкая В.Ю., Коломенская Е.Е. Влияние начальной плотности популяции на проявление токсичности веществ в испытаниях с использованием микроводорослей // Токсикологический вестник. – 2011. – № 2. – С. 51–55.

18. КНД 211.1.4.047-95. Биотестування морської води та стічної, яку відводять у море. Методика. – Видання офіційне. – Київ, 1995. – 37 с.

19. Лазарева А.М., Ипатова В.И. Влияние плотности лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. на результаты биотестирования // Бюллетень Главного ботанического сада. – 2021. – № 2. – С. 53–58.

20. Лазарева А.М., Ипатова В.И. Влияние фосфора на растительный тест-объект при культивировании на природной воде // Экологические системы и приборы. – 2023 а. – № 4. – С. 58–66.

21. Лазарева А.М., Ипатова В.И. Время суток как биологически важный фактор при проведении биотестирования // Экологические системы и приборы. – 2022. – № 4. – С. 28–37.

22. Лазарева А.М., Ипатова В.И. Использование культуры *Monoraphidium arcuatum* в качестве тест-объекта при низком и умеренном уровнях минерализации // Биодиагностика и экологическая оценка окружающей среды: современные технологии, проблемы и решения: материалы IV Международного симпозиума (Москва, 28–31 августа 2023 г.). – М.: Постер-М, 2023 б. – С. 150–154.

23. Лазарева А.М., Ипатова В.И., Ильина О.В. и др. Токсическое влияние микрочастиц пластика на культуру *Scenedesmus quadricauda*: взаимодействие между микрочастицами пластика и водорослью // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. – 2021. – Т. 7. – № 4. – С. 225–233.

24. Лазарева А.М., Ипатова В.И., Михеев М.А., Конюхов И.В. Особенности токсического действия соли алюминия на разных средах культивирования микроводорослей // Экологические системы и приборы. – 2019. – № 7. – С. 45–53.
25. Лазарева А.М., Михайлина М.А., Добровольская К.Э. и др. Зависимость токсичности $K_2Cr_2O_7$ от времени постановки опыта в фитотестировании на *Chlorella vulgaris* // Экологические системы и приборы. – 2023 а. – № 5. – С. 3–10.
26. Лазарева А.М., Рак А.Н., Гершкович Д.М. и др. Оценка токсичности микропластика супралиторали Баренцева моря с использованием тест-объектов разных трофических уровней // Биология внутренних вод. – 2024. – № 2. – С. 296–305.
27. Лазарева А.М., Рак А.Н., Ипатова В.И. и др. Исследование влияния наночастиц пластика на представителей фито- и зоопланктона // Экологические системы и приборы. – 2023 б. – № 11. – С. 47–58.
28. Медянкина М.В., Соколова С.А., Оганесова Е.В. и др. О проблемах установления нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения // Водоснабжение и санитарная техника. – 2017. – № 10. – С. 12–17.
29. Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения / под ред. С.А. Соколовой, М. В. М. – М.: ВНИРО, 2011. – 165 с.
30. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология. Теоретические и прикладные аспекты. — М.: Наука, 2009. – 400 с.
31. Мошарова И.В., Даллакян Г.А., Михеев И.В. и др. Изменения количественных и функциональных характеристик бактериопланктона под влиянием водных дисперсий немодифицированного фуллерена C_{60} // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 487. – № 2. – С. 217–220.

32. Олькова А.С. Актуальные направления развития методологии биотестирования водных сред // Вода и экология: проблемы и решения. – 2018. – № 2 (74). – С. 40–50.
33. Панова Г.Г., Канаш Е.В., Семенов К.Н. и др. Производные фуллерена стимулируют продукционный процесс, рост и устойчивость к окислительному стрессу у растений пшеницы и ячменя // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 1. – С. 38–49.
34. ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004. Т 16.1:2.3:3.7-2004. Токсикологические методы анализа. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов производства и потребления по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). – Утв. ФБУ «ФЦАО» 10.04.2012.
35. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В. и др. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. – 2009. – № 6. – С. 34–40.
36. Подколзин А.А., Гуревич К.Г. Действие биологически активных веществ в малых дозах. – М.: КМК, 2002. – 170 с.
37. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002. – 132 с.
38. Спиркина Н.Е., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф. Сравнительная динамика роста культур микроводорослей видов *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) и *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. // Бюллетень МОИП. Отделение биологическое. – 2014. – Т. 119. – Вып. 2. – С. 64–69.
39. Терехова В. А., Воронина Л. П., Гершкович Д. М., и др. Биотест-системы для задач экологического контроля: методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур. – М.: Доброе слово, 2014. – 48 с.

40. Терехова В.А., Гершкович Д.М., Гладкова М.М. и др. Биотестирование в экологическом контроле / под ред. В.А. Тереховой. – М.: ГЕОС, 2017. – 70 с.
41. Упитис В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. – Рига: Зинатне, 1983. – 240 с.
42. Файнгольд И.И. Физико-химические свойства гибридных соединений на основе фуллерена C_{60} и их биологическая активность: Дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2008. – 102 с.
43. Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф., Гершкович Д.М. и др. Биотестирование качества среды с использованием гидробионтов. Раздел большого практикума по гидробиологии: Учебно-методическое пособие. – М.: МГУ, 2015. – 44 с.
44. Фокина А.И. Использование физиолого-биохимического отклика микроорганизмов на действие токсикантов в биотестировании // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. – № 3. – С. 4–15.
45. Фрог Е.С. Мембранотропные свойства аминокислотных производных фуллерена C_{60} и обусловленная ими биологическая активность: Дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2006. – 111 с.
46. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. – Л.: Наука, 1974. – 236 с.
47. Шефтель В.О. Гигиенические свойства полиамидов (обзор) // Гигиена и санитария. – 1991. – № 4. – С. 31–33.
48. Abbott W.S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide // Journal of Economic Entomology. – 1925. – Vol. 18. – P. 265–267.
49. Al-Enazi N.M. Salinization and wastewater effects on the growth and some cell contents of *Scenedesmus bijugatus* // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – Vol. 27, No. 7. – P. 1773–1780.
50. Alimi O.S., Budarz J.F., Hernandez L.M., Tufenkji N. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced

contaminant transport // *Environmental Science and Technology*. – 2018. – Vol. 52, No. 4. – P. 1704–1724.

51. Aljaibachi R., Callaghan A. Impact of polystyrene microplastics on *Daphnia magna* mortality and reproduction in relation to food availability // *PeerJ*. – 2018. – 6:e4601.

52. Altenburger R., Walter H., Grote M. What contributes to the combined effect of a complex mixture? // *Environmental Science and Technology*. – 2004. – Vol. 38, No. 23. – P. 6353–6362.

53. Amde M., Liu J.-F., Tan Z.-Q., Bekana D. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review // *Environmental Pollution*. – 2017. – Vol. 230. – P. 250–267.

54. An D., Na J., Song J., Jung J. Size-dependent chronic toxicity of fragmented polyethylene microplastics to *Daphnia magna* // *Chemosphere*. – 2021. – Vol. 271. – 129591.

55. Aquino A., Chan J., Giolma K., Loh M. The effect of a fullerene after suspension on the growth, cell viability, and membrane integrity of *Escherichia coli* B23 // *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. – 2010. – Vol. 14. – P. 13–20.

56. Bandmann V., Müller J.D., Köhler T., Homann U. Uptake of fluorescent nanobeads into BY2 cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis // *FEBS Letters*. – 2012. – Vol. 586, No. 20. – P. 3626–3632.

57. Besseling E., Wang B., Lüring M., Koelmans A.A. Nanoplastic affects growth of *Scenedesmus obliquus* and reproduction of *Daphnia magna* // *Environmental Science and Technology*. – 2014. – Vol. 48. – P. 12336–12343.

58. Bhattacharya P., Lin S., Turner J.P., Ke P.C. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis // *The Journal of Physical Chemistry*. – 2010. – Vol. 114, No. 39. – P. 16556–16561.

59. Bišová K., Zachleder V. Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission // *Journal of Experimental Botany*. – 2014. – Vol. 65, No. 10. – P. 2585–2602.

60. Breuer G., Lamers P.P., Martens D.E., Draaisma R.B., Wijffels R.H. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 124. – P. 217–226.
61. Bruno E., Eklund B. Two new growth inhibition tests with the filamentous algae *Ceramium strictum* and *Ceramium tenuicorne* (Rhodophyta) // *Environmental Pollution*. – 2003. – Vol. 125, No. 2. – P. 287–293.
62. Calabrese E.J. Overcompensation stimulation: A mechanism for hormetic effects // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2001. – Vol. 31. – P. 425–470.
63. Canniff P.M., Hoang T.C. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 633. – P. 500–507.
64. Caron D.A., Lie A.A.Y., Buckowski T., Turner J., Frabotta K. The effect of pH and salinity on the toxicity and growth of the golden alga, *Prymnesium parvum* // *Protist*. – 2023. – Vol. 174, No. 1. – 125927.
65. Carusso S., Juárez A.B., Moretton J., Magdaleno A. Effects of three veterinary antibiotics and their binary mixtures on two green algae species // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 194. – P. 821–827.
66. Casado M.P., Macken A., Byrne H.J. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery // *Environment International*. – 2013. – Vol. 51. – P. 97–105.
67. Cau A., Avio C.G., Dessì C. et al. Benthic crustacean digestion can modulate the environmental fate of microplastics in the deep sea // *Environmental Science and Technology*. – 2020. – Vol. 54, No. 8. – P. 4886–4892.
68. Chae S.R., Wang S., Hendren Z.D. et al. Effects of fullerene nanoparticles on *Escherichia coli* K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control // *Journal of Membrane Science*. – 2009. – Vol. 329, Nos. 1–2. – P. 68–74.

69. Chae Y., Kim D., Kim S.W., An Y.J. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 284.
70. Charles A.L., Markich S.J., Stauber J.L., De Filippis L.F. The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.) // *Aquatic Toxicology*. – 2002. – Vol. 60. – No. 1–2. – P. 61–73.
71. Cheloni G., Cosio C., Slaveykova V.I. Antagonistic and synergistic effects of light irradiation on the effects of copper on *Chlamydomonas reinhardtii* // *Aquatic Toxicology*. – 2014. – Vol. 155. – P. 275–282.
72. Chen C.S., Anaya J.M., Zhang S. et al. Effects of engineered nanoparticles on the assembly of exopolymeric substances from phytoplankton // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, No. 7. – e21865.
73. Cheng H., Li G., Han Z. et al. Growth and primary cell composition of plateau microalgae *Desmodesmus* sp. QL96 under low temperature // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2019. – Vol. 332, No. 3. – 032008.
74. Church J., Hwang J.H., Kim K.T. et al. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 243. – P. 147–153.
75. Cuaresma M., Janssen M., van den End E.J. et al. Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle? // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, No. 17. – P. 7871–7878.
76. de Winter L., Cabanelas I.T., Martens D.E. et al. The influence of day/night cycles on biomass yield and composition of *Neochloris oleoabundans* // *Biotechnology for Biofuels*. – 2017 a. – Vol. 10. – P. 1–10.
77. de Winter L., Cabanelas I.T., Órfão A.N. et al. The influence of day length on circadian rhythms of *Neochloris oleoabundans* // *Algal Research*. – 2017 b. – Vol. 22. – P. 31–38.

78. de Winter L., Klok A.J., Franco M. et al. The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions // *Algal Research*. – 2013. – Vol. 2, No. 4. – P. 313–320.
79. de Winter L., Schepers L.W., Cuaresma M., Barbosa M.J., Martens D.E., Wijffels R.H. Circadian rhythms in the cell cycle and biomass composition of *Neochloris oleoabundans* under nitrogen limitation // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 187. – P. 25–33.
80. Debroas D., Mone A., Ter Halle A. Plastics in the North Atlantic garbage patch: a boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders // *Science of the Total Environment*. – 2017. – Vol. 599–600. – P. 1222–1232.
81. Demirezen D., Aksoy A., Uruc K. Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae) // *Chemosphere*. – 2007. – Vol. 66. – P. 553–557.
82. Dodd A.N., Salathia N., Hall A. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage // *Science*. – 2005. – Vol. 309, No. 5734. – P. 630–633.
83. Dosnon-Olette R., Couderchet M., Arfaoui A. et al. Influence of initial pesticide concentrations and plant population density on dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species // *Science of the Total Environment*. – 2010. – Vol. 408. – P. 2254–2259.
84. Duncan L.K., Jinschek J.R., Vikesland P.J. C₆₀ colloid formation in aqueous systems: effects of preparation method on size, structure, and surface charge // *Environmental Science and Technology*. – 2008. – Vol. 42, No. 1. – P. 173–178.
85. El-Katont T.M., El-Adl M.F. Salt response of the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kutz is modulated by the algal growth phase // *Journal of Oceanology and Limnology*. – 2020. – Vol. 38. – P. 802–815.

86. Eltemsah Y.S., Bøhn T. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna* // Environmental Pollution. – 2019. – Vol. 254, Part A. – 112919.
87. EPA Test Method 1003.0: Green Algae, *Selenastrum capricornutum*, Growth Test Method. Fourth Edition, October. – 2002.
88. EPA-712-C-96-164 Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.2400 Algal Toxicity, Tiers I and II. – 1996.
89. EPA-822-R-02-047 National Recommended Water Quality Criteria. – 2002.
90. Fadare O.O., Wan B., Guo L.-H. et al. Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to *Daphnia magna* // Environmental Science: Nano. – 2019. – Vol. 6. – P. 1466.
91. Fal S., Aasfar A., Rabie R. et al. Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* // Heliyon. – 2022. – Vol. 8, No. 1. – e08811.
92. Fargašová A. Interactive effect of manganese, molybdenum, nickel, copper I and II, and vanadium on the freshwater alga *Scenedesmus quadricauda* // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 2001. – Vol. 67, No. 5.
93. Fernando G. Torres, Diana Carolina Dioses-Salinas, Carlos Ivan Pizarro-Ortega, Gabriel E. De-la-Torre. Sorption of chemical contaminants on degradable and nondegradable microplastics: recent progress and research trends // Science of the Total Environment. – 2021. – Vol. 757. – 143875.
94. Fettah N., Derakhshandeh M., Tezcan Un U., Mahmoudi L. Effect of light on growth of green microalgae *Scenedesmus quadricauda*: influence of light intensity, light wavelength and photoperiods // International Journal of Energy and Environmental Engineering. – 2022. – P. 1–10.
95. Figler A., Figler A., B-Béres V. et al. Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates // Water. – 2019. – Vol. 11, No. 12. – 2527.

96. Finney D.J. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, London, UK. – 1971. – P. 333.
97. Franklin N.M., Stauber J.L., Apte S.C., Lim R.P. Effect of initial density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2002. – Vol. 21. – P. 742–751.
98. Gan X., Shen G., Xin B. et al. Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water // *Desalination*. – 2016. – Vol. 400. – P. 1–6.
99. García N., López-Elías J.A., Miranda A. et al. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases // *Latin American Journal of Aquatic Research*. – 2012. – Vol. 40, No. 2. – P. 435–440.
100. Gerath M.W., Chisholm S.W. Change in photosynthetic capacity over the cell cycle in light/dark-synchronized *Amphidinium carteri* is due solely to the photocycle // *Plant Physiol*. – 1989. – Vol. 91, No. 3. – P. 999–1005.
101. Gillmore M., Golding L., Angel Br. et al. Toxicity of dissolved and precipitated aluminium to marine diatoms // *Aquat. Toxicol*. – 2016. – Vol. 174. – P. 82–91.
102. González-Pleiter M., Gonzalo S., Rodea-Palomares I. et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment // *Water Research*. – 2013. – Vol. 47, No. 6. – P. 2050–2064.
103. Gouveia L., Marques A.E., Da Silva T.L., Reis A. *Neochloris oleabundans* UTEX# 1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 36, No. 6. – P. 821–826.
104. Hadduck A., Hindagolla V., Contreras A. et al. Does aqueous fullerene inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* or *Escherichia coli*? // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 76, No. 24. – P. 8239–8242.

105. Hernandez L.M., Yousefi N., Tufenkji N. Are There Nanoplastics in Your Personal Care Products? // *Environmental Science and Technology Letters*. – 2017. – Vol. 4, No. 7. – P. 280–285.
106. Holmstrup M., Bindesbøl A.M., Oostingh G.J. et al. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review // *Science of the Total Environment*. – 2010. – Vol. 408, No. 18. – P. 3746–3762.
107. Hong H.S., Wang M.H., Huang X.G., Wang D.Z. Effects of macronutrient additions on nickel uptake and distribution in the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu // *Environmental Pollution*. – 2009. – Vol. 157, No. 6. – C. 1933–1938.
108. Hong K., Zhang Z., Verma D. Removal of feedback inhibition of pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 122. – P. 1129–1136.
109. Huang F., Ge L., Zhang B. et al. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria // *Chemosphere*. – 2014. – Vol. 108. – P. 411–417.
110. Huang W., Song B., Lian J. et al. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 405. – 124187.
111. Hunt T., Sassone-Corsi P. Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle // *Cell*. – 2007. – Vol. 129, No. 3. – P. 461–464.
112. Iavicoli I., Fontana L., Leso V., Calabrese E.J. Hormetic dose-responses in nanotechnology studies // *Science of the Total Environment*. – 2014. – Vol. 487. – P. 361–374.
113. Issac M.N., Kandasubramanian B. Effect of microplastics in water and aquatic systems // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – Vol. 28. – P. 19544–19562.

114. Jaikumar G., Brun N.R., Vijver M.G. et al. Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure // *Environmental Pollution*. – 2019. – Vol. 249. – P. 638–646.
115. Jemec A., Horvat P., Kunej U. et al. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna* // *Environmental Pollution*. – 2016. – Vol. 219. – P. 201–209.
116. Jia X., Pan Y., Zhu X. Salinization and heavy metal cadmium impair growth but have contrasting effects on defensive colony formation of *Scenedesmus obliquus* // *Science of the Total Environment*. – 2023. – Vol. 862. – 160693.
117. Kaplan H. A model for the toxic dose under time-varying concentration // *Journal of Hazardous Materials*. – 2009. – Vol. 167, No. 1–3. – P. 351–356.
118. Khan F.R., Misra S.K., García-Alonso J. et al. Bioaccumulation dynamics and modeling in an estuarine invertebrate following aqueous exposure to nanosized and dissolved silver // *Environmental Science and Technology*. – 2012. – Vol. 46, No. 13. – P. 7621–7628.
119. Khoshnamvand M., Hanachi P., Ashtiani S., Walker T.R. Toxic effects of polystyrene nanoplastics on microalgae *Chlorella vulgaris*: Changes in biomass, photosynthetic pigments and morphology // *Chemosphere*. – 2021. – Vol. 280. – 130725.
120. Kik K., Bukowska B., Sicinska P. Polystyrene nanoparticles: sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms // *Environmental Pollution*. – 2020. – Vol. 262. – 114297.
121. Kim B.H., Ramanan R., Kang Z. et al. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity // *Biomass and Bioenergy*. – 2016. – Vol. 85. – P. 300–305.
122. Kinley C.M., Iwinski K.J., Hendrikse M. et al. Cell density dependence of *Microcystis aeruginosa* responses to copper algacide concentrations: Implications for microcystin-LR release // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2017. – Vol. 145. – P. 591–596.

123. Kliphuis A.M., de Winter L., Vejrazka C. et al. Photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* in a turbulently mixed short light-path photobioreactor // *Biotechnology Progress*. – 2010. – Vol. 26, No. 3. – P. 687–696.
124. Kögel T., Bjørøy Ø., Toto B. et al. Microplastics and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 709. – 136050.
125. Lacour T., Sciandra A., Talec A. et al. Diel variations of carbohydrates and neutral lipids in nitrogen-sufficient and nitrogen-starved cyclostat cultures of *Isochrysis* sp. 1 // *Journal of Phycology*. – 2012. – Vol. 48, No. 4. – P. 966–975.
126. Lagarde F., Oliver O., Zanella M. et al. Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type // *Environmental Pollution*. – 2016. – Vol. 215. – P. 331–339.
127. Lazareva A.M., Ipatova V.I., Il'ina O.V. et al. Toxic Effects of Microplastics on Culture *Scenedesmus quadricauda*: Interactions between Microplastics and Algae // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2021. – Vol. 76, № 4. – P. 202–209.
128. Lazareva A.M., Rak A.N., Gershovich D.M. et al. Evaluation of the Toxicity of Microplastics in the Supralittoral of the Barents Sea Using Test Objects of Different Trophic Levels // *Inland Water Biology*. – 2024. – Vol. 17, № 2. – P. 307–315.
129. Lead J.R., Batley G.E., Alvarez P.J.J. et al. Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability, and Effects – An Updated Review // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2018. – Vol. 37, No.8. – P. 2029–2063.
130. Levy Y., Benderly M., Cohen Y. et al. The joint action of fungicides in mixtures: Comparison of two methods for synergy calculation // *EPPO Bulletin*. – 1986. – Vol. 16, No. 4. – P. 651–657.
131. Lewis M., Thursby G. Aquatic plants: test species sensitivity and minimum data requirement evaluations for chemical risk assessments and aquatic life criteria development for the USA // *Environmental Pollution*. – 2018. – Vol. 238. – P. 270–280.

132. Li C., Busquets R., Campos L.C. Assessment of microplastics in freshwater systems: A review // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 707. – 135578.
133. Li F.W., Mathews S. Evolutionary aspects of plant photoreceptors // *Journal of Plant Research*. – 2016. – Vol. 129, No. 1. – P. 115–122.
134. Li P.T., Zou X., Sun X., Liu X. Bioremediation of domestic wastewaters integrated with enhanced biodiesel production using *Desmodesmus* sp. mutated by atmospheric and room temperature plasma // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2023 a. – Vol. 11, No. 5. – 110957.
135. Li R.R., Wang B.L., Nan F.R. et al. Effects of polystyrene nanoplastics on the physiological and biochemical characteristics of microalga *Scenedesmus quadricauda* // *Environmental Pollution*. – 2023 b. – Vol. 319. – 120987.
136. Lion L.W., Shuler M.L., Hsieh K.M., Ghiorse W.C. Trace metal interactions with microbial biofilms in natural and engineered systems // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 1988. – Vol. 17, No. 4. – P. 273–306.
137. Lithner D., Larsson A., Dave G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition // *Science of the Total Environment*. – 2011. – Vol. 409. – P. 3309–3324.
138. Liu N., Mou Y., Su K. et al. The effect of salinity stress on the growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* FACHB-1297 under xylose mixotrophic cultivation // *Process Safety and Environmental Protection*. – 2022. – Vol. 165. – P. 887–894.
139. Lockyer A., Binet M., Styan C. Importance of sperm density in assessing the toxicity of metals to the fertilization of broadcast spawners // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2019. – Vol. 172. – P. 547–555.
140. Long M., Moriceau B., Gallinari M. et al. Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates // *Marine Chemistry*. – 2015. – Vol. 175. – P. 39–46.

141. Long M., Paul-Pont I., Hégaret H. et al. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation // *Environmental Pollution*. – 2017. – Vol. 228. – P. 454–463.
142. Ma J., Chen F., Zhou B. et al. Effects of nitrogen and phosphorus availability on cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 838. – 156615.
143. Malinowski J., Laval-Martin D., Edmunds L. Jr. Circadian oscillators, cell cycles, and singularities: light perturbations of the free-running rhythm of cell division in *Euglena* // *Journal of Comparative Physiology*. – 1985. – Vol. 155, No. 2. – P. 257–267.
144. Mao Y., Ai H., Chen Y. et al. Phytoplankton response to polystyrene microplastics: perspective from an entire growth period // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 208. – P. 59–68.
145. Matsuo T., Ishiura M. Chapter 6. New insights into the circadian clock in *Chlamydomonas*. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. – Vol. 280. – Cambridge: Academic Press; 2010. – P. 281-314.
146. McLarnon-Riches C.J., Rolph C.E., Greenway D.L.A., Robinson P.K. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipid // *Phytochemistry*. – 1998. – Vol. 49, No. 5. – P. 1241-1247.
147. McMurry L., Hastings J.W. Circadian rhythms: mechanism of luciferase activity changes in *Gonyaulax* // *The Biological Bulletin*. – 1972. – Vol. 143, No. 1. – P. 196–206.
148. Menezes-Oliveira V.B., Scott-Fordsmand J.J., Rocco A. et al. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* reflecting field scenarios // *Science of the Total Environment*. – 2011. – Vol. 409. – P. 3370–3374.
149. Miao A.J., Wang W.X. Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions // *Aquatic Toxicology*. – 2006. – Vol. 78, No. 2. – P. 114–126.

150. Michels J., Stippkugel A., Lenz M. et al. Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2018. – Vol. 285. – P. 1885.
151. Mikheev I.V., Khimich E.S., Rebrikova A.T. et al. Quasi-equilibrium distribution of pristine fullerenes C₆₀ and C₇₀ in a water-toluene system // *Carbon*. – 2017. – Vol. 111. – P. 191–197.
152. Mohabir G., Edmunds Jr. L.N. Circadian clock regulation of the bimodal rhythm of cyclic AMP in wild-type *Euglena* // *Cellular Signalling*. – 1999. – Vol. 11, No. 2. – P. 143-147.
153. Nakao T., Aozasa O., Ohta S. et al. Formation of toxic chemicals including dioxin-related compounds by combustion from a small home waste incinerator // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 62. – P. 459–468.
154. Nelson R.J., Bumgarner J.R., Walker II W.H., DeVries A.C. Time-of-day as a critical biological variable // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2021. – P. 740-746.
155. Nikaido S.S., Johnson C.H. Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Photochemistry and Photobiology*. – 2000. – Vol. 71, № 6. – P. 758–765.
156. Nolte T.M., Hartmann N.B., Kleijn J.M. et al. The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption // *Aquatic Toxicology*. – 2017. – Vol. 183. – P. 11–20.
157. Nordberg G.F. Effects and dose-response relationships of toxic metals. – 1976. – 559 pp.
158. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. EPA Growth Inhibition Test, 1984.
159. Ogata Y., Takada H., Mizukawa K. et al. International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data

- on PCBs, DDTs, and HCHs // *Marine Pollution Bulletin*. – 2009. – Vol. 58. – P. 1437–1446.
160. Ogonowski M., Schür C., Jarsén Å. et al. The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna* // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11, No. 5. –e0155063.
161. Pancha I., Chokshi K., Maurya R. A.O. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 // *Bioresource Technology*. – 2015. – Vol. 189. – P. 341–348.
162. Panda S., Hogenesch J.B., Kay S.A. Circadian rhythms from the flies to human // *Nature*. – 2002. – Vol. 417. – P. 329-335.
163. Petersen J., Rredhi A., Szyttenholm J., Mittag M. Evolution of circadian clocks along the green lineage // *Plant Physiology*. – 2022. – Vol. 190, No. 2. – P. 924-937.
164. Popovich C.A., Damiani C., Constenla D. et al. *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: evaluation of its growth and biochemical composition // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 114. – P. 287–293.
165. Post A.F., Eijgenraam F., Mur L.R. Influence of light period length on photosynthesis and synchronous growth of the green alga *Scenedesmus protuberans* // *British Phycological Journal*. – 1985. – Vol. 20, No. 4. – P. 391–397.
166. Prata J.C., da Costa J.P., Lopes I. et al. Effects of microplastics on microalgae populations: a critical review // *Science of the Total Environment*. – 2019. – Vol. 665. – P. 400–405.
167. Prokhotskaya V.Yu., Veselovski V.A., Veselova T.V. et al. On the nature of the three-phase response of *Scenedesmus quadricauda* populations to the action of imazalil sulfate // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 47, No 6. – P. 772–778.
168. Qiao T., Zhao Y., Zhong D., Yu X. Hydrogen peroxide and salinity stress act synergistically to enhance lipids production in microalga by regulating reactive oxygen species and calcium // *Algal Research*. – 2021. – Vol. 53. – 102017.

169. Qu M., Xu K., Li Y. et al. Using *acs-22* mutant *Caenorhabditis elegans* to detect the toxicity of nanopolystyrene particles // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 643. – P. 119–126.
170. Rai M.P., Gautom T., Sharma N. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application // *OnLine Journal of Biological Sciences*. – 2015. – Vol. 15. – P. 260–267.
171. Rist S., Baun A., Hartmann N.B. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction // *Environmental Pollution*. – 2017. – Vol. 228. – P. 398–407.
172. Rochman C.M. The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment // *Marine Anthropogenic Litter*. – 2015. – Eds. M. Bergmann, L. Gutow, M. Klages. Springer. – P. 117–140.
173. Rosato A., Barone M., Negroni A. et al. Microbial colonization of different microplastic types and biotransformation of sorbed PCBs by a marine anaerobic bacterial community // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 705. – 135790.
174. Salama E.S., Kim H.C., Abou-Shanab R.A. et al. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2013. – Vol. 36. – P. 827–833.
175. Serrano-Bueno G., Romero-Campero F.J., Lucas-Reina E. et al. Evolution of photoperiod sensing in plants and algae // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2017. – Vol. 37. – P. 10–17.
176. Sforza E., Simionato D., Giacometti G.M. et al. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, No. 6. – e38975.
177. Shen M., Zhang Y., Zhu Y. et al. Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: a review // *Environmental Pollution*. – 2019. – Vol. 252. – P. 511–521.

178. Shetty P., Gitau M.M., Maroti G. Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. No. 12. – 1657.
179. Shiu R.-F., Vazquez C.I., Chiang C.-Y. et al. Nano- and microplastics trigger secretion of protein-rich extracellular polymeric substances from phytoplankton // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 748. – 141469.
180. Simões-Gonçalves M.L.S., Vilhena M.F.C., Sampayo M.A. Effect of nutrients, temperature and light on uptake of cadmium by *Selenastrum capricornutum* Printz // *Water Research*. – 1988. – Vol. 22, No. 11. – P. 1429–1435.
181. Singh S.P., Singh P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – Vol. 50. – P. 431–444.
182. Stewart R.C., Bewley J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // *Plant Physiology*. – 1980. – Vol. 65, No. 2. – P. 245–248.
183. Stone S., Koppel D.J., Binet M.T. et al. Application of a multispecies pulse-exposure microalgal bioassay to assess duration and time-of-day influences on the toxicity of chemicals // *Environmental Science and Technology*. – 2024. – Vol. 58, No. 48. – P. 21155–21165.
184. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivasta A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient // *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*. – 2004. – Vol. 19. – Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer. – P. 321–362.
185. Su Y., Gao L., Xu E.G. When microplastics meet microalgae: unveiling the dynamic formation of aggregates and their impact on toxicity and environmental health // *Water Research*. – 2025. – Vol. 273. – 123008.
186. Suaria G., Avio C.G., Mineo A. et al. The Mediterranean plastic soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – 37551.
187. Sun Y.P., Johnson E.R. Analysis of joint action of insecticides against house flies // *Journal of Economic Entomology*. – 1960. – Vol. 53, No. 5. – P. 887–892.

188. Sunda W.G., Huntsman S.A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems // *Science of the Total Environment*. – 1998. – Vol. 219, No. 2-3. – P. 165–181.
189. Suzuki L., Johnson C.H. Algae know the time of day: circadian and photoperiodic programs // *Journal of Phycology*. – 2001. – Vol. 37, No. 6. – P. 933–942.
190. Tanno Y., Kato Sh., Takahashi S. et al. Light dependent accumulation of β -carotene enhances photo-acclimation of *Euglena gracilis* // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – Vol. 209. – 111950.
191. Taylor N.S., Merrifield R., Williams T.D. et al. Molecular toxicity of cerium oxide nanoparticles to the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* is associated with supra-environmental exposure concentrations // *Nanotoxicology*. – 2016. – Vol. 10. – P. 32–41.
192. Thit A., Banta G.T., Selck H. Bioaccumulation, subcellular distribution and toxicity of sediment-associated copper in the ragworm *Nereis diversicolor*: The relative importance of aqueous copper, copper oxide nanoparticles and microparticles // *Environmental Pollution*. – 2015. – Vol. 20. – P. 50–57.
193. Tomasik P., Magadza C.H., Mhizha S. et al. The metal–metal interactions in biological systems Part III. *Daphnia magna* // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 1995. – Vol. 82. – P. 695–711.
194. Tong Zh.-H., Bischoff M., Nies L., et al. Influence of fullerene (C₆₀) on soil bacterial communities: aqueous aggregate size and solvent co-introduction effects // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, No. 28069. – P. 1–9.
195. Truhaut R. Eco-toxicology – objectives, principles and perspectives // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1977. – Vol. 1, No. 2. – P. 151–173.
196. Tunali M., Uzoefuna E., Tunali M.M. et al. Effect of microplastics and microplastic-metal combinations on growth and chlorophyll a concentration of *Chlorella vulgaris* // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 743. – 140479.

197. Valavanidis A., Iliopoulos N., Gotsis G. et al. Persistent free radicals, heavy metals and PAHs generated in particulate soot emissions and residue ash from controlled combustion of common types of plastic // *Journal of Hazardous Materials*. – 2008. – Vol. 156, No. 1–3. – P. 277–284.
198. Vasseur P., Pandard P., Burnel D. Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum* // *Environmental Toxicology*. – 1988. – Vol. 3, No. 3. – P. 331–343.
199. Vítová M., Bišová K., Umysová D. et al. *Chlamydomonas reinhardtii*: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity // *Planta*. – 2011. – Vol. 233, No. 1. – P. 75–86.
200. Wadley F.M. *Experimental statistics in entomology*. – 1967.
201. Wadley F.M. The evidence required to show synergistic action of insecticides and a short cut in analysis. – US Department of Agriculture, Bureau of Entomology and Plant Quarantine. – 1945.
202. Wan J.-K., Chu W.-L., Kok Y.-Y., Lee C.-S. Distribution of microplastics and nanoplastics in aquatic ecosystems and their impacts on aquatic organisms, with emphasis on microalgae // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2018. – Vol. 246. – P. 133–158.
203. Wang J., Zhang M., Xu J., Wang Y. Reciprocal effect of Cu, Cd, Zn on a kind of marine alga // *Water Research*. – 1995. – Vol. 29, No. 1. – P. 209–214.
204. Wang Z., Fu D., Gao L. et al. Aged microplastics decrease the bioavailability of coexisting heavy metals to microalga *Chlorella vulgaris* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2021. – Vol. 217. – 112199.
205. Woelfle M.A., Ouyang Y., Phanvijhitsiri K., Johnson C.H. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria // *Current Biology*. – 2004. – Vol. 14, No. 16. – P. 1481–1486.
206. Wang W. Chromate ion as a reference toxicant for aquatic phytotoxicity tests // *Environmental Toxicology and Chemistry* – 1987. – Vol. 6, No. 12. – P. 953–960.

207. Wu Y.M., Guo P.Y., Zhang X.Y. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – Vol. 374. – P. 219–227.
208. Xiang X., Zhou J., Lin S. et al. Dual drive acute lethal toxicity of methylene blue to *Daphnia magna* by polystyrene microplastics and light // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 840. – 156681.
209. Yablonskaya O.I., Trofimov A.V., Voeikov V.L. et al. Hydrated Fullerene C₆₀ decreases oxidative damage of human bronchial epithelium cells DNA // *International Journal of High Dilution Research*. – 2018. – Vol. 17, No. 2. – P. 43–44.
210. Yang L.H., Ying G.G., Su H.C. et al. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2008. – Vol. 27, No. 5. – P. 1201–1208.
211. Yokota K., Waterfield H., Hastings C. et al. Finding the missing piece of the aquatic plastic pollution puzzle: interaction between primary producers and microplastics // *Limnology and Oceanography Letters*. – 2017. – Vol. 2. – P. 91–104.
212. Yu S., Liu J., Yin Y., Shen M.J. Interactions between engineered nanoparticles and dissolved organic matter: A review on mechanisms and environmental effects // *Journal of Environmental Sciences*. – 2018. – Vol. 63. – P. 198–217.
213. Yun C.J., Hwang K.O., Han S.S., Ri H.G. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703 // *Biomass and Bioenergy*. – 2019. – Vol. 127. – 105277.
214. Zámberszky J., Hong C.I., Csikász N.A.J. Computational analysis of mammalian cell division gated by a circadian clock: quantized cell cycles and cell size control // *Biological Rhythms*. – 2007. – Vol. 22, No. 6. – P. 542–553.
215. Zhang C., Chen X., Wang J. et al. Toxic effects of microplastics on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastics and algae // *Environmental Pollution*. – 2017. – Vol. 220. – P. 1282–1288.

216. Zhang H., Zou F., Fei C. et al. Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus sp.* by ethylmethane sulfonate-induced mutation // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 2. – P. 268–275.
217. Zhang R., Saito R., Mano Y. et al. Concentration rather than dose defines the local brain toxicity of agents that are effectively distributed by convection-enhanced delivery // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2014. – Vol. 222. – P. 131–137.
218. Zhao Y.-T., Yan S., Huang B. et al. Unbound natural organic matter competes with nanoparticles for internalization receptors during cell uptake // *Environmental Science and Technology*. – 2020. – Vol. 54. – P. 15215–15224.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Данные химического анализа выбросов при сжигании смеси пластиков для получения золы, полученные в химико-аналитической лаборатории «РПН-Сфера».

Наименование показателя	Единица измерения	Обнаруженная величина	Показатель точности (при P=0,95)
3	4	5	6
Оксид азота	ppm	0	-
Диоксид азота	ppm	2	_*
Оксид углерода	ppm	453	32
Диоксид серы	ppm	77	24
Сероводород	ppm	0	-
Диоксид углерода	об. %	2,6	0,2
Бенз[а]пирен**	мкг/м ³	0,74	0,19
Взвешенные вещества (пыль)	мг/м ³	85	21
Свинец	мг/м ³	0,091	0,023
Меркаптаны**	мг/м ³	0,013	0,003
Хлористый водород	мг/м ³	4,39	1,10
Муравьиная кислота	мг/м ³	Ниже диапазона методики (<0,5)	-
Аммиак	мг/м ³	0,5	0,1
Гидроцианид**	мг/м ³	0,045	0,011
Ацетальдегид	мг/м ³	4,7	1,2
Ацетон	мг/м ³	1,5	0,4
Бензол	мг/м ³	3,1	0,8
Толуол	мг/м ³	0,62	0,16
Тетрагидрофуран	мг/м ³	0,067	0,017
Уксусная кислота	мг/м ³	Ниже диапазона методики (<1)	-
Фенол	мг/м ³	0,015	0,004
Дихлорэтан	мг/м ³	0,31	0,08
Метиловый спирт	мг/м ³	3,5	0,9
Формальдегид	мг/м ³	2,7	0,7
Хлороформ	мг/м ³	Ниже диапазона методики (<0,30)	-
Стирол	мг/м ³	3,2	0,8
Хлорбензол	мг/м ³	Ниже диапазона методики (<0,05)	-

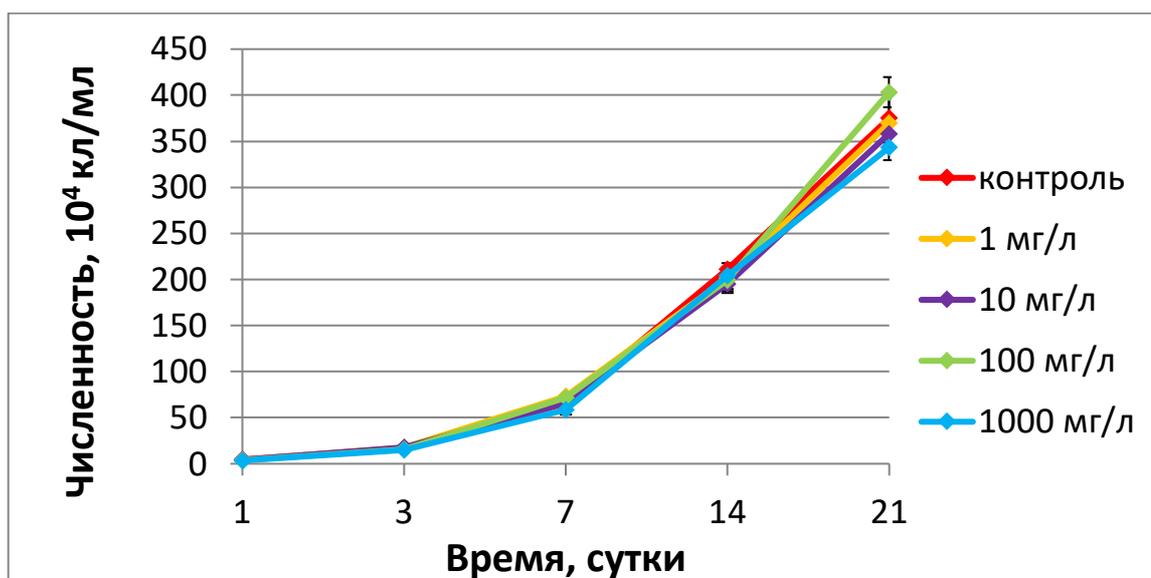


Рисунок 1. Изменение абсолютной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии EPS.

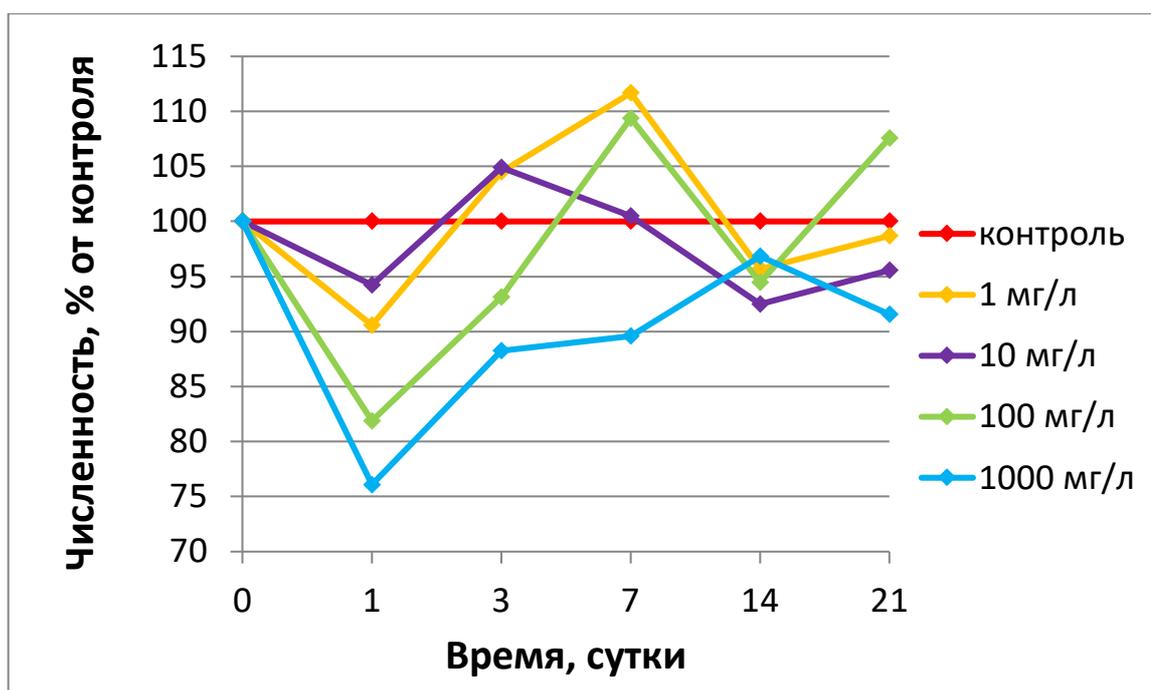


Рисунок 2. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии EPS.

Таблица 2. Концентрация химических элементов (мг/л) в пробе природной воды из оз. М. Вудъявр (методом МС ИСП - масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой по данным лаборатории ООО Микронутриенты Центра Биотической медицины).

Элемент	Результат измерения (среднее±погрешность, P=0,95)	Элемент	Результат измерения (среднее±погрешность, P=0,95)
Al	0,05±0,013	Mn	0,0008±0,00031
As	0,00006±0,000022	Mo	0,003±0,0008
Ca	0,95±0,19	Na	15,13±2,27
Cd	0,00002±0,000008	Ni	0,003±0,001
Co	0,00002±0,000009	P	0,08±0,02
Cr	0,001±0,0004	Pb	0,00009±0,000035
Cu	0,002±0,0006	Si	1,24±0,19
Fe	0,004±0,0013	Sn	0,0006±0,00024
I	0,001±0,0004	Sr	0,06±0,014
K	1,46±0,22	V	0,0001±0,00005
Mg	0,12±0,025	-	-