

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). Algologia. 2018, 28(4): 387–408

<https://doi.org/10.15407/alg28.04.387>

УДК 574; 591.544

БОЖКОВ А.И., ГОЛТВЯНСКИЙ А.В., КОВАЛЕВА М.К., МЕНЗЯНОВА Н.Г.

НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина,

Площадь Свободы, 4, Харьков 61022, Украина

[bozhkov@univer.kharkov.ua](mailto:bozhkov@univer.kharkov.ua)

### О ВОЗМОЖНОМ НАСЛЕДОВАНИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТОКСИЧЕСКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ СЕРНОКИСЛОЙ МЕДИ В РЯДУ КЛЕТОЧНЫХ ПОКОЛЕНИЙ *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD. (*CHLOROPHYTA*)

Исследована способность культуры *Dunaliella viridis* адаптироваться к токсическим концентрациям сернокислрой меди и возможность наследования такой устойчивости в ряду клеточных поколений. Для этого определяли первичную (природную) устойчивость *D. viridis* к воздействию концентраций сернокислрой меди от 0,0001 до 100 мг/л и способность культуры адаптироваться к многократным последовательным внесениям этого токсиканта в среду. Обнаружена U-образная зависимость подвижности и формирования клеточных агрегатов от дозы и времени инкубации. Многократные последовательные внесения сернокислрой меди (110 пассажей) сопровождались формированием резистентности культуры даже к ее летальным концентрациям. Показано, что в процессе адаптации к ионам меди в клетках *D. viridis* образуется специфический метаболический паттерн (эпигенотип), который отличается от эпигенотипов контрольной культуры и обеспечивает сохранение жизнеспособности клеток после накопления большого количества ионов меди (содержание увеличивается в 130–240 раз) в клетках микроводоросли. Такая индуцированная резистентность к ионам меди может наследоваться в ряду клеточных поколений. Реализуется она на основе высокой структурно-функциональной гетерогенности клеточных популяций микроводорослей и эффекта гормезиса.

К л ю ч е в ы е с л о в а : резистентность, сернокислрая медь, эпигенотип, метаболизм, наследование, микроводоросли

#### Введение

Одной из главных закономерностей всех биологических систем является способность к непрерывной адаптации, она обеспечивает выживание и эволюционный процесс в экстремальных условиях, регулирует длительность онтогенеза. Процесс адаптации зависит от: 1) первичной способности вида сохранять свои функциональные характеристики в экстремальных условиях без индукции генетических, эпигенетических и метаболических изменений; 2) адаптивности – способности формиро-

© Божков А.И., Голтвянский А.В., Ковалева М.К., Мензянова Н.Г., 2018

вать новые генетические, эпигенетические и метаболические паттерны (эпигенотипы) при длительных влияниях экстремальных факторов и обеспечивать существование вида в данных условиях.

Отделить первичную устойчивость от адаптивности достаточно сложно, так как это единый процесс и они взаимосвязаны. Это два разных механизма, действие которых имеют разные последствия для вида. Первичная устойчивость является определяющей в процессе адаптации. Экспериментально первичную устойчивость вида к экстремальным факторам можно оценить после однократного первичного воздействия при условии, что особи вида ранее не сталкивались с данным типом экстремальных влияний, тогда как адаптивность — только после многократных последовательных воздействий одних и тех же факторов (Kovaleva et al., 2012).

Индукцированные адаптивными факторами специфические метаболические паттерны (эпигенотипы), которые сохраняются в ряду клеточных поколений, лежат в основе эволюционного процесса и обеспечивают длительность онтогенеза, если они многократно повторяются в ряду поколений.

В настоящее время дарвиновская теория естественного отбора по-прежнему остается главной в понимании эволюционного процесса, результатом которого является возникновение и отбор адаптивных особей, а единицей естественного отбора — ген. Предполагается, что между генами и признаками существует жесткая и прямая корреляционная взаимосвязь. Вместе с тем, современные исследования изменили наши представления о функционировании системы «ген—признак», или «генотип—фенотип». Эта цепь последовательных событий представлена дополнительными элементами: «геном→→эпигеном→→эпигенотип→→фенотип». Каждый из этих элементов обладает относительной автономностью и оказывает многовариантное влияние на фенотип (Bozhkov, Nikitchenko, 2013).

Сегодня мы можем утверждать, что длительное сохранение новых метаболических паттернов может быть обеспечено (особенно у растительных объектов, способных к вегетативному размножению) не только «закреплением» в геноме, но и формированием эпигенетической и метаболической памяти. Мы определяем это как эпигенотип, т. е. реализованный на метаболическом уровне эпигеном (Bozhkov, Nikitchenko, 2013).

В связи с этим необходимо вспомнить незаслуженно забытую концепцию И.И. Шмальгаузена — К.Х. Уоддингтона о стабилизирующем отборе. Такой отбор обеспечивает помехоустойчивое развитие благодаря адаптивному фенотипу. Как известно, устойчивость — это не свойство генов, а свойство метаболических систем формировать новые взаимосвязи между метаболическими элементами системы (Gibson, Wagner, 2000). Исходя из этого, можно согласиться с утверждением, что эволюция организма определяет изменение его фенотипа (Schlichting, 1986).

И.И. Шмальгаузен предполагал, что лабильные модификации нормы (вариабельность), реализуемые на гетерогенной основе, стабилизируют первично неустойчивые типы онтогенетических реакций (Schmalhausen, 1949).

Нами была высказана гипотеза, согласно которой продолжительные адаптивные модификации в культуре *D. viridis* сопровождаются формированием специфических метаболических паттернов, длительно поддерживаясь в этих условиях, могут импринтироваться (запоминаться) на уровне не только генетических, но и метаболических систем и обеспечивать эволюцию этого вида. В качестве экстремального фактора среды была выбрана сернокислая медь, как один из наиболее часто встречающихся экотоксикантов (Lishtvan et al., 2007).

Для проверки этой гипотезы была определена первичная устойчивость *D. viridis* к разным концентрациям сернокислой меди и выявлена летальная концентрация для данного вида. В результате многолетнего (более 15 лет) культивирования в контролируемых условиях получена устойчивая (адаптированная CuR) к высоким концентрациям сернокислой меди культура и исследована способность *D. viridis* сохранять индуцированную резистентность (импринтированную) после перевода на стандартную среду культивирования, т. е. среду, не содержащую сернокислую медь.

#### Материалы и методы

Объектом исследования была выбрана альгологически чистая культура одноклеточной микроводоросли *D. viridis* Teod. var. *viridis* f. *euchlora*, штамм IBASU-A N29, которую обозначили как CuS *D. v.*-культура. Её культивировали на среде Артари в модификации Масюк (Масюк, 1973) при круглосуточном освещении (2,5 клк от двух ламп ЛБ-40) и температуре (26–28 °С), в плоскодонных конических колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем культуры 20 мл).

При культивировании микроводорослей, резистентных к ионам меди (CuR *D. v.*), в среду Артари при каждом пассаже вносили  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  до конечной концентрации 20 мг/л. CuR<sub>20</sub>-культура *D. viridis* в нашей лаборатории поддерживается в таких условиях уже 20 лет. Культура CuR<sub>75</sub> была получена из маточной культуры CuS методом длительной ступенчатой селекции (Божков, Голтвянский, 2000). Такая культура поддерживается на стандартной среде Артари с добавлением 75 мг/л  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в момент пересадки на протяжении 15 лет. Исходная концентрация клеток при пересадке всегда составляла 1,3 млн кл/мл.

Первичную реакцию клеточной культуры оценивали по трем показателям: потере подвижности, формированию агрегатов клеток и гибели клеток, которую определяли по окраске трипановым синим (Ростама и др., 2012). Клетки *D. viridis* обездвиживали 5%-ным спиртовым раствором йода (0,05%-ная конечная концентрация) и подсчитывали в камере Горяева. Концентрацию клеток выражали в млн кл/мл.

Для оценки морфотипов клетки микроводорослей обездвиживали 0,05%-ным спиртовым раствором йода и фотографировали с помощью цифровой камеры Canon «Digital IXUS 750» через окуляр светового микроскопа Биомед-5. На полученных микрофотографиях (программа AxioVision Rel. 4.8) определяли большой ( $d_1$ ) и малый диаметры ( $d_2$ ) клеток. Площадь продольного сечения клеток вычисляли по формуле:  $S = \pi \cdot d_1 \cdot d_2 / 2$ .

Критериями морфологических классов служили соотношение большого и малого диаметров ( $d_1/d_2$ ), а также площадь сечения клеток ( $S$ ). Для каждого варианта проанализировано по 400 клеток.

Удельную радиоактивность ДНК, РНК и белка в клетках «тяжелой» и «легкой» фракции *D. viridis* определяли, как описано ранее (Божков, Голтынский, 2000). Содержание триацилглицеридов и  $\beta$ -каротина в клетках микроводорослей анализировали и устанавливали с использованием тонкослойной хроматографии (Bozhkov, Menzyanova, 1999). Выделение клеточных ядер, определение удельной радиоактивности ДНК и белка проводили по описанному ранее методу (Rizzo, Nooden, 1973) с небольшими изменениями (Bozhkov et al., 2014). Содержание свободного пролина в клетках CuS и CuR<sub>75</sub> *D. viridis* определяли по методу, описанному в литературе (Bates et al., 1973).

Клетки CuS и CuR<sub>75</sub> *D. viridis* дважды промывали свежей средой Артари путем центрифугирования при 5 000 g в течение 15 мин. Клеточную суспензию переносили в пластиковые центрифужные пробирки по 10 мл и центрифугировали при 3 000 g в течение 10 мин. Содержание карбонированного белка в клетках определяли, как описано ранее (Божков и др., 2011).

Водорастворимые клеточные белки CuS- и CuR-культур *D. viridis*, которые находились в супернатанте, разделяли на фракции методом гельэлектрофореза в полиакриламидном геле (Остерман, 1981).

Содержание ионов меди в растворах после минерализации определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (Прайс, 1976) на спектрофотометре «Сатурн» на кафедре метрологии ХНУ имени В.Н. Каразина. Содержание меди в клетках выражали в мкг/млн кл.

Все эксперименты повторяли трижды с тремя аналитическими повторами. Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием *t*-теста Стьюдента (Гублер, Генкин, 1973).

## Результаты и обсуждение

### I. Оценка первичной ответной реакции клеток *D. viridis* на однократное внесение разных концентраций ионов меди в среду

Первичную реакцию клеточной культуры оценивали по трем показателям: потере подвижности, формированию агрегатов клеток и времени их гибели.

а) Влияние однократного внесения сернокислой меди на подвижность клеток *D. viridis*

Одной из наиболее быстрых ответных реакций клеток *D. viridis* на токсическое действие является потеря их подвижности (Kovaleva et al., 2012). Внесение в культуру сернокислой меди в очень низкой концентрации (0,001 мг/л) угнетало подвижность клеток через 20 мин после внесения (рис. 1, А). Увеличение ее концентрации не влияло на подвижность клеток по сравнению с контролем в диапазоне концентраций 0,005–0,05 мг/л. Однако подвижность клеток при концентрации 0,1–0,5 мг/л увеличивалась по сравнению с использованием концентрации 0,001 мг/л (рис. 1, А). Увеличение концентрации сернокислой меди до 1–5 и 10 мг/л приводило к резкому линейному увеличению потери подвижности клеток до их полного обездвиживания при концентрации 10 мг/л за 20 мин (рис. 1, А). Дальнейшее увеличение концентрации токсиканта в среде до 20, 50, 75 и 100 мг/л приводило к полной потере подвижности клеток и дальнейшей их гибели (рис. 1, А).

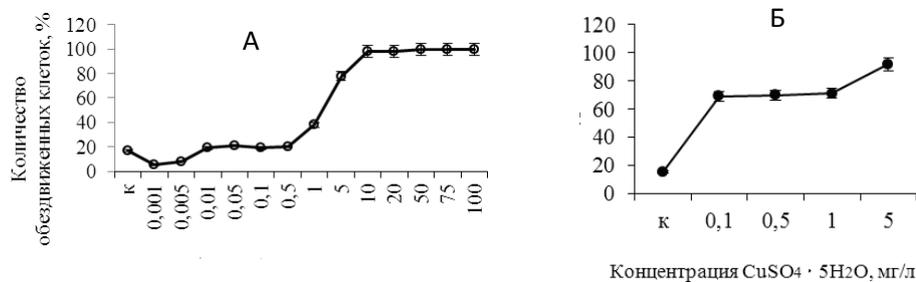


Рис. 1. Количество неподвижных клеток *Dunaliella viridis* спустя 20 мин (А) и 4 ч (Б) после внесения разных концентраций  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в среду культивирования

Наличие столь сложной зависимости в ответной реакции *D. viridis* на однократное внесение разных концентраций сернокислой меди, которая может быть определена как биомодальная U-образная кривая с насыщением, свидетельствует о высокой функциональной гетерогенности клеточных культур и о том, что ионы меди способны как активировать, так и ингибировать биологические процессы в клетках *D. viridis*. Известно (Calabrese, Baldwin, 2001), что т. н. U-образный эффект характерен для проявления гормезисного эффекта. Следовательно, ионы меди индуцируют в популяции *D. viridis* гормезисный эффект (Kovaleva et al., 2012).

Совершенно очевидно, что все биологические реакции реализуются во времени. Можно полагать, что разные концентрации сернокислой меди с разной скоростью будут обездвиживать клетки *D. viridis*.

В следующей серии экспериментов исследовали скорость потери подвижности клеток *D. viridis* (с 0,33 до 24 ч). Оказалось, что развитие ответной реакции потери подвижности с 20 мин до 24 ч имеет насыщающий характер с достижением максимального эффекта

обездвиживания к 4 ч инкубации (Ростама и др., 2012). Так, спустя 4 ч после внесения сернокислой меди в концентрации 0,1 и 0,5 мг/л 70% клеток популяции теряли подвижность. Эти концентрации не оказывали влияния на подвижность клеток после 20 мин экспозиции (рис. 1, Б).

Следовательно, гетерогенность клеточной популяции выявлялась и во временной динамике на присутствие сернокислой меди в среде. Это проявлялось в том, что ответ клеточной популяции развивался от 20 мин до 4 ч с выходом на стационарный уровень обездвиживания. Природа этой гетерогенности может быть вызвана различными причинами – как биологическими особенностями клеток, так и случайными физико-химическими обстоятельствами, которые формируются при внесении меди в среду. Но независимо от механизмов обездвиживания клеток ионами меди, в первичном ответе наблюдался не только процесс ингибирования исследуемого показателя, но и процессы стимуляции. Это важно для формирования адаптивных процессов в гетерогенной популяции клеток.

*б) Влияние однократного внесения сернокислой меди на агрегатообразование клеток *D. viridis**

Как известно, формирование клеточных агрегатов в популяции свободноживущих клеток является одной из форм адаптивного ответа (Ростама и др., 2012). Ранее было показано, что в диапазоне концентраций 0,1–1 мг/л агрегаты клеток *D. viridis* не образовывались (рис. 2, А). При внесении в среду культивирования сернокислой меди до концентрации 5 мг/л на 1,3 млн кл. спустя 1,5 ч около 10% клеток входило в состав клеточных агрегатов, их количество не изменялось до 4 ч. Однако позже часть клеток вступала в агрегатообразование и к 24 ч более 25% клеток культуры формировали агрегаты (рис. 2, Б). Такой же U-образный характер формирования клеточных агрегатов наблюдали при внесении в культуру 10 мг/л сернокислой меди. При концентрациях 20, 50 и 75 мг/л сернокислой меди агрегатообразование имело линейный характер, однако при высокой концентрации этого токсиканта (100 мг/л) U-образная кривая вновь появлялась (Ростама и др., 2012).

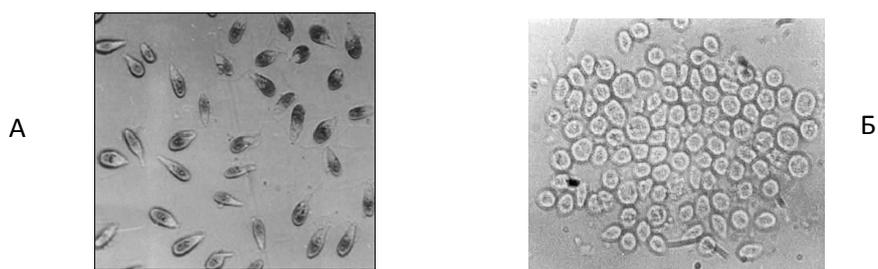


Рис. 2. Клетки *Dunaliella viridis* в контрольном варианте (А) и спустя 4 ч после внесения 5 мг/л  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в среду культивирования (Б)

Эти данные убедительно свидетельствуют о проявлении высокой гетерогенности клеточной популяции микроводоросли и способности формировать клеточные агрегаты в присутствии ионов меди.

*в) Влияние однократного внесения сернокислой меди на гибель клеток в культуре *D. viridis**

Как правило, токсичность оценивают по количеству погибших клеток  $LC_{50}$  (Burton, 2018). Следовательно, в первичной реакции клеток на внесение в среду ионов меди можно отметить два последовательных типа клеточного ответа: паттерн подвижности и агрегатообразование.

Однократное внесение больших концентраций сернокислой меди (5, 10, 50, 75 и 100 мг/л) сопровождалось снижением скорости роста культуры *D. viridis* при концентрации 5 и 10 мг/л (рис. 3). Так, количество клеток в культуре уменьшалось на 1- и 2-е сут роста при концентрации 5 и 10 мг/л сернокислой меди по сравнению с исходным количеством клеток (рис. 3, 2, 3). Однако после 3 сут оставшиеся клетки начинали активно пролиферировать и относительная скорость их роста мало отличалась от контрольного варианта при концентрации 5 мг/л и была меньше контроля при внесении 10 мг/л сернокислой меди (рис. 3, 2, 3).

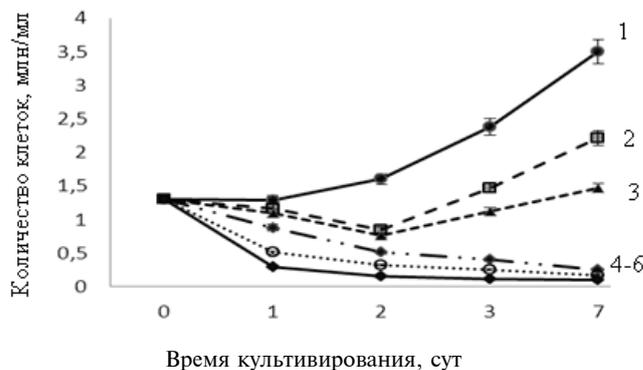


Рис. 3. Динамика роста исходной (CuS) культуры *Dunaliella viridis* (1, контроль) после первого внесения в культуру сернокислой меди в концентрациях 5 (2), 10 (3), 50 (4), 75 (5) и 100 мг/л (6) по сравнению с контролем

Внесение 50, 75 и 100 мг/л сернокислой меди сопровождалось гибелью культуры, по крайней мере, клетки не выявлялись к 3–7 суткам после внесения CuS 100 мг/л (см. рис. 3). Это свидетельствует о том, что: 1) сразу после внесения сернокислой меди часть клеток погибает в течение 1–2 сут, а оставшиеся клетки активно пролиферируют, т. е. наблюдается адаптивный процесс даже после первого внесения токсиканта в среду; 2) клетки в культуре *D. viridis* обладают разной чувствительностью к ионам меди, скорость их гибели нелинейна и они гетерогенны по функциональному ответу на присутствие больших концентраций ионов меди.

Следовательно, внесение в культуру *D. viridis* сернокислой меди, как одного из широко распространенных токсикантов водной среды, вызывает последовательные фенотипические изменения, которые проявляются в потере подвижности клеток, формировании клеточных агрегатов и гибели клеток. Последовательность и степень проявления этих процессов зависит от концентрации токсиканта.

Первое, однократное внесение в среду культивирования *D. viridis* сернокислой меди в диапазоне концентраций 0,001–100 мг/л сопровождалось последовательным изменением подвижности клеток, их агрегатообразования и гибели культуры. Для этих ответных реакций характерен U-образный ответ, который зависел от дозы и экспозиции. А это значит, что: 1 – ионы меди способны как активировать, так и ингибировать биологические процессы, т. е. индуцировать гормезисный эффект; 2 – клеточная популяция неоднородна; 3 – клетки *D. viridis* обладают не только природной устойчивостью к ионам меди, но способны вырабатывать устойчивость (адаптироваться) к этому токсиканту.

Для оценки адаптивных возможностей *D. viridis* к большим концентрациям сернокислой меди токсикант вносили в среду культивирования многократно после пересадки культуры на свежую среду.

## **II. Оценка адаптивных возможностей клеток *D. viridis* к токсическим концентрациям ионов меди**

Мы исходили из того, что адаптация – это многоуровневый процесс, который затрагивает молекулярный, супрамолекулярный, клеточный и организменный уровни, и направлен на формирование ответной реакции на изменение факторов среды (Matthews, Ritter, 2018). Для реализации структурно-функциональной перестройки биологической системы необходимо время и наличие «подкрепляющих» адаптивных сигналов. Мы полагаем, что биологическая система может реализовать свой адаптивный потенциал в том случае, если факторы индукции будут поступать с определенной периодичностью и нарастающей «мощностью».

### *а) Интенсивность роста культуры после постоянных внесений в культуру токсических концентраций сернокислой меди*

Количество клеток контрольной культуры *D. viridis* за 7 сут культивирования увеличивалось от 1,3 до 12 млн/мл (рис. 4А, 1). Если в контрольную культуру CuS *D. v.* (чувствительная к ионам меди) вносили 20 мг/л сернокислой меди сразу после пересадки, количество клеток медленно уменьшалось и к 7-м сут в культуре было в 2 раза меньше клеток, чем в исходной (рис. 4А, 2). Этот процесс гибели клеток *D. viridis* обусловлен также нарушением структуры плазмалеммы. Так, если в контрольной культуре выявлено 2-3, но не более 5% клеток с нарушенной структурой плазмалеммы, то в культуре после внесения 20 мг/л сернокислой меди количество клеток с нарушенной мембраной

на 1-е сутки составляло более 20%, а к 5–7-м суткам оставшиеся клетки имели нарушенную плазмалемму (рис. 4Б).

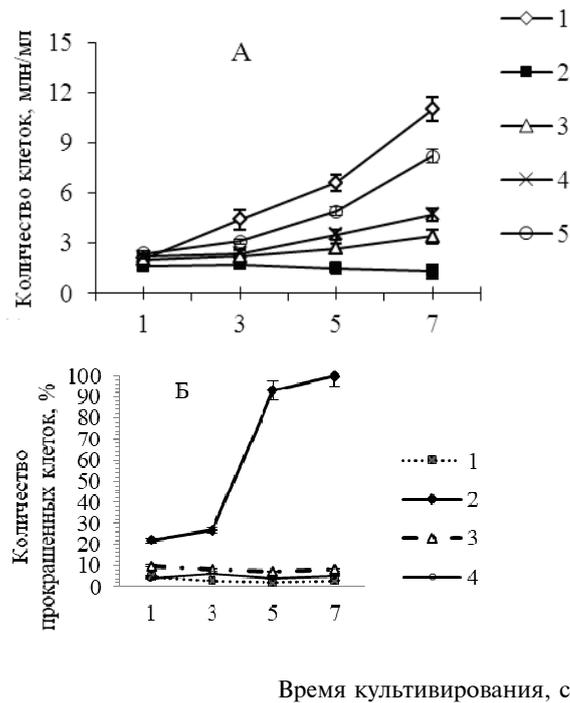


Рис. 4. Динамика роста культуры (А) и количество окрашиваемых трипановым синим клеток *Dunaliella viridis* (Б) в контрольной культуре (1), после первого внесения в культуру сернокислой меди (2), после 7 (3), 14 (4) и 25 (5) последовательных пересадок культуры на среду с сернокислой медью в концентрации 20 мг/л

Следовательно, первое внесение сернокислой меди даже в относительно небольших концентрациях повреждает структуру плазмалеммы и приводит к гибели большей части клеток. Вместе с тем, благодаря гетерогенности клеток в популяции часть их сохраняет жизнеспособность. Как предполагалось, в этих сохранившихся клетках «успевает» включиться метаболическая система адаптации, обеспечивающая им устойчивость к новым последовательным поступлениям меди в среду.

Так, если к оставшимся клеткам культуры после новой пересадки вносить те же 20 мг/л сернокислой меди, то к 7 пассажу интенсивность роста такой культуры будет значительно выше таковой после первого внесения сернокислой меди (рис. 4А, 3). Спустя 25 пассажей роста на среде с сернокислой медью интенсивность роста превзойдет культуру 14 пассажей и почти не будет отличаться от контроля (рис. 4А, 5). После 7–14 пассажей пересадки культуры на сернокислую медь плазмалемма остается нативной, как и в контрольном варианте (рис. 4Б, 3, 4).

Таким образом, последовательные многократные внесения серно-кислой меди в культуру *D. viridis* в концентрации 20 мг/л при каждой пересадке сопровождались формированием у клеток устойчивости к этому токсиканту. Более того, резистентная культура (CuR<sub>20</sub> *D. v.*) при внесении 20 мг/л серно-кислой меди проявляла устойчивость даже к внесению летальных концентраций меди (75–100 мг/л) (Bozhkov et al., 2014). В настоящее время такая устойчивая к ионам меди культура поддерживается в нашей лаборатории уже более 20 лет. Мы полагаем, что две культуры – CuS *D. v.* и CuR *D. v.* в процессе адаптиогенеза (микроэволюции) сформировали разные эпигенотипы, которые обеспечивают их выживание в разных условиях существования.

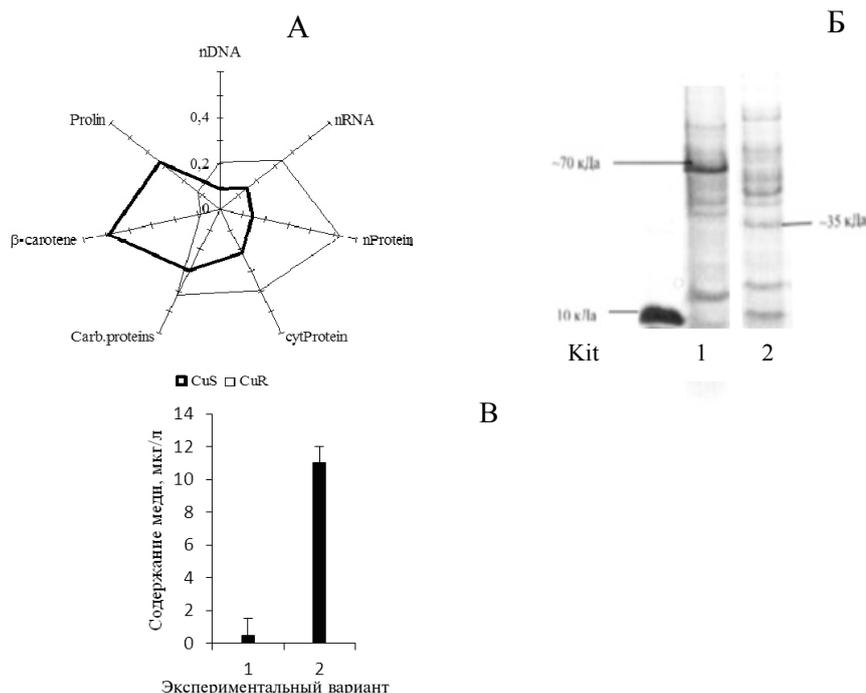


Рис. 5. Паттерн показателей первичного метаболизма (эпигенотипов): содержание ядерной ДНК (мкг/млн кл.,  $\times 10^{-2}$ ), ядерной РНК (мкг/млн кл.), ядерного белка и белков цитозоля (мкг/млн кл.,  $\times 10^4$ ); продуктов свободно-радикальных реакций: карбонилированные белки (нМ/мг белка); компоненты антиоксидантной защиты: пролин (мкг/млн кл.,  $\times 10^{-2}$ ) и β-каротин (мкг/млн кл.) в клетках, чувствительных к ионам меди, CuS и резистентным к ним CuR (А). Электрофореграмма водорастворимых белков клеток CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* (возраст культур 14 дней) (Б). 1-я дорожка – CuS-культура в стандартных условиях культивирования, 2-я – CuR-культура в стандартных условиях культивирования, а также содержание ионов меди в контрольной культуре CuS и резистентной CuR (В)

*б) Некоторые характеристики эпигенотипа (метаболических паттернов) у CuR<sub>75</sub>-культуры D. viridis*

Для характеристики эпигенотипов (метаболических паттернов) CuS *D.v.* и CuR *D.v.* сравнивали содержание ядерных ДНК, РНК и белка

(как показателя общей метаболической активности), содержание  $\beta$ -каротина (как продукта вторичного обмена, содержание которого изменяется при стресс-условиях), содержание гидроперекисей липидов и карбонилированных белков (как показателя активности прооксидантной системы клетки) и содержание свободного пролина в клетках (как показателя активности антиоксидантной системы в этих клетках).

Оказалось, что эпигенотипы для CuR<sub>75</sub> *D. viridis*, которые культивировали в присутствии летальных концентраций сернокислой меди (75 мг/л), отличались от CuS *D. viridis*. В частности, в клетках CuR<sub>75</sub> *D. viridis* было увеличено содержание ДНК и РНК в ядрах клеток *D. viridis*, и особенно общего белка в ядрах и цитозоле клеток (рис. 5).

У Cu-резистентной культуры была активирована прооксидантная система, т. е. увеличено содержание карбонилированных белков по сравнению с контрольной культурой, подавлена активность антиоксидантной системы — содержание одного из ее компонентов (свободного пролина) и угнетен вторичный обмен — значительно уменьшалось содержание  $\beta$ -каротина по сравнению с CuS *D. viridis* (см. рис. 5). Эти изменения затрагивают молекулярный, супрамолекулярный и клеточный уровни организации, т. е. в процессе адаптации к ионам меди изменяется вся структурно-функциональная организация клетки CuR<sub>75</sub> *D. viridis* по сравнению с CuS *D. viridis*. Так, в резистентных клетках изменялся состав некоторых белков цитозоля (рис. 5, Б).

Определение состава водорастворимых клеточных белков *Dunaliella* (которые экстрагировали 25 мМ *трис*-HCl, pH 7,6) показало, что в этих условиях выделяется около 10 их фракций (рис. 5, Б). При сравнении состава белков CuS- и CuR-культур оказалось, что у CuR-культур отсутствуют белки с молекулярной массой около 70 кДа и появляется фракция белков с молекулярной массой около 35 кДа.

Мы полагаем, что одной из самых важных структурно-функциональных перестроек в клетках *D. viridis*, адаптированных к присутствию в среде с высокой (летальной для данного вида) концентрацией сернокислой меди, является способность накапливать ионы меди в клетках, сохраняя интенсивность размножения почти на уровне контроля. Так, содержание ионов меди в клетках CuR<sub>75</sub> *D. viridis* составляло 12,2 мкг/млн кл. по сравнению с 0,059 в клетках CuS-культуры, т. е. в 206 раз больше контроля (рис. 5, В).

Таким образом, последовательное внесение сернокислой меди в культуру *D. viridis* обеспечивает формирование у них устойчивости даже к летальным концентрациям токсиканта. В основе такого адаптациогенеза лежит образование специфического эпигенотипа, который обеспечивает новые фенотипические проявления. Для такого эпигенотипа характерна способность накапливать огромное количество ионов меди в клетках без «ущерба» для их функционирования.

Совершенно очевидно, что такой адаптациогенез, который был индуцирован присутствием токсиканта в среде, будет влиять на характеристику эпигенотипа и, как следствие, эволюцию вида только в

том случае, если сформировавшийся эпигенотип будет сохраняться даже при изменении среды культивирования в ряду клеточных поколений, т. е. запоминаться.

В следующей серии экспериментов определяли возможность «сохранения» индуцированной устойчивости к ионам меди в ряду клеточных поколений.

в) *Исследование способности клеток D. viridis сохранять индуцированную устойчивость к ионам меди в ряду клеточных поколений*

Проведены две серии экспериментов. В первой серии культуру CuR<sub>20</sub> *D. viridis*, которая прошла 110 пассажей на среде, содержащей 20 мг/л сернокислой меди, переводили на стандартную среду и определяли относительную интенсивность ее роста по сравнению с контрольной CuS-культурой на протяжении, 2, 4, 6, 8 и 10 пассажей роста на стандартной среде (рис. 6).

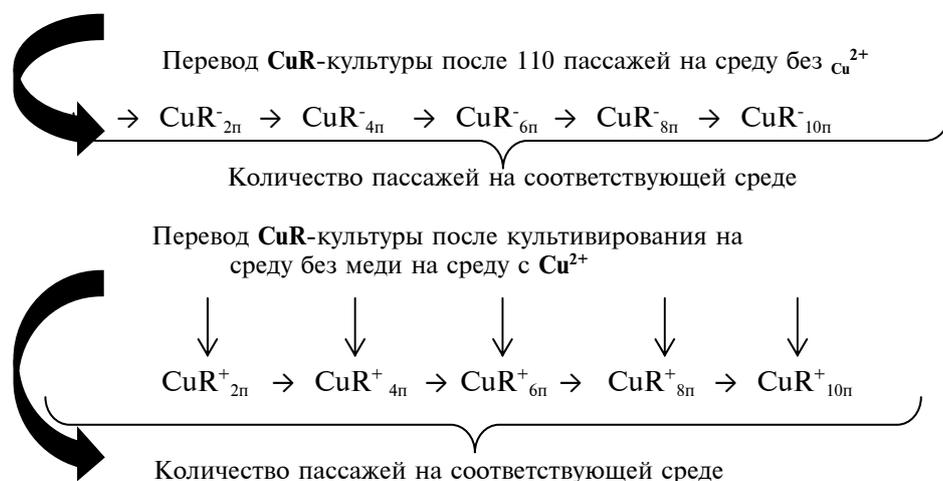


Рис. 6. Схема культивирования CuR<sub>20</sub> *Dunaliella viridis* на среде, содержащей 20 мг/л сернокислой меди, на протяжении 110 пассажей (CuR<sub>110 п</sub>). Затем ее переводили на среду без меди (-Cu<sup>2+</sup>) и на этой среде культивировали на протяжении 2, 4, 6, 8, и 10 пассажей. Каждую из этих культур вновь переводили на среду, содержащую 20 мг/л сернокислой меди, и вновь культивировали столько же пассажей

Оказалось, что возврат культуры *D. viridis*, которая адаптирована к росту на среде с медью в первые 5–7 дней, приводит к отставанию интенсивности роста от стандартной культуры (рис. 7). Более того, если культура CuR<sub>20</sub> *D. viridis* проходила 2 пассажа на чистой среде, то с 10 по 21 сут она не отличалась интенсивностью роста от CuS *D. viridis*, а культура CuR<sub>20</sub> *D. viridis*, которая прошла 4–10 пассажей, отставала в росте от контрольной CuS-культуры (рис. 7).

Следовательно, культура *D. viridis* с индуцированной устойчивостью к ионам меди и возвращенная на исходную среду после 110 пассажа роста

на среде с медью, отставала в росте от стандартной культуры даже после 10 пассажей роста на чистой среде. Возможно, такой культуре медь необходима в больших концентрациях для сохранения прежней интенсивности роста.

Во второй серии экспериментов  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis* после 2, 4, 6, 8 и 10 пассажей роста на чистой среде вновь переводили на среду с 20 мг/л сернокислой меди и определяли интенсивность ее роста по сравнению с интенсивностью роста резистентной культуры  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis*, которую принимали за базовую (100% с 1 по 21 сут роста).

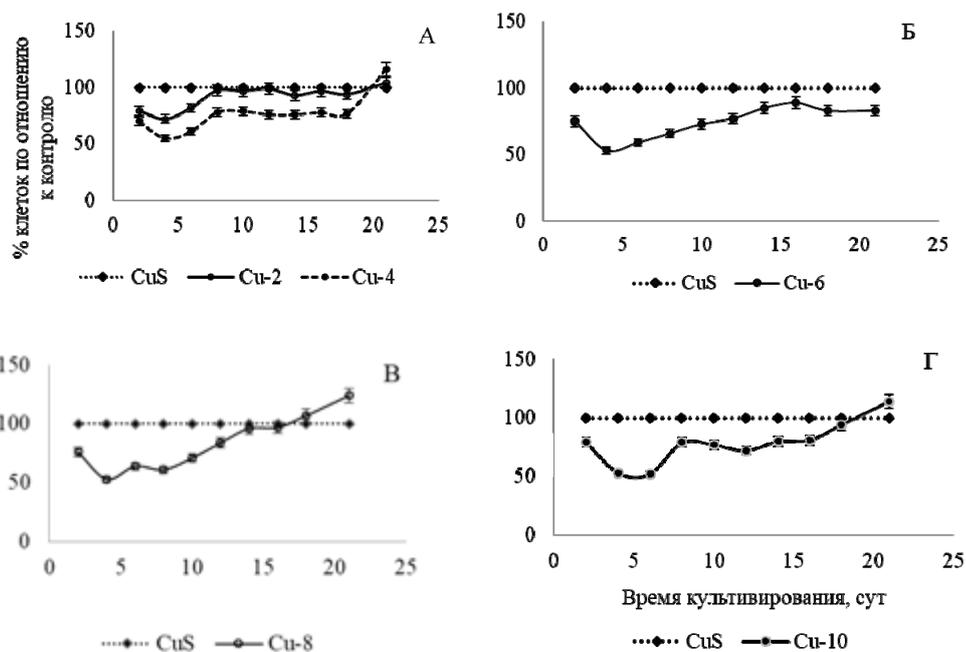


Рис. 7. Относительная интенсивность роста медьрезистентной культуры *Dunalialla viridis*, которая культивировалась и прошла 110 пассажей на среде Артари, содержащей 20 мг/л сернокислой меди ( $\text{CuR}_{20}$ ), после перевода ее на среду Артари без меди после 2 и 4 (А), 6 (Б), 8 (В) и 10 пассажей (Г) по сравнению с контролем (CuS)

Проведенные эксперименты позволяют сделать следующие выводы: 1) возврат культуры  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis*, которая прошла 2 пассажа роста на чистой среде, характеризовался не линейным, а «ритмичным» ростом по сравнению с  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis*, которая прошла 110 пассажей роста на среде с медью (рис. 8, А). Если  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis* проходила 4–6–8 или 10 пассажей, эта «ритмичность» уменьшалась (рис. 8); 2) если в резистентную культуру CuS *D. viridis* первый раз вносили 20 мг/л сернокислой меди, то интенсивность ее роста отставала от  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis* на 50–60% (рис. 8, А, Б); 3) в культуру  $\text{CuR}_{20}$  *D. viridis*, которую после 2–10 пассажей культивировали на среде без меди и вновь вносили

20 мг/л сернокислой меди, росла лучше, чем CuS после первого внесения сернокислой меди (рис. 8, А, Б). Следовательно, индуцированная устойчивость к ионам меди может сохраняться в ряду клеточных поколений, а индуцированный адаптациогенез играет важную роль в эволюции. Перевод культур с чистой среды в экспериментальную и обратно, в исходную среду, создает метастабильное состояние и увеличивает структурно-функциональную гетерогенность клеточной популяции, которая лежит в основе прогрессивной эволюции.

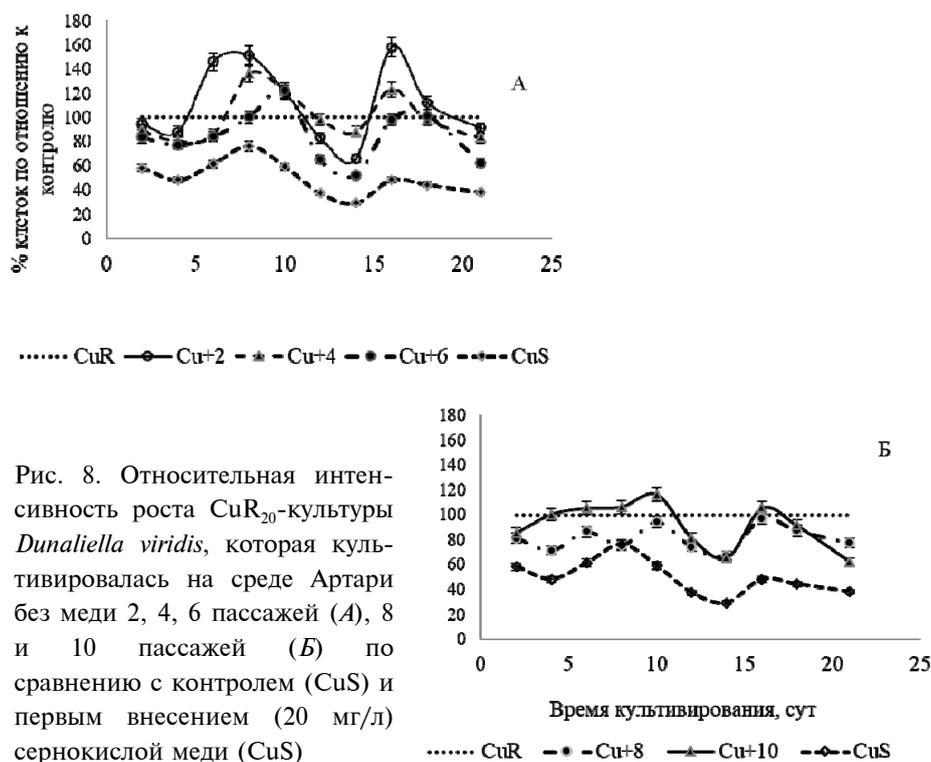


Рис. 8. Относительная интенсивность роста  $CuR_{20}$ -культуры *Dunaliella viridis*, которая культивировалась на среде Артари без меди 2, 4, 6 пассажей (А), 8 и 10 пассажей (Б) по сравнению с контролем (CuS) и первым внесением (20 мг/л) сернокислой меди (CuS)

г) Динамика содержания ионов меди в клетках  $CuR_{20}$  *D. viridis*, переведенных на среду без меди и после повторного их возврата на среду с медью

Содержание ионов меди в клетках  $CuR_{20}$  *D. viridis*, которая росла на среде с медью 110 пассажей, было в 130–240 раз больше по сравнению с контрольной культурой CuS (рис. 9). Если  $CuR_{20}$  *D. viridis* проходила 2 пассажа на среде без добавления меди, ее количество уменьшалось по сравнению с исходной культурой  $CuR_{20}$  *D. viridis* в 24 раза, после 4-го пассажа – еще в 2 раза по сравнению с 2 пассажами и в дальнейшем через 6, 8 и 10 пассажей ее содержание в клетках соответствовало таковому культуры CuS (рис. 9). Следовательно, перевод культуры  $CuR_{20}$  *D. viridis* на среду, не содержащую ионы меди, сопровождался выведением ионов меди из клеток и к 10 пассажу она не отличалась по содержанию ионов меди от культуры CuS *D. viridis* (рис. 9).

Если предположить, что токсичность ионов меди находится в зависимости от ее количества в клетках, то очевидно, что в процессе адаптации *D. viridis* к меди клетки культуры накапливают меньшее ее количество, а сохранение резистентности клеток к токсическому действию меди может быть связано с уменьшением количества проникающей в клетки меди.

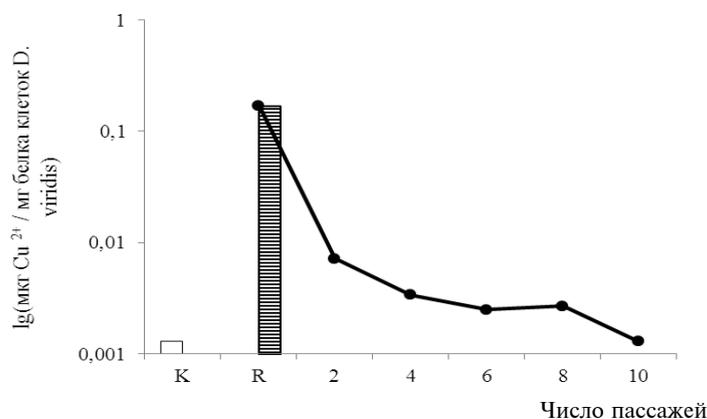


Рис. 9. Содержание ионов меди в клетках контрольной культуры (К) и резистентной CuR<sub>20</sub> *Dunaliella viridis* (R) (кривая) после перевода на среду без CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O и после пассажей культивирования на этой среде

Таблица 1

Содержание ионов меди на 21-е сут культивирования в клетках исходной медьчувствительной культуры *Dunaliella viridis* – К и медьрезистентной культуры (R), а также содержание ионов меди в клетках CuR *D. v.* после их перевода на среду без меди после 2, 4, 6, 8 и 10 пассажей (вар. 1) и после повторного возвращения на среду с медью после стольких же пассажей роста на такой среде

Вариант роста	Содержание ионов меди, мкг/млн кл.						
	CuS	CuR	CuR после пассажей				
			10	8	6	4	2
1. Среда без добавления CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0013 ±0,11	0,170 ±0,13	0,0013 ±0,11	0,0027 ±0,17	0,0025 ±0,19	0,0034 ±0,14	0,0072 ±0,21
2. Среда с добавлением CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O			0,465 ±0,12	0,315 ±0,11	0,480 ±0,13	0,290 ±0,12	0,265 ±0,16

В следующей серии экспериментов определяли содержание ионов меди в культурах CuR<sub>20</sub> *D. viridis* с последующим культивированием их 2, 4, 6, 8 и 10 пассажей без меди. Затем в эти культуры вновь вносили 20 мг/л сернокислой меди, моделируя первое внесение меди в культуру CuS *D. viridis*, как описано в предыдущем разделе.

В этом случае получены необычные и парадоксальные, на первый взгляд, результаты. Если содержание ионов меди в культуре CuR<sub>20</sub> *D. viridis*, прошедшей более 100 пассажей на такой же среде, составляло 0,170 мкг Cu<sup>2+</sup>/млн кл., то если культуру CuR<sub>20</sub> дважды культивировали на среде без меди и к ней вновь добавляли 20 мг/л сернокислой меди, (1,3 млн кл.), клетки накапливали ионов меди за то же время в 204 раза больше, чем в первом случае (табл. 1).

Если количество пассажей культуры CuR<sub>20</sub> *D. viridis* на среде культивирования без меди увеличивалось и после этого в такую культуру вновь вносили сернокислую медь, то количество связанной меди с клетками не уменьшалось, а увеличивалось (см. табл. 1). В результате в клетках CuR<sub>20</sub> *D. viridis* накапливалось в 131–240 раз больше меди, чем в CuS *D. viridis*. Если в культуру CuR<sub>20</sub> *D. viridis*, которая прошла этап освобождения от ионов меди, при культивировании на среде без меди повторно вносили 20 мг/л сернокислой меди, то она была способна накапливать в 309 раз больше ионов меди, чем в клетках CuR<sub>20</sub> *D. viridis* и сохранять способность к росту. Следовательно, формирование резистентности к ионам меди, скорее, связано не со способностью клеток предотвращать ее проникновение в клетки, а со способностью обеспечивать функционирование метаболизма в присутствии большого количества ионов меди. Более того, ее исключение из среды после перевода культуры на среду без меди вызывало временное ингибирование ее роста по сравнению со стандартными культурами.

Как было отмечено в предыдущем разделе, перевод культуры с одной среды на другую увеличивает вариабельность ее роста. Такую вариабельность можно объяснить увеличением ее гетерогенности. При исследовании процессов адаптиогенеза необходимо учитывать структурно-функциональную гетерогенность популяции, как минимум, по двум причинам. Такая гетерогенность создает большую вариабельность полученных данных и именно она обеспечивает эволюционный процесс. На следующем этапе исследования определяли структурно-функциональную гетерогенность CuS *D. viridis* после первого внесения ионов меди в среду культивирования.

д) *Некоторые особенности морфофункциональной гетерогенности популяции клеток D. viridis*

О морфофункциональной гетерогенности клеток *D. viridis* в популяции судили по распределению клеток 22-дневной культуры (время выхода на стационарную фазу роста) по площади и соотношению малого диаметра ( $d_1$ ) к большому ( $d_2$ ). Оказалось, что основная часть клеток, имела площадь 110–150 мкм<sup>2</sup>, а соотношение  $d_1/d_2$  составляет 1,7–2,2, т. е. они имеют эллипсоидную форму (рис. 10). Однако в культуре всегда присутствовали клетки с меньшей площадью и разнообразной формой – от округлых 1,0–1,2 до удлиненных 2,8–3,0, т. е. культура *D. viridis* характеризовалась высокой морфологической гетерогенностью.

$$d_1/d_2=1; \quad d_1/d_2=1,8 - 2,2 - 2,4$$

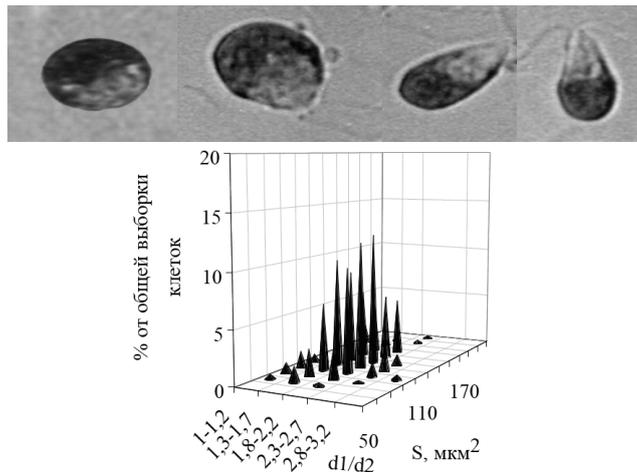


Рис. 10. Распределение клеток культуры *Dunaliella viridis* по соотношению малого и большого диаметров ( $d_1/d_2$ ) и площади  $S_1$  на 22-е сутки культивирования ( $n = 400$ )

Очевидно, что морфологически разные клетки *D. viridis* отличаются также функциональными особенностями.

Для определения функциональной гетерогенности популяцию клеток *D. viridis* после первого внесения в культуру сернокислой меди разделили на две фракции методом центрифугирования – условно «тяжелую», которая осаждалась при 1000 g в течение 5 мин, и условно «легкую», которая осаждалась при 3000 g в течение 10 мин.

Так, спустя 6 ч после первого внесения в культуру 20 мг/л сернокислой меди удельная радиоактивность ДНК (при 60 мин экспозиции с радиоактивной меткой) в клетках «тяжелой» фракции была в 4,7 раза выше по сравнению с «легкой» фракцией, а удельная радиоактивность РНК и белка – в 4,2 и 3,7 раза соответственно (рис. 11, А). Однако определение удельной радиоактивности ДНК, РНК и белка спустя 24 ч культивирования с той же концентрацией ионов меди показало, что различия в этих показателях между «тяжелой» и «легкой» фракциями отсутствуют или недостоверны (рис. 11, А). Следовательно, в культуре присутствуют клетки, метаболическая система которых быстро реагирует на появление токсических соединений, но в которой были также клетки, медленнее реагировавшие на это воздействие.

Оказалось, что в процессе роста культур «тяжелой» и «легкой» фракций с разной скоростью изменялся метаболизм нуклеиновых кислот и белков. Так, если к 24 ч культивирования *D. viridis* удельная радиоактивность ДНК в клетках «тяжелой» фракции увеличивалась в 67 раз по сравнению с 6 ч, то в клетках «легкой» фракции – в 281 раз (рис. 11, Б). Темп увеличения скорости синтеза РНК и белка в клетках

«легкой» фракции также был в 3–4 раза выше, чем в «тяжелой» с 6 до 24 ч культивирования (рис. 11).

**Удельная радиоактивность ДНК, РНК и белка в клетках «тяжелой» и «легкой» фракций *Dunaliella viridis* спустя 6 и 24 ч после внесения в среду 20 мг/л сернокислой меди**

А

Фракция	Удельная радиоактивность, имп. мин/мг					
	ДНК		РНК		белка	
	6 ч	24 ч	6 ч	24 ч	6 ч	24 ч
«Тяжелая»	470±0,11	31490±0,14	1000±0,12	5500±0,10	2000±0,21	10000±0,19
«Легкая»	100±0,13	28100±0,15	238±0,11	3809±0,14	540±0,17	12000±0,15

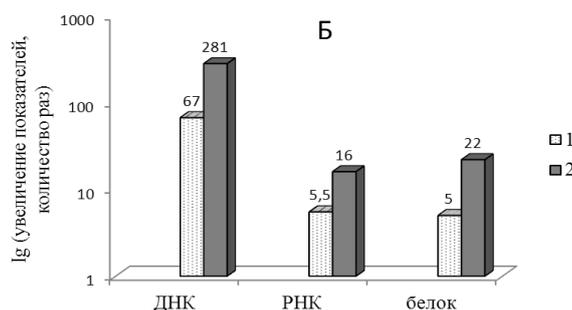


Рис. 11. Удельная радиоактивность ДНК, РНК и белка в клетках «тяжелой» (1) и «легкой» (2) фракции *Dunaliella viridis* спустя 6 и 24 ч роста после внесения в среду 20 мг/л сернокислой меди (А), а также увеличение исследуемых показателей к 24 ч роста культур по сравнению с данными 6-часовой экспозиции (Б) в случае «тяжелой» и «легкой» фракций. Экспозиция с радиоактивными предшественниками ( $\text{NaN}^{14}\text{CO}_3$ ) составляла 60 мин

В следующей серии экспериментов определяли способность клеток «тяжелой» и «легкой» фракций накапливать ионы меди. Оказалось, что если в среду культивирования «тяжелой» фракции клеток внести сернокислую медь до конечной концентрации 5 мг/л на 1,3 млн кл., то они свяжут в 6,7 раза больше ионов меди по сравнению с клетками «легкой» фракции при тех же условиях культивирования (табл. 2). В случае, если концентрацию сернокислой меди увеличивали до 10 и 50 мг/л на такое же количество клеток, то разница в количестве связанной меди между «тяжелой» и «легкой» фракциями уменьшалась, хотя и отличалась (табл. 2). Прослеживается почти линейное уменьшение в различии связывания количества ионов меди клетками «тяжелой» и «легкой» фракций в зависимости от увеличения концентрации меди в среде культивирования (табл. 2). Эта зависимость может свидетельствовать о потере «специфичности» связывания ионов меди при больших концентрациях сернокислой меди.

Таблица 2

Содержание ионов меди в клетках «тяжелой» и «легкой» фракций после 21 сут внесения в среду разных концентраций сернокислой меди

Фракция	Концентрация сернокислой меди, мг/л		
	5	10	50
«Тяжелая»	5,68±0,14	7,39±0,13	41,7±2,28
«Легкая»	0,84±0,10	3,64±0,71	33,46±4,9

Переход в «зону» неспецифического связывания компонентами клеток ионов меди будет приводить к проявлению выраженной токсичности в культуре и это, вероятно, быстрее будет наступать для клеток «тяжелой» фракции. Необходимо обратить внимание еще на один важный факт. Клетки «тяжелой» фракции, связывая большее количество ионов меди, уменьшают количество свободных ионов меди в среде, способных связываться и оказывать токсическое действие на клетки «легкой» фракции, т. е. формируют вторичную гетерогенность в культуре. Более того, часть разрушившихся клеток «тяжелой» фракции еще в большей степени будут связывать ионы меди перешедшими в раствор макромолекулами. Такая ситуация в популяции клеток усиливает клеточную и физико-химическую гетерогенность культуры, что способствует тому, что на фракцию «легких» клеток снизится токсическое влияние ионов меди и это может «запустить» адаптивную систему выживания в этих клетках, что вновь увеличит гетерогенность популяции. Такая высокая первичная и индуцированная гетерогенность клеточной популяции, очевидно, обеспечивает выживание популяции в экстремальных условиях.

### Заключение

Последовательный перевод культуры *Dunaliella viridis* на среду культивирования с сернокислой медью способствует формированию у нее устойчивости к токсическим для этого вида концентрациям сернокислой меди. В процессе адаптации к сернокислой меди у *D. viridis* формируется специфический эпигенотип – метаболический паттерн, который обеспечивает жизнеспособность культуры в случае накопления большого количества ионов меди в клетках этой микроводоросли. Сформировавшаяся резистентность к ионам меди у культуры сохраняется в ряду клеточных поколений после смены среды культивирования, т. е. эпигенотип «запоминается» – импринтируется. Формирование индуцированной резистентности к ионам меди у *D. viridis* реализуется на фоне высокой структурно-функциональной гетерогенности клеточной популяции.

Эти результаты подтверждают предположение И.И. Шмальгаузена о том, что лабильные модификации нормы, которые реализуются на гетерогенной основе, стабилизируют первично неустойчивые типы

онтогенетических реакций. Важную роль в индуцированной устойчивости к токсическим соединениям играет гетерогенность клеточной популяции и способность культуры проявлять гормезисный эффект к токсическому фактору.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Божков А.И., Голтвянский А.В. Функциональная гетерогенность *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) и чувствительность к действию сернокислой меди. *Альгология*. 2000. 10(1): 22–31.
- Божков А.И., Ковальова М.К., Мензянова Н.Г. Можно ли «отменить» процесс старения клеточных культур созданием оптимальных условий культивирования? *Усп. геронтол.* 2011. 24(1): 26–37.
- Гублер Е.В., Генкин А.А. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*. Л.: Медицина, 1973. 141 с.
- Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod. и перспективы его практического использования*. Киев: Наук. думка, 1973. 245 с.
- Остерман Л.А. *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование*. М.: Наука, 1981. 288 с.
- Прайс В. *Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия*. Пер. с англ. М.: Мир, 1976. 356 с.
- Ростама Ш., Божков А.И., Голтвянский А.В. Влияние ионов меди, свинца и кадмия на индукцию агрегирования клеток *Dunaliella viridis* (*Chlorophyta*). *Альгология*. 2012. 22(1): 30–43.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 1973. 39: 205–207.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kizilova V.Yu., Kuznetsova Y.A., Kovalenko I.F. Adaptation of *Dunaliella viridis* Teod. to copper sulfate is related with increase of genetic instability and formation of quasi-stable states. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2014. 3(10): 925–939.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G. Growth dynamics, lipid composition, and ( $\beta$ -carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. under cultivation in different types of photobioreactors. *Int. J. Algae*. 1999. 1(3): 31–39.
- Bozhkov A.I., Nikitchenko Yu.V. Caloric Restriction Diet Induces Specific Epigenotypes Associated with Life Span Extension. *J. Nutr. Therap.* 2013. 2: 30–39.
- Burton G.A. *Sediment Toxicity Assessment*. Boca Raton: CRC Press, 2018. 479 p.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001. 22(6): 285–291.
- Gibson G., Wagner G. Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? *BioEssays*. 2000. 22(4): 372–380.
- Kovaleva M.K., Menzyanova N.G., Jain A., Yadav A., Flora S., Bozhkov A.I. Effect of hormesis in *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) under the influence of copper sulfate. *Int. J. Algae*. 2012. 14(1): 44–61.
- Lishtvan I.I., Dudarchik V.M., Kovrik S.I., Smychnik T.P. Wastewater treatment of metals-ecotoxicants by peat preparations. *J. Water Chem. and Technol.* 2007. 29(1): 38–42.

- Matthews R.A., Ritter K.J. Applying adaptation theory to understand experienced incivility processes: testing the repeated exposure hypothesis. *J. Occup. Health Psychol.* 2018. <https://doi.org/10.1037/ocp0000123>
- Schlichting C.D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann. Rev. Ecol. and System.* 1986. 17(1): 667– 693.
- Schmalhausen I.I. *Factors of evolution: the theory of stabilizing selection.* Philadelphia: The Blakiston Co., 1949. 327 p.

Поступила 29 июля 2018 г.

Подписала в печать Е.К. Золотарева

## REFERENCES

- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. *Plant Soil.* 1973. 39: 205–207.
- Bozhkov A.I., Goltvyanskiy A.V. *Algologia.* 2000. 10(1): 22–31.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G. *Int. J. Algae.* 1999. 1(3): 31–39.
- Bozhkov A.I., Nikitchenko Yu.V. *J. Nutr. Therap.* 2013. 2: 30–39.
- Bozhkov A.I., Kovalova M.K., Menzyanova N.G. *Uspekhi gerantologii.* 2011. 24(1): 26–37.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kizilova V.Yu., Kuznetsova Y.A., Kovalenko I.F. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2014. 3(10): 925–939.
- Burton G.A. *Sediment Toxicity Assessment.* Boca Raton: CRC Press, 2018. 479 p.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001. 22(6): 285– 291.
- Gibson G., Wagner G. *BioEssays.* 2000. 22(4): 372–380.
- Gubler E.V., Genkin A.A. *Application of non-parametric statistics criteria in biomedical research.* Leningrad: Medicina, 1973. 141 p. [Rus.]
- Kovaleva M.K., Menzyanova N.G., Jain A., Yadav A., Flora S., Bozhkov A.I. *Int. J. Algae.* 2012. 14(1): 44–61. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v14.i1.40>
- Lishtvan I.I., Dudarchik V.M., Kovrik S.I., Smychnik T.P. *J. Water Chem. and Technol.* 2007. 29(1): 38–42.
- Massyuk N.P. *Morphology, taxonomy, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod. and the prospects for its practical use.* Kiev: Naukova Dumka Press, 1973. 245 p. [Rus.]
- Matthews R.A., Ritter K.J. *J. Occup. Health Psychol.* 2018. <https://doi.org/10.1037/ocp0000123>
- Osterman L.A. *Methods for studying proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation.* Moscow: Nauka, 1981. 288 p. [Rus.]
- Price B. *Analytical atomic absorption spectroscopy.* Trans. with English. Moscow: Mir, 1976. 356 p. [Rus.]
- Rostama Sh., Bozhkov A.I., Goltvyanskiy A.V. *Algologia.* 2012. 22(1): 30–43.
- Schlichting C.D. *Ann. Rev. Ecol. and System.* 1986. 17(1): 667–693.
- Schmalhausen I.I. *Factors of evolution: the theory of stabilizing selection.* Philadelphia: The Blakiston Co., 1949. 327 p.

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2018, 28(4): 387–408

<https://doi.org/10.15407/alg28.04.387>

*Bozhkov A.I., Goltvyanskiy A.V., Kovaleva M.K., Menzyanova N.G.*

Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkov National University,  
4 Svobody Sq., Kharkov 61022, Ukraine

ON THE INHERITANCE OF INDUCED RESISTANCE TO TOXIC  
CONCENTRATIONS OF SULFUR ACID OF COPPER BY SUBSEQUENT CELL  
GENERATIONS OF *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD.

The ability of the *Dunaliella viridis* culture to adapt to toxic concentrations of copper sulphate and the possibility of inheriting such resistance in a number of cell generations was investigated. First, the primary (natural) resistance of *D. viridis* to the effects of copper sulfate concentrations from 0.0001 to 100 mg/L was checked, as well as the ability of the culture to adapt to repeated consecutive additions of this toxicant to the medium. A U-shaped dependence of both motility and the formation of cell aggregates on the dose and time of incubation was revealed. Multiple successive additions of copper sulfate (110 passages) resulted in the formation of the culture's resistance even to lethal concentrations. It was shown that in the process of adaptation to copper ions, a specific metabolic pattern (epigenotype) is formed in *D. viridis* cells. It differs from the epigenotypes of the control culture and ensures the preservation of cell viability after their accumulation of large amounts (the rise makes 130–240 times) of copper ions. Such induced resistance to copper ions can be inherited in a number of cell generations due to the high structural and functional heterogeneity of the cell populations and hormesis effect.

**Key words:** resistance, copper sulphate, epigenotype, metabolism, inheritance, microalgae