



УДК 504.064

<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.36.24>

## **Флуоресценция хлорофилла в оценке воздействия соединений тяжёлых металлов на водные организмы**

Г. А. Сорокина, Т. Л. Шашкова, М. А. Субботин, Е. С. Стравинскене,  
Ю. С. Григорьев

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия*  
*E-mail: sorokina\_gas@mail.ru*

**Аннотация.** Рассматриваются возможности повышения качества биотестирования состояния среды водных объектов с помощью измерения флуоресценции хлорофилла, позволяющего оперативно получать информацию о физиологических изменениях в организме водных растений и животных. С использованием различных вариаций метода регистрации флуоресценции хлорофилла в серии экспериментов выполнена оценка чувствительности ряда тест-объектов (водоросли, высшие водные растения, ракообразные) к воздействию ионов тяжёлых металлов. Обсуждаются выявленные преимущества метода.

**Ключевые слова:** быстрая и замедленная флуоресценция хлорофилла, тяжёлые металлы, токсичность, хлорелла, ряска, дафнии, элодея.

**Для цитирования:** Флуоресценция хлорофилла в оценке воздействия соединений тяжёлых металлов на водные организмы / Г. А. Сорокина, Т. Л. Шашкова, М. А. Субботин, Е. С. Стравинскене, Ю. С. Григорьев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2021. Т. 36. С. 24–36. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.36.24>

### ***Введение***

Антропогенное загрязнение водных объектов является основной причиной изменения и нарушения функционирования их естественных сообществ. Характерной группой загрязнителей являются соединения тяжёлых металлов [Vardhan, Kumar, Panda, 2019; Total concentrations ... , 2020].

Оценка загрязнения среды производится главным образом на основе результатов химического анализа. Однако из-за значительного разнообразия поллютантов, большого числа источников их выбросов, а также сложности и высокой стоимости анализов организовать эффективный экологический мониторинг только средствами аналитической химии практически невозможно. В связи с этим в исследованиях состояния различных сред активно разрабатываются методы, использующие живые тест-объекты. К их числу относится регистрация флуоресценции хлорофиллсодержащих тканей растений [Bioassays, 2018; Bioindication of heavy metals ... , 2020; Chlorophyll fluorescence ... , 2021]. Преимущество флуоресцентных методов заключается в том, что информацию о содержании хлорофилла, организации фотосинтетического аппарата и его активности можно получить за короткий отрезок

времени как при контактном, так и бесконтактном способах измерения<sup>1</sup> [Флуоресценция хлорофилла ... , 2013; Маторин, Братковская, Алексеев, 2018]. Для мониторинга загрязнения хорошо зарекомендовали себя методы, основанные на измерении параметров быстрой флуоресценции водорослей [Algal photosynthetic responses ... , 2014; Choi, Berges, Young, 2012] и макрофитов [Küster, Altenburger, 2007]. В то же время замедленная флуоресценция может быть более чувствительным показателем токсического действия на фотосинтетический аппарат [Delayed fluorescence ... , 2007; Delayed fluorescence ... , 2009]. Использование флуоресцентных методов актуально также и для мониторинга физиологических изменений в организме водных животных, таких как ракообразные, кормом для которых могут служить одноклеточные водоросли. Такой подход был предложен для оценки их трофической активности [Биотестирование токсичности вод ... , 2009; Шашкова, Григорьев, 2013]. Показано, что метод может значительно сократить трудоёмкость и стоимость анализа по сравнению с альтернативным [Miniaturising acute toxicity ... , 2017].

В связи с этим актуальным является исследование возможности повышения чувствительности и оперативности результатов токсикологического анализа при использовании флуоресценции хлорофилла для регистрации тест-функций у различных организмов.

Целью данной работы являлась оценка чувствительности водных организмов к воздействию ионов тяжёлых металлов с использованием различных методов регистрации флуоресценции хлорофилла.

### **Материалы и методы**

В качестве тест-объектов для исследования использовались термофильная культура зелёной водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer), высшие водные растения элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx.) и ряска малая (*Lemna minor* L.), а также ракообразные (*Daphnia magna* Straus).

Для измерения показателей быстрой и замедленной флуоресценции (БФ и ЗФ соответственно) использовался флуориметр «Фотон-10» («СФУ-Система», Россия). Интенсивность ЗФ измерялась в двух световых режимах: при возбуждении вспышками синего света (480 нм) высокой (ЗФв) и низкой (ЗФн) интенсивности. Длительность световых импульсов в режиме высокого света составляла 20 мс. Импульсы возбуждающего света чередовались с темновыми промежутками в 5 мс, в которые регистрировалась миллисекундная компонента кривых затухания ЗФв. В режиме низкого света после коротких импульсов светового возбуждения следовали более продолжительные промежутки темноты для обеспечения измерения длительных (секундных) компонент затухания ЗФн. Относительный показатель замедленной флуоресценции (ОПЗФ), измеряемый в течение нескольких секунд, рассчитывается как отношение ЗФв к ЗФн<sup>1</sup>. Данный показатель многократно

---

<sup>1</sup> Способ биотестирования токсичности вод и водных растворов: пат. Рос. Федерации 2482474. Григорьев Ю. С., Андреев А. А., Кравчук И. С., Гекк П. И. № G01N33/00; заявл. 21.01.11; опубл. 20.05.2013. Бюл. № 14.

снижается при подавлении фотосинтеза в растительных клетках и при этом не зависит от площади листовых пластинок растений или концентрации клеток в суспензии микроводорослей.

Тяжёлые металлы (ТМ) вносились в тестируемые образцы в форме растворов сульфатов в концентрациях, указанных в таблице.

Таблица

Концентрации тяжёлых металлов (мг/л), вносимых в тест-культуры различных организмов

Тест-организм	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,005–0,080	–	–	–	–
<i>Elodea canadensis</i>	0,0002–0,025	0,002–0,250	0,001–0,125	0,002–0,250	–
<i>Lemna minor</i>	0,0160–0,250	0,100–8,000	0,032–0,500	0,030–3,000	–
<i>Daphnia magna</i>	0,0060–0,025	0,125–1,000	0,003–0,020	–	0,125–1,000

Для проведения экспериментов по воздействию ТМ на показатели ЗФ термофильного штамма хлореллы, культура предварительно выращивалась в 10%-ной среде Тамия в течение 20–22 ч. в специализированном культиваторе КВ-05 («СФУ-Система», Россия) при непрерывном облучении светом (интенсивность 60 Вт/м<sup>2</sup>), поддержании температуры 36 °С и интенсивном перемешивании. Находящаяся в экспоненциальной фазе роста тест-культура разбавлялась дистиллированной водой таким образом, чтобы концентрация среды Тамия составляла 1 %, а количество клеток – 3,7·10<sup>5</sup> в 1 мл, и разливалась в объёме по 5 мл в 24 кюветы. Измерение параметров ЗФ хлореллы производилось через 30 мин. после внесения токсиканта в указанных выше (см. табл.) концентрациях.

В экспериментах по изучению действия ионов тяжёлых металлов на ОПЗФ хлорофилла полупогружённых растений в качестве тест-объекта использовались растения ряски малой в виде трёхлистцевых розеток. Питательной средой согласно рекомендациям ISO<sup>2</sup> выступала среда Штейнберга, при этом в лабораторной культуре её концентрация составляла 100 %, а в токсикологических экспериментах – 2 %. Каждую розетку помещали во флаконы объёмом 50 мл для экспозиции с ионами металлов. Флаконы (до 18 шт.) размещались во вращающейся кассете устройства для экспонирования тест-организмов УЭР-03 («Европолитест», Россия), что обеспечивало одинаковые внешние условия для контрольных и опытных проб. Экспозиции разной длительности: краткосрочная (4 ч) и более длительная (24 ч), проводились в климатостате В4 (СФУ-Система, Россия), обеспечивающем постоянную температуру 28 °С и круглосуточную освещённость 3–4 тыс. люкс. ОПЗФ регистрировалась с верхней стороны листцев. Растения перед измерением ЗФ в течение 15 мин выдерживались в темноте.

<sup>2</sup> ISO/DIS 20079 Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. 1st ed.; 01. 11. 2005. Reference number ISO 20079:2005(E).

При использовании в качестве тест-объекта элодеи канадской растения собирали из естественных условий произрастания в р. Енисей в районе г. Красноярск. Отбирались побеги растений, сходных по морфологическим параметрам, в экспериментах использовались их верхушечные мутовки. В лаборатории культивирование и экспозиция с токсикантами проводились в 20%-ной среде Штейнберга. Экспонирование и измерение ОПЗФ побегов элодеи канадской выполнялось в условиях, аналогичных экспериментам с ряской.

При определении трофической активности дафний 10 рачков возрастом немного более суток помещались в 50 мл тестируемой пробы воды на 18 ч. В пробы вначале вносились токсиканты (растворы солей тяжёлых металлов), а спустя 5 ч. экспозиции добавлялось небольшое количество корма (культура *Ch. vulgaris*, выращенная согласно методическим рекомендациям<sup>3</sup>). Исходное содержание клеток водоросли в воде было эквивалентно оптической плотности суспензии, равной 0,02, что составляет 350–400 тыс. кл/мл). Такое количество корма рачки потребляли за время выполнения биотеста, равное 18 ч. Измерение оптической плотности при подготовке суспензии водоросли проводили с помощью прибора ИПС-03 («Омикрон», Россия) в кювете 2 см при длине волны 560 нм. Для регистрации трофической активности дафний был использован способ измерения показателя нулевого уровня быстрой флуоресценции водоросли, добавляемой в тестируемый раствор в качестве корма для рачков. Учитывая, что этот показатель находится в прямой зависимости от концентрации клеток водоросли в среде [Биотестирование токсичности ..., 2009], его возможно использовать для регистрации убыли корма в среде с дафниями. После экспонирования дафний в присутствии тяжёлых металлов производилось измерение уровня флуоресценции в испытуемых и контрольных пробах, а также в пробах без рачков. Быстрая флуоресценция возбуждалась зелёным светом (длина волны 520 нм) низкой интенсивности. Расчёт трофической активности дафний производился по формуле

$$TA = \frac{F_{xl} - F_{xl+p}}{F_{xl}} \times 100,$$

где  $TA$  – трофическая активность;  $F_{xl}$  – показатель флуоресценции в растворе хлореллы;  $F_{xl+p}$  – показатель флуоресценции в растворе хлореллы с рачками.

Все использованные приборы разработаны специалистами Сибирского федерального университета.

---

<sup>3</sup> Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 / Т 16.1:2:2.3:3.9-06. М., 2014. 42 с.

### Результаты и обсуждение

Эксперименты с использованием тест-культуры водоросли хлорелла (рис. 1) показали, что в присутствии ионов меди происходит снижение интенсивности ЗФ, возбуждаемой светом высокой интенсивности (ЗФв), и её увеличение при возбуждении светом низкой интенсивности (ЗФн). В результате этих изменений отношение ЗФв/ЗФн (ОПЗФ) снижается более чем в 10 раз. При этом 50%-ное снижение показателя ОПЗФ наблюдалось при концентрации ионов меди в диапазоне 0,005–0,01 мг/л. Таким образом, использование данного тест-объекта позволило установить присутствие в пробе ионов меди в диапазонах концентраций, сопоставимых с ПДК<sub>рх</sub> после 30 мин экспозиции.

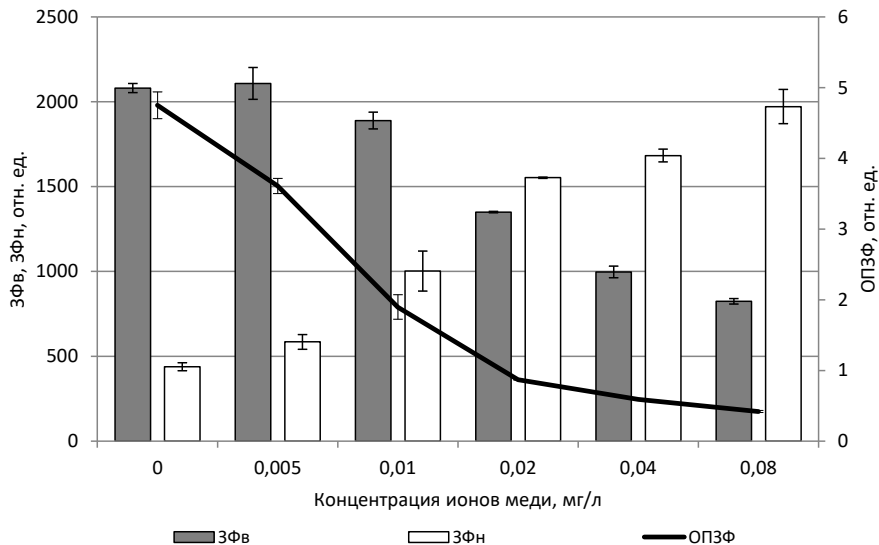


Рис. 1. Зависимость показателей замедленной флуоресценции культуры хлореллы от концентрации ионов меди в среде

В экспериментах по изучению действия ионов тяжёлых металлов на замедленную флуоресценцию ряски малой было отмечено, что ионы меди и кадмия в концентрациях от 0,032 до 0,5 мг/л снижают ОПЗФ по сравнению с контролем уже при 4-часовой экспозиции (рис. 2). При увеличении времени экспозиции до 1 сут. подавление ОПЗФ хлорофилла значительно усиливается.

Эксперименты, проведённые с ионами никеля в растворах с концентрациями 0,03–3 мг/л, не показали реакции ОПЗФ ряски при 4-часовой экспозиции, в то время как 24-часовая экспозиция ряски с ионами данного металла позволила достоверно установить снижение ОПЗФ растворов, содержащих ионы никеля в диапазоне 0,3 до 3 мг/л (см. рис. 2). Похожую чувствительность по изменению сухого веса листочков наблюдали К.-Й. Аппенрот с

соавторами в исследовании [Effects of nickel ... , 2010], выполненном по протоколу ISO 20079. По концентрации таких пигментов, как хлорофиллы и каротиноиды, при экспозиции 7 сут. авторами отмечалась бóльшая чувствительность биотеста, чем полученная нами при суточной экспозиции.

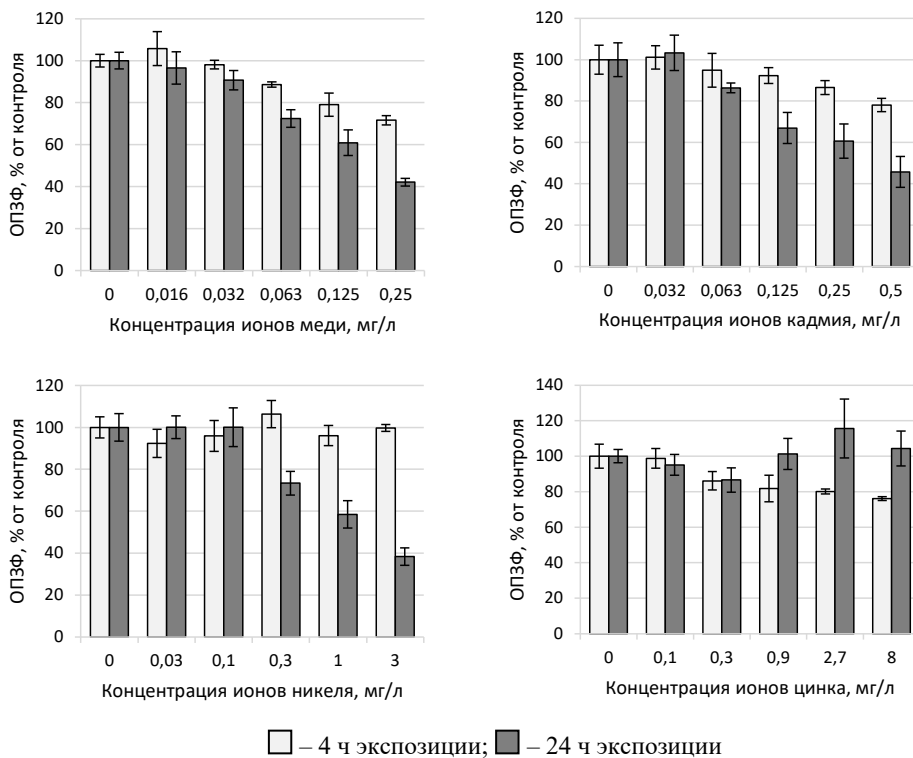


Рис. 2. Зависимость показателя отношения замедленной флуоресценции, возбуждаемой светом высокой и низкой интенсивности (ОПЗФ) хлорофилла ряски малой от концентрации ионов тяжёлых металлов в среде

При изучении действия ионов цинка на замедленную флуоресценцию ряски было отмечено незначительное подавление ОПЗФ по сравнению с контролем после 4 ч содержания растений в средах с концентрациями от 0,3 до 8 мг/л. При более продолжительном воздействии цинка на ряску наблюдалось восстановление ОПЗФ до контрольных значений.

Таким образом, влияние тяжёлых металлов на фотосинтетический аппарат *L. minor* может проявляться через разное время экспозиции, при этом наиболее токсичными для ряски оказались ионы меди и кадмия ( $EC_{50}$  составила 0,17 и 0,31 мг/л соответственно). Меньшее воздействие оказывают ионы никеля и цинка ( $EC_{50}$  составила 1,89 мг/л и более 8 мг/л соответственно). В экспериментах по стандартному протоколу ISO 20079 с недельной экспозицией ряски группой авторов [Naumann, Eberius, Appenroth, 2007] были получены близкие результаты по чувствительности при дей-

ствии металлов на прирост количества листцов. По другим показателям (сырая и сухая массы, содержание фотосинтетических пигментов) отмечена более высокая чувствительность ряски. Однако метод регистрации флуоресценции хлорофилла позволяет получить результаты воздействия после более короткой экспозиции (через 24 ч).

Внесение ионов цинка, никеля во всех исследованных концентрациях в первые сутки вызывало некоторое повышение ОПЗФ элодеи канадской. Ионы меди оказывали выраженное токсическое действие на этот тест-организм в концентрациях выше 0,025 мг/л (рис. 3). При этом элодея сохраняла жизнеспособность при всех исследованных концентрациях тяжёлых металлов в течение всего эксперимента. Данный факт свидетельствует об устойчивости растения к действию соединений кадмия, меди, никеля, цинка, что указывает на возможность использования элодеи канадской в качестве сорбента при биоремедиации водной среды, содержащей тяжёлые металлы.

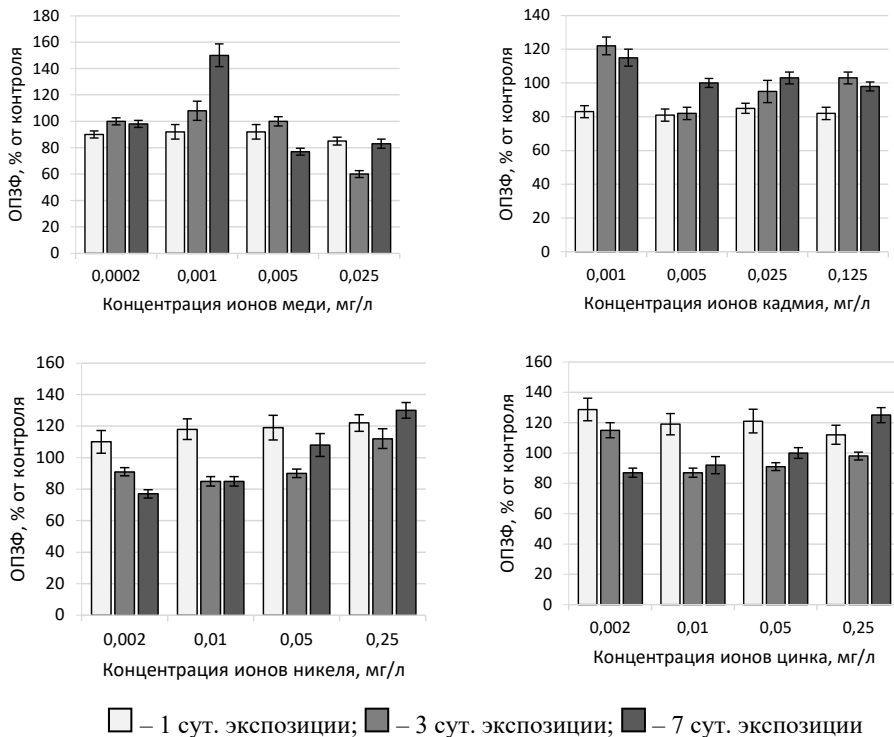


Рис. 3. Динамика изменения показателя отношения замедленной флуоресценции, возбуждаемой светом высокой и низкой интенсивности (ОПЗФ) элодеи канадской при действии различных ионов тяжёлых металлов

Результаты проведённых исследований с дафниями (рис. 4) показали, что по истечении времени экспонирования в контрольных вариантах количество потреблённого корма достигало 80 %, что свидетельствует о нормальной жизнедеятельности рачков. В присутствии солей тяжёлых металлов

в пробах происходило снижение показателя трофической активности дафний с увеличением концентрации токсиканта. Наибольшее токсическое действие на дафний было отмечено в опытах с ионами кадмия и меди, среднеэффективные концентрации ( $EC_{50}$ ) для которых составили 0,002 и 0,02 мг/л соответственно. Существенное подавление интенсивности питания рачков при добавлении ионов цинка наблюдалось при концентрациях, превышающих 0,5 мг/л. Полученные нами показатели чувствительности *D. magna* совпадают или ниже указанных в других исследованиях [Дроздова, Застенская, 2010; Олькова, Фокина, 2015], где в качестве тест-функции использовали выживаемость рачков. Так, концентрации кадмия и бихромата калия, вызывающие подавление интенсивности питания дафний на 50 % в наших опытах, в 3–5 раз ниже среднелетальных концентраций, указанных в работе Е. В. Дроздовой и И. А. Застенской [2010]. В экспериментах с ионами меди и цинка снижение трофической активности рачков наблюдается при концентрациях, на порядок более низких, чем смертность дафний, установленная для этих тяжёлых металлов в работе А. С. Ольковой и А. И. Фокиной [2015].

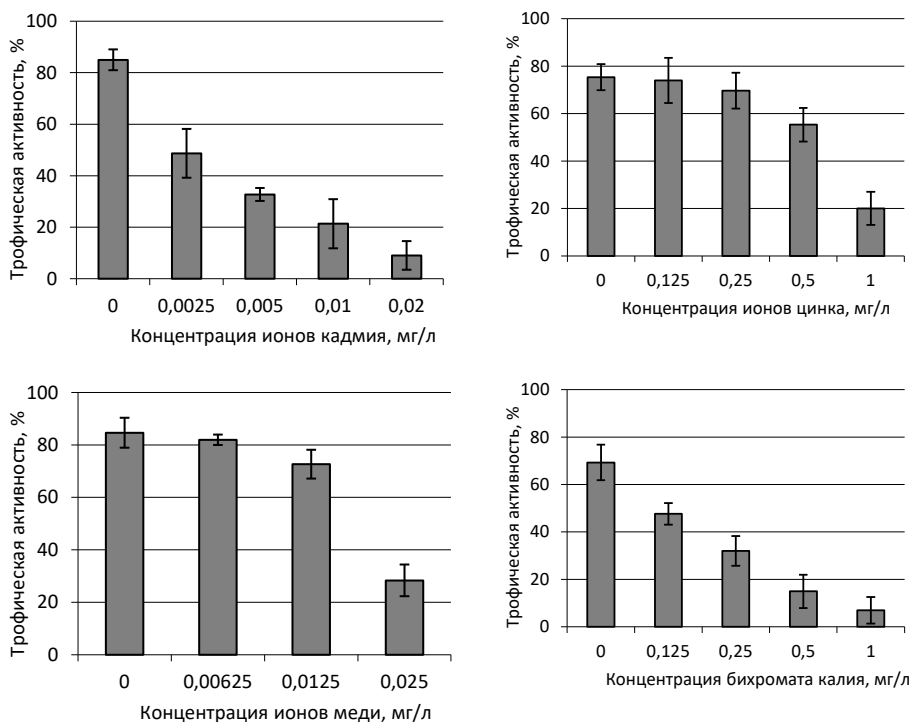


Рис. 4. Зависимость трофической активности дафний от концентрации тяжёлых металлов в среде



Трофическая активность дафний, определяемая с помощью регистрации флуоресценции хлорофилла хлореллы, даёт возможность установить токсическое действие тяжёлых металлов в более низких концентрациях, чем критичные для выживаемости рачков. При этом подавление питания дафний происходит до наступления летального исхода, что позволяет установить загрязнение водного объекта в более короткие сроки и на ранних стадиях воздействия токсических веществ.

### Заключение

Регистрация относительного показателя замедленной флуоресценции (ОПЗФ) хлорофилла позволила выявить высокую чувствительность водоросли *Chlorella vulgaris* к тяжёлым металлам, воздействие которых проявлялось в концентрациях, близких к ПДК для рыбохозяйственных водоёмов. Высшие водные растения ряска и элодея показали более низкую чувствительность к присутствию в среде тяжёлых металлов, определяемую по изменению ОПЗФ после коротких периодов экспозиций. Для этой группы гидробионтов флуоресцентный метод может быть применён для выявления устойчивых видов с целью их использования для фиторемедиации загрязнённых вод. Измерение показателя быстрой флуоресценции хлорофилла хлореллы при определении трофической активности дафний сделало возможным увеличение чувствительности и оперативности этого биотеста по сравнению с методом регистрации смертности рачков.

Таким образом, использование в биомониторинге состояния водной среды приёмов определения флуоресценции хлорофилла для определения чувствительности и устойчивости достаточно широкого круга тестируемых организмов к воздействию тяжёлых металлов позволяет более оперативно реагировать на изменения экологической ситуации в водных объектах.

### Список литературы

Биотестирование токсичности вод по скорости поглощения дафниями микроводорослей, регистрируемых с помощью флуоресценции хлорофилла / Д. Н. Маторин, Л. Б. Братковская, О. В. Яковлева, П. С. Венедиктов // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2009. № 3. С. 28–33.

Дроздова Е. В., Застенская И. А. Разработка и научное обоснование батареи чувствительных тест-моделей для эффективной оценки острой токсичности водорастворимых химических веществ // Здоровье и окружающая среда. 2010. № 16. С. 320–326.

Маторин Д. Н., Братковская Л. Б., Алексеев А. А. Флуоресценция хлорофилла для оценки состояния водорослей // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018. Т. 3. № 3. С. 686–698.

Олькова А. С., Фокина А. И. *Daphnia magna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135, № 4. С. 380–389.

Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода / В. С. Лысенко, Т. В. Вардуни, В. Г. Сойер, В. П. Краснов // Фундаментальные исследования. 2013. № 4. С. 112–120.

Шашкова Т. Л., Григорьев Ю. С. Сравнительная оценка чувствительности показателей выживаемости и трофической активности *Daphnia magna* при определении токсичности воды // Поволжский экологический журнал. 2013. № 4. С. 439–444.

Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence / K. S. Kumar, H-U. Dahms, J-S. Lee, H. Ch. Kim, W. Ch. Lee, K-H. Shin // *Eco-toxicol. Environ. Saf.* 2014. Vol. 104. P. 51–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>

Bioassays. Advanced Methods and Applications / D. P. Häder, G. S. Erzinger (Eds.) // Elsevier. 2018. 464 p. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-01695-9>

Bioindication of heavy metals in aquatic environment using photosynthetic pigments in cyanobacteria / N. A. Jusoha, M. K. Chaia, L. Sh. Wong, G. H. Ong, B. N. Voon // *S. Afr. J. Chem. Eng.* 2020. N 34. P. 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.05.011>

Chlorophyll fluorescence – A tool to assess photosynthetic performance and stress photophysiology in symbiotic marine invertebrates and seaplants / R. Bhagooli, S. Mattan-Moorgawa, D. Kaullysing, Y. D. Louis, A. Gopeechund, S. Ramah, M. Soondur, S. S. Pilly, R. Beesoo, D. P. Wijayanti, Z. B. Bachok, V. C. Monras, B. E. Casareto, Y. Suzuki, A. Ch. Baker // *Mar. Pollut. Bull.* 2021. N 165. P. 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112059>

Choi Ch. J., Berges J. A., Young E. B. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll *a* fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae // *Water Res.* 2012. Vol. 46. P. 2615–2626. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.027>

Delayed fluorescence in algal growth inhibition tests / M. Berden-Zrimec, L. Drinovec, A. Zrimec, T. Tišler // *Cent. Eur. J. Biol.* 2007. N 2(2). P. 169–181. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0014-1>

Delayed fluorescence in photosynthesis / V. Goltsev, I. Zaharieva, P. Chernev, R. J. Strasser // *Photosynth. Res.* 2009. Vol. 101 P. 217–232. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9451-1>

Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation / K. J. Appenroth, K. Krech, A. Keresztes, W. Fischer, H. Koloczek // *Chemosphere.* 2010. Vol. 78. P. 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007>

Küster A., Altenburger R. Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species // *Chemosphere.* 2007. Vol. 67. P. 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.023>

Miniaturising acute toxicity and feeding rate measurements in *Daphnia magna* / K. Grintzalis, W. Dai, K. Panagiotidis, A. Belavgeni, M. R. Viant // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017. Vol. 139. P. 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.002>

Naumann B., Eberius M., Appenroth K-J. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 4520079) with *Lemna minor* L. clone St. // *Plant Physiol.* 2007. Vol. 164. P. 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.10.011>

Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017 / Q. Zhou, N. Yang, Y. Li, B. Ren, X. Ding, H. Bian, X. Yao // *Glob. Ecol. Conserv.* 2020. N 22. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00925>

Vardhan K. H., Kumar P. S., Panda R. C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives // *J. Mol. Liq.* 2019. N 290. P. 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>

## Chlorophyll Fluorescence in Assessing the Effect of Heavy Metal Compounds on Aquatic Organisms

G. A. Sorokina, T. L. Shashkova, M. A. Subbotin, E. S. Stravinskene, Yu. S. Grigoriev

*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

**Abstract.** Fluorescent methods allow to improve the bioassays because of time effectiveness. These methods give information on chlorophyll concentration and plant photosynthetic apparatus activity in a short period of time. The aim of this study was to estimate the sensitivity of aquatic organisms to heavy metals using chlorophyll fluorescent methods. The test-organisms of different taxonomic categories were used, including thermophilic strain *Chlorella vulgaris* Beijer, aquatic plants *Elodea canadensis* Michx. and *Lemna minor* L., crustacean *Daphnia magna* Straus. Fluorimeter "Foton 10" developed in SibFU was employed to measure prompt and delayed fluorescence (PF and DF respectively). The experiments revealed that copper ions affected DF of chlorella in 30 minutes, resulting in a 50% decrease of relative indicator of DF (RIDF) in the range of concentrations 0.005-0.01 mg/l of  $\text{Cu}^{2+}$ . Measuring the DF of duckweed was less time-consuming compared to registration the changing of morphological parameters when the plants were exposed to heavy metals. Copper, cadmium, and nickel exposures were found to decrease the RIDF of duckweed by more than 50% at the concentrations of 0.17, 0.31, and 1.89 mg/l respectively. However, zinc had no significant effect on the RIDF of *Lemna minor* in the range of 0.1-8 mg/l of  $\text{Zn}^{2+}$  within 24 h of exposure time. The analysis of fluorescent parameters of Canadian elodea showed the possibility of using the plant as a sorbent during the bioremediation of aquatic environments from heavy metals. Registration of chlorophyll fluorescence allowed revealing the toxic effects of negligible concentrations of heavy metals in experiments with the feeding rate of daphnids. The median effective concentrations ( $\text{EC}_{50}$ ) were 0.002, 0.02, 0.4, and 0.25 mg/l of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and potassium dichromate respectively. This makes it possible to obtain information on the effects of pollution in the early stages of exposure and in a shorter time. Thus, the use of chlorophyll fluorescence in biomonitoring the state of the aquatic environment makes it possible to more quickly respond to changes in the ecological situation in water bodies.

**Keywords:** prompt and delayed chlorophyll fluorescence, heavy metals, toxicity, *Chlorella vulgaris*, *Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Elodea canadensis*.

**For citation:** Sorokina G.A., Shashkova T.L., Subbotin M.A., Stravinskene E.S., Grigoriev Yu.S. Chlorophyll Fluorescence in Assessing the Effect of Heavy Metal Compounds on Aquatic Organisms. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2021, vol. 36, pp. 24-36. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.36.24> (in Russian)

### References

Matorin D.N., Bratkovskaya L.B., Yakovleva O.V., Venediktov P.S. Biotestirovanie toksichnosti vod po skorosti pogloshcheniya dafniyami mikrovodoroslei, registriruemykh s pomoshch'yu fluorestsentsii khlorofilla [Bioassay of water toxicity by the rate of consumption microalgae by *Daphnia* registered using chlorophyll fluorescence]. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, 2009, no. 3, pp. 28-33. (in Russian)

Drozdova E.V., Zastenskaya I.A. Razrabotka i nauchnoe obosnovanie batarei chuvstvitel'nykh test-modelei dlya effektivnoi otsenki ostroi toksichnosti vodorastvorimykh khimicheskikh veshchestv [Development and scientific justification of a battery of sensitive test models for the effective assessment of acute toxicity of water-soluble chemicals]. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda* [Health and Environment], 2010, no. 16, pp. 320-326. (in Russian)

Matorin D.N., Bratkovskaya L.B., Alekseev A.A. Fluorestsentsiya khlorofilla dlya otsenki sostoyaniya vodoroslei [Chlorophyll fluorescence to assess the state of algal]. *Ak-*

*tual'nye voprosy biologicheskoi fiziki i khimii* [Actual Problems of Biological Physics and Chemistry], 2018, vol. 3, no. 3, pp. 686-698. (in Russian)

Ol'kova A.S., Fokina A.I. *Daphnia magna* Straus v biotestirovanii prirodnykh i tekhnogennykh sred [Daphnia magna Straus in the biotesting of natural and industrial environments]. *Biol. Bull. Rev.*, 2015, vol. 135, no. 4, pp. 380-389. (in Russian)

Lysenko V.S., Varduni T.V., Soier V.G., Krasnov V.P. Fluorestsentsiya khlorofilla rastenii kak pokazatel' ekologicheskogo stressa: teoreticheskie osnovy primeneniya metoda [Plant chlorophyll fluorescence as an indicator of environmental stress: theoretical basis for the application of the method]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental Research], 2013, no. 4, pp. 112-120. (in Russian)

Shashkova T.L., Grigoriev Yu.S. Sravnitel'naya otsenka chuvstvitelnosti pokazatelei vyzhivaemosti i troficheskoi aktivnosti *Daphnia magna* pri opredelenii toksichnosti vody [Comparative evaluation of the sensitivity of survival rates and trophic activity of *Daphnia magna* in determining water toxicity]. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal* [Povolzhskiy Journal of Ecology], 2013, no. 4, pp. 439-444. (in Russian)

Kumar K.S., Dahms H-U., Lee J-S., Kim H.Ch., Lee W.Ch., Shin K-H. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2014, vol. 104, pp. 1-71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>

*Bioassays. Advanced Methods and Applications*. Häder D. P., Erzinger G. S. (Eds.) // Elsevier, 2018, 464 p. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-01695-9>

Jusoha N.A., Chaia M.K., Wong L. Sh., Ong G.H., Voon B.N. Bioindication of heavy metals in aquatic environment using photosynthetic pigments in cyanobacteria. *S. Afr. J. Chem. Eng.*, 2020, no. 34, pp. 78-81. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.05.011>

Bhagooli R., Mattan-Moorgawa S., Kaullysing D., Louis Y.D., Gopeechund A., Ramah S., Soondur M., Pilly S.S., Beesoo R., Wijayanti D.P., Bachok Z.B., Monras V.C., Casareto B.E., Suzuki Y., Baker A.Ch. Chlorophyll fluorescence – A tool to assess photosynthetic performance and stress photophysiology in symbiotic marine invertebrates and seaplants. *Mar. Pollut. Bull.*, 2021, no. 165, pp. 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112059>

Choi Ch.J., Berges J.A., Young E.B. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae. *Water Res.*, 2012, vol. 46, pp. 2615-2626. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.027>

Berden-Zrimec M., Drinovec L., Zrimec A., Tišler T. Delayed fluorescence in algal growth inhibition tests. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2007, no. 2(2), pp. 169-181. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0014-1>

Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, 2009, vol. 101, pp. 217-232. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9451-1>

Appenroth K.J., Krech K., Keresztes A., Fischer W., Koloczek H. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere*, 2010, vol. 78, pp. 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007>

Küster A., Altenburger R. Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species. *Chemosphere*, 2007, vol. 67, pp. 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.023>

Grintzalis K., Dai W., Panagiotidis K., Belavgeni A., Viant M. R. Miniaturising acute toxicity and feeding rate measurements in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2017, vol. 139, pp. 352-357. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.002>

Naumann B., Eberius M., Appenroth K-J. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 4520079) with *Lemna minor* L. clone St. *Plant Physiol.*, 2007, vol. 164, pp. 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.10.011>

Zhou Q., Yang N., Li Y., Ren B., Ding X., Bian H., Yao X. Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. *Glob. Ecol. Conserv.*, 2020, no. 22, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00925>

Vardhan K.H., Kumar P.S., Panda R.C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *J. Mol. Liq.*, 2019, no. 290, pp. 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>

*Сорокина Галина Александровна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Сибирский федеральный университет  
Россия, 660041, г. Красноярск,  
пр. Свободный, 79  
e-mail: sorokina\_gas@mail.ru

*Sorokina Galina Alexandrovna*  
Candidate of Science (Biology),  
Associate Professor  
Siberian Federal University  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041,  
Russian Federation  
e-mail: sorokina\_gas@mail.ru

*Шашкова Татьяна Леонидовна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Сибирский федеральный университет  
Россия, 660041, г. Красноярск,  
пр. Свободный, 79  
e-mail: TShashkova@sfu-kras.ru

*Shashkova Tatiana Leonidovna*  
Candidate of Science (Biology),  
Associate Professor  
Siberian Federal University  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041,  
Russian Federation  
e-mail: TShashkova@sfu-kras.ru

*Субботин Михаил Александрович*  
старший преподаватель  
Сибирский федеральный университет  
Россия, 660041, г. Красноярск, пр.  
Свободный, 79  
e-mail: MSubbotin@sfu-kras.ru

*Subbotin Mikhail Aleksandrovich*  
Senior Lecturer  
Siberian Federal University  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041,  
Russian Federation  
e-mail: MSubbotin@sfu-kras.ru

*Стравинскене Екатерина Сергеевна*  
кандидат биологических наук,  
старший преподаватель  
Сибирский федеральный университет  
Россия, 660041, г. Красноярск,  
пр. Свободный, 79  
e-mail: EStravinskene@sfu-kras.ru

*Stravinskene Ekaterina Sergeevna*  
Candidate of Science (Biology), Senior  
Lecturer  
Siberian Federal University  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041,  
Russian Federation  
e-mail: EStravinskene@sfu-kras.ru

*Григорьев Юрий Сергеевич*  
кандидат биологических наук, профессор  
Сибирский федеральный университет  
Россия, 660041, г. Красноярск,  
пр. Свободный, 79  
e-mail: gr2897@gmail.com

*Grigoriev Yury Sergeevich*  
Candidate of Science (Biology), Professor  
Siberian Federal University  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041,  
Russian Federation  
e-mail: gr2897@gmail.com

**Дата поступления:** 17.12.2020

**Received:** December, 17, 2020