

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 574.24: 579.68: 582.263

EDN: EVWHFU

<http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-139-149>



Влияние ионов меди и цинка на зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris*

Валентина Владимировна Галямина¹, Дмитрий Юрьевич Шаравин¹

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия
Автор, ответственный за переписку: Дмитрий Юрьевич Шаравин, dima-sharavin@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты исследования токсического действия меди и цинка в диапазоне концентраций 1–17 мкМ Cu^{2+} и 5–60 мкМ Zn^{2+} на пресноводную зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris* IMBR-19. В недельном эксперименте оценку токсичности тяжелых металлов давали по таким показателям, как численность живых и мертвых клеток, содержание внутриклеточных пигментов, углеводов и пролина. Установлено, что наибольшим угнетающим действием по отношению к хлорелле обладает медь. Пороговыми концентрациями, при которых рост культуры не наблюдается, а количество мертвых клеток приближается к 100%, были 13 и 40 мкМ для меди и цинка соответственно. Установлено, что при увеличении концентрации тяжелых металлов (в диапазоне роста микроводоросли) не происходит статистически достоверного снижения концентрации фотосинтетических пигментов. Для концентраций 7–11 мкМ меди обнаружен существенный рост содержания хлорофиллов и каротиноидов. Полученные данные свидетельствуют, что при повышении концентрации тяжелых металлов происходит увеличение содержания углеводов в клетках хлореллы в 2 и 3 раза по сравнению с контролем в случае меди и цинка соответственно. Аналогичная зависимость была выявлена и в случае с пролином, где опытные варианты с медью и цинком при 13 мкМ и 30 мкМ соответственно превышали контроль в 2.7 и 4 раза.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, ионы меди и цинка, хлорофиллы, каротиноиды, углеводы, пролин, токсичность

Для цитирования: Галямина В. В., Шаравин Д. Ю. Влияние ионов меди и цинка на зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2026. Т. 17, вып. 2. С. 139–149. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-139-149>.

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028-4).

MICROBIOLOGY

Original article

Effects of copper and zinc ions on green microalgae *Chlorella vulgaris*

Valentina V. Galyamina¹, Dmitry Yu. Sharavin¹

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS – branch of the PFRC of the UB RAS, Perm, Russia
Corresponding author: Dmitry Y. Sharavin, dima-sharavin@yandex.ru

Abstract. The paper presents the results of a study on the toxic effects of copper and zinc in the concentration ranges of 1–17 μM Cu^{2+} and 5–60 μM Zn^{2+} on the freshwater green microalgae *Chlorella vulgaris* IMBR-19. In a one-week experiment, the toxicity of heavy metals was assessed based on such parameters as the number of live and dead cells, and the content of pigments, carbohydrates, and proline. Copper was found to have a greater inhibitory effect on *Chlorella* than zinc. The threshold concentrations at which no culture growth was observed and the number of dead cells approached 100% were 13 and 40 μM for copper and zinc, respectively. It was found that with an increase in heavy metal concentrations (within the microalgal growth range) does not lead to a statistically significant decrease in the concentration of photosynthetic pigments. A significant increase in chlorophyll and carotenoid content was observed at copper concentrations of 7–11 μM . The obtained data indicate that an increase in heavy metal concentrations leads to a 2- and 3-fold increase in carbohydrate content in *Chlorella* cells compared to the control, for copper and zinc, respectively. A similar relationship was observed for proline, where the experimental treatments with copper and zinc at 13 μM and 30 μM , respectively, exceeded the control by 2.7 and 4 times.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, copper and zinc ions, chlorophylls, carotenoids, carbohydrates, proline, toxicity

For citation: Galyamina V. V., Sharavin D. Yu. [Effects of copper and zinc ions on green microalgae *Chlorella vulgaris*]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Vol. 17, iss. 2 (2026): pp. 139-149. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-139-149>.

Financing: the research was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (124020500028-4).

Введение

Воды рек и водохранилищ Пермского края регулярно подвергаются загрязнению тяжелыми металлами (ТМ), которые попадают в водотоки с промышленными стоками и шахтными водами. Значительно загрязнены ТМ воды малых рек, протекающих через промышленные зоны и густонаселенные районы Пермского края.

Некоторые ТМ, такие как ртуть, свинец, кадмий, токсичны для живых организмов даже в следовых количествах. Другие, такие как медь, цинк, марганец, кобальт, никель и хром, являются необходимыми микроэлементами, которые участвуют во многих метаболических процессах [Manzoor, Karbassi, Golzary, 2019]. Однако повышенные концентрации этих металлов в водотоках отрицательно влияют на гидробионтов, ухудшая качество питьевой воды, могут наносить вред здоровью человека. ТМ накапливаются в организме, способствуя развитию раковых заболеваний, язв, аллергических реакций, нарушению в сердечно-сосудистой, дыхательной, выделительной систем и т.д. [Coelho et al., 2015; Ankit, Baudhh, Korstad, 2022].

Большинство методов очистки вод от ТМ, таких как химическое осаждение, ионный обмен, флокуляция, выщелачивание и др., являются трудоемкими и дорогостоящими. Как альтернатива физико-химическим технологиям очистки были предложены более доступные и экологически безопасные методы биоремедиации. Биоремедиация – это процесс использования метаболического потенциала живых организмов для очистки окружающей среды от ТМ [Dwivedi, 2012]. Различные виды бактерий, грибов и водорослей получили широкое распространение в биологической очистке сточных вод. Среди них микроводоросли имеют преимущество, так как благодаря коротким циклам роста и активной фиксации углерода отличаются высокой продуктивностью биомассы. Большое соотношение площади поверхности к объему клеток микроводорослей способствует эффективной адсорбции загрязняющих веществ, в том числе ТМ [Coelho et al., 2015; Manzoor, Karbassi, Golzary, 2019; Mahlangu et al., 2024]. Метаболизм большинства изученных микроводорослей позволяет им хелатировать ионы металлов и откладывать в вакуолях, хлоропластах или в полифосфатных тельцах. Кроме того, в процессе фотосинтетической активности микроводоросли повышают pH окружающей среды, что способствует осаждению некоторых металлов в виде нерастворимых соединений. В частности, при высоких уровнях pH такие металлы, как цинк, марганец и железо образуют нерастворимые гидроксиды [Li et al., 2020; Cavalletti et al., 2022; Ali, Hassan, El-Sheekh, 2024].

Клетки зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* имеют малые размеры (диаметр в среднем 4–6 мкм), но большую удельную площадь поверхности, что значительно повышает эффективность адсорбции металлов на поверхности клеточной стенки. Простота выращивания и высокая скорость роста *Chlorella vulgaris* делают эту водоросль удобной тест-системой для изучения биodeградации токсикантов. Выявлено, что *Chlorella vulgaris* способна к эффективному удалению из сточных вод таких ТМ, как медь, цинк, никель, кадмий, свинец. При этом оптимальный период очистки от них составлял 5–7 дней [Manzoor, Karbassi, Golzary, 2019]. Для определения фитотоксичности ионов металлов для водорослей наиболее часто используются тесты на ингибирование роста и фотосинтеза при внесении в ростовую среду различных концентраций солей ТМ [Exposito et al., 2021]. Mehta и Gaur [1999] при изучении влияния ТМ на клетки *Chlorella vulgaris* в присутствии пролина отметили, что дополнительная обработка клеток хлореллы этой аминокислотой (выполняющей защитную функцию при стрессе) привела к снижению негативных последствий, таких как перекисное окисление липидов, разрушение клеточных мембран и утечка электролитов.

Несмотря на высокую степень изученности *Chlorella vulgaris*, существуют противоречия в литературных данных о том, какие концентрации ТМ (в нашем случае меди и цинка) являются критическими для роста микроводоросли, а также недостаточное количество сведений о влиянии этих ТМ на некоторые биохимические параметры клеток.

Таким образом, цель исследования – выявление ингибирующих концентраций ионов меди и цинка, а также их влияния на некоторые биохимические параметры *Chlorella vulgaris* IMBR-19 в исследуемом диапазоне концентраций.

Материалы и методы

Штамм *Chlorella vulgaris* IMBR-19 был предоставлен Институтом биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН. В эксперименте использовалась культура микроводоросли на поздней экспоненциальной фазе роста (недельная). Засевали хлореллу в 500 мл колбы Эрленмейера в соотношении 1:19 на среду BG-II следующего состава (мг/л): NaNO_3 – 75; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 19; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10;

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 9; Na_2CO_3 – 5; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_3$ – 1.5; лимонная кислота – 1.5; ЭДТА – 1.2. После автоклавирования добавляли 1 мл/л микроэлементов (мг/100 мл): H_3BO_3 – 286; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 181; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 22; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 39; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 8; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5. Конечная численность хлореллы в засеянных колбах составляла 10^6 клеток на мл. Культуру микроводоросли выращивали в термостате при температуре $+28^\circ\text{C}$ на платформе со встроенными светодиодами (освещенность ≈ 5000 люкс). Режим освещения культуры составлял 12ч /12ч.

Через 1 сутки (ранняя экспоненциальная фаза) культуру хлореллы разливали по 100 мл в 250 мл колбы и вносили добавки металлов: Cu^{2+} , мкМ (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15); Zn^{2+} , мкМ (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60). Исходные растворы ТМ готовили из солей аналитической чистоты: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и ZnCl_2 .

Хлореллу с добавками ТМ инкубировали в стандартных условиях (см. выше), колбы встряхивали вручную 2 раза в день. Наблюдения за ростом хлореллы при разных концентрациях ТМ вели в течение 7 дней с промежуточными подсчетами численности клеток в камере Горяева через 2, 5 и 7 суток. Для выявления соотношения живых и мертвых клеток аликвоту культуры хлореллы из каждой колбы перед подсчетом окрашивали 1% метиленовым синим в соотношении 3 мкл красителя на 100 мкл суспензии клеток. При этом живые клетки сохраняли светло-зеленую окраску, а мертвые клетки окрашивались в синий цвет.

Содержание пролина в клеточном осадке измеряли по методу Bates, Waldren, Tear [1973]. К осадку из 80 мл культуры водорослей добавляли 200 мг очищенного кварцевого песка и растирали в фарфоровой ступке. Затем осадок ресуспендировали в 2 мл 3% сульфосалициловой кислоты и центрифугировали 10 мин при 8000 об./мин. Свободный пролин, присутствующий в супернатанте, обрабатывали 2 мл кислого нингидрина (1.25 г нингидрина, 30 мл ледяной уксусной кислоты, 20 мл 6М ортофосфорной кислоты) и 2 мл ледяной уксусной кислоты при $+80^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Реакцию останавливали на ледяной бане, а окрашенный комплекс экстрагировали толуолом. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре при длине волны 520 нм. Концентрацию пролина определяли по калибровочной кривой стандартных растворов данной аминокислоты.

Определение внутриклеточных пигментов проводили методом экстракции метанолом. Из каждой колбы отобрали по 2 мл культуры, осаждали центрифугированием 10 мин. при 8000 об./мин. Осадок дважды промывали ресуспендированием в dH_2O с последующим осаждением. Для экстракции пигментов осадок заливали 90% метанолом, перемешивали на встряхивателе и помещали на водяную баню на 1 ч при $+60^\circ\text{C}$. Затем смесь осаждали, а окрашенный супернатант анализировали на спектрофотометре при длинах волн 470, 650, 652, 660, 665 и 750 нм. Концентрацию пигментов определяли по формулам приведенным в статье Ogbonna, Nweze, Ogbonna [2021].

Общее содержание углеводов определяли по методу Герберта с использованием антронового реактива [Herbert, Phipps, Strange, 1971]. Окрашенный комплекс с белком анализировали на спектрофотометре при длине волны 625 нм. Концентрацию углеводов вычисляли по калибровочной кривой стандартных растворов глюкозы. Все спектры снимали на спектрофотометре Cary 100 (Agilent Technologies).

Хлорофиллы (Хл) *a*, *b*, каротиноиды, общее содержание углеводов и уровень пролина анализировали в конце экспериментального периода – через 7 суток роста водорослей с ионами меди и цинка. Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистический анализ и визуализация данных были проведены в программах Microsoft Excel 2010 и Grapher 13.

Результаты и их обсуждение

Диаграммы роста культуры *Chlorella vulgaris*, подвергшейся влиянию меди и цинка, представлены на рис. 1. На 5-е и 7-е сутки численность контроля составила 13.4 и 20.8×10^6 клеток. На 7-е сутки медь в концентрации 1 и 5 мкМ оказала небольшое достоверное положительное воздействие на рост хлореллы: при 1 мкМ Cu^{2+} 22.5×10^6 , при 5 мкМ Cu^{2+} 22.1×10^6 клеток соответственно. Увеличение концентрации Cu^{2+} до 9 мкМ привело к снижению численности клеток на 6% на 7 сутки, в то время как 13–17 мкМ Cu^{2+} резко угнетали рост водорослей, вплоть до полной гибели на 7-й день эксперимента. При 15–17 мкМ количество мертвых клеток доходило до 100% со 2-го дня эксперимента. Слабый стимулирующий эффект меди в диапазоне концентраций до 5 мкМ (рис. 1) объясняется использованием этого металла в метаболизме фотосинтезирующих клеток. Известно, что медь в качестве кофактора участвует в дыхании, азотном обмене и защите от окислительного стресса. В составе белка пластоцианина медь обеспечивает обратимый перенос электронов от цитохромного комплекса *b6f* к фотосистеме I [Chen et al., 2016]. Тем не менее, в более высоких концентрациях медь ингибирует фотосинтез. Кроме того, ионы меди связывают тиольные группы, что меняет баланс между восстановленным глутатионом и окисленным и нарушает формирование веретена деления клеток [Stauber, Florence, 1987; Jonson et al., 2007].

Стоит отметить, что при микроскопировании культуры хлореллы в опытах с 9 мкМ меди и выше мы наблюдали увеличение доли аномально крупных клеток: 12–15 мкм в диаметре, с заметными выпячива-

ниями стенок. Для сравнения, в контрольной культуре исследуемого нами штамма *Chlorella vulgaris* размер клеток не превышает 8–10 мкм в диаметре, при средних величинах 5–6 мкм.

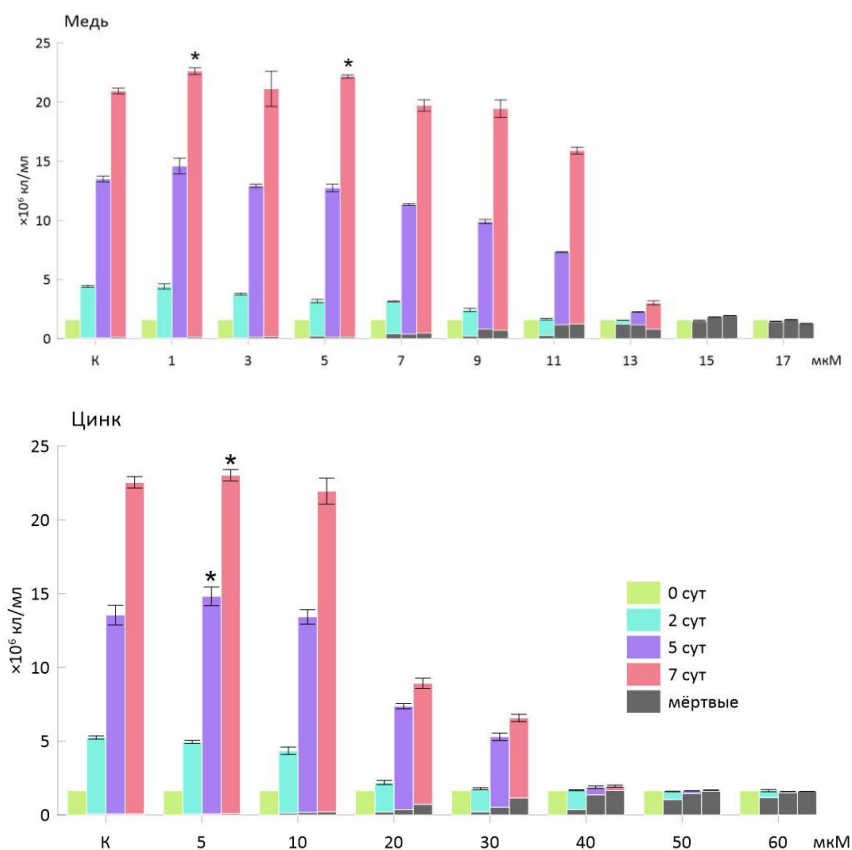


Рис. 1. Влияние различных концентраций Cu^{2+} и Zn^{2+} на численность клеток *Chlorella vulgaris* в недельном эксперименте, черным цветом обозначена доля мертвых клеток, «*» – достоверное положительное отличие от контроля при $p < 0.05$

[The effect of various concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} on *Chlorella vulgaris* cell number in a week-long experiment. The black color indicates the proportion of dead cells; “*” indicates significant positive differences]

В нашем исследовании самая низкая концентрация цинка (5 мкМ) оказала стимулирующий эффект на рост хлореллы на 5-е и 7-е сутки по сравнению с контролем (рис. 1). При концентрации 10 мкМ не фиксировалось существенных отклонений от контроля. Добавка 20 мкМ Zn^{2+} подавляла рост хлореллы на 60%. Увеличение концентрации этого ТМ до 40 мкМ оказалось высокотоксичным и привело к снижению числа клеток на 90% и более. Микроскопирование хлореллы в эксперименте с цинком (с 20 мкМ) выявило укрупнение одиночных клеток, а также появление сдвоенных клеток, большая часть которых – мертвые. Также отмечалось наличие слизистых тяжей с агрегированными на них клетками, причем частота образования скоплений прямо пропорциональна увеличению дозы цинка. Аналогичную секрецию слизистого матрикса при добавлении низких концентраций меди (150–320 мкМ Cu^{2+}) и цинка наблюдали ранее другие исследователи при изучении чувствительности к ТМ *Chlorella vulgaris* и *Raphidocelis subcapitata* [Exposito et al., 2017, 2021]. Внеклеточная слизь, образованная преимущественно экзополисахаридами и экзопротеинами, пассивно связывает ионы ТМ, препятствуя их проникновению внутрь клеток [Karlan, 2013; Zhang et al., 2015].

Цинк является кофактором многих ферментов, участвующих в фиксации CO_2 (например, карбоангидразы), транскрипции ДНК (например, РНК-полимеразы), поглощении фосфора (щелочной фосфатазы), синтезе пигментов и в других жизненно важных процессах [Hassler, Behra, Wilkinson, 2005]. При превышении необходимой концентрации цинк в первую очередь вызывает нарушение всасываемости других жизненно важных ионов металлов, в частности ионов кальция. Недостаток Ca^{2+} ведет к снижению активности Са-АТФазы, необходимой для деления клеток [Arunakumara, Zhang, 2008].

Поскольку график роста культуры отражает метаболизм клеток микроводорослей, он используется в качестве ключевого индикатора токсичности ионов металлов. При этом наномолярные концентрации

некоторых ТМ могут стимулировать увеличение численности. С повышением вносимой в среду дозы металла рост культуры водорослей замедляется, нарушается деление клеток [Arunakumara, Zhang, 2008; El-Naggar, Sheikh, 2014; Chen et al., 2016]. В нашем исследовании результаты подсчета численности указывают на бóльшую чувствительность хлореллы к меди, чем к цинку (рис. 1). Медь в концентрации 15 мкМ является летальной, в то время как цинк полностью ингибирует рост культуры в концентрации 50 мкМ. При этом наблюдается адаптация хлореллы к меди в диапазоне концентраций от 1 до 11 мкМ, а затем резкое угнетение роста при 13 мкМ, в то время как цинк вызывает более плавное подавление роста микроводорослей с повышением его концентрации в среде.

В отличие от результатов, полученных нами, в работе Bajguz [2000] цинк оказывал большее угнетающее действие на *C. vulgaris*, чем медь, тогда как El-Naggar и Sheikh [2014] утверждают, что медь существенно токсичнее цинка, при том, что малые концентрации этих элементов обладают стимулирующим эффектом. Медь и цинк в недельном эксперименте оказывали стимулирующий эффект до 25 и 77 мкМ и начинали угнетать с 32 и 154 мкМ соответственно [El-Naggar, Sheikh, 2014]. Mehta и Gaur [1999] также указывают, что медь токсичнее цинка в диапазоне концентраций 2.5–50 мкМ. Afkar, Ababna, Fathi пришли к аналогичному заключению, но при других концентрациях ТМ. Ростстимулирующее действие наблюдалось в наномолярном диапазоне, при переходе к микромолярным концентрациям фиксировалось ингибирующее действие [Afkar, Ababna, Fathi, 2010]. Другой представитель рода *Chlorella* (*Chlorella sorokiniana*) согласно León-Vaz et al. [2021] был более устойчив к меди, показывая уверенный рост при концентрациях до 1 мМ, при этом динамика численности не существенно отличалась от контроля даже при 250 мкМ. А в работе Zhou et al. [2012] для *C. pyrenoidosa* ростстимулирующим действием обладали концентрации до 8 и 150 мкМ для Cu^{2+} и Zn^{2+} соответственно.

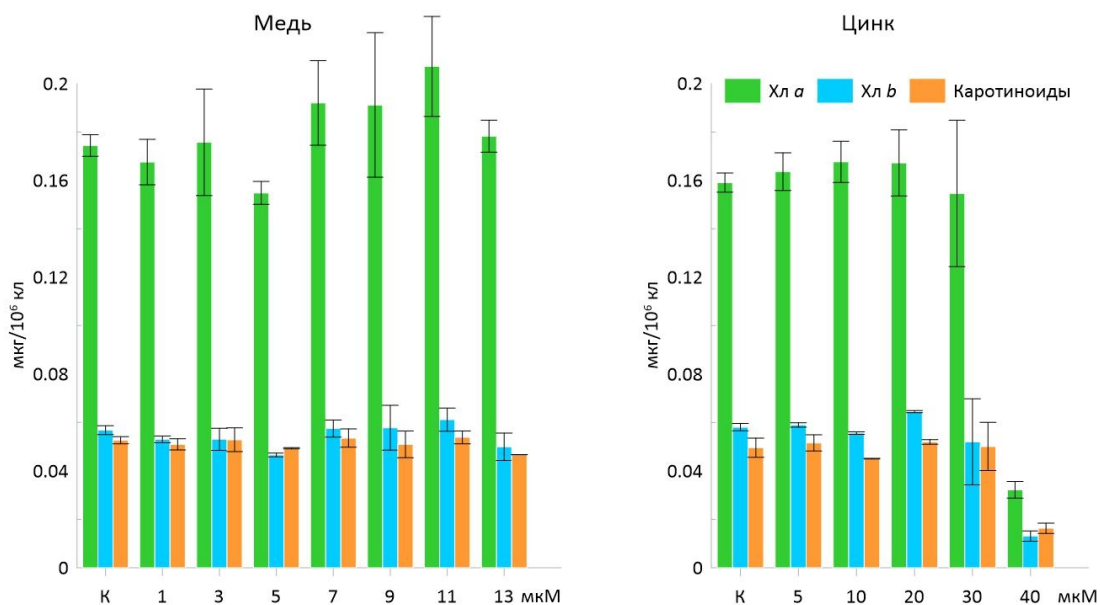


Рис. 2. Содержание пигментов в клетках *Chlorella vulgaris* через 7 суток воздействия Cu^{2+} и Zn^{2+}
[Pigment content in *Chlorella vulgaris* cells after 7 days of exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} exposure]

Пигментный анализ показал, что медь в исследуемом диапазоне концентраций не оказала статистически значимого негативного влияния на синтез пигментов (рис. 2). Концентрации Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов в контроле на 7 сут составили 0.16–0.17, 0.06 и 0.05 мкг/10⁶ клеток соответственно. Токсичная доза меди 13 мкМ, которая привела к 7-кратному снижению численности клеток, не вызвала существенного снижения внутриклеточных пигментов, что можно объяснить значительным укрупнением угнетенных клеток. При концентрации 15 мкМ и выше определения пигментов не проводилось вследствие гибели культуры.

Внесение 5–20 мкМ цинка также привело к небольшому увеличению концентраций Хл *a* и Хл *b*, в то время как присутствие 40 мкМ Zn^{2+} вызвало 5-кратное снижение как Хл *a*, так и Хл *b* (рис. 2). Анализ содержания каротиноидов не выявил заметных колебаний их уровня при внесении меди и цинка. Только присутствие цинка в количестве 40 мкМ привело к 70% снижению синтеза этих пигментов (рис. 2).

Согласно литературным данным, влияние ТМ на содержание пигментов водорослей носит дозозависимый характер, при этом медь обладает более высокой токсичностью, чем эквивалентные дозы цинка [Afkar, Ababna, Fathi, 2010; Exposito et al., 2021]. Стимулирующий эффект малых концентраций (до 8

мкМ Cu^{2+} и до 30 мкМ Zn^{2+}) на синтез пигментов хлореллы был отмечен в работах Zhou et al. [2012]. При дальнейшем росте концентраций ТМ проявляется ингибирующий эффект [Afkar, Ababna, Fathi, 2010; Zhou et al. 2012].

Под влиянием абиотического стресса микроводоросли способны накапливать множество метаболитов, выполняющих осмотическую функцию, в том числе различные углеводы [Barera, Forlani, 2023]. На 7-е сутки содержание углеводов в контроле составило 0.68 мкг/10⁶ клеток. В зависимости от концентрации меди в среде нами отмечено увеличение продукции углеводов на 6–90%, до 1.3 мкг/10⁶ клеток при 13 мкМ Cu^{2+} (рис. 3). Почти двукратное превышение контрольных значений углеводов в культуре хлореллы при воздействии 13 мкМ меди можно объяснить как повышенной продукцией, так и значительным укрупнением клеток. На диаграмме ниже также можно обнаружить увеличение содержания углеводов при концентрации Cu^{2+} 5–7 мкМ с дальнейшим снижением при 9–11 мкМ (рис. 3).

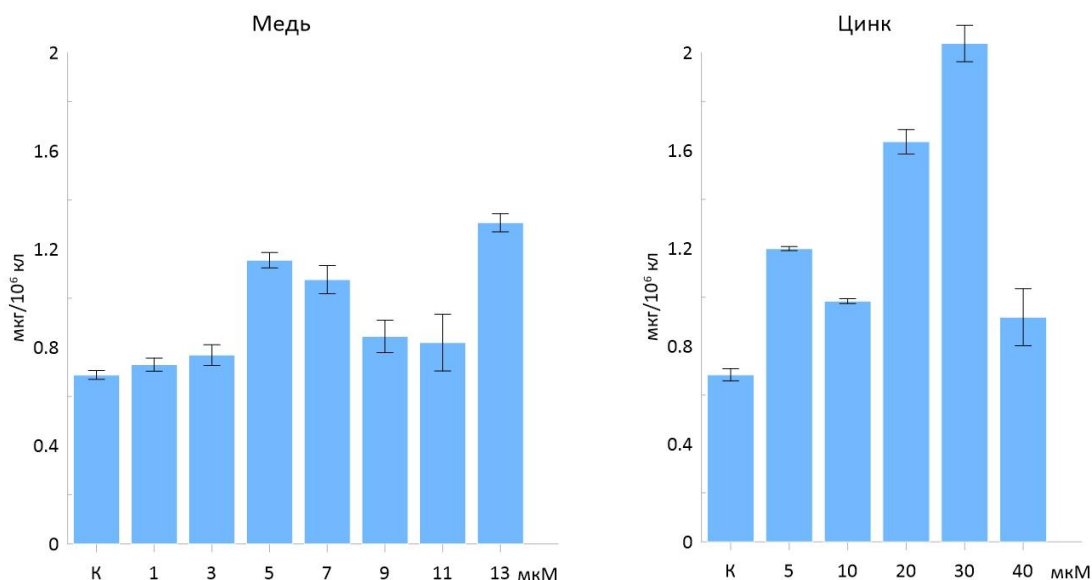


Рис. 3. Содержание углеводов в клетках *Chlorella vulgaris* через 7 суток воздействия Cu^{2+} и Zn^{2+}
[Carbohydrate content in *Chlorella vulgaris* cells after 7 days of exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} exposure]

Цинк оказывал более выраженное влияние на продукцию углеводов хлореллой. Было выявлено, что кроме внутриклеточного накопления углеводов цинк, по-видимому, стимулировал выработку внеклеточных экзополисахаридов, заметных в виде слизистых тяжей. Через 7 дней роста хлореллы общее содержание углеводов на 44–197% превышало контроль (максимум – 2.04 мкг при 30 мкМ), в зависимости от вносимой концентрации цинка (рис. 3).

Исходя из литературных данных, повышенные концентрации ТМ чаще вызывают увеличение концентрации углеводов в клетках микроводорослей [Ganguly et al., 2024]. Согласно Afkar, Ababna, Fathi [2010], в диапазоне (10^{-9} – 10^{-8} М) меди и цинка наблюдался большой разброс в содержании углеводов в клетках культуры хлореллы, а при приближении к 10^{-6} М эти значения выравниваются около 200 мкг/мг. Повышение уровня внутриклеточного пролина – это одна из ранних реакций на широкий спектр абиотических стрессов [Barera, Forlani, 2023]. Кроме основной своей функции в качестве осмолита, пролин нейтрализует некоторые активные формы кислорода, стабилизирует структуру белков, в том числе антиоксидантных ферментов, влияет на пролиферацию клеток, а также участвует в хелатировании ионов ТМ с образованием нетоксичных металл-белковых комплексов [Тарчевский, Егорова, 2022; Islam, Saxena, Sharma, 2024].

В контроле на 7-е сутки содержание пролина фиксировалось на уровне 4–5 нг/10⁶ клеток. Добавление меди в среду культивирования в диапазоне 1–11 мкМ привело к плавному росту содержания пролина (рис. 4). Максимальная концентрация меди 13 мкМ (при которой наблюдался рост культуры) вызвала увеличение уровня пролина в 2.7 раза по сравнению с контролем. В эксперименте с цинком клетки микроводоросли активировали синтез внутриклеточного пролина при увеличении содержания этого ТМ. Максимальная концентрация цинка 30 мкМ, при которой хлорелла сохраняет жизнеспособность, вызвала увеличение уровня пролина более чем в 4 раза – 18.2 нг/10⁶кл против 4.2 мкг/10⁶ кл в контроле (рис. 4).

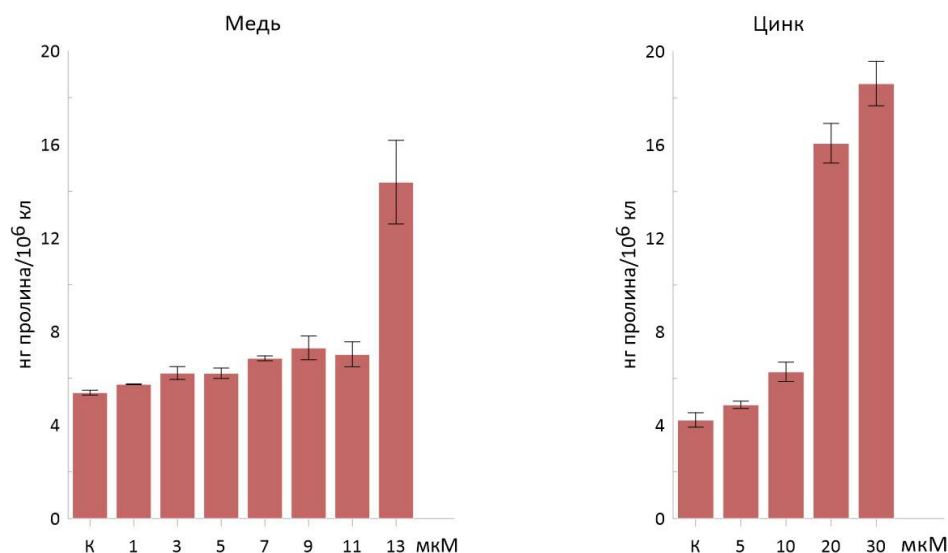


Рис. 4. Содержание пролина в клетках *Chlorella vulgaris* через 7 суток воздействия Cu^{2+} и Zn^{2+}
[Proline content in *Chlorella vulgaris* cells after 7 days of exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} exposure]

В работе Mehta и Gaur [1999] показано, что в клетках хлореллы на протяжении 24 ч под воздействием меди пролин накапливается в больших количествах, чем в среде с цинком, однако с ростом концентрации этих ТМ (более 10 мкМ) зависимость приобретает обратный характер. Накопление пролина ингибируется медью и доходит до минимальных значений, а под воздействием растущих концентраций цинка плавно увеличивается. В исследовании Wu, Hsieh, Kow [1998] обнаружен 6-кратный рост содержания пролина у *Chlorella* sp. относительно контроля в среде с Cu^{2+} . В ряде статей описывается снижение токсического эффекта ТМ на микроводоросли при наличии пролина в среде, при этом увеличивается концентрация пигментов [El-Enany, Issa, 2001; Barera, Forlani, 2025]. В работе Afkar, Ababna, Fathi [2010] также отмечалось увеличение доли свободных аминокислот в опытах по воздействию меди и цинка на хлореллу.

Заключение

В данном исследовании показано, что для пресноводной зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* концентрации меди и цинка до 5 мкМ являются ростстимулирующими. Обнаружено, что медь является более токсичным ТМ, чем цинк. Исходя из графиков роста и содержания пигментов установлено, что высокотоксичной для хлореллы является концентрация меди 13 мкМ, а цинка – 40 мкМ. При этом увеличение концентрации ТМ (в диапазоне роста) не приводило к соответствующему снижению в содержании пигментов (в пересчете на 1 млн клеток) относительно контроля.

После 7 дней культивирования было определено, что с увеличением концентрации ТМ растет и содержание углеводов, достигая максимума для меди при 13 мкМ (в 2 раза больше контроля) и при 30 мкМ для цинка (в 3 раза больше контроля). Такая же зависимость наблюдалась и для пролина, где при 13 мкМ меди и 30 мкМ цинка уровни свободного пролина превышали контрольные в 2.7 и 4 раза соответственно.

Следует учитывать, что установленные в Российской Федерации предельно-допустимые концентрации (ПДК) токсинов в водах рыбохозяйственного значения для Cu^{2+} и Zn^{2+} составляют 0.001 мг/л и 0.01 мг/л [Об утверждении нормативов ..., 2025]. Выявлено, что *Chlorella vulgaris* IMBR-19 способна к росту при концентрации ионов меди в 800 раз выше ПДК (0.83 мг/л) и концентрации ионов цинка в 260 раз выше ПДК (2.6 мг/л).

На основании полученных нами результатов штамм *Chlorella vulgaris* IMBR-19 может найти применение на стадии доочистки сточных вод от загрязнений тяжелыми металлами.

Список источников

1. Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. Приказ Росрыболовства № 296 от 26.05.2025 г. 121 с..
2. Тарчевский И.А., Егорова А.М. Участие пролина в адаптации растений к действию стресс-факторов и его использование в агробиотехнологии (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 4. С. 315–329. DOI: 10.31857/S055510992204016X. EDN: YWXHZA.

3. Afkar E., Ababna H., Fathi A.A. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals // American Journal of Environmental Sciences. 2010. Vol. 6, № 3. P. 230–237. DOI: 10.3844/ajessp.2010.230.237.
4. Ali S.S., Hassan L.H.S., El-Sheekh M. Microalgae-mediated bioremediation: current trends and opportunities – a review // Archives of microbiology. 2024. Vol. 206, № 8. Art. 343. DOI: 10.1007/s00203-024-04052-x. EDN: SAPXKL.
5. Ankit, Baudh K., Korstad J. Phycoremediation: Use of algae to sequester heavy metals // Hydrobiology 2022. Vol. 1, № 3. P. 288–303. DOI: 10.3390/hydrobiology1030021. EDN: NBXIAE.
6. Arunakumara K.K.I.U., Zhang X. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae // Journal of Ocean University of China. 2008. Vol. 7, №1. P. 60–64. DOI: 10.1007/s11802-008-0060-y.
7. Bajguz A. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide // Plant Physiology and Biochemistry. 2000. Vol. 38, № 10. P. 797–801. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01185-2.
8. Barera S., Forlani G. Osmo-induced proline accumulation in *Chlorella vulgaris* SAG 211-11p // Journal of Applied Phycology. 2025. Vol. 37. P. 3557–3566. DOI: 10.1007/s10811-025-03607-9. EDN: DHRIMP.
9. Barera S., Forlani G. The role of proline in the adaptation of eukaryotic microalgae to environmental stress: an underestimated tool for the optimization of algal growth // Journal of Applied Phycology. 2023. Vol. 35. P. 1635–1648. DOI: 10.1007/s10811-023-03017-9. EDN: FDBSRA.
10. Bates L.S., Waldren R.P., Tear I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
11. Cavalletti E. et al. Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies // Toxics. 2022. Vol. 10. Art. 527. DOI: 10.3390/toxics10090527. EDN: QMZRHW.
12. Chen Z. et al. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress // Environmental science and pollution research international. 2016. Vol. 23, № 18. P. 17910–17918. DOI: 10.1007/s11356-016-6997-2. EDN: KQNHND.
13. Coelho L.M. et al. Bioremediation of polluted waters using microorganisms. In: Nasofumi S. (ed) Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil. InTech, Rijeka, Croatia, 2015. 23 p. DOI: 10.5772/60770.
14. Dwivedi S. Bioremediation of heavy metal by algae: Current and future perspective // Journal of Advanced Laboratory Research in Biology. 2012. Vol. 3, № 3. P. 195–199.
15. El-Enany A.E., Issa A.A. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus* // Folia microbiologica. 2001. Vol. 46, № 3. P. 227–230. DOI: 10.1007/BF02818538. EDN: JKVZRA.
16. El-Naggar A.H., Sheikh H.M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals // Life Science Journal. 2014. Vol. 11, № 10. P. 1349–1357. DOI: 10.7537/marslsj111014.197.
17. Exposito N. et al. Performance of *Chlorella vulgaris* exposed to heavy metal mixtures: linking measured endpoints and mechanisms // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021. Vol. 18, № 3. Art. 1037. DOI: 10.3390/ijerph18031037
18. Exposito N. et al. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures // The Science of the total environment. 2017. Vol. 601-602. P. 865–873. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.177.
19. Ganguly A. et al. Bioremediation of chromium (VI) and arsenic (III) using isolated microalgal (*Chlorella thermophila*): Analysis of growth, biomolecular compositions (carbohydrate, protein, chlorophyll) and biosorption kinetics // Algal Research. 2024. Vol. 82. Art. 103635. DOI: 10.1016/j.algal.2024.103635. EDN: RNPPXR.
20. Hassler C.S., Behra R., Wilkinson K.J. Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii* // Aquatic Toxicology. 2005. Vol. 74, № 2. P. 139–149. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.02.008.
21. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. Chemical analysis of microbial cells // Norris J.R., Ribbons D.W., (eds). Methods in Microbiology. New York: Academic Press, 1971. P. 209–344.
22. Islam M.M., Saxena N., Sharma D. Phytoremediation as a green and sustainable prospective method for heavy metal contamination: a review // RSC Sustainability. 2024. Vol. 2. Art. 1269. DOI: 10.1039/d3su00440f. EDN: WSBCBW.
23. Jiří M., Torzillo G., Koblížek M. Photosynthesis in microalgae. Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology / ed. by Richmond A. and Hu Q., 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2013. P. 21–56.
24. Jonson H.L. et al. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation // Environmental Toxicology. 2007. Vol. 22, № 3. P. 234–244. DOI: 10.1002/tox.20265.
25. Kaplan D. Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology / ed. by Richmond A. and Hu Q., 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2013. P. 602–611.
26. León-Vaz A. et al. Impact of heavy metals in the microalga *Chlorella sorokiniana* and assessment of its potential use in cadmium bioremediation // Aquatic Toxicology. 2021. Vol. 239. Art. 105941. DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.105941. EDN: CFETNS.

27. Li H. et al. Environment-enhancing process for algal wastewater treatment, heavy metal control and hydrothermal biofuel production: a critical review // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 298. Art. 122421. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122421. EDN: FUYXDC.
28. Mahlangu D. et al. Microalgae-mediated biosorption for effective heavy metals removal from wastewater: a review // *Water*. 2024. Vol. 16. Art. 718. DOI: 10.3390/w16050718. EDN: VNDKKC.
29. Manzoor F., Karbassi A., Golzary A. Removal of heavy metal contaminants from wastewater by using *Chlorella vulgaris* Beijerinck: a review // *Current Environmental Management*. 2019. Vol. 6, № 3. P. 174–187. DOI: 10.2174/2212717806666190716160536.
30. Mehta S.K., Gaur J.P. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris* // *New Phytologist*. 1999. Vol. 143, № 2. P. 253–259. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1999.00447.x.
31. Ogbonna J.C., Nweze N.O., Ogbonna C.N. Effects of light on cell growth, chlorophyll, and carotenoid contents of *Chlorella sorokiniana* and *Ankistrodesmus falcatus* in poultry dropping medium // *Journal of applied biology and biotechnology*. 2021. Vol. 9, № 2. P. 157–163. DOI: 10.7324/JABB.2021.9215.
32. Stauber J.L., Florence T.M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae // *Marine Biology*. 1987. Vol. 94. P. 511–519. DOI: 10.1007/bf00431397 EDN: AMREAY.
33. Wu J.T., Hsieh M.T., Kow L.C. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (*Chlorophyceae*) cells // *Journal of Phycology*. 1998. Vol. 34, № 1. P. 113–117. DOI: 10.1046/j.1529-8817.1998.340113.x.
34. Zhang W. et al. Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi metal toxicity and oxidative stress // *Metallomics*. 2015. Vol. 7. Art. 426. DOI: 10.1039/c4mt00253a. EDN: XQEFMT.
35. Zhou G.J. et al. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* // *Environmental science and pollution research international*. 2012. Vol. 19, № 7. P. 2918–2929. DOI: 10.1007/s11356-012-0800-9. EDN: ULCYYT.

References

1. Prikaz Rosrybolovstva ot 26.05.2025 g. No. 296 "Ob utverzhdenii normativov kachestva vody..." [Order of the Federal Agency for Fisheries of May 26, 2025, No. 296 "On approval of water quality standards..."]. (In Russ.).
2. Tarchevsky I.A., Egorova A.M. Participation of proline in plant adaptation to stress factors and its application in agrobiotechnology (Review). *Applied biochemistry and microbiology*. V. 58, No. 4 (2022): pp. 347–360. DOI: 10.1134/s0003683822040160.
3. Afkar E., Ababna H., Fathi A.A. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. *American Journal of Environmental Sciences*. V. 6, No. 3 (2010): pp. 230–237. DOI: 10.3844/ajessp.2010.230.237.
4. Ali S.S., Hassan L.H.S., El-Sheekh M. Microalgae-mediated bioremediation: current trends and opportunities – a review. *Archives of microbiology*. V. 206, No. 8 (2024). Art. 343. DOI: 10.1007/s00203-024-04052-x.
5. Ankit, Bauddh K., Korstad J. Phycoremediation: Use of algae to sequester heavy metals. *Hydrobiology*. V. 1, No. 3 (2022): pp. 288–303. DOI: 10.3390/hydrobiology1030021.
6. Arunakumara K.K.I.U., Zhang X. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University of China*. V. 7, No. 1 (2008): pp. 60–64. DOI: 10.1007/s11802-008-0060-y.
7. Bajguz A. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiology and Biochemistry*. V. 38, No. 10 (2000): pp. 797–801. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01185-2.
8. Barera S., Forlani G. Osmo-induced proline accumulation in *Chlorella vulgaris* SAG 211-11p. *Journal of Applied Phycology*. V. 37 (2025): pp. 3557–3566. DOI: 10.1007/s10811-025-03607-9.
9. Barera S., Forlani G. The role of proline in the adaptation of eukaryotic microalgae to environmental stress: an underestimated tool for the optimization of algal growth. *Journal of Applied Phycology*. V. 35 (2023): pp. 1635–1648. DOI: 10.1007/s10811-023-03017-9.
10. Bates L.S., Waldren R.P., Tear I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. V. 39 (1973): pp. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
11. Cavalletti E., Romano G., Palma Esposito F., Barra L., Chiaiese P., Balzano S., Sardo A. Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies. *Toxics*. V. 10 (2022). Art. 527. DOI: 10.3390/toxics10090527.
12. Chen Z., Song S., Wen Y., Zou Y., Liu H. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress. *Environmental science and pollution research international*. V. 23, No. 18 (2016): pp. 17910–17918. DOI: 10.1007/s11356-016-6997-2.
13. Coelho L.M., Rezende H.C., Coelho L.M., de Sousa P.A.R., Melo D.F.O., Coelho N.M.M. Bioremediation of polluted waters using microorganisms. In: Nasofumi S. (ed.) *Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil*. InTech, Rijeka, Croatia, 2015. 23 p. DOI: 10.5772/60770.
14. Dwivedi S. Bioremediation of heavy metal by algae: Current and future perspective. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. V. 3, No. 3 (2012): pp. 195–199.

15. El-Enany A.E., Issa A.A. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. *Folia microbiologica*. V. 46, No. 3 (2001): pp. 227-230. DOI: 10.1007/BF02818538.
16. El-Naggar A.H., Sheikh H.M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals. *Life Science Journal*. V. 11, No. 10 (2014): pp. 1349-1357. DOI: 10.7537/marslsj111014.197.
17. Exposito N., Carafa R., Kumar V., Sierra J., Schuhmacher M., Papiol G. Performance of *Chlorella vulgaris* exposed to heavy metal mixtures: linking measured endpoints and mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. V. 18, No. 3 (2021). Art. 1037. DOI: 10.3390/ijerph18031037.
18. Exposito N., Kumar V., Sierra J., Schuhmacher M., Gimenez Papiol G. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. *The Science of the total environment*. V. 601-602 (2017): pp. 865-873. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.177.
19. Ganguly A., Nag S., Bhowmick T.K., Gayen K. Bioremediation of chromium (VI) and arsenic (III) using isolated microalgal (*Chlorella thermophila*): Analysis of growth, biomolecular compositions (carbohydrate, protein, chlorophyll) and biosorption kinetics. *Algal Research*. V. 82 (2024). Art. 103635. DOI: 10.1016/j.algal.2024.103635.
20. Hassler C.S., Behra R., Wilkinson K.J. Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*. *Aquatic Toxicology*. V. 74, No. 2. (2005): pp. 139-149. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.02.008
21. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. Chemical analysis of microbial cells. In: Norris J.R., Ribbons D.W., (eds). *Methods in Microbiology*. New York, Academic Press, 1971, pp. 209-344.
22. Islam M.M., Saxena N., Sharma D. Phytoremediation as a green and sustainable prospective method for heavy metal contamination: a review. *RSC Sustainability*. V. 2 (2024). Art. 1269. DOI: 10.1039/d3su00440f.
23. Jiří M., Torzillo G., Koblížek M. Photosynthesis in microalgae. *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*, edited by Richmond A. and Hu Q., 2nd ed., Wiley-Blackwell, 2013, pp. 21-56.
24. Jonson H.L., Stauber J.L., Adams M., Jolley D.F. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. *Environmental Toxicology*. V. 22, No. 3 (2007): pp. 234-244. DOI: 10.1002/tox.20265.
25. Kaplan D. Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*, edited by Richmond A. and Hu Q., 2nd ed., Wiley-Blackwell, 2013, pp. 602-611.
26. León-Vaz A., León R., Giráldez I., Vega J.M., Vigara J. Impact of heavy metals in the microalga *Chlorella sorokiniana* and assessment of its potential use in cadmium bioremediation. *Aquatic Toxicology*. V. 239 (2021). Art. 105941. DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.105941.
27. Li H., Watson J., Zhang Y., Lu H., Liu Z. Environment-enhancing process for algal wastewater treatment, heavy metal control and hydrothermal biofuel production: a critical review. *Bioresource Technology*. V. 298 (2020). Art. 122421. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122421.
28. Mahlangu D., Mphahlele K., De Paola F., Mthombeni N.H. Microalgae-mediated biosorption for effective heavy metals removal from wastewater: a review. *Water*. V. 16 (2024). Art. 718. DOI: 10.3390/w16050718.
29. Manzoor F., Karbassi A., Golzary A. Removal of heavy metal contaminants from wastewater by using *Chlorella vulgaris* Beijerinck: a review. *Current Environmental Management*. V. 6, No. 3 (2019): pp. 174-187. DOI: 10.2174/2212717806666190716160536.
30. Mehta S.K., Gaur J.P. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist*. V. 143, No. 2 (1999): pp. 253-259.
31. Ogbonna J.C., Nweze N.O., Ogbonna C.N. Effects of light on cell growth, chlorophyll, and carotenoid contents of *Chlorella sorokiniana* and *Ankistrodesmus falcatus* in poultry dropping medium. *Journal of applied biology and biotechnology*. V. 9, No. 2 (2021): pp. 157-163. DOI: 10.7324/JABB.2021.9215.
32. Stauber J.L., Florence T.M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*. V. 94 (1987): pp. 511-519.
33. Wu J.T., Hsieh M.T., Kow L.C. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (*Chlorophyceae*) cells. *Journal of Phycology*. V. 34, No. 1 (1998): pp. 113-117. DOI: 10.1046/j.1529-8817.1998.340113.x.
34. Zhang W., Tan N.G.J., Fu B., Li S.F.Y. Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi metal toxicity and oxidative stress. *Metallomics*. V. 7 (2015). Art. 426. DOI: 10.1039/c4mt00253a.
35. Zhou G.J., Peng F.Q., Zhang L.J., Ying G.G. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental science and pollution research international*. V. 19, No. 7 (2012): pp. 2918-2929. DOI: 10.1007/s11356-012-0800-9.

Статья поступила в редакцию 20.05.2026; одобрена после рецензирования 28.05.2026; принята к публикации 01.06.2026.

The article was submitted 20.05.2026; approved after reviewing 28.05.2026; accepted for publication 01.06.2026.

Информация об авторах

В. В. Галямина – galhamina_v@mail.ru, канд. биол. наук, инженер Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

Д. Ю. Шаравин – dima-sharavin@yandex.ru, канд. биол. наук, м.н.с. Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии.

Information about the authors

V. V. Galyamina – galhamina_v@mail.ru, candidate of biology, engineer at the Laboratory of cellular immunology and nanobiotechnology;

D. Yu. Sharavin – dima-sharavin@yandex.ru, candidate of biology, junior researcher at the Laboratory of cellular immunology and nanobiotechnology.

Вклад авторов:

Галямина В. В. – развитие методологии; написание исходного текста; статистическая обработка материала; итоговые выводы.

Шаравин Д. Ю. – научное руководство; концепция исследования; доработка текста; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Galyamina V. V. – methodology; writing the original draft; formal analysis; final conclusions.

Sharavin D. Yu. – research supervision; research concept; text revision; final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.