

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
 Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
 Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 2016. 24(1), 103–108.

doi:10.15421/011612

ISSN 2310-0842 print
 ISSN 2312-301X online

www.ecology.dp.ua

УДК 547.979.7+582.263

Пігментний склад *Chlorella vulgaris* за дії селеніту натрію та іонів металів

О.І. Боднар, Г.Б. Вінярська, О.В. Василенко, В.В. Грубінко

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна

Досліджували вміст пігментів у *Chlorella vulgaris* Beij. (Chlorophyta) за дії селеніту натрію у концентраціях із розрахунку на Se^{4+} 0,5, 5,0, 10,0 і 20,0 мг/дм³ протягом однієї, трьох та семи діб дії та за одночасної дії селеніту в концентрації 10,0 мг Se^{4+} /дм³ і іонів Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} у концентраціях 5,00, 0,25, 0,05, 0,008 та 0,002, мг/дм³ відповідно протягом семи діб культивування водоростей із метою встановлення умов для отримання в аквакультурі ліпідної субстанції, збагаченої селеном і біоактивними металами. Вміст пігментів визначали спектрофотометрично. Клітинну стінку виділяли центрифугуванням у градієнті перколу та досліджували мікроскопіюванням. За дії 10,0 мг Se^{4+} /дм³ окремо та одночасно з іонами досліджених металів вміст пігментів у хлорели збільшується в 1,5–2,5 раза в усіх варіантах експериментального впливу унаслідок зв'язування SeO_3^{2-} білками та ліпідами. Селен включається до всіх фракцій ліпідів (триацилгліцероли, діацилгліцероли, фосфоліпіди, неестерифіковані жирні кислоти), а максимальна кількість селенумісних ліпідів відмічена у хлоропластах. Збільшення вмісту каротиноїдів за дії експериментальних чинників відіграє виняткову роль у механізмі антиоксидативного захисту, що оберігає від руйнування хлорофіл та, відповідно, збільшує його кількість у клітинах. Зміни у функціонуванні фотосинтетичного апарату *Ch. vulgaris* відбиваються на всьому комплексі метаболічних перетворень. За концентрації селеніту 10,0 мг Se^{4+} /дм³ і зазначених концентрацій іонів відповідних металів протягом 7 діб можливе успішне культивування хлорели, збагаченої селеном і біогенними металами.

Ключові слова: хлорела; селен (IV); мікроелементи; хлорофіли; каротиноїди; клітинна оболонка

Pigments content in *Chlorella vulgaris* under the influence of the sodium selenite and the ions of metals

O.I. Bodnar, H.B. Viniarska, O.V. Vasilenko, V.V. Grubinko

Ternopil National Pedagogical University named after Volodymyr Gnatiuk, Ternopil, Ukraine

We investigated the content of pigments in *Chlorella vulgaris* Beij. (Chlorophyta) under the influence of sodium selenite in concentrations based on Se^{4+} 0.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mg/dm³ during one, three and seven days and under the influence of the simultaneous action of selenite in concentrations 10 mg Se^{4+} /dm³ and ions of Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} in concentrations 5.00, 0.25, 0.05, 0.008 and 0.002 mg/dm³ over seven days. This research was carried out to establish the conditions for obtaining algal lipid substance enriched with selenium and biogenic metals in the aquaculture. The content of pigments was determined spectrophotometrically, the cellular walls were separated by centrifuge in the percoll gradient and investigated microscopically. The pigments content in the *Ch. vulgaris* increased by 1.5–2.5 times in comparison with the control sample under the influence of 10 mg Se^{4+} /dm³ with and without metal ions, in all variants of experimental influence due to binding of SeO_3^{2-} with proteins and lipids. We found that selenium was included in all lipid fractions (triacylglycerols, diacylglycerols, phospholipids, nonetherified fatty acids); the maximum amount of selenium-containing lipids was recorded in chloroplasts. The increase in the contents of carotenoids caused by the actions of experimental factors played an exceptional role in the mechanism of antioxidant protection that prevents destruction of chlorophyll and, accordingly, increases its amount in cells. Changes in the functioning of the photosynthetic apparatus of *Ch. vulgaris* affect the whole complex of metabolic transformation. Thus, the successful cultivation of chlorella, enriched with selenium and biogenic metals, is possible within seven days under the influence of 10 mg Se^{4+} /dm³ and the above-mentioned concentration of metal ions.

Keywords: chlorella; selenium (IV); microelements; chlorophyll; carotenoids; cellular wall

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027, Україна
 Ternopil National Pedagogical University named after Volodymyr Gnatiuk, M. Krivonis Str., 2, Ternopil, 46027, Ukraine
 Tel. +38-035-43-59-01. E-mail: bodnar_oi@yahoo.com, viniarska19@gmail.com, vasylenko_ol@ukr.net, v.grubinko@gmail.com

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 2016. 24(1)

Вступ

Селен як есенціальний мікроелемент у водоростей бере участь у багатьох метаболічних процесах, зокрема, в регулюванні фотосинтезу (Zhou et al., 1997). Проте сполуки селену у високих концентраціях виявляють токсичну дію, пригнічують ріст, викликають порушення метаболізму та можуть спричинити загибель водоростей (Minjuk et al., 2000). Вплив селену на водорості залежить від морфофункціональних особливостей їх окремих видів, концентрації сполук і ступеня окиснення селену у них, а також фізико-хімічних параметрів водного середовища (Bodnar et al., 2015). Доступність сполук селену для мікрводоростей також суттєво залежить від вмісту у культуральному середовищі іонів металів (Prevot and Soyer-Gobillard, 1986; Tsvetkova et al., 2016). Раніше нами показано, що іони деяких металів, насамперед біогенних, можуть як викликати порушення фізіолого-біохімічних процесів у водоростей, так і регулювати їх метаболізм у межах адаптивної реакції (Kostiuk and Grubinko, 2014; Grubinko et al., 2011). Результати цих робіт свідчать, що певні кількості сполук селену володіють здатністю знижувати токсичну дію окремих металів. Також селеніти розглядаються як джерело цього мікроелемента та здатні, взаємодіючи з іонами металів, сприяти їх накопиченню клітинами (Prevot and Soyer-Gobillard, 1986; Uminska, 1990). Високу біоаккумуляцію неорганічних солей та утворення їх біокомплексів із макромолекулами клітин водоростей *in vitro* можна використати для одержання біологічно активних добавок, що містять необхідні мікроелементи, включно селен та іони біогенних металів (Zolotareva et al., 2008; Grubinko et al., 2014; Goltvjans'kyj, 2002).

Стійкість водоростей до екстремальних відхилень показників чинників навколишнього середовища забезпечується адаптаціями, насамперед фотосинтетичного апарату, який формує адаптаційний статус клітин водоростей шляхом біосинтезу ліпідів. Останні є джерелом енергії, а також забезпечують адаптивні структурно-функціональні перебудови мембран (Vance et al., 2002).

За дії на водорості стресових чинників змінам насамперед піддається фотосинтетичний апарат клітин (Buchanam et al., 2015). Особливий інтерес для вивчення викликає адаптивна роль фотосинтетичних пігментів – хлорофілів а, b, каротиноїдів, феофітинів (Sun et al., 2014). Зміни, що викликають екстремальні стани у клітинах, індукують утворення вторинної клітинної стінки, що є структурою, виявленою у багатьох рослинних клітинах, розташованою між першою стінкою клітин і плазматичною мембраною (Buchanam et al., 2015). Раніше ми встановили формування такої стінки, яку назвали феноменом утворення «подвійних концентричних мембран» (Grubinko and Kostiuk, 2012), за дії іонів цинку при досягненні критичних рівнів його накопичення. При цьому з пулу метаболітів вилучаються необхідні сполуки для зв'язування токсикантів, що також вимагає посилення біосинтетичних процесів (Gorda and Grubinko, 2011). Дослідження змін, що відбуваються у фотосинтетичному апараті *Chorella vulgaris* Beij. – один із важливих етапів комплексного оцінювання впливу селеніту натрію та іонів металів на водорості.

Мета дослідження – встановити зміни пігментного складу та особливості морфології клітинної стінки у *Ch. vulgaris* за дії селеніту натрію окремо та за його спільної дії з іонами металів, установити оптимальні концентрації цих речовин для отримання альгосубстанції, збагаченої селеном та іонами біоактивних металів.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на мікропопуляціях альгологічно чистої культури *Chorella vulgaris* Beij. ССАР-211/11в (Chlorophyta), яку вирощували в умовах накопичувальної культури на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера та Горхема № 11 за температури +22...+25 °С та освітлення 2500 лк, 16/8 год (Торачевскій, 1975). В експерименті до культури водоростей, відібраних у логарифмічній фазі росту, додавали водний розчин селеніту натрію у розрахунку на Se^{4+} – 0,5, 5,0, 10,0 і 20,0 мг/дм³. Біомасу живих клітин відбирали на першу, третю та сьому добу експерименту.

Для вивчення спільної дії селеніту натрію та іонів металів селеніт вносили із розрахунку на Se^{4+} – 10,0 мг/дм³, а солі металів у розрахунку на іон металу: Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 5 мг/дм³, Mn^{2+} (MnSO_4) – 0,25 мг/дм³, Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 0,002 мг/дм³, Fe^{3+} ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) – 0,008 мг/дм³, Co^{2+} (CoSO_4) – 0,05 мг/дм³. Контролем була культура, яку вирощували у середовищі без селеніту та солей металів. Відбір проб для аналізу здійснювали на сьому добу культивування.

Вміст хлорофілів а та b і каротиноїдів визначали спектрофотометрично за довжин хвиль, що відповідають їх максимумам поглинання: 430, 480, 630, 645, 663 та 750 нм після їх екстракції 90% розчином ацетону (Торачевскій, 1975). Визначення феопігментів здійснювали вимірюванням різниці оптичних щільностей екстракту пігментів за 665 нм до підкислення проби 0,1 N хлоридною кислотою і 5 хв після цього (Romanenko, 2006).

Клітинну стінку виділяли із гомогенатів водоростей в 40мМ трис-НСІ (рН 7,6) за методикою Фіндлея та Еванса (Findley and Evans, 1987) як описано нами раніше (Grubinko and Kostiuk, 2012). Морфологічні зміни клітин фіксували за допомогою мікроскопа МБІ-15 із наступним інтегрованим цифровим аналізом на комплексі «SSTU-camera Manual Vision SSD-color-WOYV00020» після їх фарбування «хлор – цинк – йод» реактивом (Broda, 1971). Статистичне опрацювання здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програми Statistica 6.0 після попереднього аналізу нормальності розподілу.

Результати та їх обговорення

Максимальне збільшення вмісту хлорофілу а щодо контролю (більше ніж утричі) виявлено за дії селеніту натрію у концентраціях 0,5 та 20,0 мг/дм³ на сьому добу дії (табл. 1). За дії селеніту у концентрації 0,5 мг/дм³ на першу та третю добу експозиції вміст хлорофілу а зріс на 36,2% та 68,5% щодо контролю відповідно, а за концентрації 20 мг/дм³ – більше ніж у 2,6 раза, починаючи з першої доби досліду. За дії селеніту у концентрації

10,0 мг/дм³ вміст хлорофілу а на третю та сьому добу збільшився відповідно на 48,7% та 81,7% щодо контролю. За дії селеніту у концентрації 5,0 мг/дм³ відмічено зменшення вмісту цього пігменту щодо контролю на 16,8% на

першу добу експозиції та на 27,4% – на третю добу дії. На сьому добу кількість хлорофілу а була незначно вищою, ніж у контролі.

Таблиця 1

Вміст пігментів у клітинах *Ch. vulgaris* за дії селеніту натрію (M ± m, n = 5)

Концентрація Se ⁴⁺ , мг/дм ³	Тривалість культивування хлорели із селенітом натрію, діб	Вміст пігментів			
		Хлорофіл а, мкг/дм ³	Хлорофіл b, мкг/дм ³	Співвідношення хлорофілів a/b	Пігментний індекс: сума каротиноїдів / хлорофіл а
контроль		160,1 ± 9,0	81,7 ± 5,0	1,96	0,22
0,5	1	218,2 ± 12,2*	146,4 ± 8,8*	1,49	0,33
	3	269,8 ± 14,7*	190,8 ± 10,5*	1,41	0,27
	7	494,2 ± 30,2*	231,8 ± 15,7*	2,13	0,20
5,0	1	133,3 ± 5,7*	106,1 ± 6,5*	1,26	0,38
	3	116,3 ± 9,2*	102,9 ± 7,4*	1,13	0,62
	7	168,7 ± 8,3	131,0 ± 9,4*	1,29	0,32
10,0	1	208,3 ± 22,2	105,8 ± 12,8	1,97	0,42
	3	309,7 ± 21,7*	137,1 ± 10,9	2,26	0,34
	7	378,4 ± 26,8*	149,5 ± 9,8*	2,53	0,27
20,0	1	431,1 ± 24,2*	138,6 ± 7,2*	3,11	0,11
	3	435,8 ± 24,6*	199,6 ± 11,1*	2,18	0,14
	7	501,3 ± 30,6*	238,5 ± 13,9*	2,10	0,13

Примітка: * – тут і в наступних таблицях відмінності показників щодо контролю вірогідні за P < 0,05.

Щодо вмісту хлорофілу b, то за дії селеніту натрію в усіх досліджуваних концентраціях виявили його збільшення щодо контролю: як і у випадку із хлорофілом а, максимальне збільшення спостерігали за дії 0,5 та 20,0 мг Se⁴⁺/дм³. На першу добу експерименту за дії селеніту в концентрації 0,5 мг/дм³ вміст цього пігменту зріс на 79,2% щодо контролю. На третю та сьому добу вміст хлорофілу b перевищував його вміст у контролі більше ніж удвічі. За дії селеніту в концентрації 20,0 мг/дм³ вміст цього пігменту збільшився на 69,7% щодо контролю. На третю добу вміст хлорофілу b перевищував контрольний показник удвічі. На сьому добу кількість пігменту зменшилася, проте перевищувала значення в контролі на 69,6%.

Вміст каротиноїдів за дії селеніту натрію в усіх досліджуваних концентраціях збільшувався (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст каротиноїдів і феофітинів у клітинах *Ch. vulgaris* за дії селеніту натрію (M ± m, n = 5)

Концентрація Se ⁴⁺ , мг/дм ³	Тривалість культивування хлорели із селенітом натрію, діб	Вміст пігментів	
		Каротиноїди, мкгSPU/дм ³	Феофітини, мкг/дм ³
контроль		35,1 ± 1,9	154,9 ± 9,3
0,5	1	71,3 ± 4,0*	217,6 ± 12,0*
	3	73,1 ± 4,1*	273,0 ± 14,8*
	7	97,0 ± 5,7*	478,7 ± 26,9*
5,0	1	50,0 ± 2,3*	112,2 ± 10,5*
	3	72,0 ± 3,7*	107,0 ± 3,0*
	7	54,0 ± 4,2*	97,5 ± 0,8*
10,0	1	87,5 ± 7,3	211,5 ± 26,5
	3	104,2 ± 9,1	215,2 ± 3,9*
	7	103,1 ± 7,2	166,8 ± 17,8*
20,0	1	46,3 ± 2,9*	413,3 ± 23,4*
	3	62,0 ± 3,5*	320,5 ± 18,1*
	7	64,5 ± 3,4*	340,4 ± 18,5*

Максимальне збільшення вмісту цих пігментів відмітили за дії селеніту у концентрації 0,5 мг/дм³ упродовж

усієї експозиції та за концентрації 5,0 мг/дм³ на третю добу досліду – більше ніж удвічі щодо контролю. За дії селеніту в концентрації 10,0 мг/дм³ на третю та сьому добу експерименту вміст каротиноїдів перевищував контрольні показники на 19,1% та 17,8% відповідно. За дії селеніту в концентрації 20,0 мг Se⁴⁺/дм³ вміст каротиноїдів збільшився на 32,1% та 76,3% на першу та третю добу відповідно. На сьому добу вміст цих пігментів перевищував контрольні показники на 83,9%.

Щодо феофітинів, то динаміка їх вмісту була подібною до змін вмісту хлорофілу а: на сьому добу за дії селеніту в концентрації 0,5 мг/дм³ і впродовж усієї тривалості досліду в концентрації 20,0 мг Se⁴⁺/дм³ відмічене збільшення їх кількості більше ніж удвічі щодо контролю (табл. 2). За концентрації 5,0 та 10,0 мг/дм³ спостерігали зменшення вмісту феофітинів щодо контролю на сьому добу на 37,1% та 21,1% відповідно.

Незважаючи на збільшення загального вмісту фотосинтетичних пігментів за дії селеніту в концентрації 0,5 мг/дм³, співвідношення хлорофілів a/b зменшилося щодо контролю на першу добу на 23,9%, на третю – на 27,9%. Щодо пігментного індексу, то за дії цієї концентрації селеніту внаслідок збільшення біосинтезу каротиноїдів порівняно із хлорофілом а його показник зростав: на першу добу на 49,3%, на третю – на 23,7% щодо контролю. На сьому добу експозиції співвідношення між пігментами було близьким до значень у контролі.

За дії 5,0 мг Se⁴⁺/дм³ співвідношення між обома формами хлорофілу змінилося: на першу добу показник зменшився на 35,9%, на третю – на 42,3%, на сьому – на 34,3% відносно контролю. Пігментний індекс при цьому збільшився: на першу добу на 71,4%, на третю – у 2,8 рази, на сьому – на 46,2% щодо контролю. Можливо, це пов'язано з перетворенням «молодих» молекул хлорофілу а на хлорофіл b, що відбувається у темновій фазі фотосинтезу (Shlyk, 1975).

Внесення селеніту в концентрації 10,0 мг Se⁴⁺/дм³ так само, як і за концентрації 0,5 мг/дм³, сприяло збіль-

шенню загальної кількості фотосинтетичних пігментів. Проте співвідношення хлорофілів а/в перевищувало контрольні показники упродовж усього періоду досліду: на третю добу – на 14,8%, на сьому – на 28,5% (зумовлено переважанням утворення хлорофілу а). Пігментний індекс за рахунок меншої інтенсивності утворення каротиноїдів порівняно із зеленими пігментами зменшився: на третю добу – на 19,3%, на сьому – на 35,2%. Таку саму тенденцію відмітили за дії 20,0 мг Se⁴⁺/дм³: відбулося значне зростання вмісту всіх пігментів та збільшення співвідношення хлорофілів а/в (на першу добу – на 58,7%, на третю – на 11,1%, на сьому – на 7,2% щодо контролю). Як і за дії 0,5 мг Se⁴⁺/дм³ показник цього співвідношення наприкінці експозиції наближався до значень у контролі. Пігментний індекс зменшився удвічі на першу добу, на третю перевищував контрольні показники на 34,9%, на сьому – на 41,3%. Співвідношення хлорофілів а/в може характеризувати

потенційну фотохімічну та біосинтетичну активність водорості. За стресових впливів відбувається зменшення вмісту хлорофілу а як менш стійкого порівняно із хлорофілом b, та, відповідно, співвідношення між цими формами пігменту зменшується. При цьому пігментний індекс зростає за рахунок посиленого утворення каротиноїдів, які виконують як допоміжну, так і захисну функцію у процесі фотосинтезу. Такі зміни відмічені за дії 5,0 мг Se⁴⁺/дм³. Збільшення вмісту хлорофілу а, а отже, і збільшення показника співвідношення хлорофілів а/в порівняно з контролем – ознака успішного формування фізіологічної адаптації хлорели (Grubinko et al., 2014; Gorda and Grubinko, 2011), що найяскравіше виявилось за 10,0 мг Se⁴⁺/дм³ протягом семи діб дії. Саме ці умови змодельовані в наступних дослідженнях.

За спільної дії селеніту натрію та іонів металів у всіх варіантах експерименту вміст зелених пігментів у хлорели зростав (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст пігментів у клітинах *Ch. vulgaris* за одночасної дії селеніту натрію та іонів металів протягом 7 діб культивування (M ± m, n = 5)

Варіант досліду	Хлорофіл а, мкг/дм ³	Хлорофіл b, мкг/дм ³	Співвідношення хлорофілів а/в	Пігментний індекс: <u>сума каротиноїдів</u> хлорофіл а
контроль	142,2 ± 19,0	60,6 ± 5,2	2,35	0,33
10 мг Se ⁴⁺ /дм ³	193,1 ± 12,2	90,1 ± 9,7	2,14	0,33
Se ⁴⁺ +Co ²⁺	189,6 ± 10,0	118,0 ± 3,4*	1,61	0,37
Se ⁴⁺ +Mn ²⁺	252,2 ± 8,1*	185,5 ± 16,2*	1,36	0,32
Se ⁴⁺ +Cu ²⁺	295,6 ± 9,9*	239,5 ± 9,1*	1,23	0,25
Se ⁴⁺ +Zn ²⁺	280,0 ± 10,6*	229,8 ± 2,5*	1,22	0,27
Se ⁴⁺ +Fe ³⁺	257,2 ± 20,3*	243,7 ± 5,7*	1,06	0,28

За дії Se⁴⁺+Co²⁺ кількість хлорофілу а збільшилася на 33,4% порівняно з контролем та була близькою до показників, зафіксованих за дії селеніту. За дії Se⁴⁺+Mn²⁺ ці показники збільшилися на 77,3% та 30,6% відповідно, за дії Se⁴⁺+Zn²⁺ – на 96,9% та 45,0%, за дії Se⁴⁺+Fe³⁺ – на 80,8% та 33,7%, за дії Se⁴⁺+Cu²⁺ – у 2,1 та 1,5 раза відповідно.

Вміст хлорофілу b зріс на 94,8% порівняно з контролем за дії Se⁴⁺+Co²⁺ та на 30,9% порівняно з дією селеніту окремо, за дії Se⁴⁺+Mn²⁺ ці показники збільшилися у 3,1 та у 2,1 раза відповідно, за дії Se⁴⁺+Zn²⁺ – у 3,8 та у 2,6 раза, за дії Se⁴⁺+Fe³⁺ – у 4,0 та у 2,7 раза, за дії Se⁴⁺+Cu²⁺ – у 4,0 та 2,6 раза відповідно (табл. 3). Вміст каротиноїдів у клітинах хлорели за дії Se⁴⁺ та іонів металів також збільшився порівняно з контролем (табл. 4).

Таблиця 4

Вміст каротиноїдів та феофітинів у клітинах *Ch. vulgaris* за одночасної дії селеніту натрію та іонів металів протягом 7 діб культивування (M ± m, n = 5)

Варіант досліду	Каротиноїди, мкСПУ/дм ³	Феофітини, мкг/дм ³
контроль	46,4 ± 6,5	211,5 ± 26,5
10 мг Se ⁴⁺ /дм ³	64,0 ± 4,0	166,8 ± 6,6*
Se ⁴⁺ +Co ²⁺	70,2 ± 4,0*	88,7 ± 8,2
Se ⁴⁺ +Mn ²⁺	81,1 ± 5,3*	240,4 ± 5,3*
Se ⁴⁺ +Cu ²⁺	74,6 ± 6,9	211,6 ± 20,0
Se ⁴⁺ +Zn ²⁺	74,6 ± 9,2	137,1 ± 6,1
Se ⁴⁺ +Fe ³⁺	71,0 ± 6,9	159,1 ± 2,3

При цьому кількість каротиноїдів за одночасної дії селеніту та металів незначно відрізнялася від показників за дії селеніту окремо. За дії Se⁴⁺+Co²⁺ вміст цих пігментів збільшився на 51,4% порівняно з контролем і на 9,7% порівняно з дією селеніту окремо. За дії Se⁴⁺+Mn²⁺ кількість каротиноїдів зросла на 74,7% щодо контролю, та на 26,6% щодо дії селеніту, за дії Se⁴⁺+Cu²⁺ – на 60,8% та 16,6% відповідно, за дії Se⁴⁺+Zn²⁺ – на 60,7% та 16,5%, за дії Se⁴⁺+Fe³⁺ на 52,9% та 10,9% відповідно.

Щодо феофітинів, то за дії селеніту їх кількість зменшилась на 21,1% порівняно з контролем. Така сама тенденція зберігається за дії Se⁴⁺+Zn²⁺ (на 48,1% щодо контролю) та за дії Se⁴⁺+Fe³⁺ (на 54,9% щодо контролю). За дії Se⁴⁺+Cu²⁺ вміст феофітинів близький до контрольних значень, а за дії Se⁴⁺+Mn²⁺ – на 13,7% переважав показники в контролі (див. табл. 4).

Отже, за спільної дії селеніту натрію та іонів металів порівняно із дією селеніту окремо значно збільшується вміст хлорофілів а та b. Вміст каротиноїдів теж збільшується відносно контролю, проте порівняно з дією селеніту зміни їх кількості у клітинах водорості несуттєві. Цікаво те, що на тлі збільшення кількості пігментів за дії селеніту натрію пігментний індекс і показник співвідношення хлорофілів а/в суттєво не змінюється порівняно з контролем, що свідчить про відсутність негативного впливу селеніту на фотосинтетичну систему хлорели. Внесення в середовище культивування хлорели із селенітом натрію солей металів викликало зменшення співвідношення хлорофілів удвічі. Пігментний індекс переважно був ниж-

чим порівняно з контролем, лише за дії $\text{Se}^{4+}+\text{Co}^{2+}$ його показник збільшився на 12,3%. Проте це може бути зумовлено збільшенням кількості хлорофілу а внаслідок запобігання руйнуванню хлорофілу за дії селеніту, а також окисненню ліпідів мембран хлоропластів, що забезпечується антиоксидантним механізмом захисту, що посилюється за наявності іонів металів, які входять до активних центрів цих ферментів (Demmig, 1990).

Хлорофіл а входить до складу реакційних центрів і периферичних комплексів фотосистем I і II, а хлорофіл b – компонент світлозбірного комплексу фотосистеми II. Тому зміна співвідношення хлорофілів a/b може свідчити про зміщення стехіометричної рівноваги між комплексами реакційних центрів обох фотосистем і світлозбірного комплексу фотосистеми II. Основними причинами зниження активності ФС II за надмірної кількості іонів металів у клітинах є зміна структури білків реакційного центру та заміщення іонами деяких металів атомів тих металів, що входять до складу реакційного центру (Mn^{2+} , Ca^{2+}). Мішень дії іонів металів, як правило, – первинний донор електронів реакційного центру фотосистеми II П-680, відновник феофітину. Можливо, іони металів, пошкоджуючи П-680, зумовлюють зменшення вмісту феофітину в клітинах водорості (табл. 4). Феофітини – перші переносники електронів у фотосистемі II. Оскільки відомо, що кількість цих пігментів прямо пропорційна кількості реакційних центрів фотосистеми II, такі зміни їх вмісту свідчать про зменшення функціональної активності реакційних центрів фотосинтезу (Prasad and Strzalka, 1999). Можлива причина інгібування іонами металів фотосинтетичного електронного транспорту – зміни ультраструктури хлоропластів, зокрема, пошкодження тилакоїдів (Maksymiec et al., 1992).

Зміни вмісту хлорофілів можуть напряму залежати від змін кількості каротиноїдів. Останні, завдяки своїм антиоксидантним властивостям, беруть участь у захисті фотосинтетичних мембран від фотоокиснення та знешкодження пероксидних радикалів, що запобігає окисненню ліпідів мембран хлоропластів, руйнуванню хлорофілу (Demmig, 1990) і, відповідно, збільшує вміст зелених пігментів

у клітинах. Внесення селеніту натрію у середовище культивування хлорели супроводжується збільшенням вмісту фотосинтетичних пігментів у клітинах водорості майже в усіх досліджених випадках. Можливо, це зумовлено потребою оновлення хлоропластів, що частково втратили фотосинтетичну ефективність. Останнє могло відбутися унаслідок зв'язування іонів SeO_3^{2-} ліпідами та хлорофіл-білковими комплексами (Zhou et al., 1997). Селен присутній у всіх фракціях ліпідів, а максимальна кількість селенумісних ліпідів відмічена в каротиноїдах (Gennity et al., 1984; Vinyarska et al., 2014). Збільшення вмісту каротиноїдів, у свою чергу, відіграє важливу роль у механізмі антиоксидантного захисту фотосинтетичних мембран, що оберігає від руйнування хлорофіл (Mager and Kruijff, 1995) і, відповідно, збільшує його кількість у клітинах. Ці зміни у функціонуванні фотосинтетичного апарату *Ch. vulgaris* відбиваються на всьому комплексі метаболічних перетворень.

Збільшення пігментного індексу пояснюється тим, що за несприятливих умов у першу чергу руйнується хлорофіл а, а каротиноїди більш стійкі. Останні – важливі протектори зелених пігментів, а також неферментні антиоксиданти компонентів клітин. У процесі біотрансформації цих пігментів утворюються фізіологічно значимі метаболіти, які беруть участь у регуляції адаптації до умов середовища, зокрема, до впливу селеніту натрію та іонів металів. Особливо чітко успішне формування адаптивних пристосувань водорості на стресові чинники простежується за дії селеніту у концентрації 10,0 мг $\text{Se}^{4+}/\text{дм}^3$, та його одночасної дії з Zn^{2+} .

За дії селеніту натрію у концентрації 10,0 мг $\text{Se}^{4+}/\text{дм}^3$ на сьому добу у клітинах хлорели виявлено потовщення мембран (рис.). Розміри ядерно-цитоплазматичного простору клітин змінилися на 3,5%, а товщина зовнішньої частини оболонки – на 12,2% щодо контролю (табл. 5). Раніше було показано, що іони цинку у концентрації 5,0 мг/дм³ спричиняють зменшення лінійних розмірів клітин хлорели вдвічі та утворення другого кола клітинної стінки (Grubinko and Kostiuk, 2012).

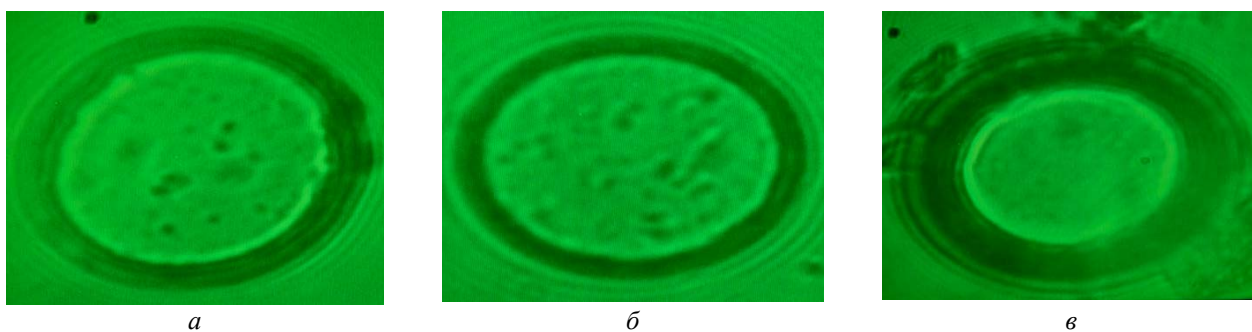


Рис. Мікрофотографії клітин *Ch. vulgaris*: а – контроль, б – за дії 10 мг $\text{Se}^{4+}/\text{дм}^3$, в – за одночасної дії $\text{Se}^{4+}+\text{Zn}^{2+}$; $\times 9000$

Таблиця 5
Основні морфометричні параметри клітин *Ch. vulgaris* за дії селеніту натрію в концентрації 10 мг $\text{Se}^{4+}/\text{дм}^3$ та спільно з іонами цинку в концентрації 5,0 мг/дм³

Умови культивування водорості	Діаметр клітин, мкм	Відстань від центру клітини до внутрішнього кола клітинної стінки, мкм	Відстань від центру клітини до зовнішнього кола клітинної стінки, мкм	Товщина клітинної стінки, мкм
Контроль	3,95 ± 0,35	1,52 ± 0,16	1,98 ± 0,18	0,46 ± 0,12
10 мг $\text{Se}^{4+}/\text{дм}^3$	3,81 ± 0,49	1,39 ± 0,20	1,90 ± 0,24	0,51 ± 0,09
$\text{Se}^{4+}+\text{Zn}^{2+}$	3,56 ± 0,48*	1,17 ± 0,16*	1,78 ± 0,24	0,61 ± 0,10

За одночасної дії селеніту та іонів цинку на сьому добу також відмітили зменшення ядерно-плазматичного простору на 4,4% та потовщення концентричної системи клітинної стінки на 29,1%. При цьому зміни у фотосинтетичному апараті вказували на успішне формування адаптації клітин хлорели до зазначених чинників.

Висновки

Динаміка вмісту фотосинтетичних пігментів, зміни у їх співвідношенні, а також морфологічні зміни свідчать про успішне формування адаптацій у хлорели у відповідь на вплив іонів металів за умов унесення в культуральне середовище селеніту натрію. У зв'язку із цим за концентрації селеніту 10,0 мг $\text{Se}^{4+}/\text{дм}^3$ і зазначених концентрацій іонів відповідних металів протягом 7 діб можливе успішне культивування хлорели, збагаченої селеном і біогенними металами.

Бібліографічні посилання

- Bodnar, O.I., Vinyarskaya, G.B., Stanislavchuk, G.V., Grubinko, V.V., 2015. Peculiarities of selenium accumulation and its biological role in algae (A review). *Hydrobiological Journal* 51(1), 63–78.
- Broda, B., 1971. *Methods histochemistry of plants*. State Agency Medical Publishing House, Warsaw (in Polish).
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Wiley, Oxford.
- Demmig-Adams, B., 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 1–24.
- Findley, J.B.C., Evans, W.H., 1987. *Biological membranes: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Gennity, J.M., Bottino, N.R., Zingaro, R.A., 1984. The binding of selenium to the lipids of two unicellular marine algae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118(1), 176–182.
- Goltvjans'kyj, A.V., 2002. Bioakumuljacija ioniv metaliv klitynamy zelenyh vodorostej ta oderzhannja biomasy bagatoi' na mikroelementy [Bioaccumulation of metal ions by green algae cells and production of biomass enriched with microelements]. Kyiv (in Ukrainian).
- Gorda, A.I., Grubinko, V.V., 2011. Biosyntezy lipidiv u *Chlorella vulgaris* Beijer. za dii' Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ta Pb^{2+} [Biosynthesis of lipids in *Chlorella vulgaris* Beijer. under the action of Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Pb^{2+}]. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine* 11, 137–142 (in Ukrainian).
- Gorda, A.I., Grubinko, V.V., 2011. Vplyv dyzel'nogo palyva na biosyntezy protei'niv, vuglevodiv i lipidiv u *Chlorella vulgaris* Beijer [Effect of diesel fuel on biosynthesis of proteins, carbohydrates and lipids in *Chlorella vulgaris* Beijer]. *Biotechnology Journal* 4(6), 74–81 (in Ukrainian).
- Grubinko, V.V., Gorda, A.I., Bodnar, O.I., Klochenko, P.D., 2011. Metabolism of algae under the impact of metal ions of the aquatic medium (A review). *Hydrobiological Journal* 47(6), 75–88.
- Grubinko, V.V., Kostiuk, K.V., 2012. Structural changes in the cellular membranes of the aquatic plants under the impact of toxic substances. *Hydrobiological Journal* 48(2), 40–54.
- Grubinko, V.V., Kostiuk, K.V., Lutsiv, A.I., 2014. Structural adaptations of cell walls of *Chlorella vulgaris* Beijer. under the action of ions zinc and lead. *Algologija* 24(3), 282–287.
- Kostiuk, K.V., Grubinko, V.V., 2014. Ion processes in the cell membranes of the aquatic plants under the toxic substances impact. *Hydrobiological Journal* 50(3), 80–89.
- Mager, W.H., Kruijff, A.J.J., 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59(3), 506–531.
- Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., Baszyński, T., 1992. Changes in acyl lipid and fatty acid composition in thylakoids of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J. Plant Physiol.* 140, 52–55.
- Minjuk, G.S., Trenkenshu, R.P., Alisievich, A.V., Drobeckaja, I.V., 2000. Vlijanie selena na rost vodorosli *Spirulina platensis* (Nords.) v nakopitel'noj i kvazinepreryvnoj kul'turah [Effect of selenium on the growth of algae *Spirulina platensis* (Nords.) in the storage and quasi-continuous cultures]. *Ekologija Morja* 54, 42–49 (in Russian).
- Prasad, M.N.V., Strzalka, K., 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- Prevot, P., Soyer-Gobillard, M.O., 1986. Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, *Prorocentrum micans* and *Cryptocodinium cohnii*. *J. Protozool.* 33(1), 42–47.
- Romanenko, V.D. (ed.), 2006. *Metody gidrobiologichnyh doslidzhen' poverhnevih vod* [Methods of hydroecological investigation of surface waters]. Logos, Kyiv (in Ukrainian).
- Shlyk, A.A. (ed.), 1975. *Biosyntezy i sostojanie hlorofilov v rastenii* [Biosynthesis and condition of chlorophylls in plants]. Nauka i Tehnika, Minsk (in Russian).
- Sun, X., Zhong, Y., Huang, Z., Yang, Y., 2014. Selenium accumulation in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments. *PLoS ONE* 9(11), e112270.
- Topachevskij, A.V. (ed.), 1975. *Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovanija vodoroslej v gidrobiologicheskoy praktike* [Methods of physiological and biochemical research of algae in hydrobiological practice]. Naukova Dumka, Kyiv (in Russian).
- Tsvetkova, N.M., Pakhomov, O.Y., Serdyuk, S.M., Yakyba, M.S., 2016. *Biologichne riznomanittja Ukrajinny. Dnipropetrovs'ka oblast. Grunty. Metaly u gruntah* [Biological diversity of Ukraine. The Dnipropetrovsk region. Soils. Metals in the soils]. Lira, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).
- Uminka, R., 1990. Selenium in human environment. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 41, 25–34.
- Vance, J.E., Vance, D.E., Schmid, K.M., Ohlrogge, J.B., 2002. *Lipid metabolism in plants. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier, Amsterdam.
- Vinyarska, H.B., Bodnar, O.I., Stanislavchuk, A.V., Grubinko, V.V., 2014. Zv'jazuvannja selenu *Chlorella vulgaris* u kul'turi [The binding of selenium by *Chlorella vulgaris* in the culture]. *Ukrainian Biochemical Journal* 86(5), 50–51 (in Ukrainian).
- Zhou, Z., Li, P., Liu, Z., Liu, X., 1997. Study on the accumulation of selenium and its binding to the proteins, polysaccharides and lipids from *Spirulina maxima*, *Spirulina platensis* and *Spirulina subsalsa*. *Oceanol. Limnol. Sin.* 28(4), 363–370.
- Zolotareva, O.K., Shnyukova, E.I., Sivash, O.O., Mikhaylenko, N.F., 2008. *Perspektyvy vykorystannja mikrovdorostej u biotekhnologii* [Prospects of the use of microalgae in biotechnology]. Alterpres, Kyiv (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 19.01.2016