

ВПЛИВ ДИЗЕЛЬНОГО ПАЛИВА НА БІОСИНТЕЗ ПРОТЕЇНІВ, ВУГЛЕВОДІВ І ЛІПІДІВ У *Chlorella vulgaris* Beijer.

А. І. Горда
В. В. Грубінко

Тернопільський національний педагогічний університет
ім. В. Гнатюка

E-mail: hiazunt@mail.ru

Одержано 07.02.2011

Розроблення технологій використання водоростей не тільки для індикації та очищення забрудненої води, але й для виробництва біопалива є на сьогодні вельми актуальним. Серед прісноводних видів на особливу увагу заслуговують *Chlorella vulgaris* і *Poecilia reticulata*, які здатні витримувати і метаболізувати компоненти нафти у річках Західного регіону України.

Наведено дані про вплив дизельного палива (0,5 мл/л) на інтенсивність біосинтезу протеїнів, вуглеводів та ліпідів, оціненого за включенням ¹⁴C-ацетату та ¹⁴C-бікарбонату, і вміст пігментів у клітинах одноклітинної зеленої водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. Встановлено, що дизельне паливо стимулює інтенсивність синтезу протеїнів і ліпідів, а синтез вуглеводів пригнічує. Відносний вміст триацилгліцеролів, діацилгліцеролів та неетерифікованих жирних кислот у клітинах водорості збільшується. Вміст хлорофілів *a* і *b* зростає, однак з подовженням терміну культивування водорості в токсичному середовищі до 7 діб — істотно зменшується. Максимальний термін культивування водорості, протягом якого дизпаливо не пригнічує метаболізм у клітинах, становить 7 діб, що можна вважати оптимальним терміном для біотехнологічного культивування хлорели разом з дизпаливом.

Ключові слова: *Chlorella vulgaris* Beijer., включення ¹⁴C-ацетату і ¹⁴C-бікарбонату, протеїни, вуглеводи, ліпіди, хлорофіл, дизельне паливо.

Останнім часом ґрунтовно розробляються технології використання водоростей не тільки для індикації та очищення забрудненої води, але й для виробництва біопалива [1, 2, 3]. Підставою для цього є великий вміст в клітинах окремих представників морської та прісноводної альгофлори ліпідів (до 80% сухої маси), що значно перевищує вміст їх в олійних культурах наземних рослин, зокрема ріпаку (6%). Це дає можливість використовувати їх для отримання компонентів біопалива, яке не містить сірки, повністю розкладається мікроорганізмами і тому відносно нешкідливе для природного середовища [2, 3]. Наприклад, вміст ліпідів у *Scenedesmus dimorphus* може коливатися в межах 16–40%, у *Chlorella vulgaris* — 14–22% від маси сухої речовини. Крім того, якість біодизеля залежить від вмісту окремих представників жирних кислот — насичених (пальмітинова) і ненасичених (пальмітоолеїнова 16:1, ліноленова 18:3), який у мікрowodоростях може суттєво змінюватися залежно від умов вирощування — температури культивування, рівня освітленості тощо [1].

Згідно з нашими попередніми даними [4, 5, 6], активними регуляторами інтенсив-

ності та спрямованості біосинтезу ліпідів, співвідношення їхніх окремих класів та вмісту жирних кислот у водяних рослин є іони деяких металів та нафтопродукти.

Використання нафтопродуктів як регуляторів життєдіяльності водоростей і біосинтезу потенційних біотехнологічно корисних продуктів є важливим як з погляду прогнозування і регулювання їхнього розвитку в природних умовах та очищення їх від нафтових забруднень, так і у зв'язку з можливістю отримання і виділення нафтово-ліпідних суспензій, в яких нафтопродукти виступають органічним розчинником у складі потенційного біопалива [2].

Дані досліджень [7] свідчать про те, що *Laminaria saccharina* (L.) Lamour, *Laminaria digitata* (Hunds) Lamour і *Fucus vesiculosus* L. мають специфічну стійкість до нафтового забруднення завдяки сорбційній здатності щодо *n*-парафінів і ароматичних вуглеводнів. Дослідження, проведені на півночі Каспію, показали, що у водному середовищі біля нафтогазодобувних свердловин активно зростають індикаторні водяні рослини *Hotamogeton pectinatus* і *Eastera Nollii* [8]. Серед прісноводних видів на особливу увагу заслуговують *Chlorella vulgaris* і *Poecilia*

reticulate, які здатні витримувати і метаболізувати компоненти нафти у річках Західного регіону України [9]. El-Sheekh і співавт. [10], вивчаючи вплив нафтопродуктів на ріст і метаболічну активність *Chlorella homosphaera* і *Chlorella vulgaris*, встановили, що низька концентрація сирої нафти (0,01%) стимулює ріст цих водоростей на 16% і 15% відповідно, а висока (0,3%) — спричиняє зниження темпів росту на 15% і 20%. Тому зазначені види в багатьох країнах світу намагаються використовувати для очищення стічних вод від нафтових забруднень. При цьому хлорела порівняно з деякими морськими водоростями менш ефективна, проте легко культивована, особливо в разі вирощування в середовищах з підвищеним вмістом вуглекислого газу, що є важливим у зв'язку з формуванням умов евтрофікації при забрудненні води [11].

Метою дослідження було з'ясування біосинтетичної активності в одноклітинній зеленої водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії дизельного палива.

Матеріали і методи

Культуру водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. (із колекції Інституту гідробіології НАН України) вирощували в скляних колбах (250 мл) на мінеральному середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема при температурі 20 ± 1 °C і освітленні 2 500 лк в люменостаті [12]. В експериментальних умовах до культури додавали дизельне паливо (Л-0,20-62, ДСТУ 3868-99) у кількості 0,5 мл/л, що відповідає 10 ГДК [13]. Період інкубації культури водорості з токсикантом становив 1, 3 і 7 діб. Контролем були рослини, які культивували в середовищі без додавання дизпалива.

Після культивування суспензію водорості інкубували з 200 кБк ^{14}C -ацетату натрію або з 20 кБк ^{14}C -бікарбонату натрію при температурі 20 °C і освітленні 2500 лк протягом 90 хв. Після зупинення реакції трихлороцтовою кислотою та центрифугування екстракту при 2 500 об/хв упродовж 20 хв, екстрагували вуглеводи та ліпіди, а також осаджували протеїни.

Вуглеводи відділяли розчином 75%-го етанолу, після чого центрифугували, двічі промивали, осаджували центрифугуванням [14] і висушували.

Протеїни осаджували 5%-м розчином трихлороцтової кислоти на водяній бані при 100 °C. Після центрифугування осад розчиняли в етанолі й знову центрифугували,

потім промивали сумішню етанол:діетиловий ефір (3:1 — за об'ємом) і підсушували ефіром. Протеїни солубілізували 5 М КОН при 70 °C протягом 24 год, нейтралізували 0,5м НСІ і висушували [15].

Екстракцію, розділення і кількісне визначення ліпідів здійснювали згідно з методом Nichols в модифікації [16]. Ліпіди екстрагували розчином Фолча за кімнатної температури, після чого фільтрували через знежирений фільтр. Для видалення неліпідних водорозчинних домішок екстракт промивали 1%-м розчином NaCl і залишали для розділення фаз. Верхню водно-метанольну фазу обережно збирали, а нижню промивали сумішню хлороформ:метанол:1%-й водний р-н NaCl (3:48:47 — за об'ємом). Екстракт висушували до постійної маси, визначали вміст загальних ліпідів ваговим методом і, розчинивши висушені ліпіди у хлороформі, використовували їх для тонкошарової хроматографії [17]. Класи ліпідів розділяли методом тонкошарової хроматографії на скляних пластинках із силікагелем L 5/40 у системі гексан — діетиловий ефір — льодяна оцтова кислота (70:30:1) і кількісно визначали згідно з методикою [16]. Хроматограми проявляли в парах кристалічного йоду. Кількість неполярних ліпідів визначали біхроматним методом на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 615 нм. Вміст фосfolіпідів після їх мінералізації при 180 °C встановлювали за кількістю неорганічного фосфору за методом Васьковського в модифікації Кейтс [17, 18].

Радіоактивність зразків вимірювали на сцинтиляційному лічильнику LS-100C Beckman (США) і виражали в імп/хв·мг сирої маси клітин.

Визначення вмісту хлорофілів у суспензії водоростей здійснювали спектрофотометрично за диференціальними спектрами їх поглинання [19]. Морфологічні зміни в клітинах спостерігали мікроскопічно при збільшенні 9000 (МБИ-15), зафарбувавши клітинні мембрани «хлор-цинк-йод» реактивом (водний р-н ZnCl_2 , КJ, насичений J_2) [13].

Одержані експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики [20].

Результати та обговорення

Відомо, що токсиканти різної природи, включаючи дизпаливо, ініціюють утворення в клітинах низки водяних рослин подвійної концентричної мембранної системи, що супроводжується зміною їхнього ліпідного і протеїнового складу, накопиченням

основних адаптивно-значущих класів ліпідів і жирних кислот, а також низки функціональних характеристик мембрани (проникність, іонний склад, функціонування ензимів — АТФ-аз, лужної фосфатази) [13]. У клітинах *Chlorella vulgaris* за дії дизельного палива нами виявлено істотні морфологічні зміни, які в основному стосуються потовщення мембран, величини клітин та стану цитоплазми і спостерігаються вже на першу добу дії дизельного палива (рис. 1). В середовищі з додаванням дизельного палива вже протягом першої доби в клітинах хлорели відбувається зменшення ядерно-цитоплазматичного простору з подальшим формуванням виразної вторинної концентричної мембрани зі збільшенням терміну експозиції.

Такі ефекти пов'язують зі здатністю клітин водоростей адаптуватися до дії стресових чинників за рахунок потовщення і мультиплікативної фрагментації клітинних

мембран, що зумовлює якісні і кількісні зміни її ліпідного складу, вмісту протеїнів, вуглеводів, функціонування мембранних АТФ-аз тощо [13].

Одержані дані (табл. 1) показують, що інтенсивність синтезу протеїнів за включення ¹⁴С-ацетату збільшується на 1-шу і 7-му добу дії дизельного палива лише на 1,5%.

Збільшення вмісту протеїнів на 10% і 6,5%, визначеного за включенням ¹⁴С-бікарбонату, має місце в разі дії на хлорелу дизельного палива протягом 3-ї і 7-ї доби дії відповідно. Порівнюючи включення ¹⁴С-субстратів у протеїни, відзначимо, що включення ¹⁴С-ацетату за дії дизельного палива близькі до включення ¹⁴С-бікарбонату, особливо на 7-му добу дії. Співвідношення показників інтенсивності включення ¹⁴С-ацетату і ¹⁴С-бікарбонату в протеїни на 3-тю і 7-му добу дії зменшується на 9,5% і 6% проти контролю відповідно.

Отже, певне збільшення вмісту протеїнів у клітинах хлорели за дії дизельного палива

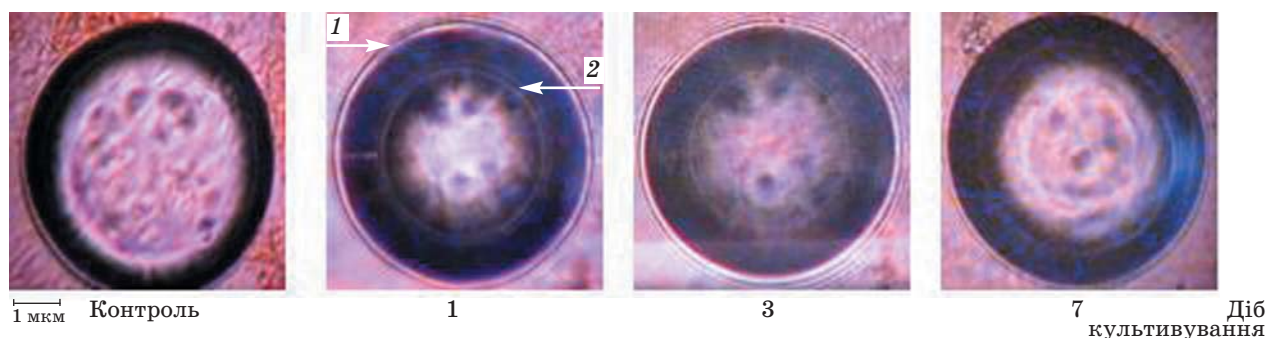


Рис. 1. Мікрофотографії клітин хлорели за дії дизпалива (0,5 мл/л): 1 — первинна мембрана; 2 — вторинна концентрична мембрана

Таблиця 1. Включення мічених попередників у протеїни, вуглеводи і ліпіди *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії дизельного палива ($M \pm m, n = 5$)

Класи сполук	Тривалість дії дизпалива, діб	Включення мічених попередників, імп/хв мг сирової маси клітин		Співвідношення включення ¹⁴ С-ацетату/ ¹⁴ С-бікарбонату
		¹⁴ С-ацетат	¹⁴ С-бікарбонат	
Протеїни	Контроль	60,000±1,447	57,333±2,167	1,05
	1	61,000±2,107	57,400±1,778	1,06
	3	59,733±1,683	63,200±1,833**	0,95
	7	60,733±1,521	61,067±2,961	0,99
Вуглеводи	Контроль	56,067±2,679	58,067±1,202	0,97
	1	56,933±2,018	57,533±2,118	0,99
	3	54,333±2,079	54,400±1,416*	0,99
	7	53,333±3,381	59,133±1,696	0,90
Ліпіди	Контроль	51,450±2,949	64,800±2,186	0,79
	1	57,267±2,949	67,200±2,829	0,85
	3	61,400±2,386**	63,067±1,812	0,97
	7	59,733±2,338	63,800±2,159	0,94

Примітка: * — $P \leq 0,05$; ** — $P \leq 0,02$ порівняно з контролем.

може мати місце у зв'язку із синтезом адаптивних захисних протеїнів, а також інших стресових протеїнів, які беруть участь у структурно-функціональній перебудові зовнішньої клітинної оболонки, як адаптивно-захисного процесу за дії неспецифічного чинника [13].

Підвищення включення у вуглеводи ^{14}C -ацетату на 1,5%, ^{14}C -бікарбонату на 2% спостерігається вже на 1-шу і 7-му добу дії дизпалива. У разі подовження терміну культивування водорості з дизпаливом протягом 3-ї і 7-ї доби включення ^{14}C -ацетату у вуглеводи зменшується на 3%, а ^{14}C -бікарбонату на — 5%. За дії дизельного палива на 1-шу і 3-тю добу інтенсивність включення ^{14}C -бікарбонату різко знижується — на 1% і 6% відповідно. За дії дизпалива на 1-шу і 3-тю добу значення включень мічених попередників близькі. Показник співвідношення інтенсивності включення мічених ацетату і бікарбонату у вуглеводи збільшується на 2% упродовж 1-ї і 3-ї доби та зменшується на 7% протягом 7-ї доби дії дизельного палива.

Вуглеводи є кінцевим продуктом фотосинтезу і виконують у клітинах рослин енергетичну та захисну функції. Згідно з даними [21], зі збільшенням концентрації нафтопродуктів у воді частка вуглеводів у зеленої водорості *Ulva rigida* Ag. знижується від 15,8% до 9,2%. За концентрації 0,12 мл/л в різних процесах у водорості беруть участь моносахариди, кількість яких різко знижується, тоді як кількість полісахаридів залишається незмінною. Отже, наші власні та дані літератури свідчать про перебудову кількісного і якісного складу вуглеводів за дії дизпалива, що, ймовірно, як і в разі дії інших токсикантів, наприклад важких металів, супроводжує формування адаптивно-захисних систем у відповідь на дію чинника [13].

Показано, що зміни протеїнового та вуглеводного складу клітинних мембран водяних рослин тісно пов'язані з обміном та якісним складом їхніх ліпідів, оскільки останні синтезуються в хлоропластах, що утворені з протеїнових комплексів тилакоїдних мембран, а їх утворення синхронізовано з інтенсивністю фотосинтезу [13, 22]. Наприклад, дизельне паливо у кількості 0,5 мл/л стимулює збільшення загального вмісту ліпідів у 2 рази в ряски та хлорели як відповідь клітин рослин на токсичну дію [13, 23]

У нашому експерименті включення ^{14}C -ацетату в ліпіди за дії дизпалива збільшується упродовж усього терміну його дії, а включення ^{14}C -бікарбонату — зменшується. Так, включення міченого ацетату в ліпіди за

дії дизельного палива протягом 1-, 3- і 7-ї діб збільшується відповідно на 11%, 19% і 16% порівняно з контрольними показниками. Інтенсивність включення міченого бікарбонату в ліпіди зростає на 4% протягом 1-ї доби і знижується на 2,5% і 1,5% на 3-тю і 7-му добу відповідно. Співвідношення показників інтенсивності включення ^{14}C -ацетату і ^{14}C -бікарбонату в ліпіди збільшується на 7,5%, 22% і 19% відповідно протягом 1-, 3- і 7-ї доби дії. Звертає на себе увагу зростання включення в ліпіди як ^{14}C -ацетату, так і ^{14}C -бікарбонату, зменшення співвідношення включення їх в ліпіди порівняно з контролем за дії дизпалива, що, як показано для рослин [22], можливо у зв'язку з функціонуванням ензимних систем утворення жирних кислот як з ацетату, так і шляхом карбоксилювання ацил-КоА на кінцевій стадії процесу. Крім того, раніше нами встановлено, що в процесі адаптації водоростей до нафтопродуктів та іонів металів синтез ліпідів можливий не тільки в хлоропластах, де їхні попередники утворюються з бікарбонату, а й у цитоплазматичній фракції клітин з ацетату [22]. Отже, дизпаливо змінює інтенсивність біосинтезу ліпідів загалом, що зумовлено перебудовою метаболізму в клітинах залежно від тривалості впливу. Як з теоретичного, так і з практичного погляду становить інтерес дослідження можливості регуляції дизпаливом якісного складу клітин водоростей у часовому градієнті.

Інтенсивність включення ^{14}C -ацетату за дії дизельного палива у триацилгліцероли (ТАГ) зменшується протягом усього періоду культивування водорості з токсикантом, у діацилгліцероли (ДАГ) — має тенденцію до зменшення на 14% упродовж 1-ї доби дії та не змінюється до 7 діб дії (табл. 2). Включення міченого ацетату в фосфоліпіди (ФЛ) зростає на 34% і 26% протягом 1-ї і 7-ї доби, а в неетерифіковані жирні кислоти (НЕЖК) — збільшується на 15% і 10% проти контролю відповідно на 1-шу і 7-му добу.

Отже, за дії дизельного палива має місце тенденція до зростання інтенсивності синтезу, переважно ФЛ і НЕЖК. Фосфоліпіди, як основний компонент мембран, впливають на їхню плинність, формують мікросередовище для мембранних ензимів, іонних каналів, регулюють зв'язок клітин із зовнішнім середовищем [24], тому збільшення їх вмісту може бути результатом відповіді на фізико-хімічну взаємодію дизпалива з мембранами [24, 25].

Щодо співвідношення відносного вмісту ліпідів (ТАГ:ДАГ:ФЛ:НЕЖК, %), то в конт-

Таблиця 2. Включення ¹⁴C-ацетату в ліпіді різних класів *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії дизельного палива ($M \pm m, n = 5$)

Умови культивування	Включення ¹⁴ C-ацетату в ліпіді різних класів, імг/хв·мг сирової маси клітин			
	ТАГ	ДАГ	ФЛ	НЕЖК
Контроль	87,167±6,789	82,500±6,614	65,000±7,937	81,167±7,779
ДП, 1-ша доба	83,167±11,094	70,667±11,623	86,833±8,884*	93,000±6,726
ДП, 7-ма доба	81,333±5,346	82,500±11,533	82,167±11,926	89,167±4,683

Примітка: * — $P \leq 0,01$ порівняно з контролем.

ролі воно становило 22:16:47:15; за дії дизельного палива протягом 1-ї доби — 26:22:27:25, 7 діб — 29:22:25:24. За дії дизельного палива відносний вміст ТАГ, ДАГ і НЕЖК зростає на 1-шу добу на 18%, 38% і 67% відповідно, а на 7-му добу — на 32%, 38% і 60% порівняно з контрольними показниками відповідно. Щодо відносного вмісту ФЛ, то він зменшується на 43% і 47% протягом 1-ї і 7-ї доби дії відповідно.

Накопичення ТАГ є типовою реакцією водяних рослин на дію стресорів, оскільки це один із чинників стабілізації клітинних мембран [13]. Збільшення відносного вмісту ДАГ і НЕЖК можна пояснити зростанням вмісту ТАГ, попередниками якого вони є. Дія дизельного палива зменшує відносний вміст ФЛ. Збільшення вмісту НЕЖК узгоджується зі зростанням їх синтезу в клітинах хлорели і може бути показником посиленого розпаду ліпідів унаслідок активування ліпаз і фосфоліпаз [26].

У зв'язку з тим, що синтез ліпідів у рослин, включаючи водорості, відбувається переважно у хлоропластах [22], становило інтерес дослідження вмісту пігментів. Одержані дані (табл. 3) свідчать про те, що вміст хлорофілів *a* і *b* протягом 1-ї доби дії токсиканта має тенденцію до збільшення (на 6% і 12% відповідно), а на 7-му добу дії — до зменшення (на 18% і 14% відповідно) порівняно з контрольними показниками.

Співвідношення вмісту хлорофілів *a/b* збільшується на 39% порівняно з контролем на 1-шу і 7-му добу дії. У дослідженні авторів [27] виявлено, що зростання концентрації нафтопродуктів у культурі прісноводної водорості *Selenastrum capricornutum* призводить до істотного зменшення вмісту

хлорофілів, а відтак, до зниження вмісту вуглеводів і протеїнів у клітині, що свідчить про участь хлоропластів та роль фотосинтезу в біосинтетичних процесах. Спостереження після аварії танкера «Тампіко Мару» показали, що дія емульсії дизельного палива протягом 3 діб у концентрації 0,1% майже повністю пригнічує фотосинтез у молодих клітинах бруї водорості *Macrocystis*, концентрація емульсії 0,01% знижує фотосинтез через 7 діб [28]. Сира нафта в концентрації 100 мл/л спричинює незворотні зміни у хлоропластах протягом 6–12 год, а за концентрації нафти 10 мл/л такі самі зміни спостерігали через 4 доби. Тому дизельне паливо, ймовірно, впливає на біосинтез ліпідів, діючи як на структуру хлоропластів, так і на системи фотосинтезу, оскільки відомо, що у рослин, в тому числі у водоростей, ці процеси відбуваються у хлоропластах [24]. Як й інші нафтопродукти, дизпаливо є поверхнево-активною речовиною, завдяки чому може тривалий час міститися на поверхні клітинної стінки водоростей, унаслідок чого погіршується фотосинтетична активність. Разом з тим зменшення проникності мембрани за дії дизельного палива [6] сприяє виходу з клітин водоростей іонів марганцю [29], що пов'язані з фотосинтезом та необхідні для утворення кисню.

Раніше було показано, що зі збільшенням кількості нафти і нафтопродуктів у середовищі існування гідробіонтів значно зростає кількість ліпідів у їхніх клітинах [30]. Первинна реакція на дію цих речовин формується на рівні клітинних мембран, що першими піддаються впливу стресових факторів, одним з основних компонентів яких є ліпіді [25]. У зв'язку з відсутністю чіткого пояснення механізму проникнення нафто-

Таблиця 3. Вміст хлорофілів *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії дизельного палива ($M \pm m, n = 5$)

Умови культивування	Вміст хлорофілів, мкг/л		Співвідношення хлорофілів <i>a/b</i>
	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	
Контроль	401,34±32,47	183,27±14,36	1,49
ДП, 1-ша доба	425,55±32,36	205,09±21,99	2,07
ДП, 7-ма доба	328,39±25,39	157,71±15,53	2,08

вих вуглеводнів у клітини водоростей вису-нуто припущення про пасивне проникнення їх у клітину з наступним окисненням вуглеводнів усередині клітин за допомогою ензимів нафтового окиснення [31]. Проведені авторами дослідження щодо впливу авіаційного й дизельного палива, машинного мастила та гасу на проникність плазмалеми у *Fucus serratus* і *Laminaria digitata* показали, що збільшення проникності поверхневої мембрани клітин ламінарії відбувалося вже через 1 год експозиції в середовищі з дією речовини, максимум наставав через 4 год, далі мембранна проникність збільшувалася неістотно. Для фукусу зубчастого відзначено незначну зміну мембранного потенціалу за дії дизельного палива, тимчасом як машинне мастило, гас і авіаційне паливо не спричинювали відхилень у величині мембранного потенціалу впродовж 24 год. Дію дизельного палива автори пов'язують з переважанням в його складі ароматичних вуглеводнів, нечисленних в гасі й машинному мастилі, а також з його високою в'язкістю, що сприяє тривалішому контакту токсиканта з поверхнею водорості. Склад дизпалива Л-0,20-62 (ДСТУ 3868-99) створює поверхневий ефект на мембранах, сприяючи їх розриву завдяки розчиненню ліпідів та зростанню проникності. Змінюється функціонування іонних каналів, що порушує обмін біогенних елементів [13, 29, 32]. Показано [13], що за низьких концентрацій токсикантів за короткотривалого (до 7 діб) впливу пригнічується іонний обмін клітин водоростей із середовищем з одночасним формуванням захисних механізмів — ущільнення протеїново-ліпідних мембранних комплексів за участю іонів кальцію. Довготривала адаптація клітин (утворення подвійних концентричних мембран) відбувається з участю іонів магнію, калію і кальцію, а також фосфатів, унаслідок чого клітинна мембрана відновлює свої функції. Нафтопродукти, як поверхнево-активні речовини, зумовлюють вихід із клітин водоростей іонів марганцю і цинку [29], а за дії чистих ароматичних вуглеводнів (бензол, нафталін) та водних екстрактів сирової нафти вміст іонів марганцю і калію зменшується [32], чим можна пояснити порушення цілісності мембран.

Отже, клітини хлорели реагують на дію дизельного палива зміною якісного та

кількісного складу ліпідів, частково протеїнів і вуглеводів, а також вмісту пігментів. Дизпаливо у клітинах хлорели стимулює інтенсивність синтезу ліпідів (у 1,1–1,2 раза), встановленого за включенням ^{14}C -ацетату, а протеїнів (у 1,1 раза) — за включенням міченого бікарбонату. Інтенсивність синтезу вуглеводів за рахунок ^{14}C -ацетату і ^{14}C -бікарбонату зменшується неістотно, і зростає лише на 1-шу і 7-му добу відповідно. Відносний вміст триацилгліцеролів, діацилгліцеролів та неетерифікованих жирних кислот зростає, хоча інтенсивність синтезу деяких ліпідів (ТАГ і ДАГ) пригнічується. Такі перебудови можна розглядати як первинну відповідь на вплив стресового чинника на рівні мембран. Інтенсивність включення ^{14}C -ацетату в синтез фосfolіпідів зростає, а їх відносний вміст у клітинах зменшується вдвічі. Оскільки проникність мембрани у *Chlorella vulgaris* Beijer. у разі дії дизельного палива зменшується за дослідженої нами концентрації, то порушується стійкість мембран, яку забезпечують передусім фосfolіпіді і триацилгліцероли [25]. Вміст хлорофілів у відповідь на стресовий чинник зростає, а з подовженням терміну культивування водорості в токсичному середовищі їх вміст значно зменшується.

Таким чином, у клітинах *Chlorella vulgaris* Beijer. за культивування у присутності дизпалива змінюється метаболічний статус і відбуваються кількісні та якісні зміни складу, насамперед окремих класів ліпідів. Зростає абсолютний і відносний вміст триацилгліцеролів, діацилгліцеролів та неетерифікованих жирних кислот, проте при цьому, спираючись на дані літератури, зростатиме і роль фосfolіпідів. Збільшення вмісту три- і діацилгліцеролів є позитивним завдяки отриманню збагаченої ліпідами суспензії водоростей, придатної для виготовлення біопалива. Максимальний термін культивування водоростей, упродовж якого дизпаливо не пригнічує метаболізм у клітинах водоростей, стимулює утворення ліпідів, що можуть бути використані як компоненти водоростевого біопалива, становить 7 діб, що можна вважати оптимальним терміном для біотехнологічного культивування хлорели разом з дизпаливом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Золотарьова О., Шнюкова Є. Куди прямує біопаливна індустрія? // Вісн. НАН України. — 2010. — № 4. — С. 10–20.
2. Aullon Alcaine A. Biodiesel from microalgae. — Stockholm (Sweden), 2010. — 92 p.
3. Olivier D. An algae-based fuel // Biofuture. — 2005. — N 255. Режим доступу: <http://www.climatebabes.com/documents/Algaefuel%20predicitons%201.pdf>.
4. Горда А. И. Регуляция биосинтеза липидов у *Chlorella vulgaris* Beijer. ионами цинка и свинца // III междунар. конференция-школа «Совр. проблемы физиол. и биохим. водн. организмов», 22–26 июня 2010, Петрозаводск. — С. 40–42.
5. Горда А. И., Грубінко В. В. Інтенсивність біосинтезу протеїнів, вуглеводів та ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії іонів цинку і свинцю // Укр. біохім. журн. — Т. 82 (Спец. вип. Мат. Х Укр. біохім. з'їзду, 13–17 вересня 2010, Одеса), №4 (додаток 1). — С. 167.
6. Костюк К. В. Влияние токсикантов на проницаемость мембран у пресноводных водорослей // III междунар. конф.-школа «Совр. пробл. физиол. и биохим. водн. организмов», 22–26 июня 2010, Петрозаводск. — С. 82–83.
7. Воскобойников Г. М., Макаров М. В., Рыжик И. В. Изменения у макрофитов литорали Баренцева моря под влиянием нефтепродуктов // Матер. междунар. конф. «Нефть и газ Арктического шельфа», 17–19 ноября 2004, Мурманск. — С. 67–69.
8. Степаньян О. В. Макроводоросли и травы Северного Каспия в условиях деятельности нефтегазодобывающего комплекса // Матер. 22-й конф. молодых ученых Мурманского морского биол. ин-та, апрель 2004, Мурманск. — С. 165–171.
9. Андрусак Н. С. Застосування мікрокосмних моделей для визначення порушень трофічної структури річок Західного регіону України, забруднених нафтопродуктами: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. — Чернівці, 2008. — 21 с.
10. El-Sheekh M. M., El-Naggar A. H., Osman M. E. H., Haieder A. Comparative Studies on the Green Algae *Chlorella Homosphaera* and *Chlorella Vulgaris* with to Oil Pollution in the River Nile // Plant and Soil. — 2004. — V. 267. — P. 191–206.
11. Романенко В. Д., Кирпенко Н. И., Коновец И. Н., Крот Ю. Г. Видоспецифические особенности роста зеленых водорослей при дополнительном углеродном питании. Сообщение 2. Рост *Chlorella vulgaris* Beijer. штамм ЛАРГ-3 при утилизации CO₂ в закрытой культивационной системе // Гидробиол. журн. — 2010. — Т. 46, № 3. — С. 50–57.
12. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Ред. А. В. Топачевский. — К.: Наук. думка, 1975. — 247 с.
13. Костюк К. В. Структурно-функціональні реакції клітин водних рослин на дію токсикантів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.17. — К., 2011. — 25 с.
14. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. — М.: Просвещение, 1975. — 318 с.
15. Вовк С. И., Янович В. Г. Исследование синтеза белков в тканях (методические рекомендации). — Львов: УНИИ физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных, 1988. — 20 с.
16. Nichols B. W. Separation of lipid of Photosynthetic Tissues: Improvement in Analysis by Thin-Layer Chromatography // Biochim. Biophys. Acta. — 1963. — V. 70, N 1. — P. 417–422.
17. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
18. Vaskovsky V. E., Kastetsky E. V., Vasedin I. M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. — 1985. — V. 114, N 1. — P. 129–141.
19. Оцінка стану водоймищ шляхом визначення пігментів фітопланктону / Метод. посібник з визначення якості води. — К., 2005. — С. 16–19.
20. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
21. Муравьева И. П. Влияние освещенности и характера загрязнения на химический состав *Ulva rigida* Ag. // Экология моря. — 2004. — Вып. 66. — С. 72–78.
22. Schmid K. M., Ohlrogge J. B. Lipid metabolism in plants / Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes / Ed. D. E. Vance, J. E. Vance. — Amsterdam: Elsevier, 2002. — P. 93–126.
23. Костюк К., Грубінко В. Вплив іонів цинку, свинцю та дизельного палива на ліпідний склад мембран клітин водних рослин // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біологічна. — Львів: ЛНУ, 2010. — Вип. 54. — С. 257–264.
24. Abbas C. A., Card G. L. The relationship between growth temperature, fatty acid composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica* // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — V. 602, N 3. — P. 469–476.
25. Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образоват. журн. — 1997. — № 9. — С. 12–17.
26. Кренис Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
27. El-Dib M. A., Abou-Waly H. F., El-Naby A. M. H. Impact of fuel oil on the freshwater alga

- Selenastrum capricornutum* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. — 1997. — V. 59, N 3. — P. 438–444.
28. Clendenning K. A., North W. J. Effects of wastes on the giant kelp *Macrocystis pyrifera* // Proc. Int. Conf. Waste Dispos. Mar. Envir. — 1960. — P. 82–91.
29. Chawla G., Viswanathan P., Devi S. Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture // Environ. Exp. Bot. — 1987. — V. 27, N 3. — P. 311–323.
30. Воскобойников Г. М., Матишов Г. Г., Быков О. Д. и др. Об устойчивости морских

- макрофитов к нефтяному загрязнению // Докл. РАН. Общая биология. — 2004. — Т. 397, № 6. — С. 842–844.
31. Reddin A., Prendeville G. N. Effect of oils on cell membrane permeability in *Fucus serratus* and *Laminaria digitata* // Mar. Pollut. Bull. — 1981. — V. 12, N 1. — P. 339–342.
32. Kauss P. B., Hutchinson T. C. Effects of benzene, a water soluble component of crude oils, on membrane integrity and ionic content of the green alga *Ankistrodesmus falcatulus* var. *mirabilis* // Water Poll. Res. Canada. — 1978. — V. 13. — P. 85–95.

ВЛИЯНИЕ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА БИОСИНТЕЗ ПРОТЕИНОВ, УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ У *Chlorella vulgaris* Beijer.

А. И. Горда, В. В. Грубинко

Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка

E-mail: hiazunt@mail.ru

Разработка технологий использования водорослей не только для индикации и очистки загрязненной воды, но и для производства биотоплива сегодня является весьма актуальной. Среди пресноводных видов особого внимания заслуживают *Chlorella vulgaris* и *Poecilia reticulata*, которые способны выдерживать и метаболизировать компоненты нефти в реках Западного региона Украины.

Представлены данные о влиянии дизельного топлива (0,5 мл/л) на интенсивность биосинтеза протеинов, углеводов и липидов, оцененного по включению ¹⁴C-ацетата и ¹⁴C-бикарбоната, а также содержание пигментов в клетках одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. Установлено, что дизельное топливо стимулирует интенсивность синтеза протеинов и липидов, а синтез углеводов угнетает. Относительное содержание триацилглицеролов, диацилглицеролов и неэтерифицированных жирных кислот в клетках водоросли увеличивается. Содержание хлорофиллов *a* и *b* возрастает, однако с увеличением срока действия дизтоплива в среде культивирования до 7 сут — существенно уменьшается. Максимальный срок культивирования водоросли, в течение которого дизтопливо не угнетает метаболизм в клетках хлореллы, составляет 7 суток, что можно считать оптимальным сроком для биотехнологического культивирования хлореллы вместе с дизтопливом.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris* Beijer., включение ¹⁴C-ацетата и ¹⁴C-бикарбоната, протеины, углеводы, липиды, хлорофилл, дизельное топливо.

EFFECT OF DIESEL FUEL ON BIOSYNTHESIS OF PROTEINS, CARBOHYDRATES AND LIPIDS IN *Chlorella vulgaris* Beijer.

A. I. Gorda, V. V. Grubinko

Volodymyr Gnatyk Ternopil National Pedagogical University

E-mail: hiazunt@mail.ru

Currently technologies of utilization of algae not only for indication and purification of dirty water but for biofuel manufacturing are developed as well. Among fresh water, *Chlorella vulgaris* and *Poecilia reticulata* species are especially important because they use and metabolize petroleum components in river of West Ukraine regions.

The effect of diesel fuel on the intensity of biosynthesis of proteins, carbohydrates and lipids in cells of unicellular green algae *Chlorella vulgaris* Beijer., and the contents of pigments were shown. Diesel fuel stimulated intensity synthesis of proteins (by include ¹⁴C-bicarbonate) and lipids (by include ¹⁴C-acetate), and inhibited synthesis of carbohydrates by incorporation of labeled precursors. The relative content of triacylglycerols, diacylglycerols and nonesterified fatty acids was increased in the green algae cells, however the intensity of synthesis of certain classes of lipids (triacylglycerols and diacylglycerols) was decreased. The content of chlorophylls *a* and *b* was increased but with the extension of the toxicant in culture medium content of chlorophylls was significantly reduced. Maximal term of cultivation of algae, during which diesel fuel does not influenced on metabolism in the cells of chlorella, makes 7 days, which can be recommended as the optimum period of biotech cultivation of chlorella together with diesel fuel.

Key words: *Chlorella vulgaris* Beijer., including ¹⁴C-acetate and ¹⁴C-bicarbonate, proteins, carbohydrates, lipids, chlorophyll, diesel fuel.