

ГІДРОБІОЛОГІЯ

УДК (581.13+582.26)547.992

¹О.В. ВАСИЛЕНКО, ¹Ю.В. СИНЮК, ¹Л.М. ГОЦУЛЯК, ¹В.В. ГРУБІНКО,
²П.Д. КЛОЧЕНКО

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

²Інститут гідробіології НАН України
пр-т Героїв Сталінграду, 12, Київ, 04210

ВМІСТ ВУГЛЕВОДІВ, БІЛКІВ І ЛІПІДІВ У КЛІТИНАХ ПРІСНОВОДНИХ ВОДОРОСТЕЙ ЗА ДІЇ ГУМІНОВИХ КИСЛОТ

Досліджено вплив гумінових кислот (ГК) на вміст вуглеводів, білків та ліпідів у клітинах прісноводних водоростей (*Calothrix braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Mayamaea atomus*, *Euglena gracilis*). Встановлено, що у відповідь на дію ГК залежно від їх концентрації та терміну дії у представників синьозелених та діатомових водоростей накопичуються переважно білки, а у діатомеї також і вуглеводи. У *Ch. vulgaris* має місце аналогічний процес з частковим підвищенням накопичення ліпідів на початку дії ГК як стрес-чинника. *Euglena gracilis* має чітку білок-ліпідну стратегію адаптації до ГК, однак, при цьому, вміст білків зростає значніше, ніж ліпідів.

Ключові слова: прісноводні водорості, гумінові кислоти, вуглеводи, білки, ліпіди

Серед низки чинників, які визначають структурно-функціональні характеристики водоростей, чільне місце посідає хімічний склад води, насамперед розчинні органічні речовини (РОР) [1]. Найбільшу їхню частку у водних екосистемах складають гумусові речовини, зокрема, у дніпровських водосховищ вона становить 65–90% усіх РОР [7]. Адаптивну роль у захисті водоростей від надлишкових концентрацій хімічних сполук відіграють структурні полімери клітин та їх метаболіти, зокрема вуглеводи, білки і ліпіди [15]. Особливості впливу фізико-хімічних чинників на функціонування водоростей можуть бути використані у біотехнології для отримання біологічно цінних сполук [9].

Метою роботи була оцінка впливу гумінових кислот на вміст вуглеводів, білків та ліпідів у клітинах прісноводних водоростей.

Матеріал і методи досліджень

Лабораторні дослідження проведені з використанням альгологічно чистих культур: синьозелених – *Calothrix braunii* Bornet et Flahault HPDP-16, зелених – *Chlorella vulgaris* Beijer. CCAP-211/11в, евгленових – *Euglena gracilis* Klebs HPDP-114 та діатомових – *Mayamaea atomus* (Näg.) Grun. АСКУ 12-02 водоростей. Представників Cyanophyta і Chlorophyta вирощували при температурі 22–25 °С й освітленні лампами денного світла інтенсивністю 2500 лк протягом 16 годин на добу. Зелені і синьозелені водорості культивували на середовищі Фітцджеральда [8], а евгленові – на середовищі №22 [3]. Діатомову водорість вирощували на середовищі Болда при температурі 16–18 °С в умовах дії природного світла (північна експозиція) [12]. В середовище в експерименті вносили розчин гумінових кислот (ГК) в

концентрації 2,0 і 5,0 мг/дм³. Відбір зразків здійснювали на 3, 7 та 14-ту доби експозиції. В якості контролю використовували культури водоростей без додавання ГК.

Вміст вуглеводів визначали ваговим методом після їх спиртової екстракції [10], білків – за методом Лоурі після осадження ТХОК і сольового відмивання [14], ліпіди екстрагували за Фолчем і визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші [6]. Розділення ліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії в герметичних камерах на пластинках із сумішшю силікагелів ЛС 5/40 мкм і Л 5/40 мкм на скляній основі [5]. Для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти й очищені стандарти [4].

Результати досліджень та їх обговорення

Вуглеводи. За впливу ГК в обох досліджуваних концентраціях у представника синьозелених водоростей *Calothrix braunii* вміст вуглеводів зменшується (відносно контролю) загалом від 30% протягом 3-х діб дії до 40–60% на 14-ту добу. У представника еугленових водоростей *Euglena gracilis*, навпаки, спочатку (3-тя доба) вміст вуглеводів зменшується на 60–70% відносно контролю, а потім (7–14 доби) відновлюється до 15–25%. У *Chlorella vulgaris* протягом 3-х діб дії ГК вміст вуглеводів зростає на 20–25%, а надалі зменшувався порівняно з контролем на 10–15%. Тільки у діатомової водорості *Mayamaea atomus* за обох концентрацій ГК протягом 14-ти діб вміст вуглеводів стійко зростає майже на 75%. Практично в усіх випадках відмінності у змінах показників за різних концентрацій ГК несуттєві (табл. 1).

Білки. У *C. braunii* відмічено зростання вмісту білків на 20–60%, при чому значніше за концентрації ГК 2,0 мг/дм³. У *Ch. vulgaris* та *E. gracilis* зміни вмісту білків залежно від концентрації ГК та тривалості їх дії були різноспрямовані. Так, за концентрації ГК 2,0 мг/дм³ вміст білків у *Ch. vulgaris* зменшувався на 20% протягом 14-ти діб, а за концентрації 5,0 мг/дм³ – зростає на 45%; у *E. gracilis* за концентрації ГК 2,0 мг/дм³ вміст білків спочатку збільшується у 1,5 рази (3-тя доба), а в подальшому (7–14 доби) – у 2,5–2,8 рази, за концентрації 5,0 мг/дм³ ГК – вміст білків зростає на 20–40%. У *M. atomus* вміст білків збільшувався протягом 14-ти діб на 12–25% за концентрації ГК 2,0 мг/дм³, тоді як за концентрації ГК 5,0 мг/дм³ – зростає на 12–30% (табл. 1). Отже, на відміну від вуглеводів, загалом всі досліджувані водорості відкликаються посиленням біосинтезу білків на дію ГК в різних концентраціях. Це може бути наслідком їх ферментної адаптації та ущільненням мембранних структур з метою захисту клітин від згубного чинника [13].

Оскільки стресостійкість клітинних мембран значною мірою визначається білок-ліпідними взаємодіями, то важливо прослідкувати і зміни вмісту ліпідів у клітинах досліджуваних водоростей. Так, у *C. braunii* за концентрації ГК 2,0 мг/дм³ відмічено зниження вмісту ліпідів на 30%. Ще значнішим (на 50%) було воно за концентрації ГК 5,0 мг/дм³. У *Ch. vulgaris* та *E. gracilis* зміни вмісту ліпідів були аналогічні незалежно від концентрації ГК та тривалості їх дії. Різниця полягала лише в тому, що протягом перших 3-х діб вміст ліпідів суттєво зростає (на 57 і 82% відповідно за концентрації ГК 2,0 та 5,0 мг/дм³), а потім суттєво знижувався (майже на 50% відносно контролю). Така ж сама закономірність виявлена у *M. atomus* за концентрації ГК 2,0 мг/дм³ (вміст ліпідів протягом перших 3-х діб зростає на 16%, а в подальшому зменшувався на 70%). Щодо концентрації 5,0 мг/дм³ ГК, то у діатомеї вміст ліпідів зменшився протягом всього експерименту на 58% (табл. 1).

Важливо ознакою змін у ліпідному обміні клітин за екстремальних умов є динаміка вмісту триацилгліцеролів (ТАГ), диацилгліцеролів (ДАГ), фосfolіпідів (ФЛ) та неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) [11]. Оскільки між класами ліпідів існує певний метаболічний зв'язок, то зміни у співвідношенні вмісту ТАГ:ДАГ:ФЛ:НЕЖК можуть віддзеркалювати особливості впливу ГК на водорості. Так, зокрема, на кінець досліду нами було зафіксовано помітне зменшення частки ТАГ у *C. braunii* та *Ch. vulgaris* за дії ГК в обох концентраціях, а у *E. gracilis* і *M. atomus* – тільки за концентрації 5,0 мг/дм³ (табл. 2). Це свідчить про активну участь ТАГ в енергозабезпеченні водоростей.

Зміни вмісту вуглеводів, білків та ліпідів у клітинах водоростей за дії ГК (% порівняно з контролем)

Види водоростей	Доба	Вуглеводи		Білки		Ліпіди	
		Концентрація ГК					
		2,0 мг/дм ³	5,0 мг/дм ³	2,0 мг/дм ³	5,0 мг/дм ³	2,0 мг/дм ³	5,0 мг/дм ³
<i>Calothrix braunii</i>	3	72,4	77,6	111,1	122,2	106,13	97,81
	7	93,9	61,2	155,6	144,4	73,52	52,51
	14	63,0	42,0	166,7	122,2	64,97	51,28
<i>Chlorella vulgaris</i>	3	125,0	117,2	40,8	144,9	157,10	182,39
	7	86,9	82,2	75,5	127,8	54,80	47,18
	14	89,4	82,1	61,2	144,3	43,30	68,66
<i>Euglena gracilis</i>	3	42,3	25,9	43,8	140,6	115,00	106,00
	7	55,9	68,1	281,3	93,8	107,75	79,78
	14	86,0	74,2	250,0	112,5	126,92	106,15
<i>Mayamaea atomus</i>	3	150,0	105,0	112,5	112,0	116,41	52,63
	7	160,0	127,7	125,0	125,0	28,01	46,91
	14	173,2	173,2	125,0	132,5	31,94	42,58

Значне підвищення частки ФЛ у *C. braunii* та у *M. atomus* за дії ГК у концентрації 2,0 мг/дм³, а також на початку дослідження у *Ch. vulgaris* і *E. gracilis*, очевидно, пов'язане із формуванням компенсаторно-адаптивних механізмів клітин, оскільки дія ГК збільшує плинність клітинних мембран, а ФЛ можуть стабілізувати їх структурно-функціональний стан. Участь ТАГ і ФЛ у адаптивному захисті водних рослин була продемонстрована й іншими дослідниками [2]. Натомість, різке зменшення частки ФЛ у *C. braunii* за дії ГК у концентрації 5,0 мг/дм³ можна пояснити значним негативним впливом цих речовин, коли адаптивні механізми водорості виявились неефективними. Варто також відмітити, що зменшення загального вмісту ліпідів у клітинах, як правило, супроводжувалося збільшенням частки НЕЖК, що може свідчити про посилення розпаду ліпідів за дії ГК.

Таблиця 2

Співвідношення вмісту ТАГ:ДАГ:ФЛ:НЕЖК у клітинах прісноводних водоростей за дії ГК, %

Види водоростей	Концентрація ГК	Тривалість дослідження, доба		
		3	7	14
<i>Calothrix braunii</i>	контроль	37:39:10:14	37:38:11:14	36:40:10:14
	2,0 мг/дм ³	26:33:12:29	25:29:20:26	25:25:25:25
	5,0 мг/дм ³	34:34:5:27	32:32:7:29	35:33:4:28
<i>Chlorella vulgaris</i>	контроль	29:26:16:29	30:26:16:28	29:26:16:29
	2,0 мг/дм ³	19:18:44:19	25:31:15:29	26:32:14:28
	5,0 мг/дм ³	15:19:46:20	21:23:24:32	22:29:17:32
<i>Euglena gracilis</i>	контроль	25:23:27:25	26:24:23:27	27:24:22:27
	2,0 мг/дм ³	22:23:37:18	29:31:30:20	30:28:12:30
	5,0 мг/дм ³	20:25:38:17	26:24:27:23	23:35:12:30
<i>Mayamaea atomus</i>	контроль	35:29:7:29	36: 29:7:28	37:30:6:27
	2,0 мг/дм ³	33:28:9:30	34:29:10:28	32:23:12:33
	5,0 мг/дм ³	34:31:7:28	33:30:8:29	27:34:11:28

Таким чином, на відміну від білків, але аналогічно з вуглеводами, досліджувані види водоростей відкликаються зниженням вмісту ліпідів на дію ГК в різних концентраціях. Тільки *Ch. vulgaris* використовує їх як засіб «миттєвої адаптації» до ГК, але потім використовує для цього метаболічно стійкіші білки. *E. gracilis* здатна накопичувати як білки, так і ліпіди, однак їх вміст, на відміну від білків, зростає на 15–25% за дії ГК у концентрації 2,0 мг/дм³ і лише на

6% – за концентрації ГК $5,0 \text{ мг/дм}^3$. Це свідчить про важливу участь білково-ліпідних комплексів *E. gracilis* у адаптації до впливу гумінових кислот.

Висновки

Отже, у представників синьозелених та діатомових водоростей у відповідь на дію ГК в концентраційно-часовому градієнті накопичуються переважно білки, а у діатомеї також і вуглеводи; у хлорели має місце аналогічний процес з частковим підвищенням накопичення ліпідів на початку дії ГК як стрес-чинника; представник евгленових водоростей має чітку білок-ліпідну стратегію адаптації до ГК, однак, при цьому, зростання вмісту білків є істотнішим порівняно з накопиченням ліпідів.

Відмінні адаптаційні стратегії водоростей до ГК зумовлені, очевидно, таксономічними структурними та фізіологічними особливостями: будовою клітинних стінок, метаболічною активністю, індивідуальним адаптивним значенням окремих метаболітів, тощо.

1. Васильчук Т. А. Динамика содержания биогенных и органических веществ в некоторых притоках Днепра и ее связь с развитием фитопланктона / Т. А. Васильчук, П. Д. Клоченко // Гидробиол. журн. — 2001. — Т. 37, № 1. — С. 36—47.
2. Верещагин А. Г. Биохимия триглицеридов / А. Г. Верещагин. — М.: Наука, 1972. — 307 с.
3. IPPAS – коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР / [Владимирова М. Г., Барцевич Е. Д., Жолдаков И. А. и др.] // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. — М., 1991. — С. 9—61.
4. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
5. Копытов Ю. П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов / Ю. П. Копытов // Экология моря. — 1983. — Вып. 12. — С. 76—80.
6. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран / Е. М. Крепс. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
7. Линник П. Н. Роль гумусовых веществ в процессах комплексообразования и детоксикации (на примере водохранилищ Днепра) / П. Н. Линник, Т. А. Васильчук // Гидробиол. журн. — 2001. — Т. 37, № 5. — С. 98—112.
8. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / [под ред. А.В. Топачевского]. — К.: Наукова думка, 1975. — 247 с.
9. Перспективи використання микроводорослей у біотехнології / [Золотарьова О. К., Шнюкова Є. І., Сиваш О. О., Михайленко Н. Ф.]. — Київ: Альтерпрес, 2008. — 234 с.
10. Практикум по общей биохимии / Ю. Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. — М.: Просвещение, 1975. — 318 с.
11. Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т.В. Чиркова // Соросовский образовательный журнал. — 1997. — № 9. — С. 12—17.
12. Beakes G. A. Zoospores ultrastructure of *Zygorhodium affluens* Canter and *Z. planktonicum* Canter, two chytrids parasiting the diatom *Asterionella formosa* Hassall / G. A. Beakes, H. M. Canter, G. H. M. Jaworski // Canadian Journal of Botany. — 1988. — Vol. 66, N 6. — P. 1054—1067.
13. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances / [Vigneault B., Percot A., Lafleur M. et al.] // Environmental Sciences Technology. — 2000. — Vol. 34. — P. 3907—3913.
14. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents / [Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.] // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
15. Reynolds C.S. The Ecology of Phytoplankton. — New York: Cambridge University Press, 2006. — 535 p.

О.В. Василенко, Ю.В. Синюк, Л.М. Гоцуляк, В.В. Грубинко, П.Д. Клоченко

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
Институт гидробиологии НАН Украины

СОДЕРЖАНИЕ УГЛЕВОДОВ, БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Исследовано влияние гуминовых кислот (ГК) на содержание углеводов, белков и липидов в клетках пресноводных водорослей (*Calothrix braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Mayamaea atomus*, *Euglena gracilis*). Установлено, что в ответ на присутствие в среде ГК в зависимости от их концентрации и срока действия у представителей синезеленых и диатомовых водорослей

накапливаются преимущественно белки, а в диатомеи также и углеводы. У *Chlorella vulgaris* имеет место аналогичный процесс с частичным повышением количества липидов в начале воздействия ГК как стресс-фактора. *Euglena gracilis* имеет четкую белок-липидную стратегию адаптации к ГК, однако, содержание белков возрастает значительно, чем липидов.

Ключевые слова: пресноводные водоросли, гуминовые кислоты, углеводы, белки, липиды

O.V. Vasilenko, Y.V. Snyuk, L.M. Gotsulyak, V.V. Grubinko, P.D. Klochenko

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

Institute of Hydrobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine

CONTENTS OF CARBOHYDRATES, PROTEINS AND LIPIDS IN CELLS OF FRESHWATER ALGAL UNDER THE INFLUENCE OF HUMIC ACIDS

Influence of humic acids to content of carbohydrates, proteins and lipids in cells of freshwater algae (*Calothrix braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Mayamaea atomus*, *Euglena gracilis*) was investigated. The humic acids effect dependent on their concentration and exposition time. The blue-green algae and diatoms accumulate primarily proteins, and diatoms also carbohydrates. In *Chlorella vulgaris* is a similar process with partial increase in lipid accumulation at the start of impact of humic acids as a stress factor. *Euglena gracilis* has a clear protein-lipid strategy of adaptation to humic acids, however, the protein content increases greater than lipids.

Keywords: humic acids, carbohydrates, proteins, lipids, freshwater algae

Рекомендує до друку

Надійшла 12.09.2014

В.В. Грубінко

УДК [574:582.261]594.8

В.П. ГУСЕЙНОВА, А.В. КУРЕЙШЕВИЧ

Інститут гідробіології НАН України

пр-т Героїв Сталінграду, 12, Київ, 04210

ВПЛИВ БЕНЗИНУ ТА ДИЗЕЛЬНОГО ПАЛИВА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ФІТОПЛАНКТОНУ

Досліджено вплив різних концентрацій бензину та дизельного палива на чисельність, біомасу планктонних водоростей, вміст хлорофілу *a*, концентрацію біогенних елементів та рН води у зразках фітопланктону з Канівського водосховища восени (вересень). Показано, що додавання до них нафтопродуктів з розрахунку 10 та 20 ГДК_р істотно пригнічує функціонування фітопланктону, призводить у більшості випадків до зменшення вмісту хлорофілу *a*, видового багатства, чисельності та біомаси водоростей. Встановлено, що нафтопродукти можуть впливати на склад альгогруповань. Синьозелені водорості (*Cyanoprokaryota*) виявилися більш чутливими до дії нафтопродуктів порівняно з зеленими.

Ключові слова: фітопланктон, бензин, дизельне паливо, чисельність, біомаса, хлорофіл *a*

Нафтопродукти належать до пріоритетних забруднюючих речовин. Згідно з даними літератури [1, 12], вміст нафтопродуктів у деяких водних об'єктах України перевищує ГДК рибогосподарську (ГДК_р) у десятки і сотні разів. Вплив нафти і нафтопродуктів на функціонування фітопланктону як основної фотосинтезуючої ланки водних екосистем досліджено більше для морських і значно менше для прісних вод. Інформація з цих питань