

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДВНЗ «ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО»**

**ЛУЦІВ АНЖЕЛА ІВАНІВНА**

УДК [577.117+582.263]613.632

**РЕГУЛЯЦІЯ БІОСИНТЕЗУ ЛІПІДІВ У *CHLORELLA VULGARIS* ВЕІЛ.  
ІОНАМИ МЕТАЛІВ ТА НАФТОПРОДУКТАМИ**

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Тернопіль – 2015

## Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Тернопільському національному педагогічному університеті імені Володимира Гнатюка Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник** – доктор біологічних наук, професор  
**Грубінко Василь Васильович**,  
Тернопільський національний педагогічний  
університет імені Володимира Гнатюка,  
завідувач кафедри загальної біології та  
методики навчання природничих дисциплін

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Воробець Наталія Миколаївна**,  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького,  
професор кафедри фармакогнозії і ботаніки

кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Коновець Ігор Миколайович**,  
Інститут гідробіології НАН України,  
завідувач лабораторії біологічно-активних сполук

Захист дисертації відбудеться «11» грудня 2015 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 в ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» за адресою: 46000, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1.

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» за адресою: 46000, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розісланий «07» листопада 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 58.601.04

Т. Я. Ярошенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Прісноводні водорості здатні до високої метаболічної активності і пластичності, що регулюються інтенсивністю і тривалістю освітлення, вмістом у воді кисню, діоксиду карбону, фосфатів, нітратів, іонів лужних і лужно-земельних металів, а також специфічними чинниками, включно іонами важких металів, фітогормонами, регуляторами росту, які спрямовують окремі ланки метаболізму в напрямку біосинтезу певних сполук (Кордюм Е.Л., 2003; Золотарьова О.К. та ін., 2008; Гандзюра В.П., Грубінко В.В., 2008; Schmid K.M., Ohlrogge J.V., 2002; Richmond A., Hu Q., 2013). Деякі чинники є активаторами біосинтезу ліпідів (Villares R. et al., 2001), що використовуються як компоненти біопалива, фармацевтичних та косметичних засобів.

Одним із найпоширеніших специфічних регуляторів фізіологічних та продукційних процесів у водних екосистемах є іони важких металів, насамперед, мангану, цинку, купруму, плумбуму тощо (Романенко В.Д., 2001; Давыдова С.Л., Тагасов В.И., 2002; Гандзюра В.П., Грубінко В.В., 2008). У водному середовищі та організмах ці іони не руйнуються, а лише змінюють фізико-хімічну форму перебування, чим і обумовлена їх біохімічна активність (Schmid K.M., Ohlrogge J.V., 2002; Nemaiswarya S. et al., 2011). Тому підвищення їх концентрації у воді призводить до накопичення гідробіонтами, а далі до істотних перебудов обміну речовин. Цікавим є вплив нафтопродуктів на мікрowodорості, які здатні залучати їх до біопродукційних процесів (Горбатюк Л.О., 2006).

Серед різноманіття біохімічних адаптацій до чинників водного середовища є перебудова ліпідного метаболізму. Вивчення цієї проблеми здійснюється на рівні оцінки та пошуку засобів підвищення стійкості водоростей до несприятливих умов існування (Гандзюра В.П., Грубінко В.В., 2008; Романенко В.Д. та ін., 2010; Noshachka P.W., Somero G.N., 2002; Voettcher T. et al., 2010) та регуляції інтенсивності біосинтезу окремих класів ліпідів, зокрема триацилгліцеролів, як біосировини для енергоносіїв (Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., 2010; Aullon Alcaine A., 2010). Разом із тим, біосинтез ліпідів у одноклітинних водоростей за дії неспецифічних регуляторів вивчений недостатньо. Сьогодні дискусійними є питання про шляхи утворення субстратів та джерела енергії, необхідної для біосинтезу ліпідів, а також роль клітинних структур у цьому процесі за дії неспецифічних чинників (Schmid K.M., Ohlrogge J.V., 2002). Тому важливо виявити механізми адаптації водоростей за рахунок ліпідсинтезних процесів, що дозволить встановити шляхи регуляції біосинтезу окремих класів ліпідів та моделювати цей процес із метою отримання біотехнологічно-корисних продуктів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана на кафедрі загальної біології та методики навчання природничих дисциплін Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка в межах науково-дослідних тем Міністерства освіти і науки України «Регуляція метаболізму у водних рослин іонами металів з метою інтенсифікації очищення ними води та отримання потенційних компонентів біопалива» (держреєстрація № 0110U000074) та «Розроблення умов культивування і

способів регуляції фізичними та хімічними факторами біосинтезу водяними рослинами цінних ліпідів» (держреєстрація № 0112U000271).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи є вивчення особливостей впливу іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива на вміст та біосинтез ліпідів, а також механізм їх участі у метаболічній адаптації *Chlorella vulgaris* Beij. до дії зазначених чинників.

Для досягнення визначеної мети в дисертації були поставлені такі **завдання**:

- дослідити фракційний склад ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. в аквакультурі та за дії іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива;
- з'ясувати кінетику та специфіку проникнення іонів металів у клітини хлорели в концентраційно-часовому градієнті;
- оцінити ступінь впливу іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива на кількісні й якісні показники біосинтезу ліпідів;
- дослідити вплив іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива на енергетичне і субстратне забезпечення біосинтезу ліпідів;
- встановити вплив іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива на показники фотосинтезу в хлорели;
- з'ясувати особливості локалізації біосинтезу ліпідів за дії іонів цинку, плюмбуму та дизельного палива.

**Об'єкт дослідження** – ліпідний обмін у клітинах *Chlorella vulgaris* Beij. за дії іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива.

**Предмет дослідження** – механізми адаптації клітин *Chlorella vulgaris* Beij. до дії іонів мангану, цинку, купруму, плюмбуму та дизельного палива.

**Методи дослідження:** загальноприйняті методи культивування мікроводоростей; біохімічні; цитологічні (світлова мікроскопія); хроматографічні (газорідинна і тонкошарова хроматографія), спектрофотометричні (атомно-абсорбційна спектрофотометрія), метод радіоактивної мітки (сцинтиляція), методи статистичної обробки отриманих даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Встановлено, що поглинання іонів мангану, цинку, купруму та плюмбуму клітинами хлорели має флуктуаційний характер і здійснюється в 4 етапи: самоізоляція (стрес-реакція) клітин, активне поглинання металів, вторинне пригнічення поглинання, відновлення активного поглинання, що співвідносяться зі структурно-функціональними перебудовами клітинної оболонки – утворенням і перебудовами системи «подвійних концентричних мембран». Вперше досліджено і проаналізовано кінетичні параметри поглинання іонів у часовому градієнті на кожному етапі акумулювання іонів металів.

Уперше показано, що досліджені чинники сприяють накопиченню ліпідів на 15-113%, включно триацилгліцеролів – на 36-181%, диацилгліцеролів – на 6-190%, фосфоліпідів – на 1,6-10,5%, неетерифікованих жирних кислот – на 49-257% щодо контролю. Уперше за дії іонів металів та дизельного палива встановлено зменшення розмірів та зміни кількості хлоропластів у клітині, у зв'язку з чим змінюється їх здатність до біосинтезу ліпідів. Виявлено, що зі зміною кількості та модифікацією хлоропластів вміст триацилгліцеролів і фосфоліпідів зростає за дії досліджених чинників у результаті адаптаційної активації біосинтезу їх окремих класів у цитоплазмі.

Встановлено, що формування адаптивних систем захисту клітин водоростей до дії чинників здійснюється шляхом зміни енергетичного та субстратного забезпечення біосинтезу ліпідів. Субстратами для біосинтезу ліпідів є гліцерол-3-фосфат, утворений в результаті фосфорилування гліцеролу та ацил-КоА, утворений з амінокислот, а забезпечення енергією цього процесу відбувається завдяки активації циклу Кребса.

Одержані результати щодо накопичення металів, зміни вмісту ліпідів та активності їх біосинтезу в різних клітинних структурах, а також енергетичне і субстратне забезпечення біосинтезу ліпідів за дії іонів металів та дизельного палива доповнюють відомості про біохімічні механізми адаптації водоростей до дії стресових чинників середовища існування.

**Практичне значення одержаних результатів.** Уперше встановлено, що біотехнологічно-ефективними для інтенсифікації біосинтезу ліпідів хлорелою триацилгліцеролів на 6% щодо контролю є вплив  $Zn^{2+}$  (5,0 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб), фосфоліпідів – на 18-34% щодо контролю є вплив  $Cu^{2+}$  (0,002 мг/дм<sup>3</sup>, 3 діб),  $Pb^{2+}$  (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб), дизельного палива (0,1 мг/дм<sup>3</sup>, 1 і 7 діб).

Встановлені особливості змін щодо накопичення та біосинтезу ліпідів, співвідношення їх окремих класів (фосфоліпідів і триацилгліцеролів) у клітинах хлорели можуть слугувати основою для розробки технології отримання ліпідвмісної біомаси за промислового культивування водоростей, перспективної для виробництва біопалива.

Виявлені закономірності поглинання іонів металів клітинами хлорели, зміни співвідношення та інтенсивності біосинтезу окремих класів ліпідів і показників функціональної активності ензимів можуть слугувати основою для розроблення методів біоіндикації пошкоджень у мікрowodоростей за стресової дії та оцінки забруднення водного середовища сполуками металів і дизельним паливом.

Результати досліджень можуть використовуватися в освітніх цілях, зокрема, при викладанні навчальних дисциплін та спецкурсів з фізіології та біохімії водоростей, гідробіології, екології, водної токсикології для студентів хіміко-біологічних та екологічних спеціальностей вищих навчальних закладів.

**Особистий внесок здобувача** полягає в самостійному опрацюванні наукової літератури з досліджуваної проблеми, оволодінні необхідними методами досліджень, виконанні всього обсягу експериментальних робіт, здійсненні статистичної обробки отриманих результатів. Здобувач особисто або у співавторстві підготувала до друку наукові праці, в яких викладені основні положення дисертації, самостійно сформулювала основні положення та висновки, задекларовані в роботі.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати, представлені в дисертації, обговорювалися на: IV Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2009); V Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих вчених «Проблеми та перспективи наук в умовах глобалізації» (Тернопіль, 2009); III Международной конференции с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, Россия, 2010); X Українському біохімічному з'їзді (Одеса, 2010); XIV Школе-конференції молодих

учених (Борок, Россия, 2010); VII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2011); I Біологічних читаннях «Фізіолого-біохімічні механізми формування токсикорезистентності біологічних систем» (Тернопіль, 2011); VII Международной научно-практической конференции «Pontus Euxinus-2011» (Севастополь, 2011); 47 Congress of European societies of toxicology (EUROTOX) (Paris, France, 2011); XIII з'їзді Українського ботанічного товариства (Львів, 2011); VI Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2011); III з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, 2012); IV Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Київ, 2012); International symposium on aquatic plants «Plants in hydrosystems from functional ecology to weed research» (Poznan, Poland, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, Россия, 2012); III Всеукраїнській науково-практичній конференції «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2012); Международной юбилейной конференции по альгологии (Київ, 2014); VII з'їзді Гідроекологічного товариства України (Київ, 2015).

**Публікації.** Результати дисертації викладено у 27 роботах, 2 з яких опубліковано у міжнародних виданнях, 8 у наукових фахових журналах України, решта – в матеріалах конференцій, симпозіумів та з'їздів.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація викладена на 143 сторінках друкованого тексту і складається із таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, висновки та список використаних джерел, що становить 294 посилань (з них 147 джерел іноземними мовами). Робота ілюстрована 26 рисунками і 18 таблицями.

### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**В огляді літератури** проаналізовано наявні у фаховій вітчизняній та зарубіжній літературі результати досліджень щодо метаболізму загалом та обміну ліпідів у водоростей зокрема. Розглянуто роль білків, вуглеводів та ліпідів у захисті клітин водоростей від підвищених концентрацій хімічних речовин у водному середовищі. Значна частина огляду присвячена обміну ліпідів у одноклітинних водоростей та впливу на цей процес чинників середовища. Акцентується увага на теоретичних і практичних аспектах використання компонентів мікрowodоростей та регуляції інтенсивності й спрямованості біосинтезу біотехнологічно важливих ліпідів.

**Матеріали та методи дослідження.** Об'єктом дослідження була альгологічно чиста культура *Chlorella vulgaris* Beij., яку культивували в середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11, що містив 0,058 мг/дм<sup>3</sup> Mn<sup>2+</sup> і 0,023 мг/дм<sup>3</sup> Zn<sup>2+</sup> (22-25<sup>o</sup>C, 2500 лк протягом 16 год/добу) (Топачевський А.В., 1975).

В експериментальних умовах у середовище культивування додавали дизельне паливо (Л-02-62, ГОСТ 305-82) в кількості 0,1; 0,5; 1,0 мг/дм<sup>3</sup>, а також водні розчини солей MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> у розрахунку на кількість іонів: Mn<sup>2+</sup> – 0,1; 0,2; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>; Zn<sup>2+</sup> – 1,0; 2,0; 5,0 мг/дм<sup>3</sup>; Cu<sup>2+</sup> – 0,001; 0,002; 0,005 мг/дм<sup>3</sup>, Pb<sup>2+</sup> – 0,1; 0,2; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>. Період інкубації культури водорості зі зазначеними речовинами становив від 0,083 год до 168 год при вивченні кінетики

поглинання іонів металів клітинами хлорели та 1, 3, 7 діб при дослідженні структурних і метаболічних показників клітин. У контролі клітини росли в поживному середовищі без присутності солей металів у експериментальних кількостях та дизельного палива (ДП).

Для дослідження готували гомогенати клітин хлорели, осаджували білки 10% трихлороцтовою кислотою та центрифугували (2500 об/хв, 20 хв). Ліпіди екстрагували сумішню хлороформ-метанол (2:1) згідно (Hokin L.E., Nехum T.D., 1992) та розділяли на класи методом одномірної тонкошарової хроматографії на силікагелі в системі гексан-диетиловий ефір-льодяна оцтова кислота (70:30:1), а їхню кількість визначали біхроматним методом (Кейтс М., 1975; Копытов Ю.П., 1983).

Інтенсивність біосинтезу ліпідів оцінювали за включенням [ $^{14}\text{C}$ ]-бікарбонату (20 кБк) та [ $^{14}\text{C}$ ]-ацетату натрію (200 кБк) при температурі 20°C і освітленні 2500 лк протягом 90 хв (Филиппович Ю.Б. та ін., 1975). Після зупинення реакції трихлороцтовою кислотою ліпіди екстрагували і розділяли за допомогою тонкошарової хроматографії. Радіоактивність проб вимірювали на сцинтиляційному лічильнику LS-100С «Beckman» (США).

Визначали активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Гл-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49) згідно з (Glucose-6-phosphatedehydrogenase/ТОУОВО ВІО СО LTD, 1999), гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (Г-3-ФДГ, КФ 1.1.1.8) згідно з (Glycerol-3-phosphatedehydrogenase/ТОУОВО ВІО СО LTD, 1999), 2-оксоглутаратдегідрогенази (2-ОГДГ, КФ 1.2.4.2) згідно з (Зинич В.Н., 1986), сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) згідно з (Прохорова М.И., 1982), цитохромоксидази (ЦО, КФ 1.9.3.1) згідно з (Straus W., 1954).

Для визначення активності гліцерол-3-фосфатацилтрансферази (Г-3-ФАТ, КФ 2.3.1.15) (Xu J.Y. et al., 2009) суспензію водорості розтирали та інкубували з 184 кБк [ $^{14}\text{C}$ ]-олеатом, 0,6 мМ гліцерол-3-фосфатом (Г-3-Ф), тритоном Х-100, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$  протягом 60 хв (20°C, 2500 лк). Реакцію зупиняли 10% трихлороцтовою кислотою, центрифугували, екстрагували ліпіди, розділяли їх на класи методом тонкошарової хроматографії та вимірювали радіоактивність зразків.

Пігменти екстрагували 90% розчином ацетону в темному місці при кімнатній температурі, центрифугували (1000 об/хв, 20 хв), тоді вимірювали вміст хлорофілів спектрофотометрично (Методичний посібник з визначення якості води, 2005; Lorenzen С.J., 1967).

Реакцію проникнення іонів металів у клітини хлорели зупиняли додаванням 2,5 мМ ЕДТА, центрифугували суспензію водоростей (2000 об/хв), осад промивали розчином середовища культивування водорості, далі проводили озолування у нітратній кислоті (Мур Дж., Рамамурти С., 1987). Вміст  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  та  $\text{Pb}^{2+}$  визначали атомно-абсорбційним методом на спектрофотометрі Selmi С-115М (Хавезова И., Цалева Д., 1983). Величини константи Міхаеліса ( $K_m$ ) і максимальної швидкості поглинання іонів металів ( $V_{max}$ ) у клітини водорості розраховані графічним методом у координатах Лайнуівера–Берка, енергію активації ( $E_a$ ) визначали графічним методом Арреніуса (Диксон М., Уэбб Э., 1982).

Морфологічні зміни в клітинах фіксували з допомогою мікроскопа МБИ-15 з наступним інтегрованим цифровим аналізом на комплексі «SSTU-camera Manual Vision SSD-color-WOYV00020» після їх фарбування «хлор-цинк-йод» реактивом згідно з (Broda B., 1971, Финдлей Дж., Эванз У., 1990).

Хлоропласти виділяли за методикою (Зубо Я.О., Кузнецов В.В., 2008) із використанням ступінчастого центрифугування в градієнті щільності перколу (40%/70%), відбирали їх на межі фаз 40%/70% перколу та досліджували на мікроскопі МБИ-15.

Одержані експериментальні дані опрацьовані методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Особливості ліпідного складу *Chlorella vulgaris* Beij.** Встановлено, що у клітинах хлорели в умовах культивування загальний вміст ліпідів становив 9,11 мг%. Однак, для отримання біологічно-активних речовин важливим є не власне вміст ліпідів у клітинах, а швидкість їх утворення та якісний склад, які можна регулювати певними чинниками (Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., 2010). Включення  $^{14}\text{C}$ -ацетату та  $^{14}\text{C}$ -бікарбонату в ліпіди становить 33,3%. Щодо біосинтезу ліпідів окремих класів, то найвищий ступінь накопичення  $^{14}\text{C}$ -ацетату спостерігається в триацилгліцероли (ТАГ), а найнижчий – у фосфоліпіди (ФЛ) (рис. 1).

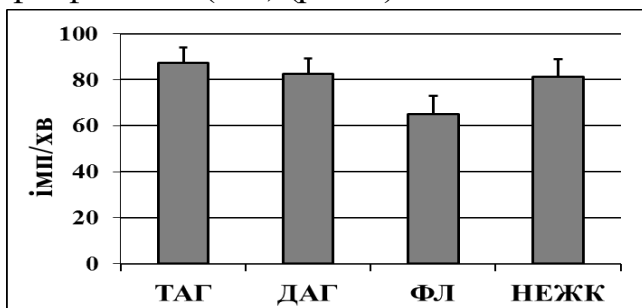


Рис. 1. Включення  $^{14}\text{C}$ -ацетату в окремі класи ліпідів у *Ch. vulgaris* Beij. у культурі,  $M \pm m$ ,  $n=3$

У клітинах хлорели найбільшим є відносний вміст ФЛ – 47% та ТАГ – 22%, бо ФЛ є структурними компонентами клітинних мембран і беруть участь у взаємодії клітини із зовнішнім середовищем (Abbas S.A., Card G.L., 1980), а ТАГ – запасним енергетичним субстратом (Gurr M.I. et al., 2002). Співвідношення вмісту ТАГ і ФЛ становить 0,47, що характеризує нормальний метаболічний статус ліпідів у клітинах водорості (Rodolfi L. et al., 2008; Griffiths M.J., Harrison S.T.L., 2009). Заряджені ФЛ мають високу сорбційну здатність (Wang L. et al., 2004) та виконують функції месенджерів щодо чинників середовища (Vigh L. et al., 1988). Менша кількість диацилгліцеролів (ДАГ, 16%) та неетерифікованих жирних кислот (НЕЖК, 15%) свідчить про незначне розщеплення їх попередників – ФЛ і ТАГ.

Щодо хлоропластів, у яких переважно відбувається біосинтез ліпідів у нормі, то вміст хлорофілу *a* (108,41 мкг/дм<sup>3</sup>) переважає вміст хлорофілу *b* (64,29 мкг/дм<sup>3</sup>), що, як вважає Чернавська Н.М. (1989), свідчить про зміщення стехіометричної рівноваги між комплексами реакційних центрів обох фотосистем (ФС) та світлозбирного комплексу ФС II. Більша кількість хлорофілу *a* співвідноситься із закономірністю до накопичення ліпідів у хлоропластах.

**Субстратне та енергетичне забезпечення біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij.** В умовах культивування важливий аспект належить швидкості біосинтезу адаптивних речовин та енергетичному статусу клітини (Schmid K.M., Ohlrogge J.B., 2002).



Отримані дані щодо активності ензимів свідчать про те, що за участю Гл-6-ФДГ утворюється значна кількість субстратів для біосинтезу ліпідів: Г-3-Ф та ацетил-КоА, а також НАДФН<sub>2</sub>, необхідний для біосинтезу жирних кислот. Щодо функціонування пентозофосфатного шляху, гліцеролфосфатного човникового механізму і циклу трикарбонових кислот (ЦТК) у субстратному забезпеченні біосинтезу ліпідів, слід зазначити, що в них відбувається активне перетворення амінокислотних залишків, які є додатковим джерелом Г-3-Ф.

Активності 2-ОГДГ та СДГ свідчать про високу інтенсивність функціонування ЦТК як постачальника НАДН<sub>2</sub>, ФАДН<sub>2</sub> та енергії для біосинтезу ліпідів.

**Концентраційно-часові закономірності поглинання іонів металів клітинами *Chlorella vulgaris* Beij.** Виявлено флюктуаційний характер поглинання досліджуваних іонів металів (рис. 2) клітинами хлорели в часі і залежно від концентрації.

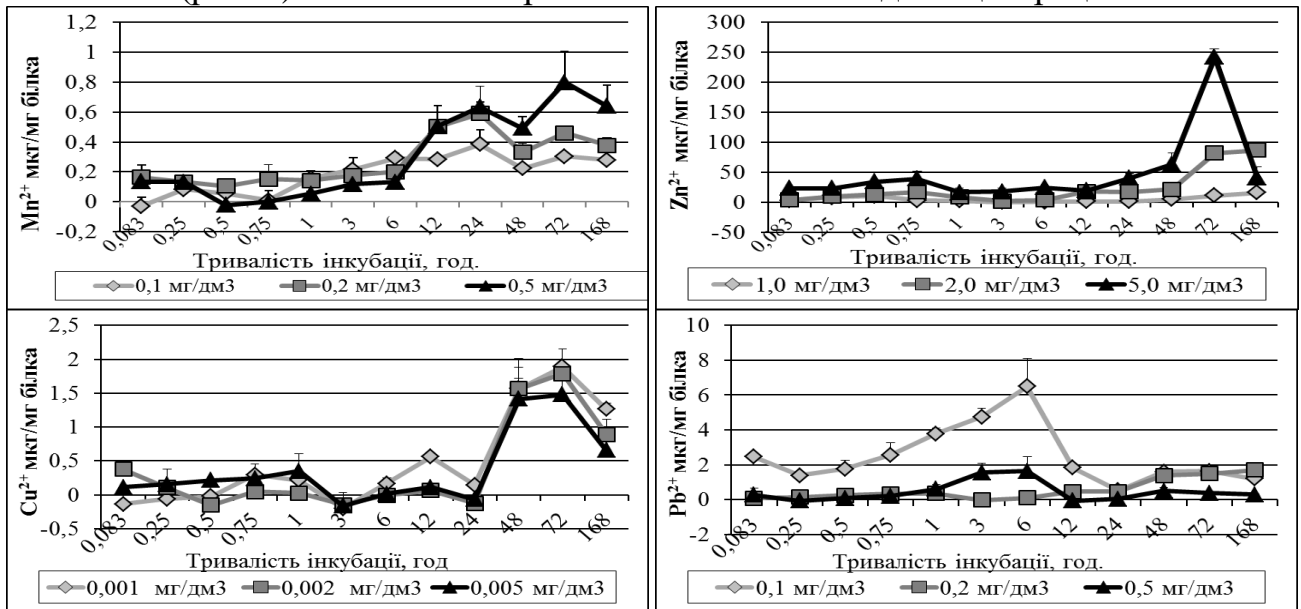
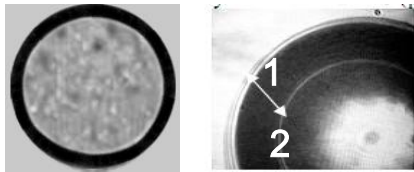


Рис. 2. Поглинання  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  клітинами *Ch. vulgaris* Beij.

Нами виділено 4 етапи поглинання іонів металів: етап самоізоляції (стрес-реакція) клітин, етап активного поглинання, етап пригнічення, етап відновленого поглинання. Етап самоізоляції – це відповідь клітинного організму на стресову дію іонів металів, що проявляється за дії  $Mn^{2+}$  (0,2 і 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – до 0,5 год),  $Cu^{2+}$  (0,002 мг/дм<sup>3</sup> – до 0,5 год),  $Pb^{2+}$  (0,1 і 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – до 0,25 год). Зниження опірності первинної клітинної мембрани до металів характеризується етап активного проникнення:  $Mn^{2+}$  (0,1 мг/дм<sup>3</sup> – від 0,75 до 24 год; 0,2 і 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – від 0,5 до 24 год),  $Zn^{2+}$  (1 мг/дм<sup>3</sup> – до 0,5 год; 2 і 5 мг/дм<sup>3</sup> – до 0,75 год),  $Cu^{2+}$  (0,001 мг/дм<sup>3</sup> – до 0,75 год; 0,002 мг/дм<sup>3</sup> – від 0,5 до 0,75 год; 0,005 мг/дм<sup>3</sup> – до 1 год),  $Pb^{2+}$  (0,1 і 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – від 0,25 до 6 год; 0,2 мг/дм<sup>3</sup> – до 1 год), що супроводжується руйнуванням клітинної оболонки (Костюк К.В., Грубінко В.В., 2010).

Виявлений характер поглинання іонів співвідноситься зі структурно-функціональними перебудовами клітинної оболонки за дії іонів металів (рис. 3), що, як показали Костюк К.В., Грубінко В.В. (2010), полягає у формуванні «подвійної концентричної мембранної системи» як захисної адаптації та сприяє нормалізації функціональної та метаболічної діяльності клітин і їх виживанню за дії несприятливих чинників.

Утворення «подвійної концентричної мембранної системи» спостерігається за дії  $Mn^{2+}$  при всіх досліджених концентраціях – від 24 год до 48 год,  $Zn^{2+}$  (5 мг/дм<sup>3</sup>) – від



Контроль

Zn<sup>2+</sup>

Рис. 3. Утворення «вторинної концентричної мембранної системи» у клітині *Ch. vulgaris* Beij. за дії Zn<sup>2+</sup> (5 мг/дм<sup>3</sup>), х900: 1 – первинна мембрана; 2 – «вторинна концентрична мембрана»

0,75 год до 1 год, Cu<sup>2+</sup> (0,001; 0,002; 0,005 мг/дм<sup>3</sup>) – від 1 год до 24 год, Pb<sup>2+</sup> (0,1; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>) – від 6 год до 12 год. Припускаємо, що «вторинна концентрична мембрана» функціонує як і первинна, що підтверджується її білково-ліпідним складом (Костюк К.В., 2011).

Наступний етап активації процесу поглинання, що спостерігається за дії Mn<sup>2+</sup> (0,1 і 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – від 48 до 72 год; 0,2 мг/дм<sup>3</sup> – від 48 год до 168 год), Zn<sup>2+</sup> (1 і 2 мг/дм<sup>3</sup> – від 3 до 168 год; 5 мг/дм<sup>3</sup> – від 1 до 72 год), Cu<sup>2+</sup> (0,001; 0,002; 0,005 мг/дм<sup>3</sup> – від 24 до 72 год), Pb<sup>2+</sup> (0,1 мг/дм<sup>3</sup> – від 24 до 72 год; 0,2 мг/дм<sup>3</sup> – від 3 до 168 год; 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – від 12 до 48 год), характеризується руйнуванням «вторинної концентричної мембрани», як зазначають Костюк К.В., Грубінко В.В. (2010), унаслідок вичерпання захисних ресурсів клітин. Подальше акумулювання іонів досліджених металів стає неконтрольованим і відбувається закономірний процес загибелі клітини.

Отже, поглинання і накопичення Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> та Pb<sup>2+</sup> клітинами *Ch. vulgaris* Beij. залежить від їх концентрації в середовищі та часу дії на клітини і є флуктуаційним, відбувається за змішаним механізмом та визначається спорідненістю металів зв'язуючих компонентів мембран, формуванням «вторинної концентричної мембрани» та її опірністю до металів, тривалістю її структурно-функціональної активності, після втрати якої та насичення іонами металів речовин, що їх зв'язують, поглинання стає неконтрольованим.

**Регуляція ліпідного обміну в *Chlorella vulgaris* Beij. іонами металів.** Іони металів у водоростей викликають кількісні та якісні зміни складу метаболітів клітин (Дмитрієва А.Г. и др., 2002; Боднар О.І., 2008; Rozentsvet O.A. et al., 2004).

За вирощування хлорели в середовищі із Mn<sup>2+</sup> (0,2 мг/дм<sup>3</sup>, 3 доба), Zn<sup>2+</sup> (5 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб), Cu<sup>2+</sup> (0,002 мг/дм<sup>3</sup>, 3 доба) і Pb<sup>2+</sup> (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб) вміст ліпідів зростає на 47%, 15%, 33% і 32% відповідно щодо контролю. Співвідношення відносного вмісту ліпідів (ТАГ:ДАГ:ФЛ:НЕЖК, %) в контролі становило 22:16:47:15, за дії: Mn<sup>2+</sup> – 27:25:28:20, Zn<sup>2+</sup> – 26:16:33:25, Cu<sup>2+</sup> – 22:22:39:17, Pb<sup>2+</sup> – 21:21:37:21.

Підвищення абсолютного вмісту ТАГ за дії усіх досліджених іонів металів та їх відносної частки за дії Mn<sup>2+</sup> і Zn<sup>2+</sup> необхідно для ущільнення клітинних мембран як захист від їх надлишку (Костюк К.В., Грубінко В.В., 2010). Зростання вмісту ТАГ – один із факторів стабілізації мембран. Збільшення вмісту ДАГ та НЕЖК за стресу пояснюється активацією ліпаз і фосфоліпаз (Мецлер Д., 1980; Schmid K.M., Ohlrogge J.V., 2002). Тому вміст ФЛ під впливом іонів металів зменшується, що можна пояснити їх участю як у зв'язуванні металів, так і їх виведенні з метаболічного пулу завдяки високій абсорбційній здатності цих ліпідів щодо металів (Wang L. et al., 2004).

За дії Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> спостерігається тенденція до зростання включення <sup>14</sup>C-ацетату (табл. 1) у ФЛ, за дії Mn<sup>2+</sup> – в ДАГ з одночасним зниженням включення мітки в ліпіди інших класів. Зростання вмісту ТАГ і ДАГ є не стільки наслідком їх біосинтезу *de novo*,

скільки перерозподілом у клітині в процесі адаптивної перебудови мембран у відповідь на дію іонів металів (Костюк К.В., Грубінко В.В., 2010; Костюк К.В., 2011).

Виявлено збільшення вмісту хлорофілів *a* та *b* за дії  $Zn^{2+}$  і  $Pb^{2+}$ , що може бути пов'язано з високою проникністю, рухливістю в клітині та комплексоутворюючою здатністю  $Zn^{2+}$ , а  $Pb^{2+}$  – високою здатністю до утворення металтіонеїноподібних комплексів (Дмитриєва А.Г. и др., 2002; Webb M., 1987). Іони  $Cu^{2+}$  і  $Mn^{2+}$  пригнічують фотосинтез, бо  $Cu^{2+}$  менш рухливі у клітинах, зв'язуються з клітинними стінками та утворюють комплекси з низькомолекулярними органічними речовинами та білками (Дмитриєва А.Г. и др., 2002), а дію  $Mn^{2+}$  можна пояснити активацією ними хлорофілази, яка руйнує хлорофіл (Howe P. et al., 2004).

Таблиця 1

Включення  $^{14}C$ -ацетату в окремі класи ліпідів у *Ch. vulgaris* Beij.  
за дії  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Pb^{2+}$ ,  $M \pm m$ ,  $n=3$

Умови культивування	Включення $^{14}C$ -ацетату в окремі класи ліпідів, імп/хв			
	ТАГ	ДАГ	ФЛ	НЕЖК
Контроль	87,17±6,79	82,50±6,61	65,00±7,94	81,17±7,78
$Mn^{2+}$ (0,2 мг/дм <sup>3</sup> , 3 доби)	79,25±2,52	91,50±2,14	63,42±5,64	67,68±9,76
$Zn^{2+}$ (5,0 мг/дм <sup>3</sup> , 7 діб)	92,50±4,33	83,00±8,23	84,50±6,36*	82,33±3,62
$Cu^{2+}$ (0,002 мг/дм <sup>3</sup> , 3 доби)	84,06±10,64	83,12±7,52	76,52±3,31	85,98±3,82
$Pb^{2+}$ (0,5 мг/дм <sup>3</sup> , 7 діб)	79,25±3,18	78,17±9,04	78,33±4,75	90,50±2,29

Примітка: \* –  $p < 0,05$  за t-критерієм Стьюдента (щодо контролю)

Отже, іони досліджених металів викликають різноспрямовані зміни ліпідного складу клітин хлорели, що, ймовірно, пов'язано з різними механізмами їх дії на метаболізм клітин та його адаптивні перебудови. Разом із тим, усі досліджені метали сприяли накопиченню ліпідів, особливо ТАГ, ДАГ і НЕЖК, що є наслідком формування захисних систем у клітинах від дії іонів металів на рівні мембран (Костюк К.В., Грубінко В.В., 2010; Костюк К.В., 2011). Найяскравіші ефекти щодо ліпідного обміну виявили  $Mn^{2+}$  та  $Zn^{2+}$ , що вибірково стимулювали синтез і накопичення окремих класів ліпідів. Інтенсивність зростання вмісту ліпідів у хлорели за дії окремих металів відбувається в рядках: ТАГ –  $Pb^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+} < Mn^{2+}$ ; ДАГ –  $Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cu^{2+} < Mn^{2+}$ ; ФЛ –  $Cu^{2+} < Pb^{2+} < Zn^{2+} < Mn^{2+}$ ; НЕЖК –  $Cu^{2+} < Pb^{2+} < Mn^{2+} < Zn^{2+}$ .

**Субстратне та енергетичне забезпечення біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. за дії іонів металів.** За дії на клітини хлорели іонів досліджуваних металів активність Гл-6-ФДГ зменшується протягом усього періоду експозиції. Інактивація Гл-6-ФДГ спостерігається за дії  $Pb^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  завдяки їх високій спорідненості до SH-груп та свідчить про те, що перетворення глюкози не є основним джерелом НАДФН<sub>2</sub>, які беруть участь у біосинтезі ліпідів. Активаційний ефект  $Mn^{2+}$  можна пояснити як його низькою спорідненістю до SH-груп, так і кофакторною участю в ряді ензимів вуглеводного обміну. Активації гліколізу сприяють  $Zn^{2+}$  і  $Pb^{2+}$ , а  $Mn^{2+}$  та  $Cu^{2+}$ , навпаки, пригнічують його. Зростання активності Г-3-ФАТ можливо пов'язано із забезпеченням енергією стресових і адаптивних відповідей, а саме зі зростанням вмісту в клітинних мембранах окремих адаптивних класів ліпідів (Костюк К.В., 2011).

Зростання активності 2-ОГДГ за дії  $Zn^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  сприяє інтенсифікації циклу Кребса, а іони  $Mn^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  пригнічують цей процес. Іони  $Pb^{2+}$  блокують SH-групи активного центру ензиму, утворюючи меркаптиди (Ленинджер А., 1985). Активуючий ефект іонів металів щодо СДГ пов'язаний із енергетичним забезпеченням виведення іонів металів із клітини. Також можливим механізмом впливу на активність СДГ є чутливість сукцинат-залежного дихання до  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$  (Tan Y.F. et al., 2010). Зростання активності ЦО, очевидно, пов'язане зі збільшенням енерговитрат організму на детоксикацію іонів металів (Боднар О.І., 2008). Цей факт узгоджується із зростанням активності на 3-тю добу дії іонів металів у ряду  $Zn^{2+} < Mn^{2+} < Pb^{2+} < Cu^{2+}$ .

Встановлено інгібування іонами металів активності Гл-6-ФДГ, і як наслідок, гліколізу, що супроводжується зниженням утворення відновлених нікотинамідів та вивільнення енергії АТФ. Спряжене функціонування Г-3-ФДГ і Г-3-ФАТ спостерігається за дії іонів  $Zn^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  протягом усього періоду дії та  $Cu^{2+}$  на 7 добу дії.

Отже, у вказаних випадках у хлорели відбувається активація біосинтезу ліпідів із Г-3-Ф, що утворюється не лише шляхом окиснення глюкози, але й з вільного гліцеролу та ацетил-КоА – з амінокислот. Енергетичне забезпечення біосинтезу ліпідів здійснюється за зростання активності 2-ОГДГ та СДГ за дії всіх досліджених іонів металів, що свідчить про активацію циклу Кребса, зростання утворення НАДН<sub>2</sub>, НАДФН<sub>2</sub> та генерування енергії АТФ у ланцюгу окислювального фосфорилування. Утворена енергія може використовуватися на детоксикацію та виведення металів із клітин.

**Особливості ліпідного обміну в *Chlorella vulgaris* Beij. за дії дизельного палива.** Використання нафтопродуктів як регуляторів життєдіяльності водоростей і біосинтезу ними біотехнологічно-корисних продуктів важливо як з погляду прогнозування і регулювання їх розвитку в природних гідроекосистемах та їх використання для очищення від нафтових забруднень, так і у зв'язку з можливістю отримання й виділення нафтово-ліпідних суспензій (Aullon Alcaine A., 2010).

Включення <sup>14</sup>С-ацетату в ліпіди (табл. 2) за дії ДП (0,1 мг/дм<sup>3</sup>) збільшується протягом усього терміну дії чинника, включення <sup>14</sup>С-бікарбонату за цей період зменшується. Зростання співвідношення включення у ліпіди <sup>14</sup>С-ацетату до <sup>14</sup>С-бікарбонату можливе у зв'язку з функціонуванням ензимних систем утворення жирних кислот не тільки шляхом карбоксилювання ацил-КоА, а й з ацетату (Schmid K.M., Ohlrogge J.V., 2002).

Таблиця 2

Включення <sup>14</sup>С-субстратів у ліпіди *Ch. vulgaris* Beij. за дії ДП,  $M \pm m$ ,  $n=3$

Тривалість дії, дів	Включення <sup>14</sup> С- субстратів, імп/хв		Співвідношення включення <sup>14</sup> С-ацетату/ <sup>14</sup> С-бікарбонату
	<sup>14</sup> С-ацетат	<sup>14</sup> С-бікарбонат	
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: \* –  $p \leq 0,02$  за  $t$ -критерієм Стьюдента (щодо контролю)

Включення <sup>14</sup>С-ацетату (табл. 3) за дії ДП (0,1 мг/дм<sup>3</sup>) у ТАГ зменшується протягом усього періоду культивування водорості, в ДАГ зменшується на 14% вже

протягом 1-ї доби дії, у ФЛ зростає на 34% і 26% протягом 1 і 7 діб, в НЕЖК збільшується на 15% і 10% щодо контролю відповідно на 1 і 7 доби.

Раніше показано (Воскобойников Г.М. и др., 2004), що зі збільшенням кількості нафти та нафтопродуктів у середовищі існування гідробіонтів значно зростає кількість ліпідів у їхніх клітинах, проте їх склад суттєво змінюється. За культивування хлорели в середовищі з ДП вміст ліпідів зростає на 72% і 113% на 1 і 7 доби дії відповідно.

Таблиця 3

Включення  $^{14}\text{C}$ -ацетату в окремі класи ліпідів *Ch. vulgaris* Beij. за дії ДП,  $M \pm m$ ,  $n=3$

Тривалість дії, діб	Включення $^{14}\text{C}$ -ацетату в окремі класи ліпідів, імп/хв			
	ТАГ	ДАГ	ФЛ	НЕЖК
Контроль	87,17±6,79	82,50±6,61	65,00±7,94	81,17±7,78
1	83,17±11,09	70,67±11,62	86,83±8,88*	93,00±6,73
7	81,33±5,35	82,50±11,53	82,17±11,93	89,17±4,68

Примітка: \* –  $p \leq 0,01$  за  $t$ -критерієм Стьюдента (щодо контролю)

Щодо співвідношення вмісту ТАГ:ДАГ:ФЛ:НЕЖК (%), то в контролі воно становило 22:16:47:15, за дії ДП протягом 1-ої доби – 26:22:27:25, 7-ї доби – 29:22:25:24. За дії ДП ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) відносний вміст ТАГ, ДАГ і НЕЖК зростає на 1 добу дії на 18%, 38% і 67% відповідно, на 7 добу дії – на 32%, 38% і 60% щодо контролю відповідно. Відносний вміст ФЛ зменшився на 43% і 47% щодо контролю протягом 1 і 7 доби дії ДП відповідно.

Отже, в клітинах хлорели за культивування у присутності ДП ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) формується стан метаболічного стресу і відбуваються суттєві кількісні та якісні зміни ліпідного складу. Зростає абсолютний і відносний вміст ТАГ, ДАГ та НЕЖК, основну захисну функціональну роль виконують ФЛ. Максимальний термін культивування водоростей, протягом якого дизпаливо ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) не пригнічує метаболізм в клітинах водоростей, становить 7 діб.

**Субстратне та енергетичне забезпечення синтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. за дії дизельного палива.** Виявлено, що активність Гл-6-ФДГ пригнічується протягом усього терміну культивування водорості за дії ДП у досліджених концентраціях. Результатом цього є пригнічення гліколізу, що знижує продукування Г-3-Ф, необхідного для біосинтезу ліпідів. Активність Г-3-ФДГ за дії досліджених концентрацій ДП зменшується. Припускаємо, що попередником біосинтезу ліпідів у водорості за дії ДП у досліджених концентраціях є Г-3-Ф, утворений шляхом фосфорилування вільного гліцеролу (Диксон М., Уэбб Э., 1982). Активність Г-3-ФАТ за дії ДП має тенденцію до зростання протягом усього періоду експозиції.

Щодо забезпечення енергією метаболізму в клітині, то активність 2-ОГДГ на 1 добу дії зростає особливо за дії ДП у концентрації  $0,1$  і  $0,5 \text{ мг/дм}^3$  на 128% і 109% відповідно щодо контролю, на 3 добу – зменшується на 3% і 36% щодо контролю відповідно, при  $1,0 \text{ мг/дм}^3$  зростає на 17%. Активація ензиму спостерігається на 7 добу дії при зростанні концентрації  $0,1$ ;  $0,5$  і  $1,0 \text{ мг/дм}^3$  на 3%, 84% і 92% відповідно.

Найнижчі значення активності СДГ спостерігаються за дії ДП ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) на 1-у (зниження на 66%) і 7-у доби (зниження на 74%) дії, що свідчить про пригнічення активності циклу Кребса, а тому й зниження утворення НАДН<sub>2</sub>, НАДФН<sub>2</sub> і генерування енергії АТФ. Незначна активація СДГ ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ , 3 доби) узгоджується із раніше

встановленим ефектом часткового відновлення метаболічної активності в багатьох водних організмів у часовому градієнті після фази первинного пригнічення (Грубінко В.В., 2008), підтвердженої у водоростей (Боднар О.І., 2008).

Активність ЦО за дії низьких концентрацій ДП (0,1; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>) стрімко зростає зі збільшенням тривалості експозиції, а саме за дії 0,1 мг/дм<sup>3</sup> ДП – на 16%, 14% та 42%, за дії 0,5 мг/дм<sup>3</sup> – на 91%, 32% та 122% щодо контролю на 1, 3 та 7 доби дії відповідно. Встановлено визначальну роль ЦО у забезпеченні енергією проникнення, зв'язування та детоксикації (Хоменчук В.О., 2003; Боднар О.І., 2008), що співвідноситься зі зростанням його активності протягом усього терміну культивування хлорели з ДП.

Встановлено, що пригнічення та активація досліджених ензимів за дії ДП порушує функціонування налагоджених механізмів генерування енергії. За таких умов джерелами субстратів для біосинтезу ліпідів є Г-3-Ф, утворений з вільного гліцеролу та ацетил-КоА – з карбонових ланцюгів амінокислот (Боднар О.І., 2008).

**Клітинна локалізація біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij.** за дії іонів цинку, плюмбуму та дизельного палива. Відомо (Schmid K.M., Ohlrogge J.B., 2002), що біосинтез ліпідів у рослин відбувається в хлоропластах, лише незначна їх частина – в цитоплазмі та мітохондріях (Ohlrogge J.B. et al., 1979). В ендоплазматичному ретикулумі відбувається приєднання новоутворених жирних кислот до Г-3-Ф з утворенням гліцероліпідів, в цитозолі – подовження ацильного ланцюга (Dörmann P., 2007), а також біосинтез ліпідів за рахунок утвореного в процесі окислення жирних кислот ацетил-КоА, експортованого із хлоропластів (Schmid K.M., Ohlrogge J.B., 2002). Однак, за дії стресорів відбувається зміна клітинного метаболізму (Rozentsvet O.A. et al., 2004), унаслідок якої зростає здатність до біосинтезу ліпідів у цитоплазмі.

Збільшення вмісту хлорофілу *a* (рис. 4.) виявлено за дії Zn<sup>2+</sup> (5,0 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб) протягом 7 діб на 25%, хлорофілу *b* – на 18%; за дії Pb<sup>2+</sup> (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба) на 1 добу вміст хлорофілів *a*, *b* також збільшується на 12%, 25% відповідно; за дії ДП (0,1 мг/дм<sup>3</sup>, 1 діб) на 1 добу дії вміст хлорофілів *a*, *b* зменшується на 20%, 23% щодо контролю.

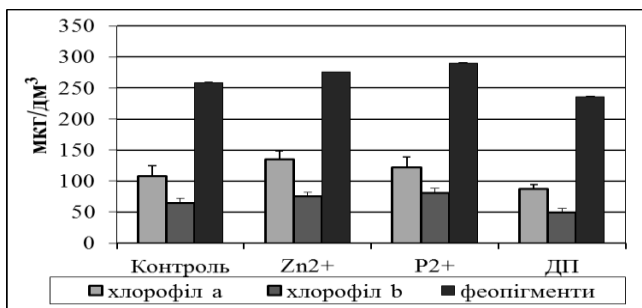


Рис. 4. Вміст хлорофілів і феофіментів у *Ch. vulgaris* Beij. за дії Zn<sup>2+</sup> (5,0 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб), Pb<sup>2+</sup> (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба) та дизельного палива (0,1 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба), M±m, n=3

Загальний вміст ліпідів (рис. 5) у контролі в цитоплазматичній фракції менший, ніж у хлоропластах на 41%, що узгоджується з локалізацією біосинтезу ліпідів у хлоропластах (Schmid K.M., Ohlrogge J.B., 2002). Вміст ліпідів у цитоплазмі та хлоропластах за дії іонів металів залежить від специфіки їх дії: Zn<sup>2+</sup> практично не змінюють загальний вміст ліпідів, Pb<sup>2+</sup> збільшують їх вміст щодо контролю на 44% в цитоплазмі. При цьому вміст ліпідів у хлоропластах практично не змінився. В цілому дія Pb<sup>2+</sup> і ДП збільшує вміст ліпідів у цитоплазмі.

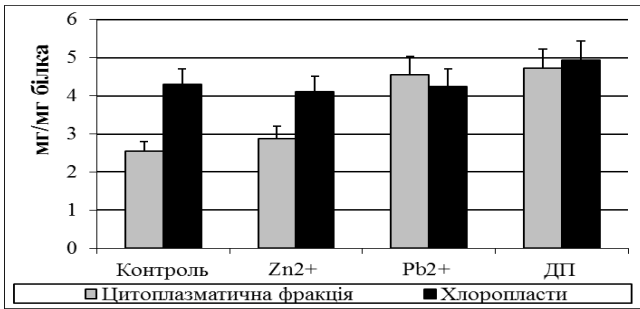


Рис. 5. Загальний вміст ліпідів у клітинних фракціях *Ch. vulgaris* Веїж. за дії Zn<sup>2+</sup> (5,0 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб), Pb<sup>2+</sup> (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба) та дизельного палива (0,1 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба), M±m, n=3

Вміст ТАГ у контролі в цитоплазмі та хлоропластах не відрізняється (рис. 6). Вміст ДАГ, ФЛ і НЕЖК у хлоропластах більший на 124%, 22% і 480% відповідно, ніж у цитоплазмі. Отримані дані співвідносяться із переважанням у тилакоїдах вуглеводних попередників ДАГ, незначним переважанням фосфатидилгліцеролів і значним переважанням вільних вищих жирних кислот (Schmid K.M., Ohlrogge J.B., 2002). Практично однаковий вміст ТАГ в обох клітинних структурах можна пояснити їх значним представленням у клітинних мембранах рослин (Froehlich J.E. et al., 2001).

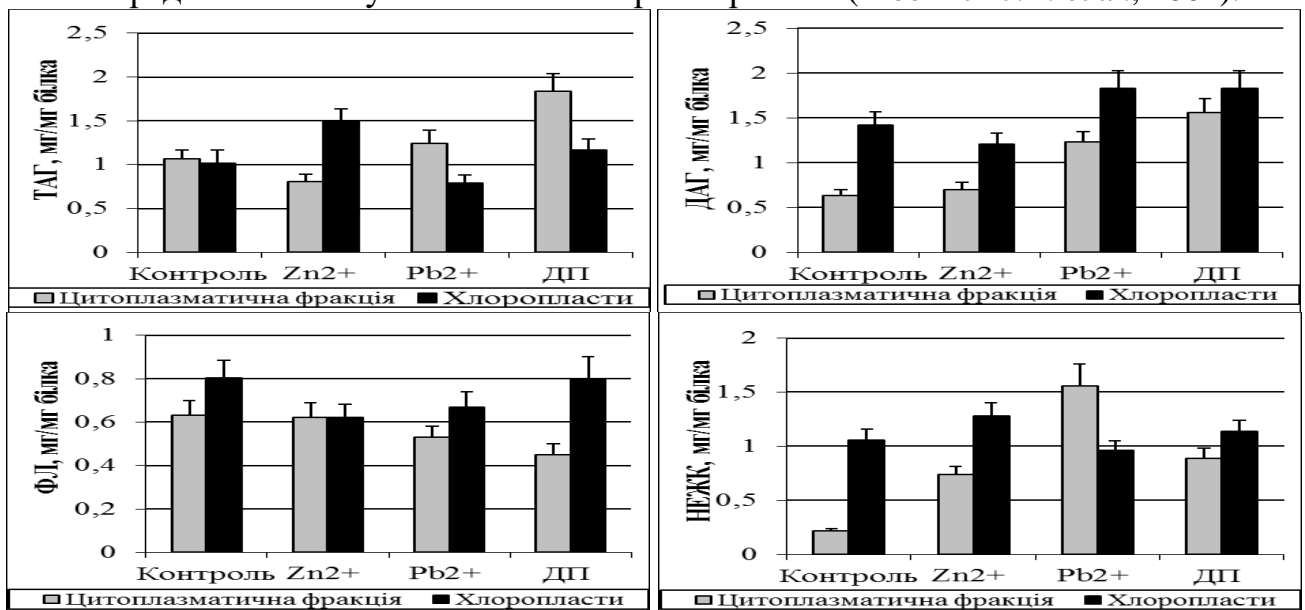


Рис. 6. Вміст ТАГ, ДАГ, ФЛ та НЕЖК у клітинних структурах *Ch. vulgaris* за дії Zn<sup>2+</sup> (5,0 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб), Pb<sup>2+</sup> (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба) та дизельного палива (0,1 мг/дм<sup>3</sup>, 1 доба), M±m, n=3

Вміст ТАГ у цитоплазмі за дії Zn<sup>2+</sup> зменшується на 24%, Pb<sup>2+</sup> і ДП стимулюють накопичення ТАГ на 16% і 73% відповідно. Вміст ТАГ у хлоропластах за дії Zn<sup>2+</sup> і ДП збільшується на 47% і 15% відповідно, за дії Pb<sup>2+</sup> – зменшується на 23%. Збільшення вмісту ТАГ у цитоплазматичній фракції може бути пов'язано з ущільненням мембран, що спостерігається за дії Pb<sup>2+</sup> і ДП (Костюк К.В., 2010). Накопичення ДАГ у цитоплазмі відбувається за дії всіх досліджених речовин: максимальне його значення спостерігається за дії Pb<sup>2+</sup> і ДП (у 2,0-2,5 раза щодо контролю). Відносний вміст ДАГ у хлоропластах за дії Pb<sup>2+</sup> і ДП зростає у 1,3 раза, за дії Zn<sup>2+</sup> – знижується. Отже, в цитоплазматичній фракції активується утворення ДАГ, що співвідноситься з мембранними перебудовами в клітинах водних рослин за дії іонів металів (Костюк К.В., 2010; Rozentsvet O.A. et al., 2004).

Вміст ФЛ у цитоплазмі найзначніше знижується за дії Pb<sup>2+</sup> (на 16%) і ДП (на 29%), у хлоропластах – на 23% і 17% за дії Zn<sup>2+</sup> і Pb<sup>2+</sup> відповідно. Зниження вмісту ФЛ може

бути спряжене як з перебудовою мембран (ущільненням), так і з їх розщепленням через активацію фосфоліпаз (Rozentsvet O.A. et al., 2004), а також участю фосфатних складових в інших метаболічних процесах (Боднар О.І., 2008; Костюк К.В., 2010).

Вміст НЕЖК у цитоплазматичній фракції за дії досліджених речовин збільшується і максимальне його значення спостерігається за дії  $Pb^{2+}$  на 1 добу дії (зростає в 7 разів). Кількість НЕЖК збільшується у хлоропластах за дії  $Zn^{2+}$  та ДП на 21% та 7,5% щодо контролю відповідно, за дії  $Pb^{2+}$  – зменшується на 9% щодо контролю. Зростання вмісту НЕЖК пов'язане з розщепленням ФЛ, які можуть бути не лише джерелом фосфатів, але й використовуються в енергетичному забезпеченні клітин (Боднар О.І., 2008). Виявлені зміни пов'язані з виконанням ліпідами різних адаптивних функцій за дії речовин різної хімічної природи.

Отримані дані підтверджуються включенням  $^{14}C$ -ацетату в ТАГ і ФЛ, що при дії  $Zn^{2+}$  у цитоплазматичній фракції знижується на 16% і 1,2%, включення  $^{14}C$ -ацетату в ДАГ зростає на 27% порівняно з контролем, в НЕЖК – практично не змінюється. Включення  $^{14}C$ -ацетату в ТАГ, ДАГ і ФЛ у цитоплазматичній фракції за дії  $Pb^{2+}$  збільшується на 3%, 5% і 30% відповідно, НЕЖК – зменшується на 12,5% щодо контролю. За дії ДП включення  $^{14}C$ -ацетату в ТАГ і НЕЖК знижується на 5%, у ФЛ – зростає на 16%, у ДАГ – не змінюється щодо контролю.

Отже, за дії всіх досліджених речовин біосинтез ліпідів активується переважно в цитоплазматичній фракції. Однак,  $Zn^{2+}$  як біогенний елемент, посилює накопичення ДАГ, а  $Pb^{2+}$  і ДТ – ФЛ, що може бути пов'язано з різним механізмом дії цих речовин (Костюк К.В., 2010).

У зв'язку з отриманими даними становило інтерес вивчення хлоропластів. Кількість хлоропластів за дії  $Zn^{2+}$  і ДП збільшується в 8,5 і 4,7 раза щодо контролю, за дії  $Pb^{2+}$  – зменшується на 19%. За дії досліджених чинників діаметр хлоропластів зменшується: за дії  $Zn^{2+}$  – на 63%,  $Pb^{2+}$  – на 6%, ДП – на 43% порівняно з контролем.  $Pb^{2+}$  переважно впливає на ензимні системи біосинтезу ліпідів, оскільки незначно знижується як кількість хлоропластів, так і їх розміри.  $Zn^{2+}$  і ДП, очевидно, впливають на структуру хлоропластів, змінюючи їх морфологію та інтенсивність утворення, оскільки їх кількість у клітинах значно зростає, що позначається на їх здатності до біосинтезу ліпідів. Раніше встановлено (Kiyomi Ono et al., 1994), що в клітинах мезофіла листя кількість хлоропластів у клітині повільно знижується в процесі старіння, коли відбувається швидка деградація хлоропластів. Пожовтіле листя при цьому містило багаточисленні структури, що нагадують краплі жиру, як і в нашому випадку за дії на клітини хлорели ДП ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) на 1 добу дії. У зв'язку з цим отримані нами результати можуть свідчити про вірогідну деградацію хлоропластів і при інтоксикації іонами металів та дизельним паливом. У хлоропластах знижується утворення необхідних адаптивних ліпідів як за кількісним, так і за якісним складом. У зв'язку з цим біосинтез ліпідів активується і в інших клітинних структурах, насамперед, ендоплазматичному ретикулумі.

## ВИСНОВКИ

У дисертації на основі проведених експериментальних досліджень вивчено вплив  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  та дизельного палива в концентраційно-часовому градієнті на



вміст та біосинтез ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris* Beij., зміну його інтенсивності в різних клітинних структурах, функціонування ключових ензимів ліпідного та енергетичного обмінів. Встановлено закономірності поглинання іонів металів клітинами та адаптації клітин до дії досліджених чинників водного середовища.

1. Виявлено, що поглинання  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  є концентраційно- і часо-залежним процесом, який носить флуктуаційний характер, має 4 етапи за дії досліджених чинників: самоізоляція (стрес-реакція) клітин, активне поглинання металів, пригнічення поглинання, нерегульоване клітиною поглинання.

2. Поглинання  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  клітинами хлорели відбувається за змішаним типом інгібування та визначається спорідненістю метал-зв'язуючих компонентів клітин, після насичення іонами металів речовин, що їх зв'язують, поглинання стає нерегульованим клітиною (за дії  $Mn^{2+}$  – 48-168 год,  $Zn^{2+}$  – 3-72 год,  $Cu^{2+}$  – 24-72 год,  $Pb^{2+}$  – 24-168 год). Процес поглинання металів є енергозалежним лише за вказаних проміжків часу:  $Mn^{2+}$  – 0,25-0,5; 24-72 год,  $Zn^{2+}$  – 0,5-3; 12-24 год,  $Cu^{2+}$  – 0,5-0,75; 1-3; 6-24 год,  $Pb^{2+}$  – 1-3 год.

3. Виявлено, що біосинтез ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. за дії іонів металів залежить від природи металу, рівня токсичності (для  $Cu^{2+}$  і  $Pb^{2+}$ ), біологічної ролі в клітині та механізму дії. Іони металів сприяють накопиченню загального вмісту ліпідів та посиленню інтенсивності біосинтезу їх окремих класів. Біотехнологічно-ефективними для накопичення ліпідів водоростями є вплив:  $Mn^{2+}$  (0,2 мг/дм<sup>3</sup>, 3 доби) збільшує вміст загальних ліпідів на 47%,  $Zn^{2+}$  (5 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб) – на 15%,  $Cu^{2+}$  (0,002 мг/дм<sup>3</sup>, 3 доби) – на 33%,  $Pb^{2+}$  (0,5 мг/дм<sup>3</sup>, 7 діб) – на 32% порівняно з контрольними показниками.

4. Встановлено, що за культивування хлорели з дизельним паливом (0,1 мг/дм<sup>3</sup>) загальний вміст ліпідів зростає на 72-113% порівняно з контролем, проте інтенсивність біосинтезу триацилгліцеролів і диацилгліцеролів знижується. Включення <sup>14</sup>C-ацетату в фосфоліпиди зростає. Виявлені перебудови ліпідного обміну в хлорели за дії дизельного палива можна розглядати як стан метаболічного стресу.

5. Встановлено, що вміст хлорофілів *a* і *b* за дії  $Mn^{2+}$  і  $Cu^{2+}$  знижується, за дії  $Zn^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  збільшується їх кількість, а за наявності у середовищі культивування дизельного палива (0,1 мг/дм<sup>3</sup>) протягом першої доби дії цей показник збільшується та з продовженням терміну культивування водорості до 7 діб значно знижується (хлорофіл *a* і *b* на 18% і 14% відповідно порівняно з контрольними показниками). Зі збільшенням кількості хлоропластів їх лінійні розміри суттєво зменшуються, особливо за дії 5,0 мг/дм<sup>3</sup>  $Zn^{2+}$  (7 діб) і 0,1 мг/дм<sup>3</sup> дизпалива (1 доба) та зменшується їх здатність до біосинтезу ліпідів, особливо за дії 0,5 мг/дм<sup>3</sup>  $Pb^{2+}$  (1 доба). При цьому вміст окремих класів ліпідів у клітинах хлорели, в основному триацилгліцеролів, за дії  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  та дизельного палива зростає, а біосинтез адаптивних форм ліпідів, що беруть участь у формуванні токсикорезистентності клітин, активується в ендоплазматичному ретикулюмі.

6. Виявлено, що субстратами для біосинтезу ліпідів за дії досліджених іонів металів та дизельного палива є гліцерол-3-фосфат, утворений у результаті фосфорилування гліцеролу, та ацил-КоА, попередником якого можуть бути амінокислоти.

7. Забезпечення енергією біосинтезу ліпідів у хлорели в середовищі з іонами металів відбувається завдяки активації циклу Кребса, про що свідчать зростання активності

2-оксоглутаратдегідрогенази (на 5% і 35% щодо контролю за дії  $Zn^{2+}$  і  $Cu^{2+}$  відповідно) та сукцинатдегідрогенази (у 2,8-5,6 раза щодо контролю за дії усіх досліджених іонів металів). Дизпаливо пригнічує генерування енергії у клітинах хлорели.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Горда А. І. Біосинтез вуглеводів, білків і ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії іонів важких металів / А. І. Горда, К. В. Костюк, В. В. Грубінко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2010. – № 2 (43). – С. 108–115. (Проведення досліджень, написання статті).
2. Горда А. І. Вплив дизельного палива на біосинтез протеїнів, вуглеводів і ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. / А. І. Горда, В. В. Грубінко // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 74–81. (Проведення досліджень, написання статті).
3. Горда А. І. Біосинтез ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  / А. І. Горда, В. В. Грубінко // Доповіді НАН України. – 2011. – № 11. – С. 137–142. (Проведення досліджень, написання статті).
4. Grubinko V. V. Metabolism of Algae under the Impact of Metal Ions of the Aquatic Medium / V. V. Grubinko, A. I. Gorda, O. I. Bodnar, P. D. Klochenko // Hydrobiological Journal. – 2011. – Vol. 47, № 6. – P. 75–88. (Участь у проведенні досліджень, написання статті).
5. Lutsiv A. I. Absorption of ions  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Pb^{2+}$  by cells of *Chlorella vulgaris* Beijer. / A. I. Lutsiv, V. V. Grubinko // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2012. – № 3 (52). – С. 42–49. (Проведення досліджень, написання статті).
6. Lutsiv A. I. Localization of the Lipids' Synthesis in *Chlorella vulgaris* under the Impact of Lead and Zinc Ions and Diesel Fuel / A. I. Lutsiv, V. V. Grubinko // Hydrobiological Journal. – 2012. – Vol. 48, № 6. – P. 95–106. (Проведення досліджень, написання статті).
7. Луців А. І. Особливості поглинання іонів  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. / А. І. Луців, В. В. Грубінко // Доповіді НАН України. – 2013. – № 7. – С. 138–145. (Проведення досліджень, написання статті).
8. Grubinko V. V. Structural adaptations of cell walls of *Chlorella vulgaris* Beij. the action of ions zinc and lead / V. V. Grubinko, K. V. Kostyuk, A. I. Lutsiv // Альгологія. – 2014. – Т. 24, № 3. – С. 282–287. (Участь у проведенні досліджень, написання статті).
9. Грубінко В. В. Функціонування глутаматдегідрогеназного шляху зв'язування амонію у прісноводних водоростей / В. В. Грубінко, О. І. Боднар, О. В. Василенко, А. І. Луців, Г. Б. Вінярська // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2014. – № 3 (60). – С. 31–36. (Участь у проведенні досліджень, участь у написання статті).
10. Луців А. І. Енергетичне забезпечення біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. за дії дизельного палива / А. І. Луців // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2015. – № 3–4 (64). – С. 399–403. (Проведення досліджень, написання статті).
11. Боднар О. І. Метаболічні адаптації водоростей різних відділів до іонів цинку і плумбуму / О. І. Боднар, А. І. Горда // Матеріали IV Міжнародної конференції молодих

науковців «Біологія: від молекули до біосфери». Харків, 17-21 листопада 2009 р.– Харків : ППВ «Нове слово», 2009. – С. 200–201.

12. Горда А. Вплив токсикантів на вміст хлорофілів у одноклітинній водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. / А. Горда, К. Костюк // Матеріали V Всеукраїнської конференції студентів та молодих вчених «Проблеми та перспективи наук в умовах глобалізації». Тернопіль, 23–24 грудня 2009 р. – Тернопіль : Вид-во ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2009. – Ч. 2. – С. 141–145.

13. Горда А. И. Регуляция биосинтеза липидов у *Chlorella vulgaris* Beijer. ионами цинка и свинца / А. И. Горда // Материалы III Международной конференции-школы «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Ин-т биологии Карельского НЦ РАН, Петрозаводск, Россия, 22–26 июня 2010 г. – Петрозаводск, 2010. – С. 40–42.

14. Горда А. І. Інтенсивність біосинтезу білків, вуглеводів та ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії іонів цинку і плюмбуму / А. І. Горда, В. В. Грубінко // Матеріали X Українського біохімічного з'їзду. Одеса, 13–17 вересня 2010 р. // Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 1). – С. 167.

15. Горда А. И. Энергетический обмен у хлореллы в токсической среде / А. И. Горда // Материалы XIV Школы-конференции молодых ученых «Биология внутренних вод». Борок, 26–30 октября 2010 г. – Борок, 2010. – С. 15–16.

16. Горда А. Вплив дизельного палива на енергетичний обмін у одноклітинній зеленої водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. / А. Горда // Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». Львів, 5–8 квітня 2011 р. – Львів, 2011. – С. 48–49.

17. Горда А. І. Регуляція біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. іонами  $Mn^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  / А. І. Горда // I Біологічні читання «Фізіолого-біохімічні та екосистемні механізми формування токсикорезистентності біологічних систем». Тернопіль, 13–14 травня 2011 р. / Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2011. – № 2 (47). – С. 175–181.

18. Горда А. І. Еволюційно-екологічні особливості енергетичного обміну у прісноводних водоростей за дії іонів цинку / А. І. Горда // Матеріали VII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Pontus Euxinus – 2011». Севастополь, 24–27 мая 2011 г. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 76–78.

19. Khomenchuk V. O.  $Zn^{2+}$  absorption in the different types of cells in the aquatic organism / V. O. Khomenchuk, A. I. Gorda, O. I. Bodnar, V. Y. Byyak, V. V. Grubinko // Abstracts of the 47<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). Paris, France, 28<sup>th</sup>–31<sup>st</sup> August 2011 // Toxicology Letters. – 2011. – Vol. 205 S. – P. 164.

20. Горда А. І. Еволюційно-екологічні особливості поглинання і накопичення важких металів одноклітинними прісноводними водоростями / А. І. Горда, О. І. Боднар, В. В. Грубінко // Матеріали XIII з'їзду Українського ботанічного товариства. Львів, 19–23 вересня 2011р. – Львів, 2011. – С. 425.

21. Луців А. І. Особливості поглинання і накопичення іонів  $Mn^{2+}$  і  $Cu^{2+}$  одноклітинною зеленою водорістю *Chlorella vulgaris* Beijer. / А. І. Луців, О. І. Боднар, Я. В. Яковлева-Яремус // Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців

«Біологія: від молекули до біосфери». 22–25 листопада 2011 р., м. Харків. – Харків : ФООП Шаповалова Т. М., 2011. – С. 58–59.

22. Луців А. І. Енергетичний обмін у *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії іонів  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  / А. І. Луців, Т. В. Андрусишин, О. І. Боднар, В. В. Грубінко // Матеріали III з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. 16–20 травня 2012 р., м. Ялта. – Ялта, 2012. – С. 182.

23. Боднар О. І. Сукцинатдегідрогеназна активність у водоростей за дії іонів цинку / О. І. Боднар, А. І. Луців, Т. В. Андрусишин, В. В. Грубінко // Матеріали III з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. 16–20 травня 2012 р., м. Ялта. – Ялта, 2012. – С. 171.

24. Луців А. И. Изменение интенсивности биосинтеза липидов у *Chlorella vulgaris* Beijer. при действии токсикантов / А. И. Луців // IV Международная конференция «Актуальные проблемы современной альгологии». 23–25 мая 2012 г., г. Киев. – Киев, 2012. – С. 177–178.

25. Lutsiv A. Concentrational and temporal characteristics of the absorption of ions  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by cells of *Chlorella vulgaris* Beijer / A. Lutsiv, V. Grubinko // International Symposium on Aquatic Plants «Plants in hydrosystems: from functional ecology to weed research». Poznań, 27–31 August 2012. – Poland, Poznań, 2012. – P. 26.

26. Луців А. И. Энергетический обмен у *Chlorella vulgaris* Beijer. при действии ионов металлов / А. И. Луців, О. И. Боднар // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов». 22–27 сентября 2012, г. Борок Некоузского района Ярославской обл. (Россия). – Борок, 2012. – С. 232–235.

27. Грубінко В. В. Регуляція метаболізму ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. іонами металів / В. В. Грубінко, А. І. Луців, О. І. Боднар // Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції «Хімія природних сполук». Тернопіль, 30–31 жовтня 2012 р. – Тернопіль, 2012. – С. 69–70.

## АНОТАЦІЯ

**Луців А. І. Регуляція біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. іонами металів та нафтопродуктами – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» МОЗ України, Тернопіль, 2015.

У дисертації досліджено поглинання та вплив іонів металів у концентраціях:  $Mn^{2+}$  – 0,1; 0,2; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>;  $Zn^{2+}$  – 1,0; 2,0; 5,0 мг/дм<sup>3</sup>;  $Cu^{2+}$  – 0,001; 0,002; 0,005 мг/дм<sup>3</sup>,  $Pb^{2+}$  – 0,1; 0,2; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, а також дизельного палива в кількості 0,1; 0,5; 1,0 мг/дм<sup>3</sup> протягом 1-7 діб на вміст та біосинтез ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. Досліджено динаміку, етапи та кінетичні параметри поглинання іонів металів хлорелою в концентраційно-часовому градієнті. Встановлено якісний та кількісний склад ліпідів у клітинах в аквакультурі та за дії досліджених чинників, зміни співвідношення вмісту ліпідів окремих класів на користь зростання вмісту триацилгліцеролів з одночасним посиленням функціональної ролі фосfolіпідів у захисті клітин до дії чинників. Вперше виявлено зменшення розмірів та кількості

хлоропластів з одночасним зниженням їх здатності до біосинтезу ліпідів за дії досліджених чинників. При цьому виявлено активацію біосинтезу ліпідів у цитоплазмі клітин хлорели. Встановлено енергетичне та субстратне забезпечення біосинтезу ліпідів хлорели у стресових умовах.

**Ключові слова:** *Chlorella vulgaris* Beij., манган, цинк, купрум, плумбум, дизельне паливо, поглинання, ліпіди, біосинтез, пігменти, регуляція.

## АННОТАЦІЯ

**Луцив А. И. Регуляция биосинтеза липидов у *Chlorella vulgaris* Beij. ионами металлов и нефтепродуктами – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского» МОЗ Украины, Тернополь, 2015.

В диссертации исследованы поглощение и влияние ионов металлов в концентрациях:  $Mn^{2+}$  – 0,1; 0,2; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>;  $Zn^{2+}$  – 1,0; 2,0; 5,0 мг/дм<sup>3</sup>;  $Cu^{2+}$  – 0,001; 0,002; 0,005 мг/дм<sup>3</sup>,  $Pb^{2+}$  – 0,1; 0,2; 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, а также дизельного топлива в количестве 0,1; 0,5; 1,0 мг/дм<sup>3</sup> в течение 1-7 суток на содержание и биосинтез липидов у *Chlorella vulgaris* Beij. Установлена динамика, этапы и кинетические параметры поглощения ионов металлов клетками хлореллы в концентрационно-временном градиенте. Приведены данные о качественном и количественном составе липидов в клетках в аквакультуре и при действии исследованных факторов, изменении соотношения содержания липидов отдельных классов в сторону увеличения содержания триацилглицеролов с одновременным усилением функциональной роли фосфолипидов в защите клеток от действия факторов. Впервые выявлено уменьшение размеров и количества хлоропластов с одновременным снижением их способности к биосинтезу липидов при действии исследованных факторов. При этом обнаружено активацию биосинтеза липидов в цитоплазме клеток хлореллы. Охарактеризовано энергетическое и субстратное обеспечение биосинтеза липидов у хлореллы в стрессовых условиях.

**Ключевые слова:** *Chlorella vulgaris* Beij., марганец, цинк, медь, свинец, дизельное топливо, поглощения, липиды, биосинтез, пигменты, регуляция.

## SUMMARY

**Lutsiv A. I. Regulation of lipid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* Beij. by ions of metals and oil products. – Manuscript.**

Thesis for a degree of candidate of biological sciences in the speciality 03.00.04 – biochemistry. – State Higher Educational Institution «Ternopil State Medical University named after I. Y. Gorbachevsky» Ministry of Public Health of Ukraine, Ternopil, 2015.

The thesis is devoted to the research of the absorption and influence of the ions of metals:  $Mn^{2+}$  (0,1; 0,2; 0,5 mg/dm<sup>3</sup>);  $Zn^{2+}$  (1,0; 2,0; 5,0 mg/dm<sup>3</sup>);  $Cu^{2+}$  (0,001; 0,002; 0,005 mg/dm<sup>3</sup>);  $Pb^{2+}$  (0,1; 0,2; 0,5 mg/dm<sup>3</sup>) and diesel fuel (0,1; 0,5; 1,0 mg/dm<sup>3</sup>) during 1-7 days on the intensity, direction and localization of lipid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* Beij. in order to develop technologies improving the biosynthesis of lipids for biofuel.

It is established that absorption of ions of  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Pb^{2+}$  by cells of *Chlorella* is fluctuating and is carried out in four stages: the stage of protective self-isolation of cells (stress-reaction), the stage of the active absorption of metals, the stage of secondary inhibition of the absorption, and the stage of restoring active absorption, that correspond with structural and functional reconstruction of cell membrane – the formation and reconstruction of «double concentric membranes». For the first time it is studied and analyzed the kinetic parameters of the absorption of ions in the time gradient at every stage of accumulation of metal ions.

For the first time it is showed that investigated factors contribute to the accumulation of lipids by 15-113%, including triacylglycerols – by 36-181%, dyacylglycerols – by 6-190%, phospholipids – by 1,6-10,5%, nonetherified fatty acids – by 49-257% compared to control subjects. Herewith, there are synthesized first of all polar phospholipids, also tri- and dyacylglycerols with residues of unsaturated fatty acids. Ratio of major classes of lipids (TAG:DAG:PL:FFA, %) in the control was 22:16:47:15, for the actions of:  $Mn^{2+}$  – 27:25:28:20,  $Zn^{2+}$  – 26:16:33:25,  $Cu^{2+}$  – 22:22:39:17,  $Pb^{2+}$  – 21:21:37:21, for the actions of diesel fuel during the first day – 26:22:27:25, 7th day – 29:22:25:24.

For the first, under the action of metal ions and diesel fuel it is established the reducing the size and increasing the number of chloroplasts in the cell, as a result there is a change of their ability to synthesize lipids. It is found that under the impact factors with decreases of number and modification of chloroplasts the content of triacylglycerols and phospholipids increases as a result of adaptive change of the localization of lipid biosynthesis from chloroplasts into cytoplasmic structures.

It is established that the formation of adaptive protection systems in cells of algae to the action of factors is performed by changing of substrate and energy support of the biosynthesis of lipids. Substrates for lipid synthesis are glycerol-3-phosphate, formed by the phosphorylation of glycerol and acyl-CoA, formed from aminoacids, and providing with energy of this process happens due to activation of the citric acid cycle, as evidenced by increased activity of 2-oksoglutarate dehydrogenase (by 5% and 35% compared with control for actions of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  respectively) and succinate dehydrogenase (in 2,8-5,6 times compared with control for actions of all investigated metal ions).

For the first time, it is established that biotechnologically effective for the intensification of the biosynthesis of lipids by *Chlorella* are triacylglycerols – by 6% is effect of  $Zn^{2+}$  (5,0 mg/dm<sup>3</sup>, 7 days), and phospholipids – by 18-34% are effects of  $Cu^{2+}$  (0,002 mg/dm<sup>3</sup>, 3 days),  $Pb^{2+}$  (0,5 mg/dm<sup>3</sup>, 7 days), diesel fuel (0,1 mg/dm<sup>3</sup>, 1 and 7 days).

There are established the regularities regarding formation of secondary concentric membranes in the algae and biosynthesis of lipids in their cell structures, changes of ratio of individual classes of lipids (phospholipids and triacylglycerols) can serve as a basis for the development of technology of industrial cultivation of algae in order to obtain industrial perspective lipid biomass.

*Keywords: Chlorella vulgaris* Beij., manganese, zinc, copper, lead, diesel fuel, absorption, lipids, biosynthesis, pigments, regulation.

Підписано до друку 03.11.2015 р. Формат 60×90/16.  
Гарнітура Times New Roman. Друк офсетний.  
Ум. др. арк. 0,9.  
Наклад 100 прим. Зам. № 124

Видрук оригінал макета:  
редакційно-видавничий відділ Тернопільського  
національного педагогічного університету  
імені Володимира Гнатюка  
м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса 2, 46027  
Реєстраційне свідоцтво № Т Р 241 від 18.11.1997 р.