НАКОПЛЕНИЕ СЕЛЕНА В ЛИПИДАХ *CHLORELLA VULGARIS* Beijer. *(CHLOROPHYTA) IN VITRO*

Галина ВИНЯРСКАЯ, Оксана БОДНАР, Анна СТАНИСЛАВЧУК, Василий ГРУБИНКО

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка,
ул. М. Кривоноса, 2, 46027, Тернополь, Украина, тел.: +380985861984,
e-mail: viniarska_halia@mail.ru

Investigated the accumulation of selenium in the classes of lipids (PL, LPL, DAG, TAG, NEFA) on Chlorella vulgaris. The inclusion of selenium in the lipids of cells Ch. vulgaris was directly proportional to the time and inversely proportional to the concentration. The most active accumulation of Se^{4+} classes of lipids occurred on the 7th day of the experiment with addition of sodium selenite at concentrations of 0.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mg/dm^3. TAG accumulated a large amount of selenium throughout the experiment compared with the NEFA, DAG, PL and LPL.

Ключевыеслова: Chlorella vulgaris, селенит, накопления, лизофосфолипиды, диацилглицеролы, триацилглицеролы, фосфолипиды, неэтерифицированные жирные кислоты.

Введение

Водоросли активно аккумулируют неорганических соединений, что обусловлено высокой адсорбционной емкостью их клеточных оболочек, значительной ассимиляционной поверхностью, способностью активно поглощать вещества против градиента концентрации, и, возможно, менее развитыми механизмами регуляции обмена металлов и неметаллов [1]. Благодаря этим свойствам микроводоросли и макрофиты могут накапливать микроэлементы в количествах, которые в сотни раз превышают их содержание в почве и в тысячи раз – в воде.

Необходимость в селене у водорослей зависит от видовых особенностей метаболизма и колеблется от сотых частей микрограмма до десятков миллиграммов [2]. Накопление и метаболическая реакция водорослей на содержание в среде этого микроэлемента зависит от химической формы селена, его концентрации и длительности влияния. Известно, что степень ингибирования роста и развития водорослей выше при действии высоких концентраций селенатов, чем селенитов, поэтому водорослидля обеспечения своей жизнедеятельности предпочитают поглощать из среды обитания соединения преимущественно Se^{4+} по сравнению с Se^{6+} [11, 14]. Микроводоросли аккумулируют селен, главным образом, в составе высо-

комолекулярных соединений (белки, полисахариды и липиды), при этом процессы накопления существенно преобладают над процессами его экскреции [15].

Целью работы было исследование накопления селенита и включение селена в липиды *Chlorella vulgaris* в культуре.

Материалы и методы

Объектом исследования была *Chlorella vulgaris* Beijer., которую выращивали в условиях накопительной культуры на среде Фитцджеральда [8] при освещении лампами дневного света (2500 лк) и 23–25^0 С. Селен вносили в виде селенита натрия из расчета Se^{4+} – 0,5; 5,0; 10,0 и 20,0 мг/дм^3. Контролем служила культура, выращиваемая на среде без селенита натрия. Отбор проб для анализа осуществляли на 1, 3 и 7-е сутки культивирования.

Селен определяли спектрофотометрическим методом с о'-фенилендиамином [3].

Для установления количества липидов, биомассу водорослей экстрагировали хлороформ-метанольной смесью в соотношении 2:1 по методу Фолча [13]. При этом в одной массовой доли биологической субсьанции добавляли 20 частиц экстрагирующей смеси и оставляли на 12 ч для экстракции. Нелипидные примеси из экстракта удаляли отмыванием 1% раствором KCl [7]. Количество общих липидов определяли весовым методом после отгонки экстрагирующей смеси [4].

Разделение липидов на фракции проводили методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии в герметических камерах на пластинках со смесью силикагелей ЛС 5/40 μ и Л 5/40 μ на стеклянной основе [5]. Перед работой пластинки активировали 30 мин при температуре 105^0 С в сушильном шкафу, обрабатывали 10% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и высушивали в потоке теплого воздуха в течение 10–15 мин. Подвижной фазой была смесь гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты в соотношении 70:30:1 [7].

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждения

Липиды у водорослей играют важную роль в процессах роста, размножения и фотосинтетической деятельности и также выполняют энергетическую функцию. В частности, у гидрофитов использование липидов значительно усиливается на поддержание жизнедеятельности при действии экстремальных факторов окружающей среды. Их количество и качественный состав в клетках, прежде всего в мембранах, отражает состояние синтеза и деградации липидов, а также особенности обмена со средой обитания [6, 9, 10, 12].

Результаты исследования показали (рис.), что на протяжении всего периода эксперимента при внесении селенина натрия в культуральную среду наблюдалось значительное накопление микроэлемента в липидах клеток *Ch. vulgaris*.

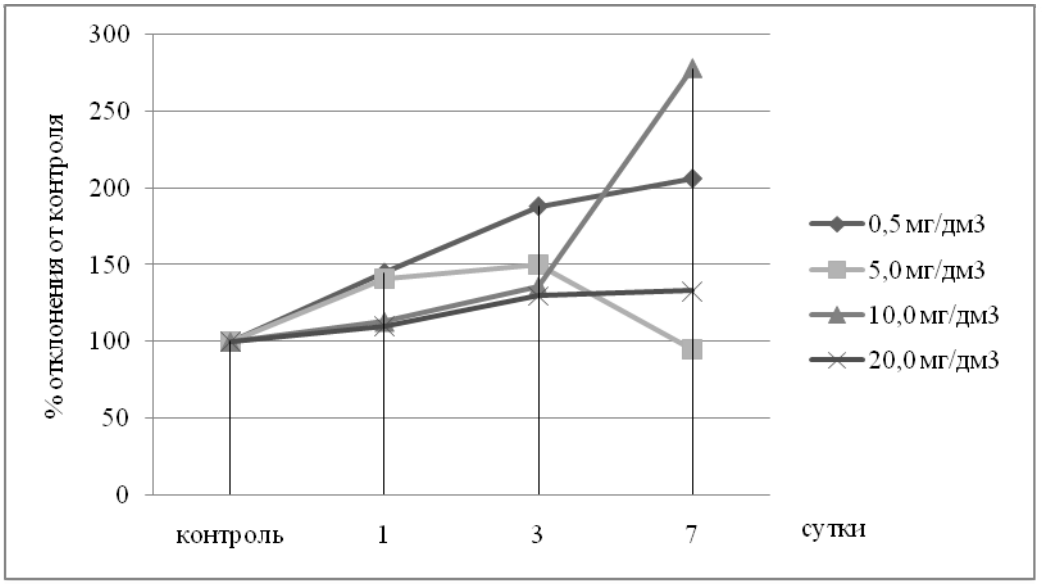


Рис. **Динамика накопления Se^{4+} в липидах *Ch. vulgaris* invitro**

Накопление селена в липидах на 1-е суткибыло достаточно активным. При воздействии Se^{4+} в концентрациях 0,5; 5,0; 10,0 и 20,0 мг/дм^3 содержание микроэлемента увеличилось относительно контрольных показателей на 45%, 41%, 13% и 10% соответственно. Со временем содержание селена в липидах возрастает. Так, на 3-и сутки эксперимента наблюдали увеличение содержания микроэлемента относительно контроля на 88% при концентрации Se^{4+} 0,5 мг/дм^3, на 50% при 5,0 мг/дм^3, на 36% при 10,0 мг/дм^3 и на 30% при 20,0 мг/дм^3. На 7-е сутки при концентрации Se^{4+} 0,5 мг/дм^3 его количество в липидах увеличилось на 106%, при 10,0 мг/дм^3 – на 178%, при 20,0 мг/дм^3 – на 33% относительно контрольных показателей, но уменьшилось на 5% при действии 5,0 мг/дм^3.

Полученные результаты свидетельствуют о наиболее эффективном накопление селена липидами хлореллы при его концентрации в среде 10,0 мг/дм^3. Поэтому, в дальнейшем нами исследовано его распределение в отдельных классах липидов (табл. 1).

Таблица 1.

Содержание селена в липидах различных классов у *Chlorella vulgaris*, *M ± m, n = 5*

Классы липидов	Контроль	Длительность воздействия, сутки			
		3	отклонение от контроля,%	7	отклонение от контроля,%
Диацилглицеролы	6,443±1,080	4,622±0,300	72	13,641±1,667*	212
Триацилглицеролы	20,100±0,587	26,962±1,814*	135	43,396±3,154*	217
Фосфолипиды	4,101±0,897	3,725±0,539	96	9,259±1,986	238
Лизофосфолипиды	15,465±1,378	10,628±1,001	69	10,868±1,121	70
Неэтерифицированные жирные кислоты	4,073±0,220	4,553±0,138	112	4,452±1,326	110

* – $p \leq 0{,}05$

Установлено, что в контроле ТАГ и ЛФЛ аккумулируют значительно больше селена, чем НЭЖК, ДАГ и ФЛ, содержащих примерно на одном уровне количество микроэлемента в несколько раз меньше.

При внесение в среду культивирования *Ch. vulgaris* селенита натрия на 3-и сутки эксперимента наблюдали увеличение содержания Se^{4+} только в НЭЖК и ТАГ на 12% и 35% по сравнению с контролем. Содержание селена в ДАГ, ФЛ и ЛФЛ уменьшилось на 28%, 4% и 31% соответственно против контроля. Дальнейшее влияние селенита натрия увеличивало количество Se практически во всех исследуемых липидах *Ch. vulgaris*. Так, на 7-е сутки эксперимента содержание микроэлемента увеличилось в НЭЖК на 10%, в ДАГ – на 112%, в ТАГ – на 117%, в ФЛ – на 138%, и только в ЛФЛ наблюдали уменьшение количества Se на 30% относительно контроля.

Поскольку между классами липидов существует метаболическая связь, то в соотношении содержания селена в НЭЖК:ДАГ:ТАГ:ФЛ:ЛФЛ также выявлена определенная зависимость (табл. 2).

Таблица 2.

Соотношение содержания селена влипидах различных классов при действии селенита натрия у *Chlorella vulgaris*

	НЭЖК:ДАГ:ТАГ:ФЛ:ЛФЛ, % содержания селенита натрия в классах липидов
контроль	8:13:40:8:31
3 сутки	9:9:54:7:21
7 сутки	6:17:53:11:13

Как видно из результатов опыта, на 3-и сутки происходит смещение накопления Se в ТАГ за счет его уменьшения в ДАГ, ФЛ и, особенно, ЛФЛ. На 7-е сутки – соответственно в ДАГ и ТАГ за счет дополнительного уменьшения в ЛФЛ. Таким образом, в течении времени воздействия селенита натрия Se перераспределяется из ФЛ и ЛФЛ, ТАГ и ДАГ, то есть из более лабильной в более консервативную и метаболически менее активную форму липидов, что может быть связано с возрастаение накопления клетками защитной адаптивной формы, каковыми являются нейтральные липиды. Возможно, объяснением накопления Se в ДАГ и ТАГ является его известная антиоксидантная функция, защищающая их от активного ПОЛ.

Выводы

Включение селена в липиды клеток *Ch. vulgaris* прямо пропорционально по времени и обратно пропорционально по концентрации: содержание селена в липидах постоянно увеличивался от 3-их до 7-ми суток воздействия селенита, но его количество при малом содержании селенита (0,5 мгSe^{4+}/дм^3) было выше, чем при уровне 20,0 мгSe^{4+}/дм^3 всреде культивирования.

Активнее всего накопление Se^{4+} липидами различных классов происходило на 7-е сутки эксперимента. При этом, ТАГ аккумулировали больше селена на протяжении всего эксперимента по сравнению с НЭЖК, ДАГ, ФЛ и ЛФЛ.

Скорее всего, накопление Se^{4+} липидами связано со структурной, функциональной и физиологической ролью селена в липидах как антиоксиданта.

Список цитированной литературы

1. Боднар О.І. Адаптивні властивості водоростей за дії іонів металів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.17 «Гідробіологія» / О.І. Боднар. – К., 2009. – 24 с.
2. Боднар О.І. Особливості накопичення сполук селену та їх біологічна роль у водоростей / О.И. Боднар, Г.Б. Вінярська, Г.В. Станіславчук, В.В. Грубінко // Наукові записки ТНПУ ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 2(55). – С. 94–107.
3. Дедков Ю.М. Селен: биологическая роль, химические свойства и методы определения // Ю.М. Дедков, А.В. Мусатов. ВИНИТИ по РЖ Химия №1688 – В2002. – 2002.
4. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 32 с.
5. Копылов Ю.П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов / Ю.П. Копытов // Экология моря. – 1983. – Вып. 12. – С.76–80.
6. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 367 с.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / [под ред. М.И. Прохоровой]. – Л. : ЛГУ, 1982. – 273 с.

8. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / [Л.А. Сирено, А.И. Сакевич, Л.Ф. Осипов и др.]; под ред. А.В. Топачевского. – К. : Наук. думка, 1975. – 247 с.
9. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. – М. : Просвещение, 1975. – 318 с.
10. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т. В. Чиркова // Соросовский образовательный журнал. − 1997. − № 9. − С. 12 − 17.
11. Fatoki O.S. Biomethylation in the natural environment. A review // S. Afr. J. Sci. – 1997. – Vol. 93, № 8. – P. 366–368.
12. Gennity J. M., Bottino N.R, Zingaro R. A. et al. The binding of selenium to the lipids of two unicellular marine algae // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol. 118, №. 1, – P. 176 – 182.
13. Hokin L.E., Hexum T.D. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase IX. on the role of phospholipids in the enzyme //Arch. Biochem and Biophys. – 1992 – Vol. 151, № 2 – P. 58–61.
14. Wang Dazhi, Cheng Zhaodi, Li Shaojing, Gao Yahu*i* Toxicity and accumulation of selenite in four microalgae // Chinese J. Oceanology & Limnology. – 2003. – 21, № 3. – P. 280–285.
15. Zhi-Yong Li, Si-YuanGuo, Lin Li. Bioe□ects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation // Bioresource Technology. – 2003. – 89. – P. 171–176.