

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
”ПОЛЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ“

Кафедра биотехнологии

Допущено к защите
Заведующий кафедрой
_____ Е.М.Волкова
_____ 2020

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему:

**”Влияние сульфата хрома (III) на физиолого-биохимическое состояние
клеток культуры *Chlorella vulgaris*“**

Студент _____
биология (биотехнология),
5 курс, группа 15БТ-1

Захаревич Леокадия Олеговна
_____ 2020

Научный руководитель _____
профессор,
доктор биологических наук

Никандров Виталий Николаевич
_____ 2020

ПИНСК 2020

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 53 страницы, 14 рисунков, 5 таблиц, 89 источников.

Ключевые слова: CHLORELLA VULGARIS, СУЛЬФАТ ХРОМА (III), БИОМАССА, БЕЛОК, ПИГМЕНТЫ.

Цель работы: исследовать влияние сульфата хрома (III) на физиолого-биохимическое состояние клеток *Chlorella vulgaris*.

Методы исследований: метод подсчёта клеток хлореллы в камере Горяева, метод Bradford для определения концентрации внутриклеточного белка в клетках хлореллы, метод определения концентрации пигментов в клетках хлореллы, компьютерная обработка данных.

Полученные результаты и их новизна: сульфат хрома (III) в различных концентрациях – от 10^{-2} до 10^{-6} М – в целом не оказал положительного влияния на динамику биомассы хлореллы и накопления у неё внутриклеточного белка по сравнению с контролем, причём чем выше была концентрация эффектора в среде, тем более был выражен угнетающий эффект. Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию пигментов хлореллы показало неоднозначные результаты.

Степень использования: полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на лучшее понимание влияния соединений трёхвалентного хрома на микроводоросли.

Область применения: фундаментальная наука, прикладная наука.

Автор работы утверждает, что приведенный в ней расчётно-исследовательский материал правильно и объективно отражает состояние исследуемого процесса, а все заимствованные из литературных и других источников теоретические, методологические и методические положения и концепции сопровождаются ссылками на их авторов.

ABSTRACT

Diploma work: 53 pages, 14 figures, 5 tables, 89 sources.

Key words: CHLORELLA VULGARIS, CHROMIUM SULPHATE (III), BIOMASS, PROTEIN, PIGMENTS.

Objective of the work: to research the impact of chromium sulphate (III) on the functional and biochemical state of *Chlorella vulgaris* cells.

Research methods: count the number of chlorella cells in the Goryaev chamber, Bradford method for identification of the intracellular protein concentration, method of identification of the pigments concentration in microalgae cells, computer processing of data.

The results obtained and their novelty: the different concentrations of chromium sulphate (III) – from 10^{-2} to 10^{-6} M – generally haven't had a positive impact on the biomass dynamic of chlorella and its intracellular protein concentration compared to the control sample. Besides, more high concentration of effector has had a more negative impact on the cells culture. The changes in pigments concentration have had oscillating character.

Degree of use: the obtained results can be used in further researches oriented to better understanding of the impact of trivalent chromium compounds on microalgae.

Application area: industrial cultivation of chlorella, basic science.

The author affirms that the research material cited in this work correctly and objectively reflects the state of the researched process, and all theoretical and methodological concepts borrowed from literature and other sources are accompanied by references to their authors.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Общие сведения о строении и особенностях метаболизма микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	7
1.2 Перспективы использования <i>Chlorella vulgaris</i> в различных отраслях народного хозяйства	10
1.2.1 Подходы к культивированию <i>Chlorella vulgaris</i>	11
1.2.2 Использование <i>Chlorella vulgaris</i> в сельском хозяйстве	13
1.2.3 Использование <i>Chlorella vulgaris</i> в экологии.....	14
1.2.4 Использование <i>Chlorella vulgaris</i> в биологически активных добавках	16
1.3 Влияние хрома на функционально-метаболические процессы различных организмов	17
1.3.1 Микроорганизмов	18
1.3.2 Высших растений	20
1.3.3 Животных и человека	22
1.4 Влияние хрома на функционально-метаболические процессы микроводорослей.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	30
2.1 Материалы исследований.....	30
2.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	30
2.1.2 Среда Тамия.....	30
2.1.3 Лабораторная посуда	30
2.1.4 Оборудование	31
2.2 Методы исследований	31
2.2.1 Подсчёт клеток	32
2.2.2 Определение концентрации внутриклеточного белка методом Bradford.....	32
2.2.3 Определение концентрации пигментов	33
2.2.4 Обработка данных.....	34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	35

3.1 Влияние сульфата хрома (III) на динамику биомассы <i>Chlorella vulgaris</i> .	35
3.1 Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию внутриклеточного белка <i>Chlorella vulgaris</i>	37
2.2.2 Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию пигментов <i>Chlorella vulgaris</i>	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45

ВВЕДЕНИЕ

Человек издавна ищет в природе и вводит в хозяйственную сферу всё новые виды растений и животных. И если сейчас, с одной стороны, выведены новые сорта растений и возникло понятие «культурные растения», а с другой – развита целая отрасль промышленности – техническая микробиология, использующая для получения ценных веществ деятельность бактерий и микроскопических грибов, то громадный мир микроскопических водорослей, особенно одноклеточных, до относительно недавнего времени оставался вне сферы практической деятельности людей. Когда наконец микроводоросли стали объектом более пристального изучения и в итоге встал вопрос о массовом их культивировании как уникальных продуцентов желаемых соединений, *Chlorella vulgaris* оказалась наиболее подходящим вариантом для этой цели. Интерес к данной микроводоросли не угасает до сих пор. Учёные постоянно находятся в поиске новых способов оптимизации процесса культивирования хлореллы для повышения выхода целевых продуктов с сохранением высокой рентабельности. Этого можно добиться путём направленных изменений условий культивирования. Одно из таких изменений – корректировка минерального питания микроводоросли.

Трёхвалентный хром известен как микроэлемент, значение которого для микроводорослей, впрочем, не является изученным. Влияние хрома на культуру клеток *Chlorella vulgaris* потенциально может представлять интерес в практическом его применении в минеральном питании микроводоросли, если данный металл покажет положительные результаты в её отношении. Кроме того, исследования влияния соединений трёхвалентного хрома на микроводоросли могут помочь в понимании его роли в процессах клеточного метаболизма данных организмов.

Таким образом, целью работы является исследование влияния сульфата хрома (III) на физиолого-биохимическое состояние клеток *Chlorella vulgaris*. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить изменение динамики биомассы *Chlorella vulgaris* под влиянием различных концентраций сульфата хрома (III).
2. Установить влияние названного эффектора на концентрацию внутриклеточного белка хлореллы.
3. Установить влияние эффектора на концентрацию пигментов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о строении и особенностях метаболизма микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris является зелёной эукаротической микроводорослью из рода *Chlorella*, существующая на Земле с Докембрийского периода. Эта одноклеточная водоросль была открыта в 1890 году голландским учёным Мартином Виллемом Бейеринком как первая микроводоросль с чётко дифференцируемым ядром [1].

Хлорелла, являясь типовым представителем своего рода, нашла широкое распространение. Это обусловлено её неприхотливостью к местам обитания и способностью к интенсивному размножению. В водоёмах хлорелла – типичный планктер, но встречается она и в бентосе, перифитоне и нейстоне, а также на наземных субстратах и в увлажнённой почве. Она также входит в состав лишайников, вступает в симбиоз с разными гидробионтами, образуя так называемые зоохлореллы [2].

Chlorella vulgaris представляет собой сферическую микроскопическую клетку диаметром 2-10 мкм (рисунок 1). Жёсткая клеточная стенка защищает микроводоросль от суровых условий внешней среды. В соответствии с фазой роста клеточная стенка различна. Во время раннего формирования хлореллы из аутоспоры новообразовавшаяся клеточная стенка является хрупкой структурой с толщиной не более 2 нм. Постепенно она утолщается, пока после окончательного созревания клетки не достигает 17-21 нм.

Клеточная стенка *Chlorella vulgaris* представляет собой не просто целлюлозную оболочку. Клеточная стенка данной микроводоросли имеет также наружный хитозаноподобный слой, состоящий из глюкозамина и формирующий микрофибриллы, которые и обуславливают жёсткость структуры [4]. Кроме того, клеточная стенка хлореллы содержит белки, уроновые кислоты, маннозу, ксилозу и пр. [5]. Некоторые исследования также сообщают о наличии в клеточной стенке *Chlorella vulgaris* спорополленина [6,7], хотя общепринято, что названный полимер у данного вида хлорелл всё же отсутствует.

Стоит отметить, что толщина и качественный состав клеточной стенки не постоянны. Данные показатели могут варьировать не только в зависимости от фазы роста, как упоминалось ранее, но и от условий окружающей среды [4].

Рассматривая внутреннее строение хлореллы, можно обнаружить, что она имеет множество структурных элементов, похожих на растительные (рисунок 2).

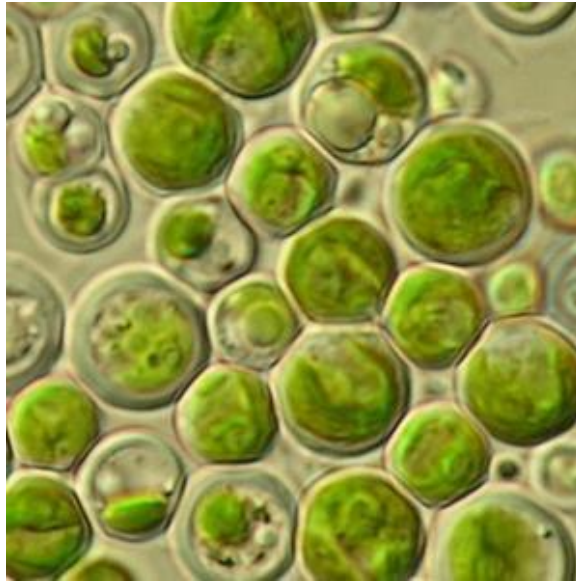
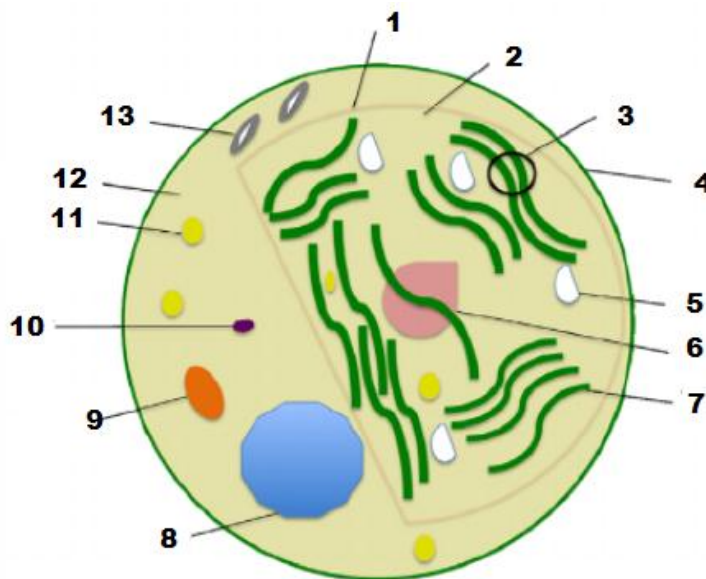


Рисунок 1.1 – Клетки *Chlorella vulgaris* под световым микроскопом [3]



1 – мембрана хлоропласта; 2 – хлоропласт; 3 – хлорофилл и каротиноиды; 4 – клеточная стенка; 5 – крахмальное зерно; 6 – пиреноид; 7 – тилакоид; 8 – ядро; 9 – вакуоль; 10 – аппарат Гольджи; 11 – липидная капля; 12 – цитоплазма; 13 - митохондрия

Рисунок 1.2 – Внутреннее строение *Chlorella vulgaris* [4]

Цитоплазма *Chlorella vulgaris* представляет собой гелеобразную субстанцию, ограниченную плазматической мембраной и включающую органеллы микроводоросли. Самой крупной из таковых является хлоропласт.

Единственный чашевидный хлоропласт *Chlorella vulgaris*, имеющий двойную фосфолипидную мембрану, занимает периферическое положение. Внутренняя мембрана впячена, образуя тилакоиды, содержащие пигменты: хлорофилл *a* и *b*, а также каротиноиды. Хлоропласт включает в себя структуру, называемую пиреноидом. Пиреноид представляет собой место запасания фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (рубиско), катализирующей присоединение углекислого газа к рибулозо-1,5-бисфосфату на первой стадии цикла Кальвина, а также реакцию окисления рибулозобифосфата на первой стадии процесса фотодыхания. Кроме того, стоит отметить, что хлоропласт хлореллы включает в себя крахмальные зёрна и липидные капли. Число последних резко повышается во время азотного голодания [4].

Хлорелла является типичным автотрофным организмом, использующим энергию света для синтеза макроэргических соединений, выработки кислорода и фиксации углекислого газа в виде органических веществ. Эффективность фотосинтеза данной микроводоросли сильно зависит от внешних условий, что используется при её культивировании. Так, благодаря соответствующим исследованиям известно, например, что насыщение углекислым газом культуральных сред способствует усилению фотосинтетической активности *Chlorella vulgaris* посредством повышения интенсивности роста культуры [8]. Наблюдалось также, что содержание пигментов и белков у *Chlorella vulgaris* увеличивалось вследствие воздействия на культуру электромагнитным полем [9]. Более подробно об аспектах культивирования хлореллы с целью максимального выхода того или иного продукта будет рассмотрено в следующем разделе.

Возвращаясь непосредственно к хлоропласту *Chlorella vulgaris*, стоит отметить, что было произведено полное секвенирование его генома. Размер генома составил 150,613 п.н. Было обнаружено, что геномная секция в хлоропласте хлореллы, ответственная за его деление, соответствует таковой у бактерии *Escherichia coli*.

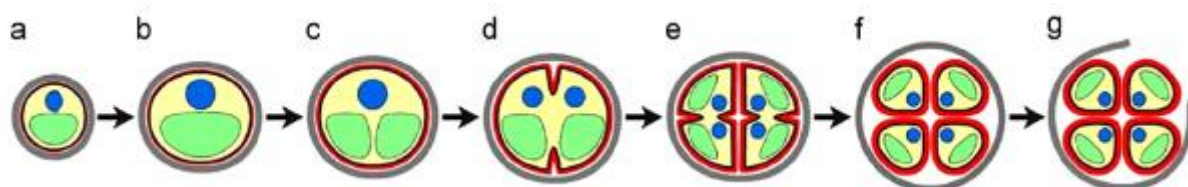
Оттеснённое к периферии огромным хлоропластом ядро *Chlorella vulgaris* содержит 16 хромосом. Его структура идентична таковой других эукариотических водорослей [10].

Энергетические станции клетки – митохондрии – у *Chlorella vulgaris* не отличаются от митохондрий других эукариотических организмов. Данная органелла имеет двойную фосфолипидную мембрану, впячивания внутренней

мембраны (содержащей, к слову, в три раза больше белков по отношению к липидам) образуют кристы; имеется собственная ДНК, как в хлоропласте.

Протопласт также содержит такие органеллы, как вакуоль, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум (ЭПР), пронизывающий периферию клетки и образующий множество цистерн. На мембране шероховатых цистерн ЭПР располагаются рибосомы.

Размножение *Chlorella vulgaris* происходит бесполом путём – посредством аутоспор, образующихся внутри материнской клетки. Содержимое таковой митотически делится, начиная с хлоропласта, и образует таким образом дочерние клетки – аутоспоры. В определённый момент они разрывают оболочку материнской клетки и выходят наружу. Весь описанный процесс протекает в несколько фаз и занимает около 24 часов (рисунок 3) [4].



a – ранняя фаза роста; b – поздняя фаза роста; c – фаза деления хлоропластов; d – ранняя фаза деления протопластов; e – поздняя фаза деления протопласта; f – фаза созревания дочерних клеток; g – фаза высвобождения.

Рисунок 1.3 – Фазы деления клетки *Chlorella vulgaris* [4]

1.2 Перспективы использования *Chlorella vulgaris* в различных отраслях народного хозяйства

Значение хлореллы в природе очевидно и обусловлено её принадлежностью к зелёным микроводорослям: она является организмом, осуществляющим процесс фотосинтеза и вырабатывающим в ходе него необходимый для жизни кислород. Широко распространённая в пресных водоёмах *Chlorella vulgaris* также способствует их очищению и служит кормом для обитающих там ракообразных и рыб.

Сегодня *Chlorella vulgaris* является весьма перспективной микроводорослью и для использования человеком в различных отраслях народного хозяйства. Интерес к культивированию хлореллы возрастает с каждым годом, и это детерминировано той практической пользой, которую она несёт. Кроме того, немаловажную роль играет её относительно простая

организация, высокая скорость размножения, возможность культивирования в полностью контролируемых условиях и высокая пластичность метаболизма.

1.2.1 Подходы к культивированию *Chlorella vulgaris*

Рассмотрение разнообразия сфер использования *Chlorella vulgaris* необходимо начать с анализа основных подходов, применяемых для её крупномасштабного культивирования, поскольку таковое, по сути, лежит в основе всего производственного процесса.

Выделяют несколько способов культивирования хлореллы. Наиболее простым является фотоавтотрофное культивирование в открытых прудах. Это самый дешёвый метод культивирования для производства биомассы в крупных масштабах. Данные открытые пруды могут быть как природными, так и искусственными. Их оптимальная глубина должна составлять 15-50 см, что связано с необходимостью в достаточном освещении всей клеточной массы. Открытые пруды имеют ряд недостатков, связанных с влиянием факторов окружающей среды и отсутствием возможности равномерного регулирования таковых. Имеются риски избыточного испарения воды, контаминации с вредоносными бактериями и грибами, роста других водорослей и неравномерного распределения солнечного света.

Более дорогостоящим, но порядка более совершенным является культивирование *Chlorella vulgaris* в закрытых системах – фотобиореакторах. Данный вид культивирования преодолевает ограничивающие факторы открытых прудов (рН, интенсивность освещения, температура, концентрация углекислого газа) [4]. Фитобиореакторы выполняются из прозрачного материала – как правило, стекла – и представляют собой выровненные по горизонтали или вертикали узкие панели либо трубки с расположенными горизонтально, вертикально или по спирали петлями; диаметр таким трубок обычно не превышает 10 сантиметров [11]. Главным параметром фотобиореактора той или иной комплектации является наилучшее отношение объёма к площади поверхности для максимально эффективного использования света [12]. Культивирование в таких фотобиореакторах реализуется для получения более высокой концентрации биомассы и качественного целевого продукта для использования в фармацевтике, нутрицевтике и косметике [4].

Рассмотренные выше способы культивирования хлореллы основаны на фотоавтотрофном росте: микроводоросли используют в качестве источника энергии для протекания эндогенных реакций солнечный свет и

углекислый газ в качестве источника углерода для образования органических веществ.

Реализуется также культивирование, основанное на гетеротрофном росте, когда микроводоросли в отсутствии света используют как источники углерода и энергии сахара и органические кислоты. Такой способ культивирования можно проводить в обычных биореакторах для микробного синтеза [13].

Распространён и миксотрофный способ культивирования хлореллы. Он характеризуется ассимиляцией углекислого газа водорослями с использованием в качестве источника энергии не света, а органических соединений [3, 14].

Рассмотренные способы культивирования в значительной степени оказывают влияние на ростовые процессы хлореллы, однако на накопление представляющих интерес веществ (белка, пигментов, липидов, витаминов) влияют непосредственно условия культивирования, направленное изменение которых лежит в основе стратегий по увеличению выхода целевых продуктов.

Рассмотрим некоторые стратегии с подтверждёнными исследованиями успехом в отношении *Chlorella vulgaris*:

1) Азотное голодание. Реализуется либо посредством истощения азота (полного исключения источника азота в среде культивирования), либо – ограничения (недостаток азота). Доказано, что в данных условиях *Chlorella vulgaris*, как и другие микроводоросли, увеличивает содержание липидов и каратиноидов [14].

2) Фосфорное голодание. Концентрация нейтральных липидов в клетках *Chlorella vulgaris* увеличилась в условиях дефицита фосфора в среде с добавлением кадмия [15].

3) Увеличение интенсивности света и длины светового дня. Было показано, что максимальная скорость роста, содержание белка, насыщенных жирных кислот и β -каротина были получены при освещенности 100 мкмоль/м²/с и фотопериоде 16:8 ч свет/темнота [16].

4) Двухэтапное культивирование. Таковое представляет собой сочетание двух способов культивирования с разделением их на соответствующие этапы. Китайскими учёными осуществлялось двухэтапное культивирование *Chlorella vulgaris*. На первом этапе проводилось обычное фотоавтотрофное культивирование, на втором – миксотрофное. Это позволило добиться синергетического эффекта данных способов культивирования и увеличить прирост биомассы на 74%, а также повысить содержание белка [17].

5) Повышение концентрации углекислого газа в среде.

6) Воздействие электромагнитным полем.

Последние две стратегии были описаны в предыдущем разделе.

Стоит отметить, что характер изменений уровня накопления разных веществ в условиях той или иной стратегии может отличаться в зависимости от целевого продукта. Азотное и фосфорное голодание обуславливало снижение содержания белка [14, 15], а увеличение интенсивности света и длины светового дня приводило к уменьшению концентрации хлорофилла *a*, а также мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот [16]. Таким образом, следует обратить внимание на то, каким важным является целеполагание в вопросе получения максимального выхода интересующего продукта.

1.2.2 Использование *Chlorella vulgaris* в сельском хозяйстве

От 50 до 80% в себестоимости продукции животноводства составляют расходы на приготовление корма [18]. Качество такового должно отвечать всем современным стандартам, т.е. корм должен быть питательным и содержать необходимые организму вещества в оптимальных количествах. Хлорелла, выступая в качестве кормовой добавки, способствует удовлетворению данных требований, поскольку является активным продуцентом белков, углеводов, липидов, витаминов, притом, как уже упоминалось, соотношение этих соединений при изменении условий культивирования достаточно легко регулируемо. Благодаря этому хлорелла применяется в различных отраслях животноводства: скотоводстве, свиноводстве, звероводстве, птицеводстве, рыбоводстве, пчеловодстве.

Согласно имеющимся в литературе данным, применение суспензии хлореллы в кормовом рационе крупного рогатого скота позволяет на молодняке получить дополнительные привесы от 25% до 45% и довести сохранность поголовья до 99%. Молочная продуктивность по дойному стаду увеличивается на 15-25%, при этом улучшаются вкусовые качества и возрастает жирность молока [19].

При использовании хлореллы в свиноводстве также отмечалось крайне положительное её влияние: повышение плодовитости свиноматок, увеличение привеса молодняка и сохранности поголовья (99%). Подобные тенденции справедливы и для птицеводства, а также для рыбоводства [20, 21].

Благоприятное влияние *Chlorella vulgaris* на организм животных наблюдалось при оказании защитного эффекта против тяжёлых металлов (кадмий, свинец), существенно снижавшего уровень окислительного стресса, вызванного данными металлами. Предполагается, что это обусловлено тем, что некие биологически активные вещества хлореллы индуцируют в печени экспрессию генов, кодирующих металлотионеины [22] – семейство

низкомолекулярных белков с высоким содержанием цистеина, которые способны связывать как физиологические, так и ксенобиологические тяжёлые металлы [23].

Также доказано, что *Chlorella vulgaris* способствует увеличению антиоксидантной активности организма животных [24]. Использование данной микроводоросли позволяет снизить применение лекарственных препаратов в том числе антибиотиков, для лечения животных. Это позволит получать животноводческую продукцию более высокого качества [19].

Многие микроводоросли, в том числе *Chlorella vulgaris*, оказывают благотворное воздействие на растения посредством продуцирования веществ, которые улучшают рост и продуктивность растений: регуляторов роста, витаминов, аминокислот, полипептидов, бактерицидных и фунгицидных соединений, проявляющих фитопатогенный биоконтроль, и полимеров, таких как экзополисахариды [4].

Было показано, что водный экстракт хлореллы, используемый в качестве корневой подпитки и листового спрея для пшеницы (*Triticum aestivum L.*), увеличил урожайность и прирост биомассы на 140% и 40% соответственно [25]. Другое исследование, объектом которого служил латук посевной (*Lactuca sativa*), также показало значительное увеличение показателей роста и урожайности при использовании жидкого экстракта *Chlorella vulgaris* [4].

Замачивание семян ячменя, свёклы, гороха и томата в культуральной жидкости хлореллы оказало крайне благоприятное воздействие на степень их всхожести и длину проростков. Дело в том, что культуральная жидкость хлореллы содержит широкую гамму физиологически активных веществ, среди которых индольные (ауксины) и фенольные соединения, стероиды, витамины, гиббереллиноподобные вещества, а также соединения с цитокининовой активностью. Гибберелины и ауксины являются регуляторами роста и развития растений, к тому же в присутствии последних наиболее полно реализуется способность цитокининов активизировать процесс клеточного деления [26]. Всё это подтверждает перспективность применения *Chlorella vulgaris* в растениеводстве для получения большого количества высококачественного урожая.

1.2.3 Использование *Chlorella vulgaris* в экологии

Приоритет микроводорослей в области экологии сводится, в основном, к двум направлениям: использованию их в очистке сточных вод и в качестве ценных продуцентов биотоплива. Кроме того, микроводоросли выступают в

качестве биоиндикаторов, видовое разнообразие, численность, морфологическое и физиологическое состояние которых могут служить показателем уровня загрязнения водоёмов.

Множество исследований демонстрирует удивительный потенциал *Chlorella vulgaris* в фиксации свыше 74% углекислого газа во время роста в в фитобиореакторах [27], а также в поглощении 45-97% азота, 28-96% фосфора, снижении химического потребления кислорода (chemical oxygen demand, COD) на 61-86% в различных типах сточных вод: текстильного производства, канализации, сельского хозяйства и т.д. Микроводоросли способны поглощать из сточных вод не только азот, фосфор и углекислый газ, являющиеся для них жизненно необходимыми, но и тяжёлые металлы и различные другие токсические вещества. Очистка сточных вод при помощи биомассы микроводорослей является экономически выгодной и весьма перспективной [4]. Кроме того, производительность *Chlorella vulgaris* была значительно увеличена при коиммобилизации в альгинатных гранулах со способствующими её росту бактериями: наблюдалось устранение 100% катиона аммония в течение четырёх последовательных 48-часовых циклов и 83% фосфора за один 48-часовой цикл. Таким образом, *Chlorella vulgaris* может считаться одной из лучших среди микроводорослей для биоремедиации сточных вод [28].

Ввиду стремительно растущих с каждым годом темпов потребления ископаемого топлива и, соответственно, истощения его запасов вопрос об альтернативе стоит наиболее остро. Таковой является использование неисчерпаемых и возобновляемых природных ресурсов. К последним относится биотопливо. Самым распространённым видом биотоплива является древесина. Жидкое биотопливо (этанол, метанол, биодизель) в основном получают из так называемых биотопливных культур (кукурузы, сои и др.), а также из лигноцеллюлозного сырья. Последнее является более предпочтительным, поскольку не конкурирует с пищевой промышленностью, не требует пахотных земель для выращивания и является, по сути, отходом деревообрабатывающей промышленности. В целом, использование растительного сырья в качестве биотоплива не представляется высоко rentable, а также негативно влияет на продовольственную безопасность и несёт губительные последствия для экосистем.

Прекрасная альтернатива биотопливу из растительного сырья – микроводоросли. И хоть пока что себестоимость биотоплива из микроводорослей не может конкурировать с таковой у традиционного топлива, использование их более rentable в долгосрочной перспективе, чем, скажем, зерновых культур [4]. *Chlorella vulgaris* способна накапливать большое количество липидов, особенно при культивировании в миксотрофных условиях.

Профиль жирных кислот *Chlorella vulgaris* пригоден для производства биодизеля, соответствующего стандартам разных стран [29]. Кроме того, *Chlorella vulgaris* имеет также большое количество крахмала, который может быть хорошим источником для производства этанола [30].

Основной проблемой использования микроводорослей в получении биотоплива является, как уже упоминалось, высокая себестоимость продукта, не позволяющая достигнуть конкурентоспособной цены на рынке, а также отсутствие устойчивого производства ввиду неотлаженных технологий.

1.2.4 Использование *Chlorella vulgaris* в биологически активных добавках

Биологически активные добавки (БАД) к пище – биологически активные вещества и их композиции, предназначенные для непосредственного приёма с пищей или введения в состав пищевых продуктов. Они используются как дополнительный источник пищевых и биологически активных веществ, для оптимизации различных видов обмена веществ, нормализации и/или улучшения функционального состояния органов и систем, снижения риска заболеваний, нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта и в качестве энтеросорбентов. При этом БАД не являются лекарственными средствами и, согласно отдельным мнениям, занимают промежуточную позицию между ними и продуктами питания [31].

Сегодня существует огромное количество всевозможных БАД, в том числе и на основе хлореллы, притом, как в самостоятельном её виде, так и в сочетании с другими водорослями. Использование хлореллы в качестве БАД связано с её богатым витаминным профилем, высоким содержанием белка и полиненасыщенных жирных кислот, пигментов (и всё в зависимости от условий культивирования).

Chlorella vulgaris богата витаминами А, Е и С, которые являются ключевыми элементами роста и дифференциации клеток организма, а также обладают антиоксидантной активностью, улучшают кровообращение и мышечные функции. Витамины группы В, также содержащиеся в хлорелле, являются основными факторами активности ферментов, участвующих в обмене веществ, способствуют пролиферации эритроцитов, поддерживают кожу, волосы и мышцы в здоровом состоянии, снижают риск развития рака поджелудочной железы [4]. Витаминный профиль хлореллы очень чувствителен к условиям роста. Так, известно, что наиболее высокие

концентрации витаминов достигались при гетеротрофном культивировании с использованием в качестве источника углерода и энергии глюкозы [32].

Содержание белка в клетках *Chlorella vulgaris* составляет 42-58% от сухой биомассы. Его питательная ценность велика, поскольку он включает в себя все незаменимые аминокислоты, [4] а также превосходит таковую для соевого белка [20].

При культивировании *Chlorella vulgaris* в благоприятных условиях, т.е. в отсутствии каких-либо стрессовых факторов, наблюдается значительный выход полиненасыщенных жирных кислот: линолевой, линоленовой и эйкопентаеновой. Они не пригодны для производства биодизеля, но прекрасно подходят в качестве пищевой добавки [33, 34].

Показано, что пигменты хлореллы обладают множеством терапевтических свойств, таких как антиоксидантная активность, защитный эффект против дистрофии сетчатки, регуляция уровня холестерина в крови, предупреждение сердечно-сосудистых заболеваний, иммуномодуляция [4].

В качестве пищевой добавки микроводоросль можно принимать в нескольких формах: порошкообразной, жидкой и в виде капсул, таблеток. Таблетированная форма хлореллы имеет ряд недостатков по сравнению с жидкими концентратами: высушивание при высоких температурах приводит к снижению количества полезных веществ [35].

Стоит отметить, что хлорелла способна синтезировать природный антибиотик «хлореллин», эффективный против стрептококков, стафилококков, кишечной палочки, в меньшей степени – против возбудителя туберкулеза [36].

В общем, все вышеперечисленные области применения *Chlorella vulgaris* диктуют необходимость дальнейшего изучения данной микроводоросли с максимальной оптимизацией её культивирования.

1.3 Влияние хрома на функционально-метаболические процессы различных организмов

Хром (Cr) – элемент побочной подгруппы 6 группы IV периода периодической системы химических элементов Д.И. Менделеева. Атомный номер – 24. Простое вещество хром – устойчивый твёрдый металл, имеющий голубовато-белый цвет. По электронному строению относится к d-элементам, т.е. является переходным металлом. Обладает переменными степенями окисления: +2, +3, +4, +5, +6.

В природе стабильными формами хрома являются трёхвалентная и шестивалентная.

Хром достаточно распространён в земной коре. Основным его соединением является хромистый железняк – $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$, хотя таковой редко встречается в самостоятельном виде, а входит в состав других минералов.

Соединения хрома нашли широкое применение в различных отраслях промышленности: в производстве нержавеющей стали, а также красителей и пигментов, покрытии поверхностей, сохранении древесины, дублении кож, синтезе искусственных рубинов и пр. Таким образом, соединения хрома постоянно циркулируют в окружающей среде, оказывая непосредственное влияние на неё, а также на человека.

Наибольшую опасность для здоровья человека представляют соединения шестивалентного хрома, особенно растворимые в воде хроматы и дихроматы. Cr (VI) обладает мутагенными и канцерогенными свойствами.

Кроме того, загрязнение почв тяжёлыми металлами, к которым относится, в частности, и хром, неблагоприятно влияет на рост и продуктивность сельскохозяйственных растений.

Cr (III) обладает порядка меньшей токсичностью по сравнению с Cr (VI) и является необходимым для жизни микроэлементом, точное значение которого, впрочем, установлено лишь в отношении метаболизма человека.

1.3.1 Микроорганизмов

Знание и понимание влияния хрома на метаболические процессы бактерий являются важными со стороны практического применения данных сведений.

Одним из наиболее прогрессивных методов добычи ценных металлов, в том числе хрома, из бедных руд является гидрометаллургия с использованием биовыщелачивания тионовыми бактериями (*Acidithiobacillus (Thiobacillus) ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* и др.) [37]. В ходе процесса биовыщелачивания возникают закономерные проблемы: во-первых, при извлечении данным способом хрома повышается его концентрация; во-вторых, Cr (III) – а именно такая валентность данного металла в природе является основной – окисляется до порядка более токсичного Cr (VI). Всё это в конечном счёте приводит к снижению активности тионовых бактерий за счёт выраженного токсичного действия хрома шестивалентной формы. Это в первую очередь связано со способностью данного элемента быть катализатором в генерации активных форм кислорода

(АФК), а также с тем, что катионы хрома легко взаимодействуют с различными электрондонорными группами в составе многих органических соединений, образуя комплексы с гидроксильными, карбоксильными, фосфатными и аминогруппами, а также ковалентные связи с сульфгидрильными (-SH) группами белков. Можно сказать, что токсическое действие хрома носит неспецифический характер. Также данный элемент оказывает ДНК-повреждающее воздействие, т.е. обладает выраженной генотоксичностью [38]. Таким образом, крайне важным объектом изучения как промышленной гидрометаллургии, так и геомикробиологии, является устойчивость промышленных штаммов бактерий к добываемым из руд тяжёлым металлам, в частности, хрому. Это означает, что для промышленного биовыщелачивания должна проводиться предварительная селекция видов и штаммов. Также при получении бактериальных штаммов, способных к высокоэффективному выщелачиванию хрома из бедных руд, крайне перспективным представляется использование генетических инструментов – плазмид, содержащих генный детерминант устойчивости к данному металлу.

Хром и его соединения, как известно, широко применяются в различных отраслях промышленности, и в сточных водах химических, машиностроительных, текстильных, предприятиях кожяного дубления и других производств концентрация хрома превышает предельно допустимую [39]. Хром в шестивалентной форме имеет наибольшее промышленное использование вследствие мощных окислительных свойств и способности образовывать интенсивное окрашивание и нерастворимые соли. И его же соединения являются наиболее токсичными. Биологическая очистка промышленных сточных вод связана с трансформацией микроорганизмами Cr (VI) в относительно малотоксичный и малорастворимый Cr (III). Восстановителями хрома являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Aeromonas* и *Esherihia* [38].

Биохимия процесса является достаточно малоизученной. Очевидно, хромредуцирующие бактерии имеют гены устойчивости к соответствующему металлу, а само восстановление Cr (VI) до Cr (III) является естественным механизмом детоксикации, а также (в случае первого механизма, см. ниже) источником необходимой для роста и жизнедеятельности энергией.

Описаны два основных механизма восстановления Cr (VI):

1) Cr (VI) может использоваться некоторыми бактериями в качестве акцептора электронов в цепи переноса электронов в анаэробных условиях (цитохромы MtrC и OmcA *Shewanella oneidensis* MR-1 являются терминальными редуктазами шестивалентного хрома) [40, 41];

2) Cr (VI) восстанавливается в аэробных условиях, связанных с деятельностью хроматредуктаз, использующих NADH или NADPH в качестве кофакторов [42].

Стоит отметить, что, вероятно, у некоторых бактерий восстановление хрома частично может происходить и в результате поверхностной биосорбции (за счёт наличия в клеточных стенках бактерий соединений с заряженными функциональными группами, связывающими хромат- и дихромат-анионы) [43, 44] и внеклеточной биосорбции (за счёт секреции бактериями полимерных веществ, включающих соответствующие функциональные группы) [45, 46].

Известно также, что косвенно Cr (VI) может восстанавливаться посредством неспецифических реакций, связанных с редокс-промежуточными органическими соединениями, такими как глутатион, аминокислоты, витамины, органические кислоты и пр. [47, 48].

Нельзя не отметить также тот факт, что хромредуцирующей способностью обладают не только бактерии, но и эукариотические микроорганизмы – дрожжевые грибы (некоторые представители родов *Candida*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* и др.), хотя пока что генетические и биохимические аспекты метаболизма хрома у них изучены недостаточно. Так, неизвестно, какая именно система редукции – ферментативная или неферментативная – играет основную роль в процессах детоксикации дрожжами шестивалентного хрома [49], однако многими исследованиями было установлено, что для них более характерны внеклеточные механизмы восстановления данного элемента [50].

1.3.2 Высших растений

Прямых доказательств того, что хром является необходимым элементом для растений нет. Тем не менее, он постоянно присутствует в их тканях в небольших количествах, что даёт основание полагать его в качестве микроэлемента, хотя по результатам опытов с водными культурами пяти видов растений он не играет сколь-нибудь существенной роли для нормального роста и развития. Есть, однако, данные, что этот элемент неспецифически активизирует некоторые ферменты, участвуя таким образом в ферментативных реакциях [51]. По данным А.Т. Щеглова, небольшие концентрации хрома (0,05-0,0005 %) стимулируют активность каталазы и протеолиз [52]. По ряду опытов также известно, что хром в сочетании с никелем и молибденом оказывает положительное влияние на прорастание семян ячменя. Кроме того, низкие концентрации хрома повышают содержание хлорофилла в листьях и общую

продуктивность фотосинтеза [51]. Незначительные количества трёхвалентного хрома стимулируют образование клубеньков у бобовых растений [53].

Конкретика влияния хрома и его соединений на растения продолжает изучаться. Можно, тем не менее, утверждать, что нетоксичные концентрации хрома могут вызывать некоторую стимуляцию физиологических процессов, как было указано выше. В тоже время высокие его концентрации существенно ингибируют все ростовые процессы. Это проявляется в торможении роста корневой системы растений, снижении сырого и сухого веса, изменении цвета корней, уменьшении количества листьев, площади ассимиляционной поверхности, возникновении хлорозов и некрозов, что приводит к снижению накопления биомассы. Избыток хрома в среде выращивания ингибирует прорастание пыльцы древесных и цветочных растений, приводит к появлению тератоморф [51]. Резонно предположить, что данные последствия детерминированы способностью хрома повреждать ДНК растений, прямо или же опосредованно – иницируя окислительный стресс, оказывающий, в свою очередь, деструктивное влияние не только на генетический материал, но и на другие клеточные компоненты. Всё это доказательно для животных и даже микроорганизмов, и вероятно, у растений названные механизмы не сильно отличаются, однако соответствующих исследований не проводилось.

Имели место, однако, эксперименты по изучению влияния токсичности различных уровней содержания Cr (VI) (0; 0,5; 1,0; 2,0 и 4,0 мг/кг⁻¹ почвы в виде дихромата калия) на ключевые ферменты азотистого обмена у *Cyatopsis tetragonoloba* L. (гуара). Было установлено, что хром отрицательно влияет на нитрогеназу, нитратредуктазу, нитритредуктазу, глутаминсинтетазу и глутаматдегидрогеназу в различных органах растений на разных стадиях роста, поскольку удельная ферментативная активность их снижалась, притом с увеличением уровня содержания металла. Значение в 4,0 мг Cr (VI) на кг-1 почвы оказалось летальным для растений [54]. Таким образом, очевидно, что шестивалентный хром оказывает значительное негативное влияние на азотистый обмен растений – один из ключевых их процессов, определяющий рост и жизнедеятельность целом.

Что же касается хрома как потенциального микроэлемента для растений, то строение его атома, его близость по положению в периодической системе элементов к марганцу и молибдену, физиологическая активность которых общеизвестна, его химические свойства дают основание предполагать, что хром, находясь в организме растений, не является индифферентным металлом, а всё же играет какую-то определенную роль в их жизнедеятельности [55]. Однако на сегодняшний день биохимия функционально-метаболических

процессов с участием данного элемента у высших растений остаётся практически неизученной.

1.3.3 Животных и человека

В организм соединения хрома поступают с водой, воздухом и пищей. Естественным источником хрома для человека являются растения. Хром содержится во многих овощных культурах (брокколи, зелёная фасоль), ягодах и фруктах, в некоторых лекарственных растениях (сушеница топяная, Melissa), а также в рыбе, креветках, крабах, печени, куриных яйцах, пивных дрожжах и чёрном перце. В пищевых продуктах хром практически всегда содержится в виде неорганических солей. Всасывание данных веществ в организм происходит через стенки кишечника [56] и характеризуется низким всасыванием самого хрома (всего 0,2-2% от общего количества). Органический хром всасывается намного лучше – до 16% [57].

Суточная потребность в хромом организма взрослого человека – 50-200 мкг [56].

В организме человека содержится от 6 до 12 мг хрома. Значительное его количество сконцентрировано в коже, а также в мышцах и костной ткани. С возрастом количество хрома в организме снижается [58].

Один из основных биологических эффектов хрома связан с его влиянием на регуляцию углеводного обмена и уровня глюкозы в крови. Это обусловлено тем, что хром является компонентом низкомолекулярного органического комплекса, называемого фактором толерантности к глюкозе – Glucose Tolerance Factor, или GTF. Точная структура GTF остается неизвестной, однако, несомненно, он содержит трёхвалентный хром. Предполагается, что хром образует комплекс с никотиновой кислотой и аминокислотами: вероятно, глутаминовой кислотой, цистеином и глицином [59]. GTF был выделен из пивных дрожжей, являющихся одним из самых богатых источников органического хрома [57].

GTF способствует процессу потенцирования гормона инсулина. Когда инсулин взаимодействует с соответствующим клеточным рецептором, GTF связывается с цитоплазматическим доменом того. Вследствие этого активируются белок IRS (insulin receptor substrate) и PI3-киназа (phosphatidylinositol 3-kinase), что, в свою очередь, через протеинкиназу Akt повышает сродство глюкозы и молекулы инсулинозависимого глюкозного транспортера (GLUT4). В результате глюкоза из крови поглощается клеткой, где служит источником энергии (рисунок 3).

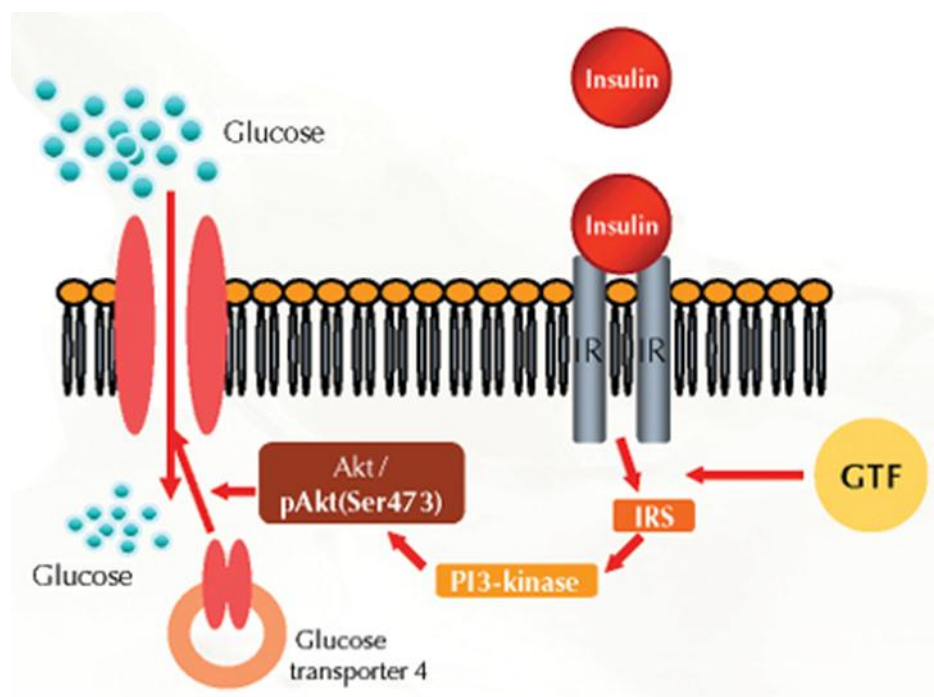


Рисунок 2.1 – Схема поглощения клеткой молекул глюкозы [60]

Проводились исследования, в ходе которых генетически диабетических мышей лечили экзогенным инсулином и это приводило к снижению уровня глюкозы в крови на 11-18%. Комбинированное лечение мышей с диабетом экзогенным инсулином и GTF было значительно более эффективным в снижении уровня глюкозы в плазме (39-51%) [61]. Таким образом, терапия сахарного диабета обязательно должна включать в себя потребление хромсодержащих продуктов и специальных добавок. Недостаток GTF серьезно усугубляет состояние гипергликемии. С другой стороны, неадекватная работа данного фактора может вызывать ненормальное поглощение глюкозы клетками, что приводит к значительному понижению её уровня в крови – гипогликемии.

Крайне важной функцией хрома является также контроль уровня холестерина в крови, т.е. данный микроэлемент участвует и в липидном обмене через всё то же регулирующее действие в составе GTF на функционирование инсулина. Дело в том, что в основе диабета 2 типа лежит явление инсулинорезистентности, характеризующееся нарушением взаимодействия инсулина с клетками тканей. Механизм возникновения инсулинорезистентности пока не изучен, однако известно, что основной причиной возникновения данного патологического состояния являются нарушения на пострецепторном уровне взаимодействия инсулина с клеткой. Как раз-таки на данном уровне реализует свою функцию GTF. Вполне

вероятно, что наличие определённых проблем с данным комплексом может вызывать инсулинорезистентность. Данное состояние, в свою очередь, закономерно вызывает гипергликемию. Глюкоза активно гликирует липопротеины крови, в том числе липопротеины низкой плотности (ЛПНП), транспортирующие холестерин. Это приводит к потере их сродства к рецепторам периферических клеток и, соответственно, к невозможности быть поглощёнными. ЛПНП накапливаются в крови и окисляются с привлечением макрофагов. Данные клетки не имеют ферментов, с помощью которых могли бы утилизировать холестерин до конечных продуктов (CO_2 и H_2O), поэтому холестерин формирует бляшки в местах гибели макрофагов – пенных клеток. Такими местами чаще всего являются стенки артерий. Это приводит к известным итогам: инсульту, инфаркту и пр.

Таким образом, проследив целый ряд различных процессов, можно сделать предположение о том, что в основе предотвращения названных патологий лежит правильная работа активного органического хрома – GTF – и, соответственно, его общее количество, детерминированное оптимальным содержанием трёхвалентного хрома в организме. Известно, что у людей, страдающих ожирением, диабетом, атеросклерозом наблюдается пониженное содержание данного микроэлемента [56].

В целом, на сегодняшний день функциональное значение хрома известно лишь в рамках фактора толерантности к глюкозе. Несмотря на всё вышеизложенное, непоколебимой уверенности в крайней важности и незаменимости данного элемента нет. Ионы трёхвалентного хрома действительно обуславливают положительную динамику при нарушениях метаболизма глюкозы или липидов, однако данные из экспериментов, проводимых на здоровых людях, довольно часто показывают отсутствие какого-либо благоприятного воздействия хрома на метаболизм соответствующих веществ. Это, в свою очередь, приводит к гипотезе, что добавки ионов хрома полезны лишь для организма, имеющего определённые нарушения. Здоровые же люди должны использовать хромовые добавки (тот же пиколинат хрома) разумным образом, не исключая возможности возникновения побочных эффектов [62].

Более сведений о биологической роли хрома – по крайней мере, в сколь-нибудь изученных процессах – нет. Не было найдено ни одного фермента, использующего хром в качестве кофактора [63, 64].

Что же касается животных, имеются данные, согласно которым оптимальный уровень хрома в рационе дойных коров благоприятно влияет на их общее состояние, молочную продуктивность, а также способствует

улучшению химического состава и повышению качества молока [65]. Биохимическая этиология этого пока неизвестна.

Хром является не только микроэлементом, но и опасным токсикантом. Среди химических элементов в отходах крупных промышленных городов хром по частоте встречаемости входит в первую десятку [66].

Как упоминалось ранее, шестивалентный хром представляет наибольшую опасность. Его основными источниками являются различные соли (хроматы, дихроматы), а также соответствующий триоксид. Cr (VI) обладает высокой кумулятивной способностью. Это связано с тем, что обычно его ионы в составе хроматов находятся в тетраэдрической конфигурации, обуславливающей их активное прохождение через клеточные мембранные каналы для транспорта изоструктурных сульфатов и фосфатов [67]. Cr (III) не поступает в клетки таким образом, поэтому усвояемость шестивалентной формы в 3-5 раз выше [68].

Хром, будучи металлом переменной валентности, является инициатором свободно-радикального окисления (СРО) [69]. При хромовой интоксикации ионы Cr (VI) восстанавливаются до через промежуточные четырёхвалентную и пятивалентную формы до трёхвалентного состояния под действием редуцирующих веществ, в частности, глутатиона, аскорбиновой кислоты, NADH и др. [70, 71]. Крайне реакционноспособные промежуточные ионы Cr⁵⁺ и Cr⁴⁺, вероятно, активируют процессы СРО в реакции с перекисью водорода по механизмам Хабера-Вейса и Фентона [72] и способствуют образованию гидроксил-радикала ($\bullet\text{OH}$), который, являясь активной формой кислорода, усиливает СРО, тем самым оказывая повреждающее действие на организм [69]. Данный радикал чрезвычайно химически активен и разрушает почти любые встретившиеся ему молекулы: белков, нуклеиновых кислот, липидов мембран и т.д.

Повреждения ДНК, возникающие в результате индуцированного хромом окислительного стресса, обуславливают явление мутагенеза при действии данного металла на клетки отчасти. Так, хром вызывает образование мутаций не только через деструктивную активность АФК. Связываясь внутриклеточно с лизин-, гистидин- и аргинин-богатыми пептидными последовательностями гистонов или ядерных белков в цитоплазме, Cr (VI) может транспортироваться таким образом в ядро клетки через механизм активного транспорта белков. Эти связывания являются обратимыми и могут высвободиться в непосредственной близости от ДНК, что приводит к образованию реакционноспособных интермедиатов Cr (V/IV) и, в конечном итоге, – к образованию бинарных аддуктов Cr (III)-ДНК либо тройных аддуктов Cr (III)-аминокислота-ДНК в ядре клетки (рисунок 3). Данный процесс считается важнейшим путём

индуцированного шестивалентным хромом повреждения ДНК *in vitro*. Неправильная репарация ДНК может привести к хромосомной нестабильности, мутациям, которые могут перерасти в онкогенез [73].

В последнее время хорошо известную канцерогенность шестивалентного хрома связывают не только с повреждением ДНК, но и с его влиянием на онкомиры (onco-miR's) – микроРНК (miRNA), связанные с некоторыми типами рака. miRNA представляют собой семейство небольших (18-25 нуклеотидов) некодирующих молекул РНК, которые контролируют экспрессию генов-мишеней путем взаимодействия с 3'-нетранслируемой областью мРНК-мишеней, что влечёт за собой репрессию трансляции или, напротив, деградации мРНК. Это оказывает значительное влияние на физиологические и патологические процессы [74, 75].

Среди них miR-21 является преобладающим onco-miR, вовлеченным в процесс развития рака. Pratheeshkumar и соавторы отметили, что хроническое воздействие шестивалентного хрома в клетках бронхиального эпителия человека может привести к росту поколения miR21 и, соответственно, к снижению экспрессии супрессора опухолей PDCD4 (рисунок 4). Такое влияние Cr (VI) обусловлено его способностью генерировать АФК, а также тем, что данный элемент стимулирует выработку интерлейкина 6 (IL-6), который, в свою очередь, индуцирует фосфолирование белка STAT3 – фактора транскрипции miR-21. [76].

Итак, исходя из вышесказанного, можно выделить как минимум два фактора, определяющих более высокую токсичность шестивалентного хрома по сравнению с трёхвалентным: во-первых, это достаточно активная кумуляция, и во-вторых, способность Cr (VI) восстанавливаться внутри клеток до Cr (III) с образованием высокоактивных промежуточных форм – Cr (V) и Cr (IV).

Есть данные, согласно которым и Cr (III) оказывает повреждающее действие на ДНК посредством нарушения укладки пар оснований [77]. Вопрос с канцерогенностью трёхвалентного хрома пока что остаётся открытым. Несмотря на то, что, как показали исследования *in vitro*, Cr (III) способен вызывать повреждения ДНК, большинство экспериментов *in vivo* обозначили его канцерогенность как неопределённую [78].

Выраженные канцерогенные свойства шестивалентного хрома подтверждены не только исследованиями в условиях лаборатории, но и, к сожалению, эпидемиологическими данными [79].

Хром, являясь тяжёлым металлом, способен оказывать ингибирующее влияние на активность ферментов. Тяжёлые металлы образуют с ними устойчивые комплексы. Особенную тропность данные элементы имеют к сульфгидрильным группам, с которыми формирует прочные ковалентные

связи. Аминокислота цистеин, содержащая SH-группу, входит в активный центр обширной группы протеолитических ферментов – цистеиновых протеиназ – и является ядром их каталитической активности.

Исследованиями было доказано инактивирующее действие тяжёлых металлов на цистеиновые протеиназы, зависящее от концентрации первых и времени воздействия. Так, ионы двухвалентных тяжёлых металлов (кадмия, кобальта, цинка), а также железа (III) ингибировали каталитическую активность кальпаина мидий (в данном случае обозначенный эффект мог быть связан также с конкуренцией тяжёлых металлов за ионы кальция, т.к. кальпаин – Ca^{2+} -зависимая протеиназа) [80]; в присутствии ионов Hg^{2+} и Cu^{2+} ингибировался гидролиз казеина бромелаином из стеблей и плодов ананаса [81]. Тем не менее, данных об исследованиях инактивации цистеиновых протеиназ именно соединениями хрома найдено не было.

Изучалось, однако, влияние Cr (VI) на активность ферментов печени (кислой и щелочной фосфатазы, каталазы и глюкозо-6-фосфатазы); высокие концентрации металла вызвали ингибирование ферментов [82]. Вероятно, это связано с инициацией хромом окислительного стресса.

1.4 Влияние хрома на функционально-метаболические процессы микроводорослей

Ввиду темы дипломной работы влияние хрома на функционально-метаболические процессы микроводорослей стоит отдельного рассмотрения.

Как упоминалось в разделе о высших растениях, нет прямых доказательств необходимости хрома для них. Это справедливо и для водорослей, в том числе микроводорослей.

В целом, имеется не так уж много сведений о действии данного металла на микроводоросли. Как правило, уже в небольших концентрациях (1-2 мг/л) он ингибирует их рост, причём соединения шестивалентного хрома ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ввиду описанных выше причин на порядок более токсичны по сравнению с соединениями трёхвалентного ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Чувствительность к хромуму возрастает в следующем ряду: одноклеточные зелёные водоросли (*Chlorococcales*) → эвгленовые (*Euglena*) → диатомовые (*Diatomea*) [83]. Согласно одним данным, концентрации шестивалентного хрома до 0,1 мг/л стимулировали рост *Chlorella pyrenoidosa*, при этом повышалась также интенсивность деления клеток и фотосинтетическое выделение ими кислорода [84]. По другим данным, упомянутая концентрация (0,1 мг/л) Cr (VI) может

существенно (на 85%) снизить интенсивность фотосинтеза у хлореллы, а при 1 мг/л он почти прекращается [85].

Исследования, проведённые на *Chlorella sp.* 1-14, показали, что содержание шестивалентного хрома в среде выше 0,5 мг/л при исходном засеве 3-5 млн/мл клеток на 1 мл среды вызывает явно угнетение роста. При сильно токсических концентрациях элемента (5 мг/л) нарушается биосинтез белка. Также клетки теряют хлорофилл и обесцвечиваются. Это связано с тем, что избыток хрома в питательном растворе разрушает фотосинтетический аппарат.

Микроводоросли в целом обладают высокой кумулятивной способностью по отношению к тяжёлым металлам. Поглощение хрома клетками хлореллы, например, увеличивается по мере возрастания его концентрации в питательной среде. Известно, что токсическое действие данного металла можно снизить несколькими путями, связанными с коррекцией состава питательной среды. Один из них – применение хелатирующего агента (например, ЭДТА). Хром проявляет ярко выраженную способность к комплексообразованию, и снижение его токсического действия на рост микроводорослей происходит в результате связывания ионов данного элемента в комплексные соединения [83]. Стоит сразу обозначить, что в ходе проведённого в рамках дипломной работы эксперимента ЭДТА не вносился в питательную среду с целью получения более объективных результатов, отражающих реальное влияние соединения трёхвалентного хрома на культуру хлореллы.

Снижению токсического действия хрома на хлореллу также способствует повышение концентрации железа в питательной среде. В случаях, если ингибирование роста культуры избытком хрома не превышает 40%, отрицательный эффект исчезает полностью. Некоторая нормализация продуктивности достигается также повышенными концентрациями молибдена (0,5 и 1,0 мг/л). Остальные элементы (бор, цинк) либо не влияют на токсичность для хлореллы хрома, либо усиливают его токсическое действие (марганец и особенно медь). Следовательно, для снижения токсичности хрома может быть использован антагонизм между этим элементом и железом. Это важно, поскольку повышенные дозы железа сами по себе не токсичны для хлореллы: она относится к организмам, способным переносить очень высокие концентрации железа в среде [83, 86].

Современные исследования показывают, что клетки *Chlorella vulgaris* восстанавливают Cr (VI) до трёхвалентного состояния. Это наглядно показывает общность процессов метаболизма данного элемента у различных организмов. Редукция шестивалентного хрома может происходить либо посредством активности хроматредуктазы, либо под действием глутатиона [87].

Стоит отметить, что несмотря на исследования о влиянии на микроводоросли Cr (VI), существует мало данных о том, какое воздействие на таковые оказывает Cr (III), не говоря уже о том, что его функциональное значение для данной группы организмов до сих пор неизвестно.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальное исследование проводилось на базе НИЛ ДНК и клеточных технологий в животноводстве и растениеводстве УО «Полесский государственный университет».

Объектом исследования являлась зелёная микроводоросль *Chlorella vulgaris*, а предметом исследования – влияние сульфата хрома (III) на физиолого-биохимическое состояние клеток *Chlorella vulgaris*.

2.1 Материалы исследований

2.1.1 *Chlorella vulgaris*

Исследование было выполнено на культуре *Chlorella vulgaris*, штамм ИВСЕ С-19 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

2.1.2 Среда Тамия

Микроводоросль культивировалась на питательной среде Тамия без добавления ЭДТА (рН 7,0) следующего состава, г/л:

- 5,0 KNO₃;
- 2,5 MgSO₄•7H₂O;
- 1,25 KH₂PO₄;
- 0,003 FeSO₄•7H₂O;
- 1 мл раствора микроэлементов (2,86 г/л H₃BO₃, 1,81 г/л MnCl₂•4H₂O, 0,222 г/л ZnSO₄•7H₂O, 176,4 мг/10 л MoO₃, 229,6 мг/10 л NH₄VO₃).

2.1.3 Лабораторная посуда

Центрифугирование клеточной культуры и приготовление ацетоновой вытяжки для определения концентрации пигментов в ней производили в эппендорфах. Клетки растирали в фарфоровых ступках. Растворы для определения концентрации внутриклеточного белка готовили в стеклянных пробирках. Для измерения величины абсорбции в спектрофотометре

использовали кварцевую кювету. Реактив Bradford готовили в химическом стакане объёмом 1 л и хранили в холодильнике в колбе из тёмного стекла с притёртой крышкой.

2.1.4 Оборудование

Для взвешивания компонентов среды Тамия и эффектора использовали аналитические весы модели OHAUS Adventurer ProAV264C. Измерение водородного показателя при приготовлении питательной среды осуществляли с помощью рН-метра стационарного HI 2211-02. Подсчёт клеток микроводоросли осуществляли с помощью микроскопа Микмед-5 ЛОМО ($\times 40$) в двухсеточной камере Горяева. Центрифугирование клеточной культуры производили в микроцентрифуге CF-10. Внесение различных жидких компонентов в эппендорфы и пробирки осуществляли с использованием одноканальных механических дозаторов Thermo Scientific Ленпипет различного объёма. Величину абсорбции (A) при определении концентрации внутриклеточного белка и пигментов в ацетоновой вытяжке измеряли с помощью спектрофотометра Varian CARY 50.

2.2 Методы исследований

100 мл культуры клеток *Chlorella vulgaris* культивировали в стеклянных банках объёмом 250 мл при температуре 25 ± 1 °C, перемешивании дважды в сутки, освещённости на поверхности сосуда 5000 лК, продолжительности световых и темновых фаз 12ч/12ч в течение 21 суток. В исследовании фигурировало 6 вариантов в троекратной повторности с различной концентрацией сульфата хрома (III) в культуре: от 10^{-2} до 10^{-6} М, а также контроль (отсутствие эффектора).

Для исследования влияния сульфата хрома (III) на физиолого-биохимическое состояние клеток *Chlorella vulgaris* были использованы следующие методы:

- подсчёт клеток хлореллы в камере Горяева;
- определение концентрации внутриклеточного белка в клетках хлореллы с помощью реактива Bradford;
- определение концентрации пигментов в клетках хлореллы экстракцией ацетоном из гомогенизированной клеточной массы;
- компьютерная обработка данных.

2.2.1 Подсчёт клеток

Подсчёт клеток *Chlorella vulgaris* осуществляли каждые вторые сутки исследования, используя камеру Горяева.

Взбалтывали содержимое опытной колбы. Брли каплю культуры и наносили на сетку камеры Горяева, прикрывали покрывным стеклом. Тщательно притирали покрывное стекло к поверхности камеры. Удаляли лишнюю жидкость вокруг покрывного стекла и в желобках камеры фильтровальной бумагой. Производили подсчёт клеток в 25 больших квадратах камеры и затем суммировали количество клеток в 25 квадратах и вычисляли содержание клеток, млн/мл по формуле:

$$\text{Млн кл./мл} = \frac{\sum \text{клеток в 25 квадратах}}{100} \cdot 10^6 \quad [88] \quad (2.1)$$

2.2.2 Определение концентрации внутриклеточного белка методом Bradford

Метод основан на прямом связывании Кумасси ярко-голубого с аминокислотными остатками аргинина, триптофана, тирозина, гистидина и фенилаланина в белке.

Сначала приготовили сам реактив Bradford.

Реактивы:

- краситель Кумасси ярко-голубой (Coomassie Blue Brilliant G250);
- 96% этанол;
- 85% фосфорная кислота.

100 мг красителя Кумасси ярко-голубого растворили в 50 мл 96% этанола. К этому раствору, постоянно перемешивая его стеклянной палочкой, добавили 100 мл 85% фосфорной кислоты. В стакан объёмом 1 л налили 500-700 мл дистиллированной воды и медленно, помешивая воду стеклянной палочкой, добавили в неё раствор, содержащий краситель Кумасси голубой, этанол и фосфорную кислоту. Довели раствор до 1 литра и оставили на ночь при комнатной температуре. Полученный раствор профильтровали. Готовый реактив хранили в холодильнике в колбе из тёмного стекла.

Затем построили калибровочную кривую, используя яичный альбумин (ЯА). Для этого 10 мг ЯА растворили в 10 мл дистиллированной воды – концентрация раствора 1 мг/мл. Приготовили второй стандартный раствор с концентрацией 0,1 мг/мл: взяли 1 мл первого стандартного раствора и 9 мл H₂O.

Из второго стандартного раствора приготовили серию разведений с концентрацией белка от 10 до 100 мкг/мл. 0,1 мл соответствующего раствора белка поместили в пробирки. Добавили 5 мл реактива Bradford, перемешали и оставили при комнатной температуре на 10 минут (интервал времени от внесения реактива для всех пробирок одинаков). Измерили в спектрофотометре величину A для образцов при λ 595 нм. По полученным после измерения данным построили калибровочную кривую, откладывая на оси абсцисс значения концентрации, а на оси ординат – абсорбции.

Определение концентрации внутриклеточного белка *Chlorella vulgaris* осуществлялось каждые вторые сутки исследования.

Отбирали из культуры 10 мл клеток. Вносили x мл культуры, содержащей необходимое количество клеток, в эппендорф и центрифугировали в течение 10 минут при количестве оборотов 6000 об/мин. Аккуратно удаляли пипет-дозатором супернатант и добавляли 0,5 мл дистиллята. Центрифугировали 10 минут, 6000 об/мин. Вносили в расположенную на льду ступку 0,5 мл дистиллята с клетками, мел на кончике иглы и стекло. Растирали 10 минут. Из ступки брали 0,1 мл растёртых клеток в эппендорф и отбирали в пробирку супернатант. Добавляли в данную пробирку 5 мл реактива Bradford. Перемешивали содержимое пробирки и оставляли на 10 минут. Вносили раствор в кювету и измеряли в спектрофотометре величину A при λ 595 нм. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой [89].

2.2.3 Определение концентрации пигментов

Определение концентрации пигментов осуществлялось каждые вторые сутки исследования.

Отбирали из культуры 10 мл клеток. Вносили x мл культуры, содержащей необходимое количество клеток, в эппендорф и центрифугировали в течение 10 минут при количестве оборотов 6000 об/мин. Аккуратно удаляли пипет-дозатором супернатант и добавляли 0,5 мл дистиллята. Центрифугировали 10 минут, 6000 об/мин. Вносили в расположенную на льду ступку 0,5 мл дистиллята с клетками, мел на кончике иглы и стекло. Растирали 10 минут. 0,4 мл растёртых клеток из ступки вносили эппендорф. Добавляли 1,6 мл ацетона и оставляли в темноте до обесцвечивания растёртой массы. Отбирали полученную вытяжку в кварцевую кювету и измеряли величину A в спектрофотометре трижды: при λ 644,8 нм, 661,6 нм и 470 нм. Подставляя полученные значения A в формулы определяли концентрации пигментов в вытяжке:

$$C_a = (11,24 \cdot A_{661,6}) - (2,04 \cdot A_{644,8}), \quad (2.2)$$

где C_a – концентрация хлорофилла a , $A_{661,6}$ – величина A при λ 661,6 нм, $A_{644,8}$ – величина A при λ 644,8 нм.

$$C_b = (20,13 \cdot A_{644,8}) - (4,19 \cdot A_{661,6}), \quad (2.3)$$

где C_b – концентрация хлорофилла b .

$$C_{\text{кар}} = \frac{(1000 \cdot A_{470}) - (1,90 \cdot C_a) - (63,14 \cdot C_b)}{214}, \quad (2.4)$$

где $C_{\text{кар}}$ – концентрация каротиноидов, A_{470} – величина A при λ 470 нм [88].

2.2.4 Обработка данных

Все полученные результаты представлены как среднее арифметическое не менее трёх независимых измерений. Обработку данных производили с использованием программ Excel и Origin 6.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние сульфата хрома (III) на динамику биомассы *Chlorella vulgaris*

На протяжении всех 21 суток исследования наблюдалось возрастание количества клеток в контроле с пиком в $18,05 \pm 0,03$ млн клеток/мл на последних сутках (таблица 3.1, рисунок 3.1).

В варианте опыта с концентрацией соли хрома в среде 10^{-2} М наблюдалась гибель культуры уже на 3 сутки ($3,66 \pm 0,09$ млн клеток/мл в первые сутки). Мёртвые клетки представляли собой бледно-зелёную хлопьевидную массу, осевшую на дне банки.

Во всех остальных вариантах опыта динамика биомассы носила местами колебательный характер с уменьшением концентрации клеток на последних сутках: -52,41%, -56,4%, -51,14%, -47,26% относительно контроля, принятого за 100%, для 10^{-3} - 10^{-6} М соответственно (рисунок 3.2).

Таблица 3.1 – Динамика биомассы *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях (n=3)

Сутки	Концентрация сульфата хрома (III), М					
	0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	$4,21 \pm 0,06$	$3,66 \pm 0,09$	$3,08 \pm 0,06$	$3,04 \pm 0,06$	$4,13 \pm 0,07$	$3,38 \pm 0,06$
3	$4,78 \pm 0,03$	0	$4,13 \pm 0,07$	$3,38 \pm 0,04$	$4,73 \pm 0,03$	$4,41 \pm 0,02$
5	$6,54 \pm 0,04$	0	$4,72 \pm 0,11$	$3,61 \pm 0,02$	$4,98 \pm 0,04$	$5,22 \pm 0,07$
7	$7,81 \pm 0,05$	0	$5,39 \pm 0,02$	$4,30 \pm 0,03$	$5,00 \pm 0,06$	$10,77 \pm 0,18$
9	$8,25 \pm 0,08$	0	$6,03 \pm 0,04$	$5,09 \pm 0,08$	$7,40 \pm 0,06$	$9,01 \pm 0,06$
11	$9,20 \pm 0,08$	0	$5,43 \pm 0,07$	$6,47 \pm 0,08$	$10,34 \pm 0,07$	$8,12 \pm 0,07$
13	$11,00 \pm 0,07$	0	$5,62 \pm 0,05$	$8,59 \pm 0,06$	$13,1 \pm 0,06$	$9,76 \pm 0,09$
15	$10,81 \pm 0,02$	0	$6,53 \pm 0,07$	$8,95 \pm 0,03$	$12,47 \pm 0,05$	$9,94 \pm 0,06$
17	$10,00 \pm 0,07$	0	$7,86 \pm 0,04$	$10,24 \pm 0,05$	$11,91 \pm 0,05$	$10,02 \pm 0,09$
19	$16,14 \pm 0,09$	0	$9,53 \pm 0,07$	$11,67 \pm 0,04$	$12,56 \pm 0,03$	$10,54 \pm 0,06$
21	$18,05 \pm 0,03$	0	$8,59 \pm 0,02$	$7,87 \pm 0,04$	$8,82 \pm 0,05$	$9,52 \pm 0,02$

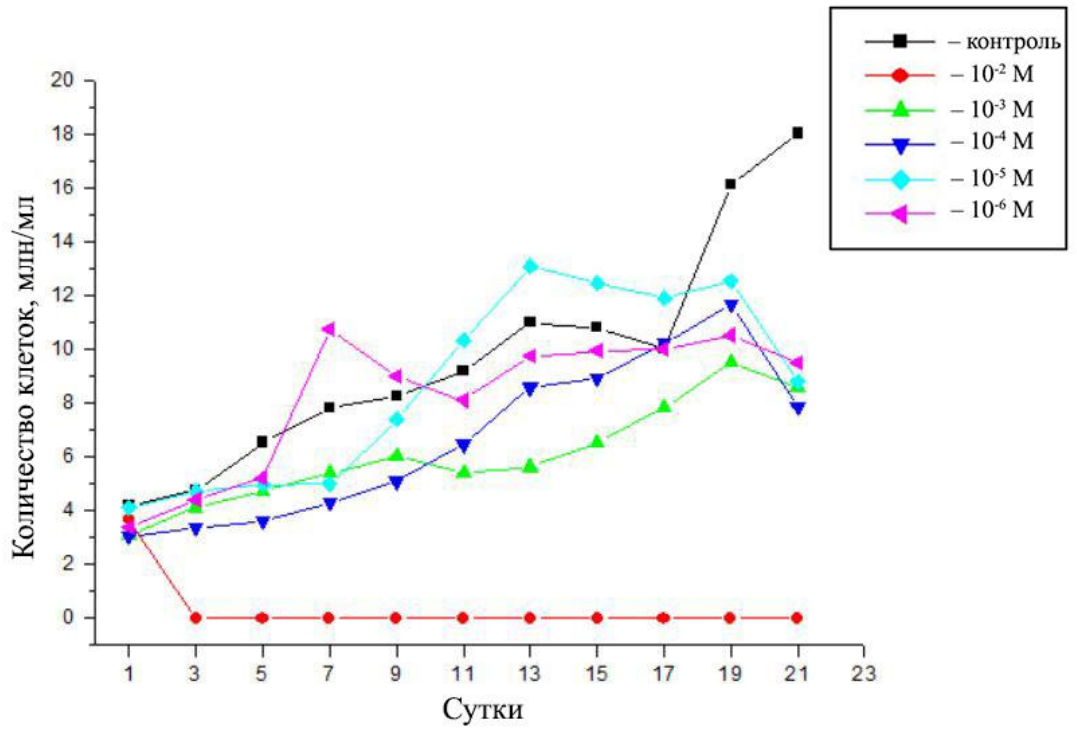


Рисунок 3.1 – Динамика биомассы *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях

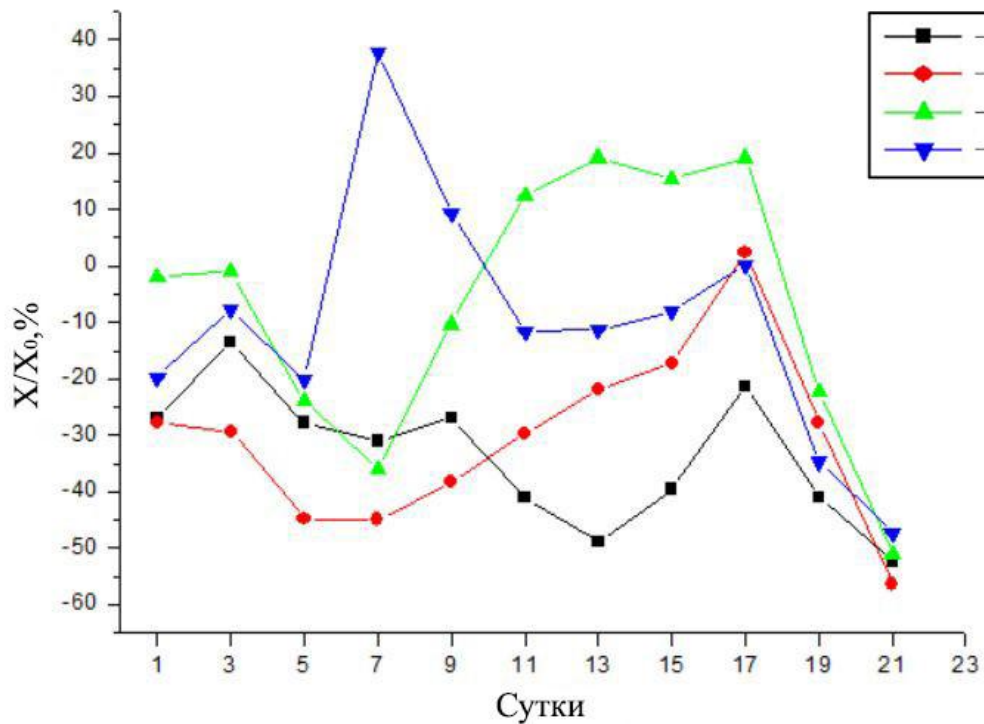


Рисунок 3.2 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы при добавление в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях

Видно, что сульфат хрома (III) в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} М оказывал явно угнетающее влияние на рост биомассы по сравнению с контролем, не говоря уже о том, что концентрация 10^{-2} М привела к гибели культуры.

Эффектор в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М хоть и показывали некоторые положительные тенденции динамики биомассы на определённых этапах исследования, но всё же уступили контролю. Таким образом, можно сделать вывод о том, что сульфат хрома (III) не оказывает благоприятного влияния на рост биомассы культуры *Chlorella vulgaris*.

3.1 Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию внутриклеточного белка *Chlorella vulgaris*

Максимальная концентрация внутриклеточного белка наблюдалась в контроле на последние сутки исследования и составляла $89,23 \pm 0,11$ мкг/млн клеток (таблица 3.2, рисунок 3.3).

Уровень накопления белка в образцах с концентрацией сульфата хрома (III) 10^{-3} и 10^{-4} М был значительно ниже в сравнении с контролем за всё время исследования. В вариантах с содержанием соли 10^{-5} и 10^{-6} М в отдельные сутки исследования концентрация внутриклеточного белка превышала таковую в контроле: на 10,28% (3 сутки) и на 1,08%, 69,39%, 8,09% (3-7 сутки) для 10^{-5} и 10^{-6} М эффектора в среде соответственно (рисунок 3.4.). В остальное время в данных образцах также отмечался низкий уровень белка по сравнению с контролем.

Таблица 3.2 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию внутриклеточного белка (мкг/мл млн клеток) *Chlorella vulgaris* (n=3)

Сутки	Концентрация сульфата хрома (III), М					
	0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	19,15±0,05	14,55±0,02	16,14±0,04	14,75±0,09	17,23±0,06	18,33±0,10
3	21,31±0,07	0	18,43±0,07	19,48±0,04	23,50±0,04	21,54±0,04
5	32,54±0,04	0	20,72±0,09	25,12±0,03	30,18±0,04	55,12±0,05
7	57,61±0,05	0	25,60±0,09	28,30±0,02	42,45±0,05	62,27±0,05
9	59,85±0,09	0	28,23±0,05	35,05±0,09	39,66±0,07	58,08±0,06
11	63,20±0,03	0	31,51±0,10	47,17±0,03	50,30±0,12	47,75±0,12
13	79,44±0,10	0	24,86±0,04	54,29±0,05	68,82±0,03	59,76±0,09
15	68,21±0,04	0	30,30±0,07	59,55±0,05	60,17±0,05	58,94±0,07
17	70,38±0,08	0	42,07±0,06	60,20±0,10	59,71±0,06	57,02±0,08

Продолжение таблицы

19	80,66±0,09	0	50,77±0,12	64,67±0,07	66,13±0,08	58,54±0,03
21	89,23±0,11	0	40,09±0,08	52,80±0,08	53,91±0,07	54,06±0,02

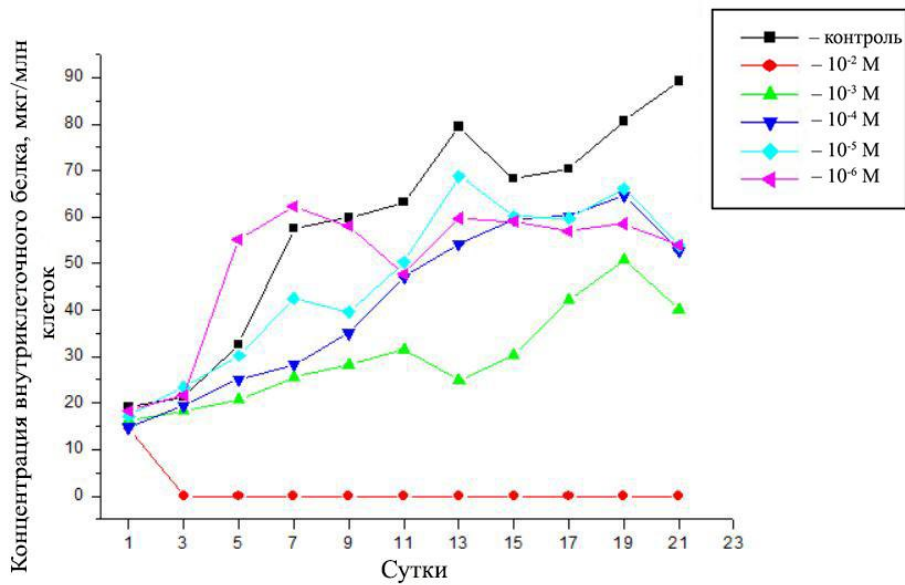


Рисунок 3.3 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию внутриклеточного белка (мкг/мл млн клеток) *Chlorella vulgaris*

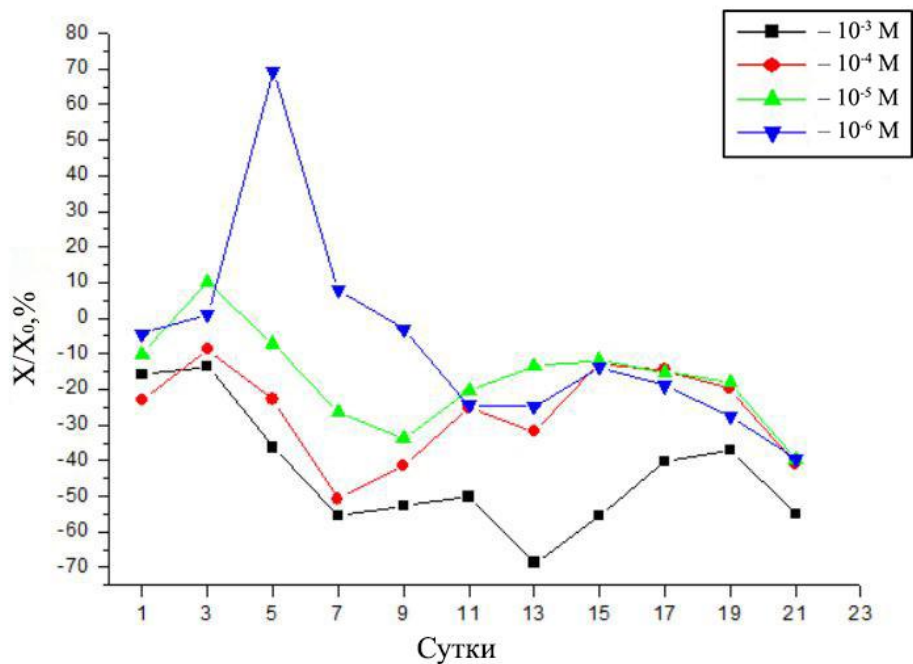


Рисунок 3.4 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) концентрации внутриклеточного белка при добавление в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях

Исходя из представленных данных можно сделать вывод о том, что сульфат хрома (III) не оказывал сколь-нибудь положительного влияния на накопление культурой белка по сравнению с контролем.

2.2.2 Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию пигментов *Chlorella vulgaris*

Максимальная концентрация хлорофилла *a* наблюдалась на 7 сутки исследования в образце с содержанием сульфата хрома (III) 10^{-5} М и составляла $19,80 \pm 0,12$ мкг/мл млн клеток (таблица 3.3, рисунок 3.5), что на 17,79% превысило значение контроля в эти же сутки (рисунок 3.6). Изменения концентрации хлорофилла *a* носило выраженный колебательный характер. В образцах, содержащих эффектор, с 1 по 3 сутки исследования (для вариантов с концентрацией сульфата 10^{-4} и 10^{-5} М также на 5 сутки) отмечался значительный прирост содержания пигмента по сравнению с контролем (даже в погибшей на третьи сутки культуре): свыше 100%, с рекордом в +588,03% в образце с концентрацией эффектора 10^{-3} М. Неизвестно, что послужило причиной данного явления. Возможно, это произошло ввиду перестройки клеточного метаболизма под влиянием хрома. В любом случае, для создания доказательной базы той или иной теории необходимо проведение соответствующих исследований. Тем более, подобный скачок был зафиксирован также на предпоследние сутки исследования в образце с концентрацией сульфата хрома (III) 10^{-4} М: +113,09%. Более таких «пиков» концентрации хлорофилла *a* не наблюдалось, а все остальные приросты – порядка менее большие и немногочисленные – отображены в таблице и на соответствующих рисунках. Стоит отметить, что с 5 по последние сутки исследования в варианте с содержанием эффектора 10^{-6} М отмечался более низкий уровень концентрации хлорофилла *a* по сравнению с контролем. Такая же тенденция наблюдалась в варианте с 10^{-5} М сульфата в среде, начиная с 9 суток.

Таблица 3.3 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию хлорофилла *a* (мкг/мл млн клеток) *Chlorella vulgaris* (n=3)

Сутки	Концентрация сульфата хрома (III), М					
	0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	$2,34 \pm 0,09$	$7,94 \pm 0,08$	$16,10 \pm 0,06$	$7,49 \pm 0,07$	$15,82 \pm 0,10$	$14,15 \pm 0,07$
3	$2,60 \pm 0,06$	0	$16,33 \pm 0,11$	$10,22 \pm 0,15$	$17,77 \pm 0,07$	$14,16 \pm 0,10$

Продолжение таблицы

5	7,49±0,08	0	10,62±0,05	19,34±0,11	15,05±0,19	7,06±0,10
7	16,81±0,17	0	11,22±0,05	11,27±0,11	19,80±0,12	7,77±0,05
9	14,76±0,11	0	8,18±0,09	9,73±0,06	9,40 ±0,06	7,56±0,12
11	13,46±0,09	0	7,37±0,07	6,07±0,09	5,00 ±0,05	6,23±0,08
13	7,25±0,06	0	9,66±0,08	5,06±0,10	4,50 ±0,09	6,53±0,08
15	8,25±0,12	0	7,15±0,08	6,07±0,08	4,50 ±0,12	6,03±0,07
17	8,78±0,09	0	6,90±0,13	6,41±0,80	4,10 ±0,05	4,21±0,13
19	7,03±0,08	0	6,94±0,14	14,98±0,09	5,57±0,08	14,15±0,07
21	7,61±0,06	0	9,42±0,09	12,08±0,14	7,26±0,11	14,16±0,10

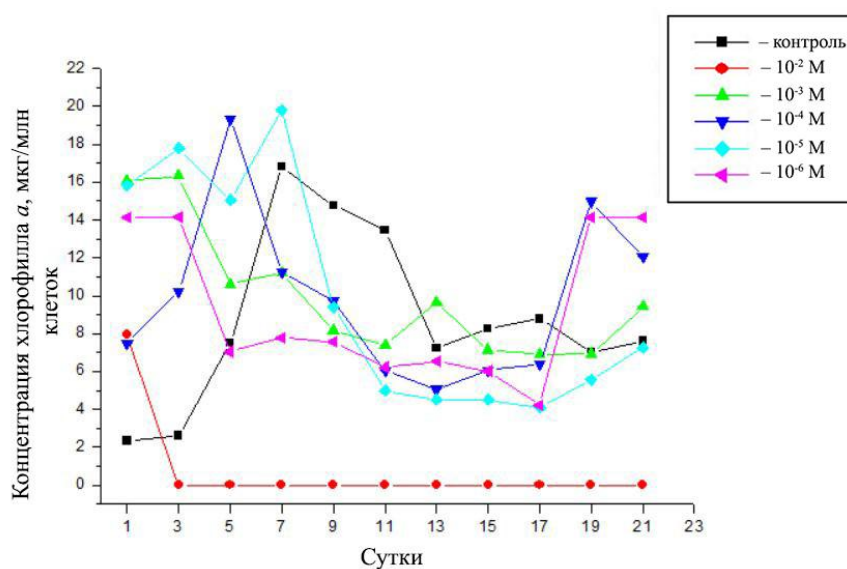


Рисунок 3.5 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию хлорофилла *a* (мкг/ млн клеток) *Chlorella vulgaris*

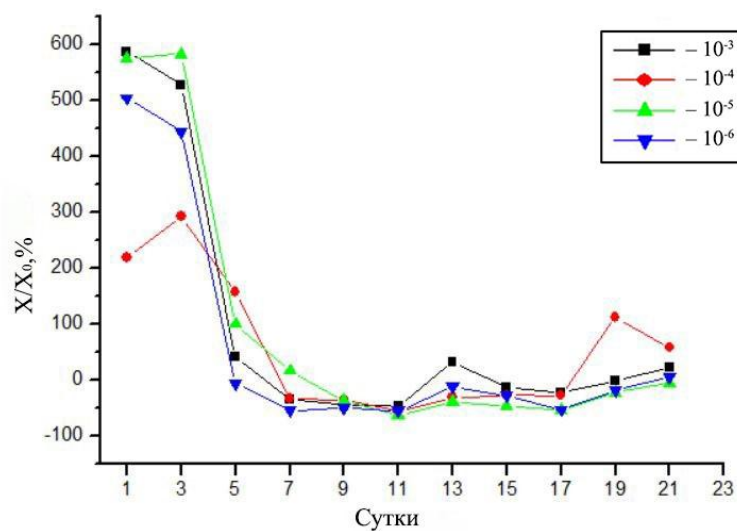


Рисунок 3.6 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) концентрации хлорофилла *a* при добавление в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях

Общая тенденция влияния сульфата хрома (III) на концентрацию в клетках хлореллы хлорофилла *b* аналогично таковой у хлорофилла *a*. Это представлено в таблице (таблица 3.4) и на соответствующих рисунках (рисунок 3.7, рисунок 3.8).

Максимальная концентрация хлорофилла *b* наблюдалась на 7 сутки исследования в образце с содержанием сульфата хрома (III) 10^{-5} М и составляла $32,33 \pm 0,06$ мкг/мл млн клеток, что на 36,3% превысило значение контроля в эти же сутки.

Таблица 3.4 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию хлорофилла *b* (мкг/ мл млн клеток) *Chlorella vulgaris* (n=3)

Сутки	Концентрация сульфата хрома (III), М					
	0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	4,33±0,10	8,84 ±0,12	27,02±0,11	16,42±0,06	25,56±0,16	20,67±0,12
3	4,78±0,09	0	27,30±0,06	18,15±0,08	30,10±0,09	24,02±0,16
5	12,98±0,09	0	13,35±0,09	32,47±0,08	19,17±0,05	5,76±0,09
7	23,72±0,06	0	17,91±0,07	13,03±0,15	32,33±0,06	10,38±0,07
9	20,78±0,05	0	10,85±0,08	7,76±0,13	13,78±0,08	5,01±0,11
11	18,66±0,09	0	6,57±0,04	5,39±0,04	5,42±0,12	5,96±0,10
13	7,49±0,14	0	10,39±0,05	4,66±0,12	4,68±0,10	6,63±0,06
15	8,46±0,11	0	10,54±0,13	5,80±0,07	3,65±0,08	4,61±0,05
17	9,51±0,07	0	5,90±0,09	6,84±0,08	3,26±0,07	3,67±0,13
19	8,57±0,07	0	7,94±0,13	22,75±0,07	6,15±0,11	5,94±0,12
21	9,45±0,18	0	12,48±0,10	17,33±0,06	7,63±0,05	8,92±0,08

Из-за огромных приростов концентрации пигментов в начале исследования получается, что, в среднем, сульфат хрома (III) благоприятно повлиял на накопление их микроводорослью, однако это не является достоверным, поскольку в последующие дни в целом наблюдалась отрицательная динамика. К тому же, как ранее упоминалось, изменения концентрации хлорофилла *a* и *b* носило выраженный колебательный характер. Таким образом, ввиду неоднозначности полученных данных оценка влияния сульфата хрома (III) на концентрацию хлорофилла *a* и *b* является затруднительной. Требуется дополнительные исследования в этой области для разрешения возникших вопросов.

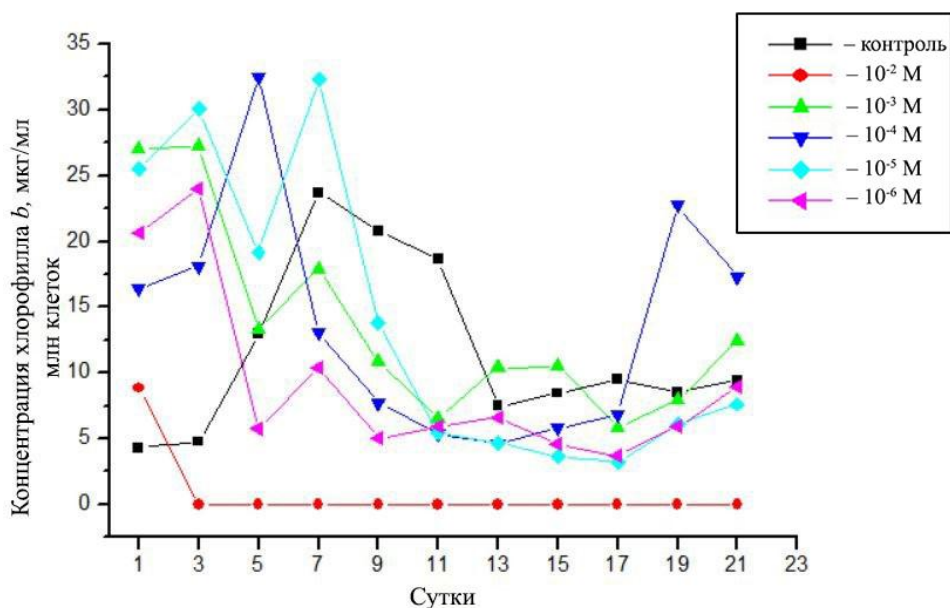


Рисунок 3.7 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию хлорофилла *b* (мкг/ мл млн клеток) *Chlorella vulgaris*

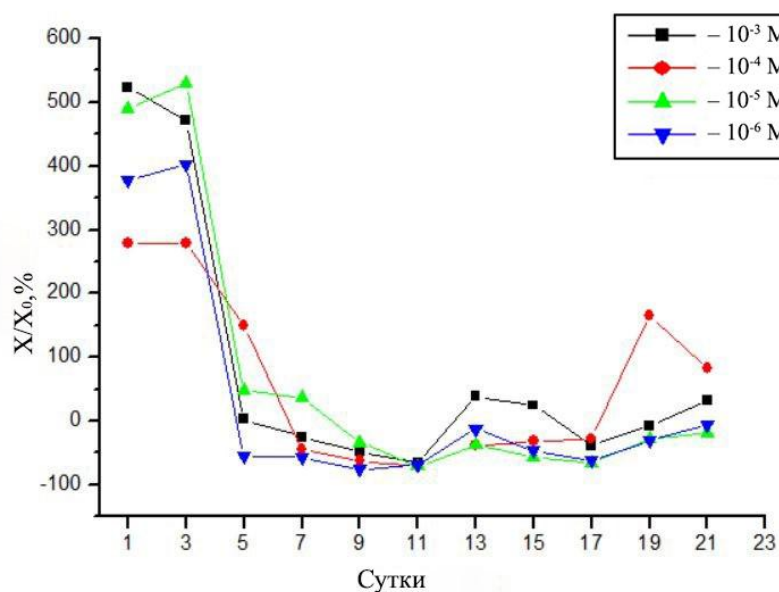


Рисунок 3.8 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) концентрации хлорофилла *b* при добавление в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях

Максимальная концентрация каротиноидов была отмечена на 9 сутки исследования в образце с содержанием сульфата хрома (III) 10^{-4} М и составила $2,87 \pm 0,06$ мкг/мл млн клеток (таблица 3.5, рисунок 3.7), что на 55,98% превысило значение контроля в эти же сутки (рисунок 3.8).

В таблице и на графиках можно наблюдать, как и в случае с хлорофиллом *a* и *b*, колебательный характер изменения концентрации каротиноидов при различном содержании эффектора, что также создаёт определённые трудности в интерпретации полученных результатов. Тем не менее, можно сделать вывод,

что содержание в среде сульфата хрома (III) 10^{-3} - 10^{-5} М (не говоря уже о 10^{-2} М) негативно повлияло на накопление хлореллой каротиноидов, а также с осторожностью предположить, что, судя по данным исследования, содержание эффектора 10^{-6} М оказало в целом благоприятное влияние на концентрацию каротиноидов в клетках культуры по сравнению с контролем. Возможно, дополнительные исследования внесут больше ясности в этот вопрос.

Таблица 3.5 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию каротиноидов (мкг/ мл млн клеток) *Chlorella vulgaris* (n=3)

Сутки	Концентрация сульфата хрома (III), М					
	0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	0,70±0,09	1,50 ±0,07	0,30±0,07	0,35±0,10	0,37±0,08	0,84±0,10
3	0,85±0,09	0	0,17±0,07	0,30±0,12	0,12±0,04	1,06±0,09
5	0,98±0,05	0	1,90±0,09	0,45±0,07	2,04±0,09	1,86±0,12
7	1,84±0,05	0	0,28±0,12	2,01±0,09	0,60±0,12	1,08±0,06
9	1,84±0,07	0	1,30±0,13	2,87±0,06	1,77±0,13	2,44±0,05
11	1,42±0,08	0	1,98±0,08	1,65±0,12	0,99±0,07	1,38±0,17
13	1,49±0,12	0	2,28±0,06	1,37±0,09	1,03±0,06	1,43±0,09
15	1,99±0,10	0	1,23±9,06	1,44±0,08	1,21±0,10	1,55±0,09
17	1,91±0,07	0	2,01±0,15	1,39±0,10	1,25±0,17	1,19±0,07
19	1,13±0,06	0	1,49±0,09	1,25±0,11	1,21±0,08	1,37±0,11
21	1,35±0,08	0	1,67±0,10	1,68±0,15	1,79±0,09	1,95±0,05

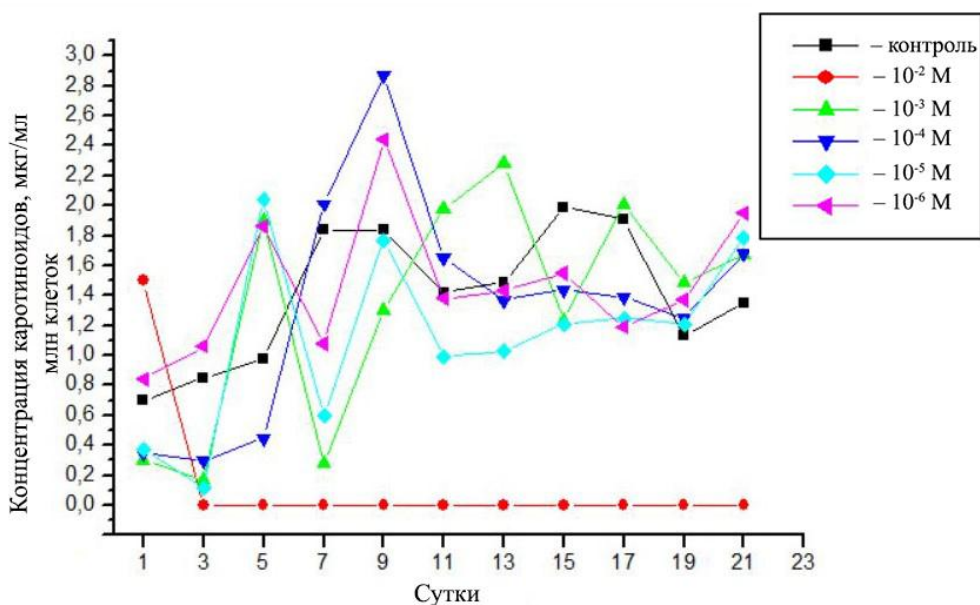


Рисунок 3.9 – Влияние сульфата хрома (III) на концентрацию каротиноидов (мкг/ мл млн клеток) *Chlorella vulgaris*

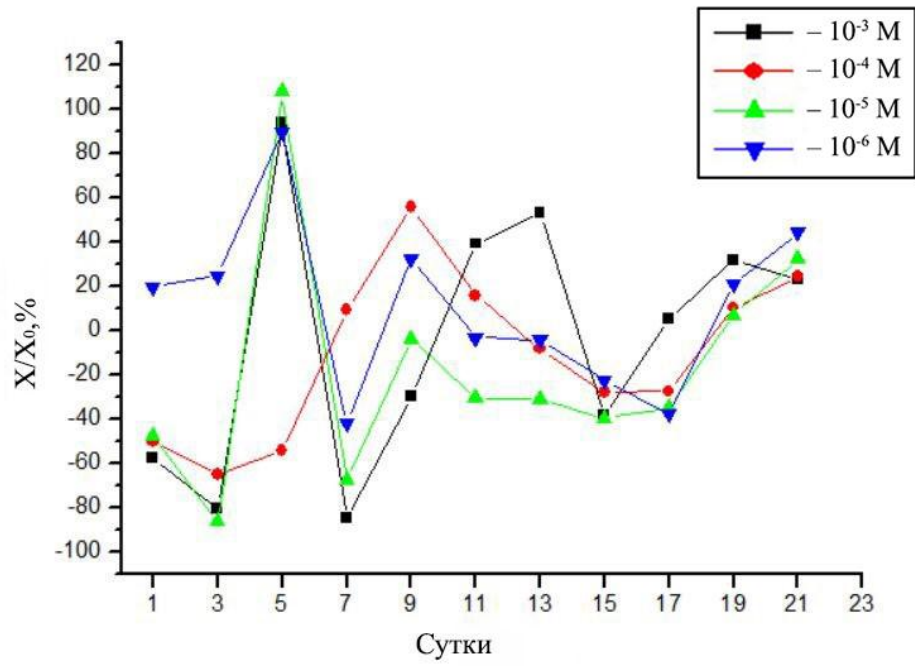


Рисунок 3.10 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) концентрации каротиноидов при добавление в среду сульфата хрома (III) в различных концентрациях

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований было выявлено следующее:

1. В варианте опыта с содержанием сульфата хрома (III) в среде 10^{-2} М наблюдалась гибель культуры уже на 3 сутки. Эффектор в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} М оказывал явно угнетающее влияние на рост биомассы по сравнению с контролем. Сульфат хрома (III) в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М хоть и показывали некоторые положительные тенденции динамики биомассы на определённых этапах исследования, но всё же уступили контролю. Таким образом, можно сделать вывод о том, что исследуемый эффектор не оказывает благоприятного влияния на рост биомассы культуры *Chlorella vulgaris*.

2. Сульфат хрома (III) не оказал также сколь-нибудь положительного влияния на накопление культурой внутриклеточного белка по сравнению с контролем, причём эффектор в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} М показал более отрицательную динамику.

3. Оценка влияния сульфата хрома (III) в различных концентрациях на накопление клетками микроводоросли хлорофилла *a* и *b* оказалась затруднительной ввиду колебательного характера полученных результатов.

4. Изменения концентрации каротиноидов при различном содержании эффектора, как и в случае с хлорофиллом *a* и *b*, носили колебательный характер, что также создаёт определённые трудности в интерпретации полученных результатов. Тем не менее, можно сделать вывод, что сульфат хрома (III) в концентрациях 10^{-3} - 10^{-5} М (не говоря уже о 10^{-2} М) негативно повлиял на накопление хлореллой каротиноидов, а также, что, судя по данным исследования, эффектор в концентрации 10^{-6} М оказал в целом благоприятное влияние на содержание каротиноидов в клетках культуры по сравнению с контролем, хотя это является не совсем однозначным результатом.

Требуются дополнительные исследования для внесения большей ясности в возникшие в результате работы вопросы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Burczyk, J. The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin / J. Burczyk, M. Hesse // *Plant Syst Evol.* – 1981. – V. 138. – P. 121-37.
2. Голлербаха, М.М Жизнь растений. Том 3. Водоросли. Лишайники / М.М. Голлербаха. – М.: Просвещение, 1977. – № 4. – С. 487.
3. ALGAE research and supply [Electronic resource]. – Mode of access: <https://algaeresearchsupply.com/products/algae-culture-chlorella-vulgaris>. – Date of access: 05.04.2020.
4. Safi, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review / C.Safi, B. Zebib, O. Merah, P.Y. Pontalier, C. Vacarcia // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2014. – V. 35. – P. 265-278.
5. Gerken, H. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production / H. Gerken, B.S. Donohoe, E.P. Knoshaug // *Planta.* – 2012. – V. 273, i. 1. – P. 234-56.
6. Atkinson Jr. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of ^{14}C -acetate, studied in synchronous cultures / Jr. Atkinson, B.E.S. Gunning, P.C.L. John // *Planta.* – 1972. – V. 107, i.1. – P. 32.
7. Hagen, C. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation / C. Hagen, S. Siegmund, W. Braune // *Eur J Phycol.* – 2002. – V. 37. – P. 217-26.
8. Романенко, В.Д Видоспецифические особенности роста зелёных водорослей при дополнительном углеродном питании. Сообщение 1. Скорость роста зелёных водорослей при максимальном насыщении среды CO_2 в открытой культивационной системе / В.Д. Романенко, Н.И. Кирипенко, И.Н. Коновец, Ю.Г. Крот // *Гибриобиологический журнал.* – 2010. – №1. – С. 62-74.
9. Bona, F. Semicontinuous nitrogen limitation as convenient operation strategy to maximize fatty acid production in *Neochloris oleoabundans* / F. Bona, A. Capuzzo, M. Franchino, M.E. Maffei // *Algal Res.* – 2014. – V. 5. – P. 1-6.
10. Microbe WIKI [Electronic resource]. – Mode of access: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Chlorella_vulgaris. – Date of access: 05.04.2020.
11. Panahi, Y. Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition / Y. Panahi, A.Y. Khosroushahi, A. Sahebkar, H.R. Heidari // *advanced pharmaceutical bulletin.* – 2019. – V. 9, i. 2. – P. 182-194.

12. Carvalho, A.P. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances / A.P. Carvalho, L.A. Meireles, F.X. Malcata // *Biotechnology Progress* – 2006. – V. 22, i. 6. – P. 1490-506.

13. Chen C.Y. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review / C.Y. Chen, K.L. Yeh, R. Aisyah, D.J. Lee, J.S. Chang // *Bioresour. Technol.* – 2011. – V. 102. – P. 71-81.

14. Benavente-Valdes, J.R. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species / J.R. Benavente-Valdes, C.Aguilar, J.C. Contreras-Esquivel, A. Mendez-Zavala, J. Montanez // *biotechnology reports.* – 2016. – V. 10. – P. 117-125.

15. Chia, M.A. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations / M.A. Chia, A.T. Lombardi, M.G. Melao, G.C. Parrish // *Aquat. Toxicol.* – 2013. – V. 128. – P.171-182.

16. Seyfabadi, J. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes / J. Seyfabadi, Z. Ramezanpou, Z.A. Khoeyi // *J. Appl. Phycol.* – 2011. – V. 23. – P. 721-726.

17. Yen, H.W. A two-stage cultivation process for the growth enhancement of *Chlorella vulgaris* / H.W. Yen, J.T. Chang // *Bioprocess and Biosystems Engineering.* – 2013. – V. 36. – P. 1797-1801.

18. Министерство сельского хозяйства алтайского края официальный сайт [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.altagro22.ru/management/docs/?ELEMENT_ID=50946. – Дата доступа: 06.04.2020.

19. Муханов, Н.Б. Возможности использования биомассы хлореллы в кормлении сельскохозяйственных животных / Н. Б. Муханов, Е. Ж. Шорабаев, Ж. К. Дастанова // *Молодой ученый.* – 2015. – № 7. – С. 21-22.

20. Мельников, С. Использование хлореллы в кормлении сельскохозяйственных животных / С. Мельников, Е. Мананкина // *Наука и инновации.* – 2010. – № 8. – 40-43.

21. Хлорелла.рф [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.xn--80ajrbapo1b.xn--plai/chlorella-v-ribovodstve-menu.html>. – Дата доступа: 07.04.2020.

22. Shim, J.Y. Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats / J.Y. Shim, H.S. Shin, J.G. Han, H.S. Park, B.L. Lim, K.W. Chung // *J MedFood.* – 2008. – V. 11. – P. 479-85.

23. Sigel, A. Metallothioneins and Related Chelators / A. Sigel, H. Sigel // Cambridge: Royal Society of Chemistry. – 2009. – V. 5. – P. 34-37.

24. Yun, H. Protective effect of *Chlorella vulgaris* against lead-induced oxidative stress in rat brains / H. Yun, I. Kim, S-H. Kwon, J-S. Kang, A-S. Om // Journal of Health Sciences. – 2011. – V. 57. – P. 245-54.
25. Shaaban, M. Green microalgae water extracts as foliar feeding to wheatplants / M. Shaaban // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2001. – V. 4. – P. 628-32.
26. Хлорелла.рф [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.xn--80ajrbapo1b.xn--p1ai/chlorella-v-rastenievodstve-menu.html>. – Дата доступа: 07.04.2020.
27. Keffer, J.E. Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in aphotobioreactor / J.E. Keffer, G.T. Kleinheinz // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2002. – V. 29. – P. 275-80.
28. Brennan, L. Biofuels from microalgae –a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products / L. Brennan, P. Owende // Renew Sustain Energy Rev. – 2010. – V. 14. – P. 557-77.
29. Wang, K. Fast pyrolysis of microalgae remnants in a fluidized bed reactor for bio-oil and biocharproduction / K. Wang, R.C. Brown, S. Homsy, L. Martinez, S.S. Sidhu // Bioresour Technol. – 2013. – V. 127. – P. 494-9.
30. Hirano, A. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation / A. Hirano, R. Ueda, S. Hirayama, Y. Ogushi // Energy. – 1997. – V. 22. – P. 137-42.
31. Беспалов В. Г. Современный взгляд на биологически активные добавки к пище и их использование в лечебно-профилактических целях в клинической медицине / В. Г. Беспалов, В. Б. Некрасова, А. К. Иорданишвили // Медицина. XXI век. – 2007. – № 8. – С. 86-94.
32. Hanan, M.K. Comparative effects of autotrophic and heterotrophic growth on some vitamins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, amino acids and protein profile of *Chlorella vulgaris* / M.K. Hanan // Beijerinck. Afr J Biotechnol. – 2011. – V. 10. – P. 13514-9.
33. Stephenson, A.L. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks / A.L. Stephenson, J.S. Dennis, C.J. Howe, S.A. Scott, A.G. Smith // Biofuels. – 2009. – V. 1. – P. 47-58.
34. Chen, W. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae / W. Chen, M. Sommerfeld, Q. Hu // Bioresour Technol. – 2011. – V. 102. – P. 135-41.
35. Liu, J. Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects / J. Liu, F. Chen // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2014. – V. 1. – P. 35.

36. Музафаров, А.М. Культивирование и применение микроводорослей / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. –Т.: Фан УзССР, 1984. –136 с.
37. Ахметов, Л.И. Токсичность никеля для тионовых бактерий / Л.И. Ахметов, А.Г. Быков, М.Б. Вайнштейн, Т.З. Есикова, А.Е. Филонов, Л.Н. Крылова, С. Мортазави // Известия Тульского государственного университета Естественные науки. – 2010. – № 1. – С. 167-174.
38. Багаева, Т.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжёлых металлов: учеб.-метод. пособие / Т.В. Багаева, Н.Э. Ионова, Г.В. Надеева. – К.: Казанский университет, 2013. – 56 с.
39. Климова, О.В. Сорбция ионов хрома (VI) углеродным сорбентом / О.В. Климова // Вестник ИргТУ. – 2012. – № 11. – С. 155-159.
40. Tebo, V.M. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV), and Fe (III) as electron acceptors / V.M. Tebo, A.Y. Obraztova // FEMS Microbiol Lett. – 1998. – V. 162, i. 1. – P. 193-198.
41. Belchik, S.M. Extracellular reduction of hexavalent chromium by cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1 / S.M. Belchik, D.W. Kennedy, A.C. Dohnalkova, Y. Wang, P.C. Sevinc, H. Wu, Y. Lin, H.P. Lu, J.K. Fredrickson, L. Shi // Appl Environ Microbiol. – 2011. – V. 77, i.12. – P. 4035-4041.
42. Park, C.H. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase / C.H. Park, M. Keyhan, B. Wielinga, S. Fendorf, A. Matin // Appl Environ Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 1788-1795.
43. Flemming, H.C. Sorption sites in biofilms / H.C. Flemming // Water Sci. Tech. – 1995. – V. 32. – P. 27-33.
44. Beveridge, T.J. Metal fixation by bacterial cell walls / T.J. Beveridge, W.S. Fyfe // Can. J. Earth Sci. – 1985. – V. 22, i. 12. – P. 1893-1898.
45. Marques, R.X. Uranium accumulation by *Pseudomonas* sp. EPS-5028 / R.X. Marques, D.M. Simon-Pujol, M.C. Fuste, F. Congregado // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1991. – V. 35. – P. 406-410.
46. Christensen, B.E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms / B.E. Christensen // J. Biotechnol. – 1989. – V. 10. – P. 181-202.
47. Myers, C.R. Chromium (VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1 / C.R. Myers, B.P. Carstens, W.E. Antholine, J.M. Myers // Appl Environ Microbiol. – 2000. – V. 88, i. 1. – P. 98-106.
48. Robins, K.J. *Escherichia coli* NemaA is an efficient chromate reductase that can be biologically immobilized to provide a cell free system for remediation of hexavalent chromium / K.J. Robins, D.O. Hooks, B.H. Rehm, D.F. Ackerley // PLoS One. – 2013. – V. 8, i. 3. – P. 1-8.

49. Кшеминская, Г.П. Хромат-резистентные мутанты дрожжей *Pichia Guilliermondii*: получение и свойства / Г.П. Кшеминская, Г.З. Зайда, М.Ф. Иваш, М.В. Гончар // Микробиология. – 2011. – Т. 30, № 3. – С. 1-12.
50. Park, D. Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger* / D. Park, Y.S. Yun, J.H. Jo, J.M. Park // *Water Res.* – 2005. – V. 39, i. 4. – P. 533-540.
51. Бессонова, В.П. Накопичення хрому в рослинах та його токсичність / В.П. Бессонова, О.Є. Іванченко // Питання біоіндикації та екології. – 2011. – № 2. – С. 35-52.
52. Щеглов, А.Т. Влияние хрома на некоторые физиологические показатели у кукурузы / А.Т. Щеглов // Применение удобрений, микроэлементов и регуляторов роста в сельском хозяйстве: науч. труды Ставропольского сельскохозяйственного ин-та. – 1981. – № 44, Т. 1. – С. 35-40.
53. Алексеев, Ю.В Тяжёлые металлы в почве и растениях / Ю.В. Алексеев – Л.: Агропромиздат, 1987. – 142 с.
54. Sangwan, P. Effect of Chromium (VI) Toxicity on Enzymes of Nitrogen Metabolism in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) / P. Sangwan, V. Kumar, U.N. Joshi // *Enzyme Res.* – 2014. – V. 21. – P. 1-9.
55. Ноздрюхина, Л.Р Нарушение микроэлементного обмена и пути его коррекции / Л.Р. Ноздрюхина, Н.И. Гринкевич. – М.: Наука, 1980. – 280 с.
56. Гудман, М. Органические молекулы в действии / М. Гудман, Ф. Морхауз. – М.: Мир, 1977. – 336 с.
57. Аблаев, Н.Р. Молекулярные механизмы развития сахарного диабета при дефиците витамина Д и хрома (обзор современной литературы) / Н.Р. Аблаев, Д.Ж. Батырбаева // Вестник КАЗНМУ. – 2015. – № 3. – С. 186-197.
58. Реутин, С.В. Роль хрома в организме человека / С.В. Реутин // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2009. - № 4. – С. 50-55.
59. Steele, N.C. Biological activity of glucose tolerance factor in swine / N.C. Steele, T.G. Althen, L.T. Frobish // *Journal of animal science.* – 1977. – V. 45, i. 6. – P. 1341-1345.
60. GT&F® MILK [Electronic resource]. – Mode of access: <http://gtf.com.my/web/benefits/diabetes/>. – Date of access: 27.04.2020.
61. Tuman, R.W. Metabolic effects of the glucose tolerance factor (GTF) in normal and genetically diabetic mice / R.W. Tuman, R.J. Doisy // *Diabetes.* – 1977. – V. 26, i. 9. – P. 820-826.
62. Lewicki, S. The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment / S. Lewicki, R. Zdanowski, M. Krzyżowska, A.

Lewicka, B. Dębski, M. Niemcewicz, M. Goniewicz // *Ann Agric Environ Med.* – 2014. – V. 21, i. 2. – P. 331-336.

63. Aggett, P.J. Physiology and metabolism of essential trace elements: an outline / P.J. Aggett // *Clin Endocrinol Metab.* – 1985. – V.14. – P. 513-543.

64. Stearns, D.M. Is chromium a trace essential metal / D.M. Stearns // *BioFactors* – 2000. – V. 11, i. 3. – P. 149-162.

65. Кокорев, В.А. Влияние хрома на обмен веществ и молочную продуктивность коров / В.А. Кокорев, А.Б. Межевов, Н.И. Гибалкина, А.Н. Федаев // *Животноводство и ветеринарная медицина.* – 2015. – №18. – С. 1-14.

66. Изтлеуов, М.К Патогенез нарушений гомеостаза, вызванных избыточным поступлением хрома в организм, и пути их коррекции / М.К. Изтлеуов. – М.: Российский университет дружбы народов, 2004. – 361 с.

67. Valko, M. Metals, toxicity, oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T.D. Cronin // *Life Chem Rep.* – 2005. – V. 12, i. 10. – P. 1177-1180.

68. Перельман, А.И Геохимия / Перельман А.И. – М.: Высшая школа, 1989. – 582 с.

69. Тимошинова, С.В. Влияние хронической интоксикации хромом и бензолом на антиоксидантный статус крыс / С.В. Тимошинова, Н.В. Шарапова, И.В. Михайлова, С.И. Красикова, В.М. Боев, В.И. Смолягин // *Вестник ОГУ.* – 2004. – № 10. – С. 132-133.

70. De Flora, S. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity / S. De Flora, K.E. Wetterhahn // *Life Chem Rep.* – 1989. – V. 5. – P. 168-244.

71. Norseth, T. The carcinogenicity of chromium / T. Norseth // *Environ Health Perspect.* – 1981. – V. 40. – P. 121-130.

72. Lloid, D.R. Comparison of the formation of 8-hydroxi-2-deoxyguanosione and single- and doubl-strand breaks in DNA mediated by Fenton reaction / D.R. Lloid, P.L. Carmichael, D.N. Phillips // *Chem Res Toxicol.* – 1998. – V. 11. – P. 420-427.

73. Levina, A. Binding of chromium (VI) to histones: implications for chromium (VI)-induced genotoxicity / A. Levina, H.H. Harris, P.A. Lay // *J Biol Inorg Chem.* – 2006. – V. 11, i. 2. – P. 225-234.

74. Takeuchi-Yorimoto, A. MicroRNA-21 is associated with fibrosis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis and serves as a plasma biomarker for fibrotic liver disease / A. Takeuchi-Yorimoto, Y. Yamaura, M. Kanki // *Toxicol Lett.* – 2016. – V. 258. – P. 159-167.

75. Zhang, H. Profiling of differentially expressed microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / H. Zhang, S. Liu, T. Dong // *Sci Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 1-9.

76. Pratheeshkumar, P. Quercetin inhibits Cr (VI)-induced malignant cell transformation by targeting miR-21 PDCD4 signaling pathway / P. Pratheeshkumar, Y.O. Son, S.P. Divya // *Oncotarget.* – 2016. – V. 8, i. 32. – P. 52118-52131.

77. Fang, Z. Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro / Z. Fang, M. Zhao, H. Zhen, L. Chen, P. Shi, Z. Huang // *PloS One.* – 2014. – V. 9, i. 8. – P. 94.

78. Wang, Y. Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update / Y. Wang, H. Su, Y. Gu, X. Song, J. Zhao // *Onco Targets Ther.* – 2017. – V. 10. – P. 4065-4079.

79. Wise, J.P. Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung and testes fibroblasts / J.P. Wise, S.S. Wise, S. Kraus // *Mutat Res.* – 2008. – V. 650, i. 1. – P. 30-38.

80. Канцерова, Н.П. Влияние ионов тяжелых металлов на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы *Mytilus edulis* L. в экспериментах in vitro и in vivo / Н.П. Канцерова, Л.А. Лысенко, Н.Н. Немова, В.В. Осташкова // Материалы XXVIII межд. конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». – 2009. – С. 257-261.

81. Shukor, M.Y. An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease / M.Y. Shukor, N. Masdor, N.A. Baharom, J.A. Jamal, M.P. Abdullah, N.A. Shamaan, M.A. Syed // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2008. – V. 144, i. 3. – P. 283-291.

82. Sivalingam, P.M. Enzymatic and cellular level effects of chromium / P.M. Sivalingam // *Toxicological & Environmental Chemistry.* – 1989. – V. 19, i. 4. – P. 119-123.

83. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В.В. Упитис. – Р.: Зинатне, 1983. – 240 с.

84. Meisch, H-U. Influence of Tri- and Hexavalent Chromium on two *Chlorella* Strains / H-U. Meisch, I. Schmitt-Beckmann // *research gate.* – 1979. – V. 94, i. 3. – P. 231-239.

85. Романенко В.И. Влияние ионов на жизнедеятельность бактерий и водорослей / В.И. Романенко, И.А. Величко // *Биология внутренних вод.* – 1974. – № 21. – С.12-15.

86. Кузнецов Е.Д. Железо как фактор, лимитирующий рост хлореллы на среде Тамия / Е.Д. Кузнецов, М.Г. Владимирова // *Физиология растений.* – 1964. – №. 4. – Т.11. – С. 615-619.

87. Yen, H-W. The use of autotrophic *Chlorella vulgaris* in chromium (VI) reduction under different reduction conditions / H-W. Yen, P-W. Chen, C-Y. Hsu, L. Lee // Elsevier. – 2017. – V. 74. – P. 1-6.

88. Сиренко, Л.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л.А. Сиренко, А.И. Сакевич – М.: Наукова Думка, 1975. – 248 с.

89. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): Учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – К: Казанский университет, 2012. – 3 с.