

**ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКА КУЛЬТУРОЙ *CHLORELLA VULGARIS*
В ПРИСУТСТВИИ $Fe_2(SO_4)_3$ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

И.А. Ильючик, А.А. Шульган, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет, Пинск, irina.iliuchik@mail.ru

Микроводоросли, благодаря своему составу, условиям культивирования, стали неотъемлемой частью мировых аквафермерства, пищевой промышленности и кормопроизводства. Особое внимание заслуживают белки хлореллы (около 60% от сухой биомассы), содержащие все незаменимые аминокислоты. По аминокислотному индексу (ЕААІ), используемому для оценки качества белка, белок хлореллы (ЕААІ, 0,92) превосходит белок сои (ЕААІ, 0,66) [1].

В настоящее время актуально изучение влияния различных эффекторов на процессы метаболизма водорослей в связи с необходимостью разработки путей интенсификации их продуктивно-

сти. Механизмы влияния микроэлементов на физиолого-биохимические процессы водорослей и особенности усвоения ими микроэлементов остаются изученными далеко не до конца. Ранее нами рассматривались воздействия добавления в питательную среду марганца, никеля, хрома на накопление биомассы и белка *Chlorella vulgaris* [2–4].

Железо – один из самых распространенных металлов земной коры (4,7% по массе), также является одним из распространенных элементов в природных водах, где его концентрация составляет 0,01–26,0 мг/л [5]. Железо как микроэлемент поддерживает жизнедеятельность микроводорослей, играет важную роль в различных энзиматических процессах и транспортных системах (например, дыхании, синтезе ДНК, биосинтезе хлорофилла, фотосинтезе). Оно входит в состав ряда энзимов, благодаря способности принимать и отдавать электроны [6]. Вместе с тем, известно, что при высокой концентрации в среде железа может происходить гибель микроводорослей, а при его дефиците – угнетение их роста и развития [7].

Цель работы – раскрыть влияние $Fe_2(SO_4)_3$ на процесс накопления внутриклеточного белка культурой *Chlorella vulgaris*, а также при культивировании водоросли без содержания железа в питательной среде.

Материалы и методы. Исследования выполнены на альгологически чистой культуре *Ch. vulgaris* биологического штамма С 111 IBCE С-19 из коллекции ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Микроводоросль выращивали на среде Тамия, содержание ионов железа в которой составляло 0,01 мМ [8] (контроль), в прозрачных сосудах объемом 0,1 л при температуре 25 ± 1 °С, освещенности на поверхности сосуда 5000 лк, продолжительности световой и темновой фазы – 12 ч / 12 ч. В экспериментальные варианты питательных сред добавляли сульфат железа (III) в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-8} М. Один экспериментальный вариант среды солей железа не содержал.

На 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21-е сутки культивирования с помощью камеры Горяева определяли уровень биомассы, отбирали аликвоты культуры по $10 \pm 0,36$ млн клеток, определяли концентрацию внутриклеточного белка колориметрическим методом [8].

Все исследования выполнены трехкратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли по t-коэффициенту Стьюдента для уровня значимости $P \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При росте на среде Тамия (контроль) в период 1–21 сутки роста микроводоросли наблюдалось увеличение биомассы, достигавшее максимума на 21-е сутки: прирост составил 145% в сравнении с 1-ми сутками (таблица 1). Накопление внутриклеточного белка *Ch. vulgaris* так же происходило на протяжении всего периода культивирования, достигая максимума на 19-е сутки, что на 86% превышало уровень белка на начало культивирования (таблица 2, рисунок 1).

Таблица 1. – Динамика биомассы культуры хлореллы (млн клеток/мл, $M \pm m$) при добавлении $Fe_2(SO_4)_3$ в питательную среду ($n = 3$)

Время роста, сутки	Концентрация $Fe_2(SO_4)_3$, М						Среда, не содержащая железа
	Контроль (среда Тамия)	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
1	$3,3 \pm 0,06$	$3,2 \pm 0,06$	$3,3 \pm 0,06$	$3,3 \pm 0,02^*$	$3,3 \pm 0,05$	$3,4 \pm 0,04^*$	$3,4 \pm 0,05$
3	$3,7 \pm 0,11$	$2,4 \pm 0,05^*$	$2,7 \pm 0,03^*$	$3,5 \pm 0,08$	$3,6 \pm 0,04$	$3,8 \pm 0,03$	$3,7 \pm 0,03$
5	$4,0 \pm 0,07$	$1,8 \pm 0,08^*$	$2,1 \pm 0,05^*$	$3,9 \pm 0,03$	$4,0 \pm 0,07$	$4,0 \pm 0,07$	$3,9 \pm 0,06$
7	$4,4 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,05^*$	$2,4 \pm 0,07^*$	$4,3 \pm 0,06$	$4,3 \pm 0,02$	$4,4 \pm 0,04^*$	$4,0 \pm 0,07$
9	$5,0 \pm 0,05$	$2,9 \pm 0,05^*$	$3,2 \pm 0,09^*$	$4,9 \pm 0,04$	$4,9 \pm 0,09$	$5,0 \pm 0,03$	$4,4 \pm 0,10$
11	$5,3 \pm 0,08$	$3,4 \pm 0,09^*$	$3,7 \pm 0,04^*$	$5,1 \pm 0,07$	$5,2 \pm 0,10$	$5,8 \pm 0,02$	$4,7 \pm 0,09$
13	$5,8 \pm 0,03$	$3,8 \pm 0,04^*$	$4,1 \pm 0,03^*$	$5,4 \pm 0,08$	$5,7 \pm 0,30$	$6,2 \pm 0,05$	$4,4 \pm 0,05^*$
15	$6,3 \pm 0,06$	$4,1 \pm 0,03^*$	$4,4 \pm 0,04^*$	$5,9 \pm 0,05$	$6,3 \pm 0,04$	$6,5 \pm 0,05$	$4,2 \pm 0,04^*$
17	$6,8 \pm 0,09$	$3,7 \pm 0,04^*$	$4,3 \pm 0,04^*$	$6,5 \pm 0,06$	$6,6 \pm 0,07$	$7,0 \pm 0,03$	$3,9 \pm 0,07^*$
19	$7,4 \pm 0,08$	$3,3 \pm 0,04^*$	$4,0 \pm 0,02^*$	$6,8 \pm 0,07$	$7,2 \pm 0,06$	$7,8 \pm 0,07$	$3,9 \pm 0,08^*$
21	$8,1 \pm 0,04$	$3,1 \pm 0,05^*$	$3,7 \pm 0,07^*$	$7,1 \pm 0,05$	$7,7 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,06$	$3,8 \pm 0,04^*$

* – здесь и далее: изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Исключение из питательной среды ионов железа не повлекло полной гибели культуры (таблица 1), но отрицательно сказалось на накоплении белка хлореллой: на 21-е сутки его концентрация снижалась на 22% в сравнении с 1-ми сутками. При этом, однако, до 9-х суток роста культуры наблюдалось увеличение содержания белка в клетках, а в период 5–7 сутки его концентрация на 20–30% превышала уровень белка в начале культивирования (таблица 2, рисунок 2).

Добавление в питательную среду $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрации 10^{-4} – 10^{-7} М на протяжении всего периода культивирования, в целом, отрицательно повлияло на накопление внутриклеточного белка *Ch. vulgaris* (таблица 2).

В максимальных использованных концентрациях – 10^{-4} М и 10^{-5} М соль железа в период 1–7 сутки вызвала угнетение роста хлореллы. Урожай биомассы в сравнении с началом культивирования падал на 33–44%, а в сравнении с контрольным вариантом – в 1,8–2,0 раза. В период 3–21 сутки урожай биомассы культуры падал на 27–61%, это сопровождалось угнетением накопления белка на 25–62% в сравнении с контролем и на 7–34% в сравнении с началом культивирования (таблица 2, рисунки 1, 2).

Таблица 2. – Динамика концентрации внутриклеточного белка (мкг/млн клеток, $M \pm m$) культуры хлореллы при добавлении $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ в питательную среду ($n = 3$)

Время роста, сутки	Концентрация $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, М						Среда не содержащая железа
	Контроль (среда Тамия)	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
1	44,3 ± 0,06	40,0 ± 0,02	41,5 ± 0,04	42,5 ± 0,07	46,3 ± 0,05	48,9 ± 0,07	50,1 ± 0,08*
3	51,2 ± 0,02	32,0 ± 0,03*	38,4 ± 0,03*	44,6 ± 0,08	49,3 ± 0,04	54,1 ± 0,03	53,9 ± 0,09
5	53,6 ± 0,03	25,9 ± 0,07*	29,8 ± 0,04*	48,0 ± 0,03	52,2 ± 0,02	55,4 ± 0,09	60,1 ± 0,06*
7	51,5 ± 0,04	22,6 ± 0,06*	26,1 ± 0,09*	42,4 ± 0,08*	53,8 ± 0,09	60,3 ± 0,06*	65,3 ± 0,09*
9	55,1 ± 0,07	26,6 ± 0,07*	32,1 ± 0,08*	47,1 ± 0,06*	52,1 ± 0,06	58,3 ± 0,06	56,1 ± 0,04
11	61,3 ± 0,08	32,9 ± 0,09*	28,1 ± 0,01*	52,0 ± 0,02*	57,8 ± 0,04	59,4 ± 0,01	50,2 ± 0,08*
13	58,5 ± 0,04	35,9 ± 0,02*	37,3 ± 0,02*	56,3 ± 0,05	61,2 ± 0,04	63,1 ± 0,07	53,3 ± 0,08
15	65,1 ± 0,05	36,1 ± 0,03*	36,6 ± 0,03*	57,4 ± 0,07	62,6 ± 0,08*	66,7 ± 0,09	45,9 ± 0,07*
17	76,4 ± 0,03	35,7 ± 0,01*	34,5 ± 0,04*	60,1 ± 0,05*	72,8 ± 0,06	79,0 ± 0,04	40,9 ± 0,04*
19	82,3 ± 0,05	31,0 ± 0,05*	31,6 ± 0,05*	61,3 ± 0,03*	67,6 ± 0,02*	68,4 ± 0,03*	43,6 ± 0,06*
21	69,6 ± 0,04	28,0 ± 0,07*	28,5 ± 0,06*	58,4 ± 0,05*	59,1 ± 0,06*	71,3 ± 0,09	39,1 ± 0,09*

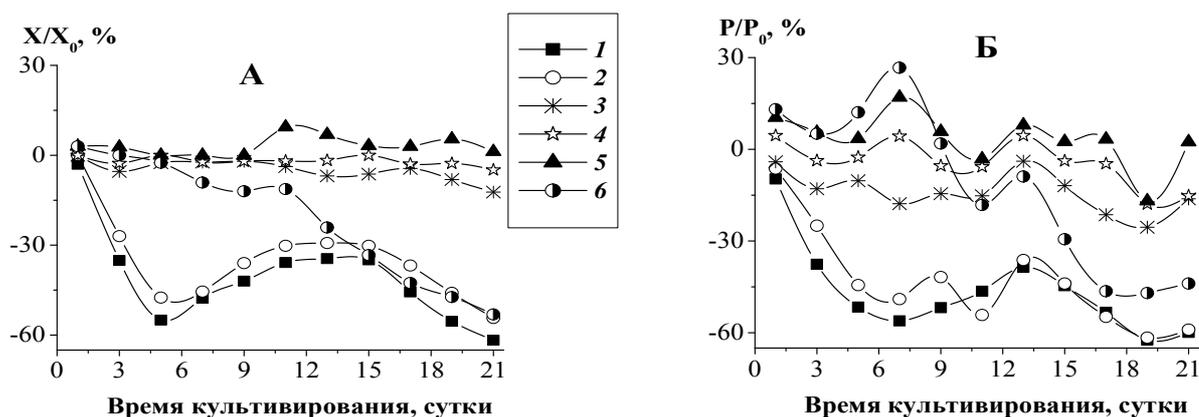


Рисунок 1. – Изменения (% к контролю, принятым за 100%) накопления биомассы (А) и белка (Б) культурой *Chlorella vulgaris* при добавлении в питательную среду $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, М: 1 – 10^{-4} ; 2 – 10^{-5} ; 3 – 10^{-6} ; 4 – 10^{-7} ; 5 – 10^{-8} ; 6 – среда Тамия без железа

Добавление в питательную среду сульфата железа в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-7} М существенно не отразилось на росте культуры (сдвиги урожая биомассы не превышали 12%), но также вызвало угнетение накопления белка, однако, в меньшей степени. В сравнении с контролем к концу культивирования уменьшение его концентрации составило 15–26%.

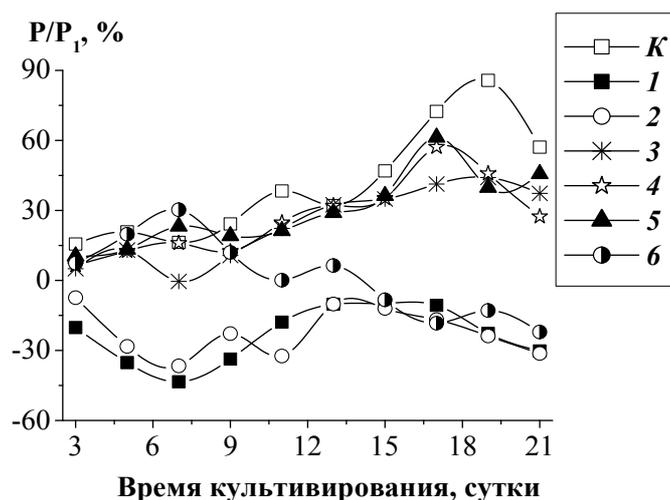


Рисунок 2. – Изменения (% к 1-м суткам культивирования, принятым за 100%) накопления внутриклеточного белка культурой *Chlorella vulgaris* при добавлении в питательную среду $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, М: К – контроль (среда Тамия); 1 – 10^{-4} ; 2 – 10^{-5} ; 3 – 10^{-6} ; 4 – 10^{-7} ; 5 – 10^{-8} ; 6 – среда Тамия без железа

В сравнении же с началом культивирования выявлен даже рост уровня внутриклеточного белка на протяжении всего периода культивирования с достижением максимума в период 17–21 сутки, что на 27–57% превысило его начальный уровень (таблица 2, рисунки 1, 2).

В минимальной концентрации соли железа (10^{-8} М) уровень биомассы несколько возрастал в сравнении с контролем, но без статистически значимых сдвигов. Концентрация белка в сравнении с контролем в этом случае также изменялась незначительно. Лишь на 7-е сутки наблюдалось увеличение его концентрации на 17%, а на 19-е сутки – уменьшение на 17%. В сравнении с началом культивирования в период 3–21 сутки роста микроводоросли концентрация белка возросла на 10–61% (таблица 2, рисунки 1, 2).

Заключение. Результаты проведенных исследований показали, что исключение из состава питательной среды ионов железа не вызвало гибели культуры хлореллы, а уровень внутриклеточного белка снижался, начиная лишь с 11-х суток. В максимальных концентрациях – 10^{-4} и 10^{-5} М $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ вызвал угнетение роста культуры и падение концентрации внутриклеточного белка. А в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} М эффектор не вызвал угнетение роста *Ch. vulgaris* и не оказал существенного снижения белка в сравнении с контролем.

Список использованных источников

1. Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health / Т. Bito, Е. Okumura, М. Fujishima, F. Watanabe // *Nutrients*. 2020. № 12(9). doi: 10.3390/nu12092524. – Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825362/>. – Дата доступа: 06.11.2023.
2. Влияние сульфата никеля на урожай биомассы и содержание белка в клетках *Chlorella vulgaris* в динамике роста культуры / И.А. Ильючик [и др.] // *Вестн. Полес. дзярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук.* – 2020. – № 2. – С. 32–39.
3. Ильючик, И.А. Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде источника азота – KNO_3 / И.А. Ильючик, Л.О. Захаревич, В.Н. Никандров // *Актуальные вопросы биологической физики и химии.* – 2022. – Том 7, № 2. – С. 343–352.
4. Ильючик, И.А. Влияние хлорида марганца на физиолого-биохимическое состояние клеток *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Биотехнология: достижения и перспективы развития: сб. материалов V международной науч.-практ. конф.*, Пинск, 25–26 ноября 2021 г. – Пинск: ПолесГУ, 2021. – С. 74–79.
5. Бондарева, Д.Г. Избыточное содержание железа в питьевых водах ЕАО как результат воздействия природных и антропогенных факторов / Д.Г. Бондарева // *Вестник ПГУ им. Шолом-Алейхема.* – 2012. – №2. – С. 5–11.
6. Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate / Н. Ermis, U. Guven-Gulhan, Т. Cakir, М. Altinbas // *Scientific*

Reports. 2020. № 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-60622-1. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32103096/>. – Дата доступа: 04.11.2023.

7. Saxena, P. Toxicity evaluation of iron oxide nanoparticles and accumulation by microalgae *Coelastrella terrestris* / P. Saxena, V. Sangela // Environmental science and pollution research international. – 2020. – Vol. 27, № 16. – P. 19650–19660.

8. Ильючик, И.А. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*) / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с.