

УДК 576.32/36:582.263:546.55/59: 581.174

**И.А. ИЛЮЧИК**, канд. биол. наук, доцент,  
доцент кафедры биохимии и биоинформатики<sup>1</sup>

**Р.Н. СЕГЕН**  
магистр<sup>1</sup>

**В.Н. НИКАНДРОВ**, д-р биол. наук, профессор,  
профессор кафедры биотехнологии<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 26 сентября 2024 г.

## ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТА МЕДИ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ *CHLORELLA VULGARIS*

При добавлении в среду Тамия  $\text{CuSO}_4$  в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М культура *Chlorella vulgaris* сохраняла жизнеспособность на протяжении 21 дня. Однако при всех концентрациях сульфата меди в сравнении с контролем отмечено угнетение роста биомассы, особенно после 9-х суток. Максимальный эффект – уменьшение на 34–53% – выявлен при концентрации  $\text{Cu}^{2+}$   $10^{-4}$  М. Изменения концентрации внутриклеточного белка во всех вариантах питательной среды были близки динамике биомассы. При этом добавление в питательную среду  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях  $10^{-8}$  и  $10^{-7}$  М стимулировало накопление внутриклеточного белка по отношению к контролю до 11-х суток, а на 7-е сутки эти варианты питательной среды превосходили контроль на 20%. Внесение в питательную среду  $\text{CuSO}_4$  сопровождалось снижением уровня накопления клетками хлореллы хлорофилла **a** тем более выраженным, чем выше концентрация эффектора в питательной среде. Изменение уровня в клетках хлорофилла **b** на протяжении всего периода наблюдений было менее выраженными в сравнении с таковым хлорофилла **a**. В динамике роста культуры хлореллы в ее клетках нарастал уровень каротиноидов, особенно выражено при концентрации  $\text{CuSO}_4$   $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  М: уровень пигментов на 15–17-е сутки возрос в 2,3–2,7 раза в сравнении с началом культивирования.

**Ключевые слова:** культура хлореллы, сульфат меди, уровень биомассы, внутриклеточный белок, хлорофиллы, каротиноиды.

**ILYUCHYK I.A.**, PhD in Biol. Sc., Associate Professor,  
Associate Professor of the Department of Biochemistry and Bioinformatics<sup>1</sup>

**SEGEN R.N.**, Master of Sci.<sup>1</sup>

**NIKANDROV V.N.**, Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor,  
Professor of the Department of Biotechnology<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

## EFFECT OF COPPER SULPHATE ON THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STATE OF CELLS OF *CHLORELLA VULGARIS*

When adding  $\text{CuSO}_4$  to the Tamiya medium in the concentration range of  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M, the *Chlorella vulgaris* culture retained its viability for 21 days. However, at all concentrations of copper sulfate, in comparison with the control, inhibition of biomass growth was noted, especially after the 9th day. The maximum effect - a decrease of 34–53% - was revealed at a  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of  $10^{-4}$  M. Changes in the concentration of intracellular protein in all variants of the nutrient medium were close to the biomass dynamics. At the same time, adding  $\text{CuSO}_4$  to the nutrient medium in concentrations of  $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M

*stimulated the accumulation of intracellular protein in relation to the control up to the 11th day, and on the 7th day these variants of the nutrient medium exceeded the control by 20%. The introduction of  $\text{CuSO}_4$  into the nutrient medium was accompanied by a decrease in the level of chlorophyll *a* accumulation by chlorella cells, and the higher the concentration of the effector in the nutrient medium, the more pronounced it was. Changes in the level of chlorophyll *b* in cells throughout the observation period were less pronounced compared to those of chlorophyll *a*. In the dynamics of chlorella culture growth, the level of carotenoids in its cells increased, especially pronounced at a  $\text{CuSO}_4$  concentration of  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M: the level of pigments on the 15th–17th day increased by 2.3–2.7 times compared to the beginning of cultivation.*

**Keywords:** *chlorella culture, copper sulfate, biomass level, intracellular protein, chlorophylls, carotenoids.*

**Введение.** Зеленая одноклеточная водоросль хлорелла обыкновенная (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) уже более 30 лет используется в промышленной биотехнологии для получения биомассы и ряда биологически активных соединений. Основные промышленные производства хлореллы находятся в США, Китае, Индии, Японии, Германии, Австралии, Израиле и Тайване. Ее производство уже достигло более двух тысяч тонн сухой массы в год. Коммерческой наработкой биомассы водорослей занимаются такие компании, как *Royal, Dutch Shell* (Гавайские острова), *Algae BioFuels* (США, Алабама), *Aquaflow Bionomic Corporation* (Новая Зеландия), *Mitsubishi* (Япония), *Agro Hayat LLC* (Турция) и ряд других. В Европе масштабным производителем биомассы микроводорослей является биотехнологическая компания *Ingrepro B.V.* (Нидерланды). Особенно интенсивными потребителями водорослей на душу населения являются Республика Корея, Китай и Япония [1, 2].

Суспензия хлореллы с большим успехом применяется в качестве подкормки при разведении и выращивании промысловых видов рыб, для очистки сточных вод от различного рода загрязнений, для альголизации водоемов и для предотвращения бурного «цветения» в них цианобактерий, а также для полива и обработки растений против грибковых заболеваний. Биомассу водоросли используют и животноводстве для откорма животных, повышения молочной продуктивности, улучшения репродуктивной способности, жизнестойкости и жизнеспособности молодняка, повышения яйценоскости, улучшения состояния внутренних органов и товарного качества цыплят-бройлеров и т.д. В послед-

нее время *Ch. vulgaris* рассматривают и в качестве перспективного источника биоэнергии [3]. Кроме того, в США, странах Востока и Западной Европы хлореллу начали использовать в качестве пищевой добавки. Это обусловлено тем, что продуцируемые ею компоненты обладают потенциальной терапевтической активностью – антиоксидантной, антимикробной, противовоспалительной, противораковой, антигипергликемической [4–6].

Сухая биомасса хлореллы содержит более 55% высококачественного белка и все незаменимые аминокислоты, до 25% углеводов, до 12% жиров и 8% минеральных веществ, включая железо, йод, медь, магний, марганец, молибден, селен, цинк и другие. Около 80% всех жирных кислот микроводоросли приходится на ненасыщенные, являющиеся предшественниками простагландинов. Вместе с тем, концентрация нуклеиновых кислот в хлорелле не превышает 4–5% [7–9].

Пигментный состав хлоропластов микроводоросли представлен хлорофиллами *a*, *b* и каротиноидами. На долю общего хлорофилла приходится 1–2% от сухой биомассы микроводоросли [10]. Подавляющая часть хлорофилла *b* присутствует в составе светособирающих комплексов фотосистемы II (PSII) [11]. Каротиноиды, встречающиеся в хлорелле, включают  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротины, зеаксантин, лютеин, неоксантин и виолаксантин. Наиболее ценным среди них является  $\beta$ -каротин, концентрация которого в микроводоросле 0,1–0,2% [12].

На рост и продукцию метаболитов *C. vulgaris* непосредственно влияют условия ее развития.

Медь является одним из важнейших биогенных микроэлементов. Физиологическая

активность ее связана, прежде всего, с присутствием в составе ряда энзиматических систем, относящихся к группе оксидаз (полифенолоксидаза, цитохромоксидаза, аскорбатоксидаза). Полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза осуществляют процессы окисления фенолов и аскорбиновой кислоты, а цитохромоксидаза входит в состав дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, медь активизирует ряд энзимов, например, нитратредуктазу и протеазы [13].

Недостаток меди отрицательно влияет на синтез белков, жиров и витаминов и ведет к бесплодию растений. Участвуя в процессе фотосинтеза, медь влияет и на усвоение азота растениями. Вместе с тем, ее избыток оказывает неблагоприятное воздействие на живые организмы.

Основным источником поступления меди в природные водоемы являются сточные воды предприятий химической, металлургической промышленности, шахтные воды, алдегидные реагенты, используемые для уничтожения водорослей. При концентрации катионов меди (II) 0,01 мг/л тормозятся процессы самоочищения водоемов, а при ее уровне 0,40–0,50 мг/л наблюдается гибель микрофлоры и тормозятся биологические процессы очистки сточных вод [14, 15].

У *Ch. vulgaris* катионы меди при концентрации 10–90 мкг/л вызывают фотоингибирование реакционных центров PSII на свету, а при концентрации более 50 мкг/л наблюдается снижение активности PSII и при отсутствии света [16].

Ранее было показано, что скорость роста хлореллы в питательной среде Chu10 значительно снижалась при концентрации сульфата меди  $10^{-5}$  М. Водоросли, выращенные на питательной среде Мойзе, содержащей  $3,2 \cdot 10^{-7}$  М сульфата меди, были менее чувствительны к воздействию этой соли. Ингибирование сульфатом меди роста хлореллы вызывало при ресуспендировании в свежей культуральной среде большую чувствительность к дальнейшему добавлению этой соли [17].

Воздействие на *Ch. vulgaris* меди в концентрации 0,5 и  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М значительно угнетало ее рост и снижало содержание хлорофилла, подавляло активность PSII и ассимиляцию  $\text{CO}_2$ , но увеличивало уровень активных форм кислорода [18].

Вместе с тем, приведенные материалы носят фрагментарный характер и не создают целостной картины эффекта катионов меди (II) на состояние клеток хлореллы в культуре.

Цель данной работы – раскрыть особенности влияния  $\text{CuSO}_4$  в широком диапазоне концентраций на физиолого-биохимическое состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris*.

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

Микроводоросль выращивали на питательной среде, используя как основную среду Тамия [19] рН 7,0, не содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту. В экспериментальные варианты питательной среды вносили сульфат меди до конечной концентрации от  $10^{-8}$  М до  $10^{-4}$  М. В контрольный вариант сульфат меди не добавляли.

Хлореллу культивировали в прозрачных сосудах объемом 0,1 л при температуре 25–26 °С, освещенности на поверхности сосуда 5000 лк, которую регистрировали с помощью люксметра Ю-116, продолжительности световых и темновых фаз – 12 ч/12 ч. Посевная доза составляла  $3,26 \pm 0,05$  млн/мл клеток. Концентрацию клеток микроводоросли определяли визуально с помощью камеры Горяева.

На 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21-е сутки культивирования отбирали аликвоты культуры, содержащие по  $10,0 \pm 0,06$  млн клеток, отделяли их путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 10 мин, дважды отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой.

В гомогенатах клеток определяли концентрацию белка колориметрическим методом [19], хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов – по спектрам поглощения экстрактов в 100%-ном ацетоне [19]. Все операции при гомогенизации и спектрофотометрировании выполняли в затемненном помещении.

Исследования проведены не менее чем шестикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для принятого уровня значимости ( $P \leq 0,05$ ).

**Результаты исследований и их обсуждение.** В контрольном варианте культура сохраняла жизнеспособность на протяжении 21-х суток (таблица 1, рисунок *а*). Максимальный прирост биомассы достигался на 17-е сутки – в 2,9 раза в сравнении с началом культивирования. В дальнейшем наблюдалось небольшое (на 11–14%) уменьшение этого показателя вследствие старения культуры.

Внесение в питательную среду  $CuSO_4$  в целом негативно отразилось на росте культуры. На протяжении всего периода исследования во всех образцах в сравнении с контролем отмечено угнетение роста биомассы, особенно после 9-х суток. При этом максимальный эффект – уменьшение на 34–53% – выявлен при концентрации  $Cu^{2+} 10^{-4}$  М.

Вместе с тем, при концентрации  $Cu^{2+} 10^{-5}$  М наивысший прирост биомассы – в 2,6 раза в сравнении с началом культивирования наблюдался на 15-е сутки, что лишь на 5% уступало контрольному варианту питательной среды. А при концентрации  $Cu^{2+} 10^{-8}$  М увеличение концентрации клеток на 3-и и 5-е сутки превосходило контроль на 16 и 12% соответственно.

При этом ни в одном из экспериментальных вариантов на протяжении всего периода культивирования не отмечено гибели культуры. Возможно и при определенном угнетении метаболических процессов, вызванном внесением катионов меди, сохранившейся интенсивности этих процессов было достаточно для медленного развития и поддержания культуры в жизнеспособном состоянии.

Изменения концентрации внутриклеточного белка во всех вариантах питательной среды были близки таковым динамике биомассы (таблица 2, рисунок *б*). Это, в известной мере, согласуется с предположением об снижении метаболических процессов и сохранении их на определенном уровне.

В контроле максимум концентрации внутриклеточного белка наблюдался на 17-е сутки – прирост в 3,5 раза в сравнении с началом культивирования, с последующим спадом на 21% к 21-м суткам (таблица 2).

Добавление в питательную среду  $CuSO_4$  в концентрациях  $10^{-8}$  и  $10^{-7}$  М стимулировало накопление внутриклеточного белка по отношению к контролю до 11-х суток. При этом данные варианты питательной среды на 7-е сутки превосходили контроль на 20%.

Таблица 1. – Концентрация клеток *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду культивирования  $CuSO_4$  (млн клеток/мл),  $n = 9$

Время роста, сутки	Концентрация $CuSO_4$ , М					
	контроль	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
1	3,41±0,11	3,53±0,09	3,08±0,07	3,26±0,08	3,57±0,09	3,24±0,12
3	3,35±0,07	3,89±0,07*	3,22±0,09	3,11±0,09	3,47±0,07	3,17±0,09
5	4,12±0,09	4,61±0,05*	3,81±0,06	3,97±0,06	3,85±0,05	3,43±0,06*
7	4,88±0,05	4,77±0,08	4,31±0,07	5,17±0,05	3,73±0,07*	4,69±0,07
9	5,38±0,07	4,67±0,10*	5,32±0,04	5,55±0,07	5,27±0,11	5,01±0,08
11	7,21±0,09	5,42±0,07*	6,27±0,12*	5,89±0,09*	6,86±0,09	4,75±0,05*
13	8,47±0,06	6,01±0,09*	6,55±0,07*	6,41±0,11*	8,25±0,07	4,43±0,06*
15	9,61±0,12	6,54±0,11*	6,79±0,06*	6,82±0,12*	9,38±0,11	4,72±0,10*
17	9,89±0,08	6,97±0,07*	7,25±0,09*	7,33±0,08*	8,75±0,12	4,66±0,08*
19	8,76±0,09	6,72±0,12*	7,57±0,10*	8,51±0,11	8,34±0,08	4,49±0,11*
21	8,51±0,11	6,57±0,09*	6,88±0,09*	7,67±0,07	7,83±0,11	4,34±0,12*

Примечание (здесь и далее) – \* Изменения статистически достоверны при  $P \leq 0,05$

Концентрация внутриклеточного белка в период культивирования во всех исследуемых вариантах линейно возрастала (таблица 1, рисунок 1б). Однако максимум достигался в разные сроки.

Так, в контроле и при концентрации  $\text{Cu}^{2+}$   $10^{-8}$  М уровень белка повышался на 249 и 188% соответственно на 17-е сутки, при концентрации эффектора  $10^{-7}$  М – на 144% только на 19-е сутки, а при концентрации  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М – на 214 и 150% соответственно на 15-е сутки. Внесение в питательную среду сульфата меди в концентрации  $10^{-4}$  М сопровождалось приростом уровня внутриклеточного белка лишь на 45% на 11-е сутки, после чего наблюдался его спад к концу культивирования на 25%.

Начиная с 15-х суток, во всех экспериментальных вариантах уровень белка стабилизировался или снижался особенно сильно – на 58% при концентрации сульфата меди  $10^{-4}$  М.

Уровень хлорофилла *a* в клетках контрольного варианта увеличивался с максимумом до 15-х суток на 267% от начала культивирования, затем отмечено его снижение на 33% (таблица 3).

Внесение в питательную среду  $\text{CuSO}_4$  сопровождалось снижением уровня накопления клетками хлореллы хлорофилла *a* тем более выраженным, чем выше концентрация фактора в питательной среде.

При добавлении в питательную среду сульфата меди в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  М в период 3–7 сутки выявлено увеличение концентрации хлорофилла *a* в сравнении с контрольным вариантом на 28–72%. Причем при минимальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  прирост хлорофилла *a* на 7-е сутки составил 157% в сравнении с началом культивирования, после чего его уровень снижался. Так, к концу эксперимента наблюдалось снижение уровня хлорофилла *a* на 32–82% по отношению к максимальной его концентрации во всех вариантах эксперимента, включая контрольный вариант (таблица 3, рисунок 1 в).

Однако в динамике культивирования ни в одном из экспериментальных вариантов питательной среды не отмечен прирост уровня пигмента в сравнении с началом культивирования как это наблюдали в контрольном варианте.

Таблица 2. – Концентрация внутриклеточного водорастворимого белка *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду культивирования  $\text{CuSO}_4$  (мкг/мл млн клеток),  $n = 6$

Время роста, сутки	Концентрация $\text{CuSO}_4$ , М					
	контроль	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
1	14,25±0,09	14,19±0,10	17,92±0,10*	12,37±0,08*	15,66±0,06	17,25±0,07*
3	14,83±0,05	18,62±0,04*	19,85±0,08*	12,57±0,09*	16,31±0,04	16,42±0,05
5	20,34±0,11	24,77±0,05*	25,38±0,04*	19,72±0,10	19,55±0,04	17,61±0,07*
7	23,83±0,09	28,69±0,05*	28,73±0,09*	24,85±0,08	23,37±0,05	20,13±0,09*
9	30,07±0,08	33,72±0,06*	32,09±0,07	31,53±0,05	27,83±0,07	21,37±0,05*
11	34,38±0,06	37,87±0,12	35,24±0,06	33,15±0,07	30,34±0,11*	24,94±0,14*
13	39,04±0,10	38,64±0,07	36,82±0,12	37,63±0,09	34,01±0,09*	23,79±0,08*
15	45,34±0,09	39,08±0,09*	39,28±0,09*	38,78±0,12*	39,14±0,12*	23,27±0,13*
17	49,72±0,12	40,83±0,11*	41,37±0,12*	34,37±0,11*	37,28±0,13*	21,82±0,12*
19	43,83±0,11	37,29±0,13*	43,81±0,14	35,16±0,12*	35,31±0,09*	18,34±0,14*
21	39,38±0,13	35,19±0,12	38,43±0,13	33,72±0,09*	31,67±0,11*	18,67±0,10*



Таблица 3. – Концентрация хлорофилла *a* в клетках *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду культивирования CuSO<sub>4</sub> (мкг/млн клеток), *n* = 6

Время роста, сутки	Концентрация CuSO <sub>4</sub> , М					
	контроль	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	5,41±0,07	7,47±0,09*	7,35±0,10*	6,74±0,09*	6,49±0,05*	4,46±0,06*
3	6,62±0,09	11,39±0,08*	10,54±0,09*	8,95±0,08*	7,83±0,04*	5,37±0,11*
5	8,59±0,04	13,67±0,09*	12,76±0,07*	12,43±0,11*	9,54±0,06*	5,73±0,09*
7	12,92±0,09	19,21±0,11*	13,66±0,09	16,58±0,07*	10,80±0,09*	7,35±0,07*
9	15,45±0,08	17,25±0,11	17,34±0,09	15,96±0,05	12,56±0,05*	8,04±0,08*
11	16,27±0,12	18,38±0,09*	15,87±0,12	16,73±0,08	14,73±0,08	9,34±0,09*
13	14,22±0,09	17,53±0,05*	13,51±0,05	15,82±0,05	13,36±0,12	8,25±0,06*
15	19,84±0,15	16,58±0,12*	15,67±0,11*	15,73±0,11*	15,61±0,11*	7,45±0,13*
17	18,21±0,13	17,37±0,14	14,82±0,09*	13,64±0,09*	15,37±0,10*	6,73±0,10*
19	15,43±0,16	15,89±0,09	12,37±0,13*	14,29±0,12	14,61±0,13	5,79±0,14*
21	13,29±0,12	14,68±0,12	13,17±0,11	13,52±0,11	12,28±0,11	5,36±0,12*

Исключением является уже отмеченный выше по тексту сдвиг содержания пигмента при концентрации сульфата меди 10<sup>-8</sup> М. А при максимальной концентрации Cu<sup>2+</sup> был зафиксирован значительный спад уровня хлорофилла *a* на 18–63% на протяжении всего эксперимента.

Изменения уровня в клетках хлорофилла *b* на протяжении всего периода наблюдений были менее выраженными в сравнении с таковыми хлорофилла *a* (таблица 4, рисунок *г*). Так, в контрольном варианте максимальный уровень пигмента достигался на 11-е сутки роста. Увеличение его в сравнении с началом культивирования составило 65%. При добавлении в питательную среду сульфата меди в диапазоне концентраций 10<sup>-8</sup>–10<sup>-5</sup> М в динамике роста культуры максимальный уровень хлорофилла *b* наблюдали на 9–11-е сутки. Прирост по отношению к началу культивирования в случае концентраций эффектора 10<sup>-6</sup> и 10<sup>-5</sup> М составил 47 и 37% соответственно, тогда как при меньших концентрациях Cu<sup>2+</sup> – 10<sup>-6</sup> и 10<sup>-5</sup> М этот прирост достигал 98–105%. Внесение в питательную среду сульфата меди в максимальной концентрации вообще не приводило к какому-либо росту уровня этого фотосинтетического пигмента,

но даже вызвало его снижение в сравнении с началом культивирования.

В динамике роста культуры хлореллы отмечено нарастание в ее клетках уровня каротиноидов. Оно было особенно выражено при концентрации CuSO<sub>4</sub> 10<sup>-4</sup> и 10<sup>-5</sup> М (таблица 5, рисунок *д*). Это увеличение уровня на 15–17-е сутки при данной концентрации эффектора составило 2,3–2,7 раза в сравнении с началом культивирования, а по отношению к контрольному варианту – на 20–51%. В то же время в контрольном варианте накопление каротиноидов не превышало 73%, а при меньшей концентрации сульфата меди: 10<sup>-8</sup> и 10<sup>-6</sup> М рост уровня каротиноидов составил 73 и 29% соответственно.

Несколько особо стоит вариант питательной среды, содержащий 10<sup>-7</sup> М CuSO<sub>4</sub>: максимум концентрации каротиноидов в клетках наблюдали на 9-е сутки. Он соответствовал 2,1 раза по отношению к началу культивирования. Интенсивный рост уровня данного пигмента при максимальных концентрациях сульфата меди, по-видимому, свидетельствует о проявлении в клетках окислительного стресса, учитывая, что катионы меди способны инициировать это состояние.

Таблица 4. – Концентрация хлорофилла *b* в клетках *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду культивирования CuSO<sub>4</sub> (мкг/млн клеток), *n* = 6

Время роста, сутки	Концентрация CuSO <sub>4</sub> , М					
	контроль	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	6,67±0,12	5,82±0,12*	4,51±0,08*	6,11±0,05	6,34±0,07	6,43±0,09
3	7,71±0,08	6,77±0,11*	6,64±0,04*	5,82±0,07*	6,75±0,09*	6,15±0,08*
5	8,73±0,08	7,38±0,04*	7,43±0,05*	7,23±0,11*	6,46±0,05*	5,89±0,04*
7	11,67±0,11	9,47±0,08*	7,83±0,07*	8,41±0,09*	6,02±0,11*	5,43±0,07*
9	10,16±0,08	9,31±0,05	9,26±0,05	8,96±0,06	7,59±0,07*	5,69±0,09*
11	10,99±0,08	11,52±0,09	7,11±0,09*	8,53±0,07*	8,68±0,08*	6,12±0,04*
13	9,82±0,08	10,38±0,08	6,28±0,06*	7,82±0,08*	9,10±0,04	5,81±0,11*
15	9,57±0,11	9,37±0,11	7,21±0,12*	8,87±0,11	8,73±0,07	4,65±0,08*
17	9,54±0,09	9,62±0,08	6,87±0,10*	7,54±0,09*	8,62±0,09	4,56±0,13*
19	8,67±0,13	9,73±0,11*	6,19±0,11*	6,86±0,11*	7,57±0,12*	3,93±0,11*
21	7,38±0,12	7,31±0,12	5,37±0,14*	6,12±0,12*	7,23±0,09	3,76±0,09*

Таблица 5. – Концентрация каротиноидов в клетках *Chlorella vulgaris* при добавлении в среду культивирования CuSO<sub>4</sub> (мкг/млн клеток), *n* = 6

Время роста, сутки	Концентрация CuSO <sub>4</sub> , М					
	контроль	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	1,14±0,09	1,03±0,10	0,79±0,08*	1,19±0,07	0,86±0,08*	1,07±0,10
3	0,97±0,15	1,22±0,11*	1,02±0,12	1,03±0,12	1,15±0,11*	1,54±0,13*
5	1,26±0,08	1,43±0,09*	1,15±0,05	1,37±0,11	1,42±0,09*	2,34±0,09*
7	1,45±0,11	1,36±0,07	1,44±0,07	1,57±0,10	1,31±0,11	1,93±0,07*
9	1,37±0,09	1,47±0,09	1,68±0,11*	1,41±0,08	1,89±0,09*	2,49±0,12*
11	1,64±0,08	1,45±0,04	1,63±0,09	1,54±0,15	1,78±0,08*	2,09±0,04*
13	1,59±0,07	1,39±0,13*	1,46±0,07	1,34±0,09*	1,71±0,12*	1,87±0,11*
15	1,83±0,12	1,58±0,11*	1,49±0,10*	1,48±0,11*	2,11±0,13*	2,78±0,12*
17	1,97±0,15	1,87±0,10	1,33±0,09*	1,32±0,15*	2,36±0,11*	2,43±0,11*
19	1,79±0,11	1,55±0,09*	1,26±0,08*	1,14±0,11*	2,08±0,14*	2,11±0,13*
21	1,56±0,12	1,28±0,13*	1,17±0,11*	0,96±0,12*	1,87±0,10*	1,78±0,09*

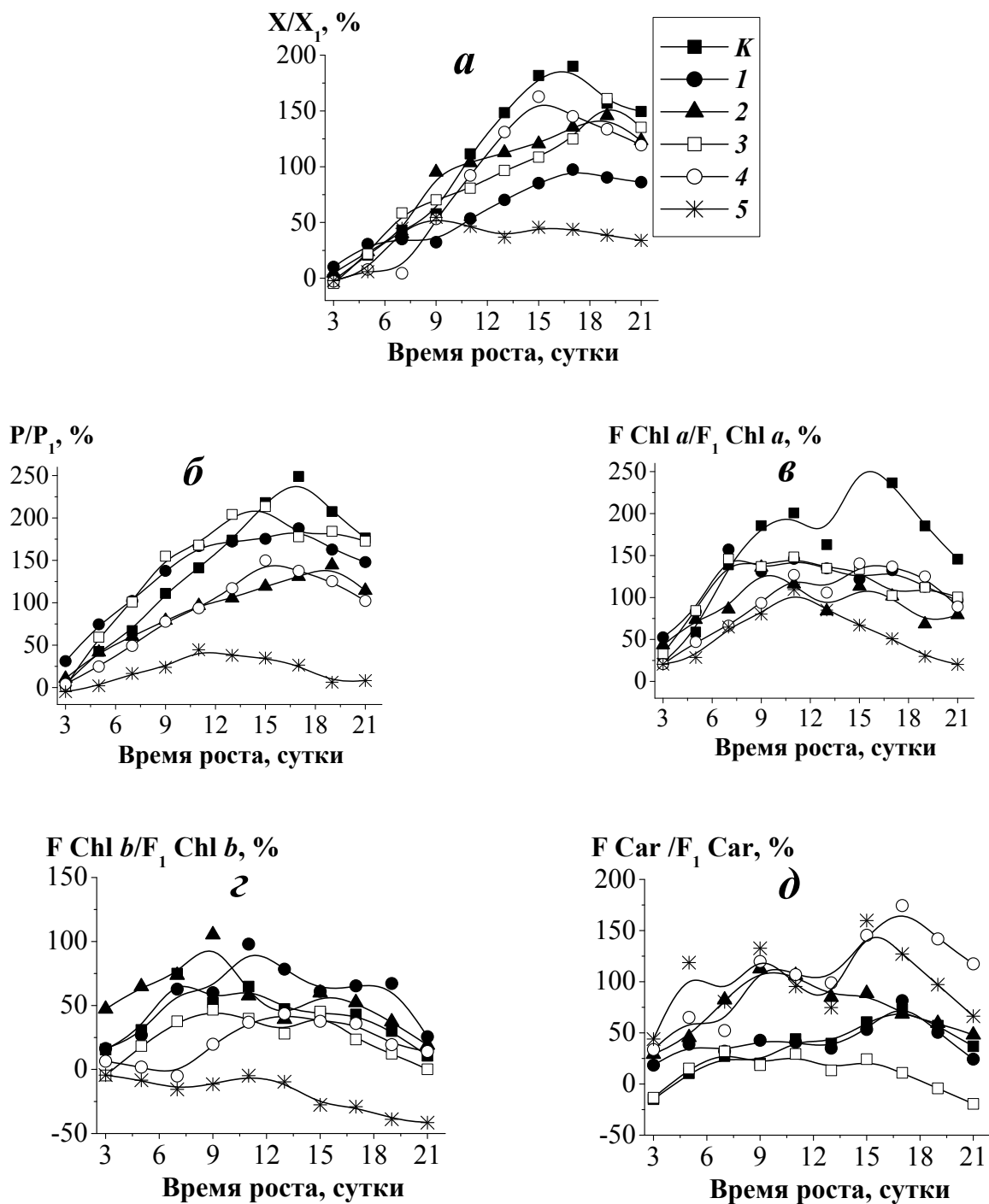


Рисунок. – Динамика (% по отношению к 1 суткам, принятым за 100%) уровня биомассы (а), внутриклеточного белка (б), хлорофилла а (в), хлорофилла б (г), каротиноидов (д) в клетках культуры *Ch. vulgaris* при добавлении в среду культивирования  $\text{CuSO}_4$ ; контроль – К (без соли меди); концентрация  $\text{CuSO}_4$  (М):  $10^{-8}$ (1);  $10^{-7}$  (2);  $10^{-6}$  (3);  $10^{-5}$  (4);  $10^{-4}$  (5)

**Заклучение.** Итак, судя по полученным результатам, добавление в питательную среду сульфата меди даже в концентрации  $10^{-4}$  М хотя и вызвало угнетение роста культуры

хлореллы, но не сопровождалось ее гибелью на протяжении 21 дня. Динамика концентрации внутриклеточного белка во всех вариантах питательной среды была близка динамике



ке биомассы. Примечательно, что добавление в питательную среду  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях  $10^{-8}$  М и  $10^{-7}$  М стимулировало накопление внутриклеточного белка по отношению к контролю до 11-х суток, а на 7-е сутки эти варианты питательной среды превосходили контроль на 20%. На наш взгляд, это довольно примечательная особенность, которая отличает эффект катионов меди (II) от такового эффекта катионов железа (III) в эквимольных концентрациях, при котором уровень внутриклеточного белка был ниже контрольного варианта [20]. В известной степени это сравнение условно, поскольку среда Тамийя включает соли железа в концентрации  $10^{-5}$  М, тогда как соединения меди в ней отсутствуют.

Выявленные изменения накопления в клетках хлорофилла *a* и каротиноидов, по-видимому, отражают адаптацию клеток культуры к эффекту катионов меди, способных инициировать процессы с генерированием активных форм кислорода. Об известной степени адаптации, на наш взгляд, свидетельствует увеличение накопления внутриклеточного белка при добавлении в питательную среду  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях  $10^{-8}$  М и  $10^{-7}$  М по отношению к контролю до 11-х суток. К тому же на 7-е сутки роста эти варианты питательной среды превосходили контроль на 20%.

Следовательно, эффекты катионов меди отличаются по характеру, что логически создает предпосылки для дальнейших исследований.

### Список литературы

1. Ibrahim, I.A. A review: Importance of chlorella and different applications / I.A. Ibrahim, Z.I. Elbaily // Alexandria Journal of Veterinary Sciences. – 2020. – Vol. 65, iss. 1. – P.16–34. DOI:10.5455/ajvs.94847.
2. Ocean sprawl: The global footprint of shellfish and algae aquaculture and its implications for production, environmental impact, and biosecurity / M. Harvey [et al.] // Aquaculture. – 2024. – Vol. 586, article 740747. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740747>.
3. Review: Biofuel production from plant and algal biomass / R.A. Voloshin [et al.] // Int. J. Hydrogen Energy. – 2016. – Vol. 41, iss. 39. – P. 17257–17273.
4. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review / J.A. Coronado-Reyes [et al.] // Food Science and Technology. – 2022. – Vol. 42. – P. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.37320>.
5. Widyaningrum, D. Chlorella as a source of functional food ingredients: short review / D. Widyaningrum, A.D. Prianto // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – Vol. 794. – P. 1–8. DOI: 10.1088/1755-1315/794/1/012148.
6. Mosibo, O.K. Proteins as sustainable ingredients in novel foods: recent developments and challenges / O.K. Mosibo, G. Ferrentino, C.C. Udenigwe // Foods. – 2024. – Vol. 13, iss.5, 733. – P. 1–28. <https://doi.org/10.3390/foods13050733>.
7. Лукьянов, В.А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В.А. Лукьянов, А.И. Стифеев. – Курск : Изд-во Кур. гос. с.-х. акад., 2014. – 181 с.
8. Bioactivity of macronutrients from chlorella in physical exercise / K. Lorenzo [et al.] // Nutrients. – 2023. – Vol. 15, iss. 9, 2168. – P. 1–17. DOI: 10.3390/nu15092168.
9. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors / C. Safi [et al.] // Journal of Applied Phycology. – 2013. – Vol. 25, iss. 2. – P. 523–529.
10. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review / C. Safi [et al.] // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2014. – Vol. 35. – P. 265–278.
11. Green, B.R. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family / B.R. Green, E. Pichersky, K. Kloppstech // Trends in biochemical sciences. – 1991. – Vol. 16. – P. 181–186.
12. Garbzhii, K. Analysis on application of *Chlorella* in the feeding of farm animals / K. Garbzhii // New stages of development of modern science in Ukraine and EU countries: monograph / edited by authors. – 7st ed. – Riga, Latvia : Baltija Publishing, 2019. – P. 60–85.
13. Shukor, M.Y. An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease / M.Y. Shukor [et al.] // Appl Biochem Biotechnol. – 2008. – Vol. 144, iss. 3. – P. 271–276.

14. Cavalletti, E. Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies / E. Cavalletti [et al.] // *Toxics*. – 2022. – Vol. 10, iss. 9, 527. – P. 1–14. DOI: 10.3390/toxics10090527.
15. Лозинская, Е. Ф. Изучение сорбционных свойств природных сорбентов по отношению к ионам меди(II) / Е. Ф. Лозинская, Т. Н. Митракова, Н. А. Жилиева // *Ученые записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета*. – 2013. – № 3 (27). – С. 1–7.
16. Koshkin, E. I. Physiology of crop sustainability / E. I. Koshkin. – Moscow : Drofa Publ., 2010. – 638 p.
17. The effect of copper sulphate on the growth of the alga *Chlorella* / V. A. Moss [et al.] // *British Homeopathic journal*. – 1977. – Vol. 66, iss. 3. – P. 169–177. DOI: 10.1016/S0007-0785(77)80010-0.
18. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription / H. Qian [et al.] // *Aquat Toxicol*. – 2009. – Vol. 94, iss. 1. – P. 56–61. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.05.014.
19. 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.
20. Ильючик, И. А. 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 // *Биотехнология: достижения и перспективы развития : сборник материалов VI международной научно-практической online-offline конференции, Пинск, 30 ноября – 1 декабря 2023 г.* – Пинск : ПолесГУ, 2023. – С. 89–93.
21. Cavalletti, E. Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies. *Aquaculture*, 2024, vol. 586, article 740747. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740747>.
22. Voloshin R.A., Rodionova M.V., Zharmukhamedov S.K., Veziroglu T.N., Allakhverdiev S.I. Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2016, vol. 41(39), pp. 17257–17273.
23. Coronado-Reyes J.A., Salazar-Torres J.A., Juárez-Campos B., González-Hernández J.C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, 2022, vol. 42, pp. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.37320>.
24. Widyaningrum D., Prianto A.D. *Chlorella* as a source of functional food ingredients: short review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 794, pp. 1–8. DOI: 10.1088/1755-1315/794/1/012148.
25. Mosibo O.K., Ferrentino G., Udenigwe C.C. Proteins as sustainable ingredients in novel foods: recent developments and challenges. *Foods*, 2024, vol. 13(5):733. <https://doi.org/10.3390/foods13050733>.
26. Luk'ianov V.A. Stifeev A.I. *Prikladnye aspekty primeneniia mikrovodoroslei v agrotsenoze* [Applied aspects of the use of microalgae in agrocenosis]. Kursk, Publishing house Kursk. state agricultural acad., 2014, 181 p. (In Russian)
27. Lorenzo K, Santocildes G, Torrella JR, Magalhães J, Pagès T, Viscor G, Torres JL, Ramos-Romero S. Bioactivity of macronutrients from chlorella in physical exercise. *Nutrients*, 2023, vol. 15(9): 2168. DOI: 10.3390/nu15092168.
28. Safi C., Charton M., Pignolet O., Silvestre F., Vaca-Garcia C., Pontalier P.-Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 2013, vol. 25(2), pp. 523–529.
29. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, vol. 35, pp. 265–278.
30. Green B. R., Pichersky E., Kloppstech K. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extend-

## References

1. Ibrahim I.A., Elbaily Z.I. A review: Importance of chlorella and different applications. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 2020, vol. 65(1), pp. 16–34. DOI:10.5455/ajvs.94847.
2. Harvey M., Barrett L.T., Morris R.L., Swearer S.E., Dempster T. Ocean sprawl: The global footprint of shellfish and algae aquaculture and its implications for production, environ-

- ed family. Trends in biochemical sciences, 1991, vol. 16, pp. 181–186.
12. Garbzhii K. Analysis on application of Chlorella in the feeding of farm animals. New stages of development of modern science in Ukraine and EU countries: monograph. Riga, Baltija Publishing, 2019, pp. 60–85.
  13. Shukor M.Y., Masdor N., Baharom N.A., Jamal J.A., Abdullah M.P., Shamaan N.A., Syed M.A. An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease. Appl Biochem Biotechnol, 2008, vol. 144(3), pp. 271–276.
  14. Cavalletti E, Romano G, Palma Esposito F, Barra L, Chiaiese P, Balzano S, Sardo A. Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies. Toxics, 2022, vol. 10(9): 527. DOI: 10.3390/toxics10090527.
  15. Lozinskaia E.F., Mitrakova T.N., Zhiliaeva N.A. Izuchenie sorbtionnykh svoistv prirodnykh sorbentov po otnosheniiu k ionam medi(II) [Study of the sorption properties of natural sorbents in relation to copper(II) ions]. Uchenye zapiski. Elektronnyi nauchnyi zhurnal Kurskogo gosudarstvennogo universiteta [Scientific notes. Electronic scientific journal of Kursk State University], 2013, no. 3 (27), pp. 1–7. (In Russian)
  16. Koshkin E.I. *Physiology of crop sustainability*. Moscow, Drofa Publ., 2010, 638 p.
  17. Moss V.A., Roberts J.A., Keith H., Simpson L. The effect of copper sulphate on the growth of the alga Chlorella. British Homeopathic journal, 1977, vol. 66(3), pp. 169–177. DOI: 10.1016/S0007-0785(77)80010-0.
  18. Qian H, Li J, Sun L, Chen W, Sheng GD, Liu W, Fu Z. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. Aquat Toxicol, 2009, Vol. 94(1), pp. 56–61. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.05.014.
  19. Ilyuchyk I.A., Nikandrov, V.N. *Metodicheskie rekomendatsii po izucheniiu biokhimicheskikh svoistv odnokletochnykh zelenykh vodoroslei (na primere Chlorella vulgaris)* [Methodological recommendations for studying the biochemical properties of unicellular green algae (using the example of Chlorella vulgaris)]. Pinsk, PolesGU, 2020, 29 p. (In Russian)
  20. Ilyuchyk I.A., Shul'gan, V.N., Nikandrov, V.N. *Osobennosti nakopleniya belka kul'turoj Chlorella vulgaris v prisutstvii Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> v pitatel'noj srede* [Peculiarities of protein accumulation by *Chlorella vulgaris* culture in the presence of Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> in a nutrient medium] *Biotekhnologiya: dostizheniya i perspektivy` razvitiya : sbornik materialov VI mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy online-offline konferenczii, Pinsk, 30 noyabrya – 1 dekabrya 2023 g.* Pinsk : PolesGU, 2023, pp. 89–93. (In Russian)

Received 26 September 2024