

ВПЛИВ СПОЛУК СУЛЬФУРУ НА ПРОЦЕСИ ФОТОСИНТЕЗУ ТА ДИХАННЯ У *CHLORELLA VULGARIS*

© Голуб Н.Б., Ситнік О.І., Будика К.Е., 2012

З метою застосування димових газів для вирощування мікроводоростей розглянуто вплив сполук сульфуру різних ступенів окиснення на процеси фотосинтезу та дихання у *Chlorella vulgaris*. Показано, що сполуки сульфуру підвищують біосинтез хлорофілу *a* і знижують хлорофілу *b* та є стресовим фактором для процесу фотосинтезу. Пригнічення процесу дихання при вмісті у культуральному середовищі сполук сульфуру пов'язано з інгібуванням ферментів електронтранспортного ланцюга.

Ключові слова: біодизель, *Chlorella vulgaris*, дихання, фотосинтез, сполуки сульфуру, хлорофіл *a*, хлорофіл *b*.

For the implementation of smoke gases for cultivation of microalgae the influence of sulfur compounds in various stages of oxidation on the processes of photosynthesis and respiration in *Chlorella vulgaris* was reviewed. It was shown that sulfur compounds enhance the biosynthesis of chlorophyll *a* and reduce biosynthesis of chlorophyll *b* and has the properties of the stress factor for the process of photosynthesis. Inhibition of respiration process while the content of sulfur compounds in the culture medium is associated with the inhibition of enzymes elektrontransportnoho chain.

Key word: biodiesel, *Chlorella vulgaris*, respiration, photosynthesis, sulfur compounds, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*.

Постановка проблеми та аналіз відомих досліджень і публікацій

Використання мікроводоростей для одержання біодизельного пального набуває усе більшої популярності в світі. Можливість культивування водоростей за використання димових газів дає змогу вирішувати як енергетичні, так і екологічні проблеми. Наявні сьогодні технології використання димових газів для вирощування мікроводоростей потребують їх попереднього очищення, що ускладнює технологію і збільшує ціну одержаного пального [1]. Залежно від сировини та умов спалювання викопного палива утворюються сполуки сульфуру – SO_2 , SO_3 , H_2S [2], які у разі розчинення у воді підвищують рН середовища, що негативно впливає на розмноження водоростей. Також ці сполуки за певної концентрації можуть впливати на метаболізм клітин, що може приводити до зменшення або підвищення концентрації ліпідів та їх складу у клітинах мікроводоростей, що впливає на продуктивність одержання біодизельного пального. Тому дослідження процесів росту та розвитку мікроорганізмів, а саме фотосинтезу та дихання при вмісті у культуральному середовищі сполук сульфуру є актуальною проблемою.

Метою роботи є дослідження впливу сполук сульфуру різних ступенів окиснення на метаболічні процеси мікроводоростей.

Завдання, що вирішувались:

1. Дослідити вплив сполук сульфуру у різній концентрації на біосинтез хлорофілів *a* та *b* у *Chlorella vulgaris*.
2. Дослідити зміну інтенсивності фотосинтезу та дихання при вмісті у культуральному середовищі сполук сульфуру, що містяться в димових газах.

Основний матеріал

Для культивування мікроводоростей використовували стандартне поживне середовище Тамія [3]: KNO_3 х.ч. – 5,0 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. – 2,5 г/л, KH_2PO_4 х.ч. – 1,25 г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. – 0,003 г/л, H_3BO_3 х.ч. – 2,36 г/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. – 1,81 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. – 0,222 г/л, MoO_3 ч.д.а. – 0,001764 г/л, NH_4VO_3 х.ч. – 0,002296 г/л. Аналогом сполук сульфур, що містяться в димових газах, слугували: сульфід натрію (Na_2S) ч.д.а. виробництва BASF у концентраціях 0,1 мМ/л, 1 мМ/л та 10 мМ/л; сульфат магнію (MgSO_4) ч.д.а. виробництва MERK у концентраціях 1 мМ/л, 10 мМ/л та 100 мМ/л.

Культивування *Chlorella vulgaris* проводили у прозорих скляних колбах об'ємом 250 мл, за використання шейкера (115–120 об/хв.) при світловому періоді у 14 годин та температурі 20–25 °С.

Швидкість фотосинтезу і дихання вимірювали полярографічним методом, використовуючи полярограф Охуgraph Plus на комірці Hansatech. Полярографічний метод заснований на амперометричному визначенні поглиненого кисню. Зміна концентрації кисню в об'ємі впливає на швидкість електрохімічного відновлення кисню і, внаслідок цього, на величину сили струму. Останнє призводить до зміни характеру залежності між силою струму і прикладеною напругою, що відбивається на характері полярограми (величина кута нахилу). Отже, за кутом нахилу полярографічних кривих можна розраховувати кількість поглиненого кисню в одиницю часу, тобто швидкість дихання або ж виділеного кисню, або швидкість фотосинтезу досліджуваних об'єктів [4].

У комірці об'ємом 1 см³ поміщали біологічний матеріал. Перемішували середовище за допомогою магнітної мішалки, шляхом обертання в комірці сталевій голки, запаяної в скло. Постійність температури забезпечується термостатом. Оскільки комірка герметична, через деякий час весь кисень вичерпується, і дихання клітин припиняється. Для вимірювання швидкості дихання комірку не освітлювали, оскільки *Chlorella vulgaris* фотосинтезуюча мікроводорість.

Визначали вміст хлорофілів *a* та *b* за методикою Річчі. Хлорофіли виділяли із наважки 50 мг у 5 мл 95 % етилового спирту. Після прогрівання при температурі 60°C протягом 30 хв проби центрифугувалися і знову доводилися до 5 мл за об'ємом 95 % спиртом. Екстинцію препаратів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі у 649 і 665 нм. Результат виражали у мг хлорофілу на г сухої ваги. Концентрацію хлорофілів *a* і *b* розраховували за формулами [5]:

концентрація хлорофілу *a*:

$$Ca = 13,5275 \times D665 - 5,2007 \times D649$$

концентрація хлорофілу *b*:

$$Cb = 22,4327 \times D649 - 7,0741 \times D665$$

При культивуванні мікроводоростей *Chlorella vulgaris* одним з показників продуктивності є вміст в клітині хлорофілу. Під час свого росту та розвитку мікроводорості постійно продукують хлорофіл, що забезпечує оптимальний функціонально-активний стан фотосинтезуючого апарату. Тому за вмістом хлорофілу оцінюють ступінь розвитку водоростей, їх біомасу і первинну продукцію. Вплив солей, що вміщують сульфур, на ріст та розвиток клітин може проявлятися дією як катіона, так і аніона. Дія катіона може проявлятися у зміні зарядів макромолекул, і, відповідно, у зміні їх структури і функціональної активності. Збільшення концентрації іонів Na^+ призводить до підвищення солоності культурального середовища. У відповідь на зростання солоності (при концентрації солей у 10 мМ/л) відбувається акумуляція синтезу невеликих молекул осморегулюючих речовин, до яких належать багатоатомні спирти, наприклад, гліцерил, фітол і низькомолекулярні вищі жирні кислоти, що також приводить до зростання загального вмісту ліпідів [6].

Як видно з таблиці, вміст хлорофілу *a* значно більший у клітинах *Chlorella vulgaris*, що вирощувалась на середовищі з додатковим вмістом сульфату натрію та сульфату магнію. Приріст хлорофілу *a*, що є основним пігментом фотосинтезу, у культурі, що росла на середовищі з концентрацією сульфату натрію 10 мМ/л, можна пояснити впливом іонів натрію, який сприяє зростанню проникності біологічних мембран за рахунок індукції натрієвих каналів. Підвищення солоності також позитивно впливає на збільшення кількості хлорофілу у клітинах, оскільки

пригнічується ККД фотосинтезу і, відповідно, клітина у відповідь на дію стресового фактора підвищує біосинтез основного пігменту для забезпечення енергією біосинтетичних процесів [7]. Підвищена концентрація сульфід і сульфат аніонів не впливає на біосинтез хлорофілу *a*, оскільки мікроводорості потребують неорганічних сульфатів для синтезу амінокислот. Причому кисень, що виділяється, є окисником для сульфору в сульфід іоні, і з часом у культуральному середовищі сульфід іони окиснюються до сульфату. Незначне підвищення Mg^{2+} , що входить до молекули хлорофілу, одночасно з концентрацією сульфат іонів позитивно впливає на біосинтез хлорофілу, оскільки іон магнію є одним з ключових елементів у будові пігментів. Такий висновок підтверджується даними таблиці.

Вміст хлорофілу у *Chlorella vulgaris*

№ з/п	Концентрація реагенту	Хл <i>a</i> /сух.ваги, мг/г	Хл <i>b</i> /сух.ваги, мг/г	Загальний вміст хлорофілу, мг/г сух.ваги
1	Контроль	10,24	5,51	15,75
2	Na ₂ S 0,1mM/л	8,62	3,75	12,37
3	Na ₂ S 1mM/л	10,08	3,66	13,74
4	Na ₂ S 10mM/л	8,22	2,93	11,15
5	Na ₂ SO ₃ 0,1mM/л	12,45	5,34	17,79
6	Na ₂ SO ₃ 1mM/л	11,41	3,29	14,70
7	Na ₂ SO ₃ 10mM/л	14,31	4,30	18,61
8	MgSO ₄ 1mM/л	13,53	5,19	18,72
9	MgSO ₄ 10mM/л	13,04	4,67	17,71
10	MgSO ₄ 100mM/л	10,73	2,73	13,46

Всі досліджувані сполуки у всіх концентраціях пригнічували накопичення хлорофілу *b* (таблиця), який синтезується з хлорофілу *a*, оскільки клітина у відповідь на дію стресового фактора синтезуватиме речовини, які сприяють її адаптації до зміни умов середовища і забезпечують максимальною кількістю енергії. Найбільше впливає на біосинтез хлорофілів у *Chlorella vulgaris* сульфід натрію (пригнічується синтез хлорофілів від 12 до 46%). Пояснити зниження вмісту хлорофілу в середовищі, що містить Na₂S, можна утворенням нерозчинних сполук сульфідів металів (Fe, Mn, Zn), які беруть участь у біосинтетичних процесах та фотосинтезі [6].

У клітині *in vivo* спостерігаються процеси, коли невеликих молекул в критично обмежених кількостях недостатньо для використання як субстрат, але вони можуть мати значення для «початку» каскадного механізму підсилення біологічних сигналів, що може спостерігатись за використання сполук сульфору. Такий механізм вимагає затрат енергії. У фотосинтезуючих організмів збільшення загальної та вільної енергії пов'язано з фотосинтезом, який є основою енергетичного циклу.

Вплив сполук сульфору на інтенсивність фотосинтезу проілюстровано на рис. 1. Як видно з рис. 1, за відсутності сполук сульфору в культуральному середовищі (контроль) спостерігається найбільша швидкість фотосинтезу, тобто усі сполуки сульфору пригнічували швидкість фотосинтезу. Немає прямої пропорційності між концентрацією хлорофілу та інтенсивністю фотосинтезу. Найбільше впливали на інтенсивність фотосинтезу сульфід та сульфід натрію за меншої концентрації, а сульфат магнію – за найбільшої (у концентрації 100 mM/л пригнічував фотосинтез на 45 % порівняно з контролем). Пояснити це можливо тим, що збільшення швидкості циклічного фосфорилування призводить до створення великого пулу фосфорильованих інтермедіатів циклу Кальвіна і сприяє інтенсивнішій роботі білків хлоропластів. Як відомо, циклічне фосфорилування є більш резистентним до дії несприятливих умов середовища. Тому можна прогнозувати, що досліджувані сполуки сульфору у цих концентраціях мають стресову дію. Таку дію можна пояснити імовірним одночасним впливом іонів натрію та сульфору в різному ступені окиснення на водоокиснюючий комплекс фотосистеми II.

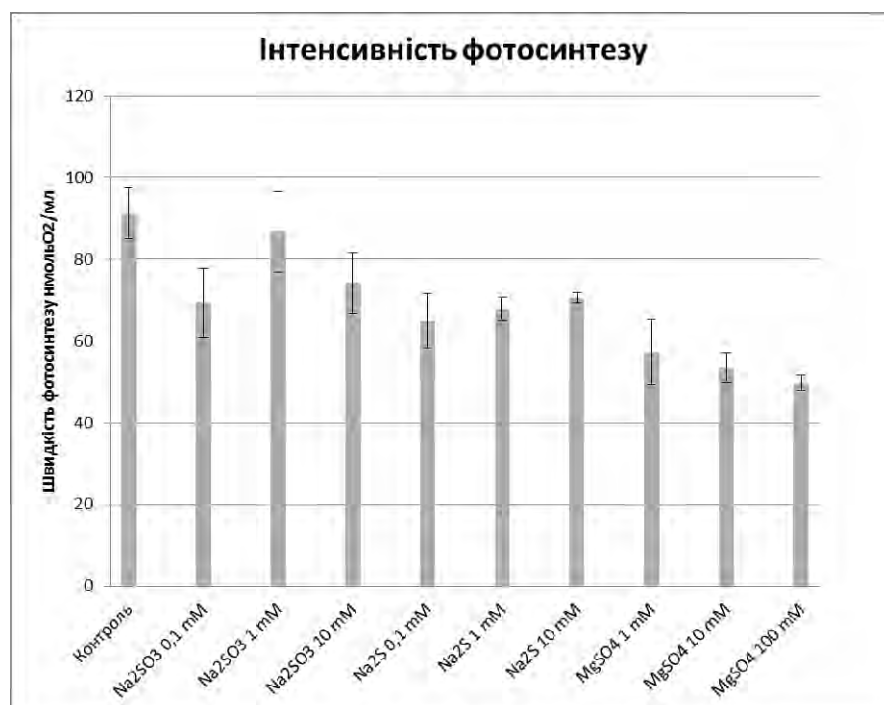


Рис. 1. Інтенсивність фотосинтезу *Chlorella vulgaris*

Дихання є основним джерелом енергії для перебігу ендоерганічних процесів життєдіяльності рослин. На рис. 2 наведено дані щодо швидкості поглинання кисню клітинами *Chlorella vulgaris*. Спостерігалось пригнічення інтенсивності дихання порівняно з контролем.

Ступінь стимуляції поглинання кисню залежить від концентрації цих сполук. У середовищі з додатковим вмістом сульфату магнію у концентрації 100 мМ/л спостерігалася найбільша інгібуюча дія на швидкість поглинання кисню, яка зменшувалась на 75 % порівняно з контролем. Пригнічення швидкості поглинання в цих умовах пов'язано з порушенням основної функції мітохондрій – роботою ферментів електронного транспорту, сполученого з окисним фосфорилуванням.

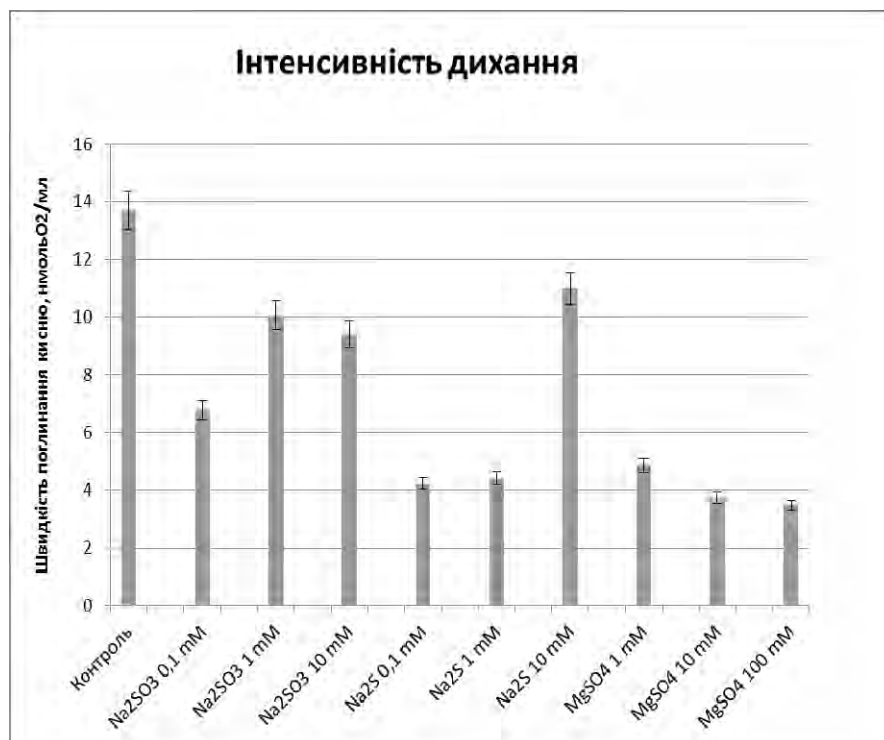


Рис. 2. Інтенсивність дихання *Chlorella vulgaris*

Висновки

Сполуки сульфуру в обраних концентраціях, які відповідають найбільш вірогідній концентрації таких сполук у димових газах, пригнічують процеси дихання та фотосинтезу у культурі мікроводорості *Chlorella vulgaris*. Найбільш інгібуюча дія відбувається за наявності сульфату магнію у культуральному середовищі.

Сульфід натрію впливає на продукування хлорофілів і, відповідно, на накопичення біомаси. Тому за використання димових газів для забезпечення мікроводоростей джерелом карбону необхідно попередньо окиснювати іони S^{2-} , SO_3^{2-} до форми, що є поживною речовиною для *Chlorella vulgaris*.

Загальна концентрація сульфат-іона в культуральному середовищі при вирощуванні *Chlorella vulgaris* за використання димових газів не повинна перевищувати 10 г/л.

1. Mata, T. M., Martins A. A., Caetano N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications / *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2010. – № 14. – pp. 217–232.
2. Вилесов Н. Г., Костюковская А. А. Очистка выбросных газов. – К.: Техника, 1971. – 196 с.
3. Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П. Водоросли. Справочник. – Киев : Наукова думка, 1989. – 608 с.
4. Veereshwarayya V., Kumar P., Rosen K.M., Mestril R., Querfurth H.W. Differential Effects of Mitochondrial Heat Shock Protein and Related Molecular Chaperones to Prevent Intracellular-Amyloid-induced Inhibition of Complex IV and Limit Apoptosis / *The journal of biological chemistry*. – 2006. – v. 281, №. 40, pp. 29468–29478.
5. Raymond J. Ritchie. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents / *Photosynth Res*. – 2006. – № 89. – pp. 27–41.
6. Голуб Н.Б., Бунча В.Ю. Водоросли як сировина для одержання біодизельного пального / *Відновлювальна енергетика*, 2010. – № 2. – С.79–86.
7. EL-Sheekh M. M., Omar H.H. Effect of high salt stress on growth and fatty acids content of the unicellular green alga *Chlorella vulgaris* / *Az. J. Microbiol.* – 2002. – № 55. – pp. 181–191.