

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ ХАРКІВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ДЕПОНУВАННЯ ІОНІВ
МІДІ В КЛІТИНАХ DUNALIELLA VIRIDIS У ПРОЦЕСІ
АДАПТАЦІЇ ДО СІРЧАНОКИСЛОЇ МІДІ**

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Семенової Тетяни Андріївни

Допущена до захисту «__»_____ 20 р.

Завідувач кафедри _____

Науковий керівник:
доцент, к.б.н.
Голтвянський А.В.

Оцінка «_____»

«__»_____ 20 р.

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

У роботі було досліджено здатність клітин мікроводоростей вихідної культури *Dunaliellaviridis*D.v-Cu.S і резистентної до іонів міді культури D.v-Cu.R депонувати та утримувати іони міді.

Отримані дані свідчать про те, що біомаса клітин водоростей D.v-Cu.S і D.v-Cu.R має відмінності щодо здатності депонувати іони міді, а саме після механічного впливу (гомогенізації) та додаткового внесення 7 г/л сірчаноокислої міді, що виражалось в кількості зв'язаної міді та більшому ступені утримання іонів міді компонентами зруйнованих клітин.

Встановлено, що у біомасі клітин D.v-Cu.R співвідношення між іонною формою і хелатною формою міді зміщене в бік іонної форми міді.

Результати показали, що біомаси, отримані з клітин D.v-Cu.S та D.v-Cu.R після гомогенізації, різнилися між собою за кольором, що вказує на зміну структури пігментів (хлорофіл, каротиноїди), та за ступенем агрегованості клітинних компонентів. Механічне руйнування клітин D.v-Cu.S супроводжувалося переходом у водне середовище відносно невеликої кількості амінокислот, пептидів, білків, що поглинали в ділянці від 220 до 280 нм, і пігментів, що поглинали в ділянці 400-500 і 670 нм

Додаткове внесення сірчаноокислої міді в концентрації 7 г/л до біомаси D.v-Cu.S і D.v-Cu.R мікроводоростей після гомогенізації супроводжувалося значним зменшенням екстрактивності клітинних компонентів мікроводоростей у водне середовище, що зумовлено формуванням мідьвмісних біокомплексів.

Робота включає 55 сторінки, містить 8 рисунків. Список джерел літератури містить 45 джерела, з них 43 іноземні.

Ключові слова: *Dunaliella viridis*, іони міді, культуральна рідина, резистентність.

ABSTRACT

In the work, the ability of cells of microalgae of the original culture *Dunaliellaviridis*D.v-Cu.S and the culture resistant to copper ions D.v-Cu.R to deposit and retain copper ions was investigated.

The obtained data indicate that the biomass of D.v-Cu.S and D.v-Cu.R algae cells has differences in the ability to deposit copper ions, namely after mechanical impact (homogenization) and additional introduction of 7 g/l of copper sulfate, which was expressed in the amount of bound copper and the higher degree of retention of copper ions by the components of destroyed cells.

It was established that in the biomass of D.v-Cu.R cells, the ratio between the ionic form and the chelate form of copper is shifted towards the ionic form of copper.

The results showed that the biomass obtained from D.v-Cu.S and D.v-Cu.R cells after homogenization differed among themselves in terms of color, which indicates a change in the structure of pigments (chlorophyll, carotenoids), and the degree of aggregation of cellular components. Mechanical destruction of D.v-Cu.S cells was accompanied by the transition to the aqueous environment of a relatively small amount of amino acids, peptides, proteins that absorbed in the region from 220 to 280 nm, and pigments that absorbed in the region of 400-500 and 670 nm.

Additional addition of copper sulfate at a concentration of 7 g/l to the biomass of D.v-Cu.S and D.v-Cu.R microalgae after homogenization was accompanied by a significant decrease in the extractability of cellular components of microalgae into the aqueous medium, which is due to the formation of copper-containing biocomplexes.

The work includes 55 pages, contains 8 figures. The list of literature sources contains 45 sources, of which 43 are foreign.

Key words: *Dunaliella viridis*, copper ions, culture fluid, resistance.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	8
1.1. Специфічне і неспецифічне зв'язування компонентами клітин водоростей іонів міді	8
1.2. Роль металлотіонеїнів та фітохелатинів у процесі адаптації до іонів міді	20
1.3. Часовий характер збереження стійкості (резистентності) культур мікроводоростей до високих концентрацій металів	27
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	35
2.1 Об'єкт дослідження та умови культивування.....	35
2.2. Процедура отримання маткової культури <i>D. viridis</i>	37
2.3 Спосіб отримання хелатної форми міді в клітинах <i>Dunaliella viridis</i>	38
2.4 Спосіб отримання іонної форми міді в клітинах <i>Dunaliellaviridis</i>	39
2.5 Визначення вмісту міді.....	39
2.6 Визначення екстрактивності компонентів водоростей	40
2.7 Статистичні методи	40
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	41
3.1. Дослідження «здатності» біомаси культур мікроводоростей D.v-Cu.S і D.v-Cu.R зв'язувати іони міді	41
3.2. Дослідження «екстрактивності» біологічно активних компонентів із біомас клітин D.v-Cu.S та D.v-Cu.R. після додаткового внесення до них 7 г/л сірчаної кислоти міді	44
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	50

ВСТУП

Мідь (Cu) є одним відомим із важливих металів та являється незамінним для мікробіоти. Мідь зустрічається у вигляді самородної міді в мінеральній формі або частіше в більш ніж 150 мінералах, переважно пов'язаних з сіркою або карбонатом. Прикладами найпоширеніших мінералів міді є халькопірит (CuFeS_2), борніт (Cu_5FeS_4), ковеліт (CuS), халькоцит (Cu_2S), азурит ($\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$), малахіт ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$) і куприт (Cu_2O). Хоча деякі з цих елементів є шкідливими забруднювачами навколишнього середовища. В останні століття діяльність людини призвела до забруднення земель і вод важкими металами. [12]

Звідки з'являються у навколишньому середовищі ці сполуки міді? Взагалі, основні джерела із яких надходять важкі метали поділяються на два типи, це такі як природні джерела, прикладами такого типу можуть бути, викиди вулканів, лісові пожежі, глибоководні джерела та гейзери. Другий тип джерел включає в себе, гірничо-металургійні підприємства, метал-виробничі підприємства, лакофарбова промисловість, шкіряні заводи. Вищі концентрації міді досягають ґрунту і води в безпосередній близькості від мідеплавильних заводів та електротехнічної промисловості. Також з основних джерел забруднення міддю можуть бути добрива, пестициди та антиобростаючі фарби (оксид міді та тіоціанат міді). Можуть з'являтися через промислові, цивільні або сільськогосподарські стічні води, і оскільки вони не можуть бути розщеплені, вони вважаються стійкими забруднювачами та небезпечними для людини та екосистем. [28]

В результаті цих різних джерел забруднення загальна концентрація міді в окисних водних системах сильно варіюється. Концентрації у прісній воді коливаються від $0,3\text{-}3 \cdot 10^{-8}$ М загальної міді для незабруднених озер і річок до 10^{-6} М загальної міді в річках і озерах у гірничодобувних районах. У морських водах концентрації, за даними досліджень, становлять від $5 \cdot 10^{-10}$ М для незабруднених районів до $6 \cdot 10^{-7}$ М для сильно забруднених

естуаріїв. Для незабруднених вод концентрації вільних іонів міді коливаються між $10-16 \cdot 10^{-9}$ М у прісній воді та $10-13 \cdot 10^{-12}$ М у морській воді. [12]

Мікрводорості - це водні фотосинтезуючі організми, які мають здатність необхідно та несуттєво розрізняти іони важких металів, які їм необхідні для росту, для цього процесу вони потребують як макроелементів (наприклад, азоту, фосфору, кремнію), так і мікроелементів (наприклад, вітамінів). Мікрводорості являються дуже важливими об'єктами, які зможуть видаляти ці важкі метали із забруднених стічних вод. Але в цьому є свої недоліки, наприклад, при відносно високих концентраціях важких металів вони також можуть виявляти ознаки стресу, такі як порушення органел і підвищення активності антиоксидантних ферментів. [28]

Водорості, зокрема *Dunaliella viridis*, є важливими моделями для вивчення механізмів адаптації до стресових умов, включаючи вплив токсичних металів на клітинні процеси. Мідь є одним з таких токсичних металів, і її вплив на клітини *Dunaliella viridis* може вивчити механізми адаптації цих водоростей до стресу від міді, а також допоможе краще зрозуміти, як клітини реагують на стресові умови та адаптуються до них.

Дослідження механізму депонування іонів міді в клітинах *Dunaliella viridis* у процесі адаптації до сірчаноокислої міді має важливе значення для розуміння відповідей клітин водоростей на зміну навколишнього середовища та може бути корисним для подальшого дослідження метаболічних шляхів, що регулюють обіг міді в клітинах водоростей. [18]

У зв'язку з цим метою роботи було: дослідити механізми депонування іонів міді в клітинах *Dunaliella viridis* у процесі її адаптації до сірчаноокислої міді.

Об'єкт роботи: одноклітинні зелені водорості *Dunaliella viridis*.

Предмет роботи: механізми адаптації *Dunaliella viridis* до сірчаноокислої міді та депонування власне самої міді у її клітинах.

Завдання роботи:

1. Дослідити спроможність клітин мікроводоростей D.v-Cu.S і D.v-Cu.R депонувати іони міді.
2. Визначити здатність біомаси клітин D.v-Cu.S і D.v-Cu.R утримувати іони міді після механічного впливу (гомогенізації) та додаткового внесення іонів міді.
3. Оцінити екстрактивність клітинних компонентів водоростей у водне середовище після додаткового внесення сірчаної кислоти міді до гомогенату біомаси D.v-Cu.S і D.v-Cu.R.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Специфічне і неспецифічне зв'язування компонентами клітин водоростей іонів міді

Мідь є важливим мікроелементом для прісноводних водоростей, як і для інших організмів. Вид та іонний заряд іонів металів, організм водоростей і хімічний склад розчину іонів металів – це все залежить від механізму зв'язування компонентами клітин водоростей іонів металу. Для того, щоб можливо було ефективно використовувати біомасу водоростей для очищення води та регенерації металу, важливо розуміти хімічну природу процесу зв'язування металу.[4]

Процес зв'язування іонів важких металів з клітинною стінкою водоростей може бути специфічним або неспецифічним.

Специфічне і неспецифічне зв'язування іонів міді компонентами клітин водоростей може відбуватися за різними механізмами, залежно від типу водоростей та умов оточуючого середовища. Основні механізми зв'язування включають хімічне зв'язування, адсорбцію та електростатичні взаємодії. [14]

Специфічне зв'язування компонентів клітинної водоростей іонів міді відбувається за допомогою спеціалізованих біомолекул або структур, які можуть специфічно взаємодіяти з міддю. Такими структурами можуть бути металоутворюючих білків або фітохелатинів. [38] Це білки, які складають у собі спеціальні природні комплексоутворюючі групи, такі як гістидинові залишки чи цистеїнові петлі, які можуть зв'язувати іони металів, включаючи іони міді. Ці молекули мають афінність до іонів міді та сприяють їх утриманню на поверхні клітин або внутрішній частині клітини. Таке специфічне зв'язування може відбуватися через іонно-молекулярні взаємодії, комплексоутворення або інші специфічні молекулярні взаємодії.[8]

Специфічне зв'язування іонів міді компонентами клітин водоростей, такими як металотіонеїни і фітохелатини, відбувається за допомогою специфічних біохімічних механізмів. Цей процес складається з декількох етапів. [4]

По-перше, це визначення іонів міді, тобто клітинні рецептори або інші білкові компоненти клітини розпізнають присутність іонів міді у зовнішньому середовищі. По-друге, відбувається активація синтезу металотіонеїни і фітохелатини. На даному етапі здійснюється відповідь на виявлення іонів міді, клітина активує синтез специфічних білків - металотіонеїнів і фітохелатинів. Як $Cu(II)$, так і $Cu(I)$ дуже ефективно зв'язуються з органічними молекулами завдяки своїй високій електронній спорідненості. Дослідження специфічного зв'язування іонів міді компонентами клітин водоростей, зокрема *Dunaliella viridis*, є важливим для розуміння механізмів, що лежать в основі адаптації цих мікроорганізмів до стресу від токсичних металів. Іони міді можуть взаємодіяти з різними клітинними компонентами, такими як білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти та інші, викликаючи різноманітні клітинні відповіді. [28]

Продовження процесу включає в себе зв'язування міді з металотіонеїнами. Металотіонеїни мають високу афінність до іонів міді, це означає, що вони можуть зв'язувати ці метали та утворювати стійкі комплекси, що допомагають у їхній детоксикації та уникненні токсичних ефектів. Комплекси міді з компонентами клітин водоростей утворюються завдяки хелатувальним властивостям спеціалізованих молекул. [28]

Це специфічне зв'язування відбувається через ковалентні та координаційні зв'язки між цистеїновими залишками та іонами міді, що забезпечує надійне утримання міді у водоростей. Металотіонеїни містять сульфідні групи (-SH), які є активними центрами для зв'язування металів. Ці цистеїнові залишки організовані у два кластери: альфа-домен (C-кінцевий) та бета-домен (N-кінцевий), що дозволяє зв'язувати метали.

Вони можуть утворювати комплекси з іонами міді, які стабілізують ці іони та забезпечують їх детоксикацію. А так як фітохелатин є пептидом, які утворюються з амінокислот, що містять тіолові групи (-SH), то вони також можуть зв'язуватись з металом та утворювати комплекси, що сприяють детоксикації та уникненню токсичних ефектів міді. Це відбувається завдяки великій кількості тіолових груп цистеїну, тому вони здатні ефективно зв'язувати іони важких металів, утворюючи стабільні хелатні комплекси.[16]

Зв'язування металів тіоловими групами цистеїну допомагає регулювати внутрішньоклітинні рівні важких металів, забезпечуючи оптимальний баланс між їхньою наявністю та необхідністю для клітинних процесів. Завдяки утворенню міцних метал-тіолових комплексів, металотіонеїни стабілізують зв'язані метали, перешкоджаючи їхньому взаємодії з іншими біомолекулами, що може призвести до клітинного ушкодження. Завдяки своїй здатності зв'язувати метали через тіолові групи цистеїну, вони забезпечують ефективний механізм адаптації клітин до несприятливих умов.[16]

Далі відбувається формування комплексу мідь-фітохелатин, на цьому етапі фітохелатин також може зв'язуватись з іонами міді і також може утворювати комплекси, які допомагають знизити токсичність міді у клітинах водорості. Фітохелатини утворюють хелатні кільця з іонами міді, що дозволяє ефективно зв'язувати та транспортувати іони всередині клітини. Хелатування також запобігає вільному руху іонів міді та їхньому потенційному токсичному впливу. Фітохелатини синтезуються з глутатіону під дією ферменту фітохелатин-синтази (PCS) у відповідь на підвищення концентрації важких металів у клітинах.[28]

І завершується цей процес тим, що утворені комплекси мідь-металотіонеїн та мідь-фітохелатин можуть бути транспортовані до вакуолей, де мідь може бути ізольована і зберігатися без шкоди для

клітини. У мікродоростей специфічні білки-транспортери забезпечують ефективне переміщення іонів міді до вакуолей, що дозволяє адаптуватися до умов з високим вмістом важких металів. Саме транспортування іонів міді важливим процесом для клітин мікродоростей, так як це підтримує гомеостаз металів, це забезпечує ефективну детоксикацію іонів міді та запобігає їх токсичному впливу на клітинні структури. У вакуолях іони міді залишаються зв'язаними з фітохелатинами, що дозволяє підтримувати гомеостаз металів у клітині та запобігає їхньому токсичному впливу на інші органели та молекули. [16]

Для чого це потрібно? По-перше, так як вакуолі вважаються спеціалізованими органелами, які можуть ізолювати токсичні речовини, включаючи важкі метали, то слід зазначити, що транспортування іонів міді до вакуолей дозволяє знизити їхню концентрацію в цитоплазмі, що допомагає захистити клітину від металевого стресу і токсичності. По-друге, саме вакуолі забезпечують оптимальний рівень іонів міді в цитоплазмі, для того щоб організм міг нормально функціонувати. Це дозволяє клітині швидко реагувати на зміни концентрації міді в навколишньому середовищі та уникати токсичних ефектів при її надлишку. Також потрібно зазначити, що вільні іони міді можуть каталізувати утворення активних форм кисню (АФК), тобто спричиняти окислювальний стрес та пошкодження клітинних структур. Тому ізоляція міді у вакуолях мінімізує ризик утворення АФК та пов'язаних з цим ушкоджень. А також у деяких випадках вакуолі можуть грати роль у процесах виведення токсичних металів з клітини. Комплекси іонів міді з фітохелатинами можуть транспортуватися до вакуолей для подальшого виведення з клітини через екзоцитоз. [11]

Таким чином, специфічне зв'язування іонів міді компонентами клітин водоростей включає ряд біохімічних етапів, що забезпечують захист клітини від токсичності металу та регулювання його концентрації у внутрішньоклітинному середовищі.

Специфічне зв'язування має ряд біологічних значень, таких як детоксикація, тобто за допомогою специфічного зв'язування водорості детоксикують іони міді і цим вони знижують їх токсичний вплив, а також забезпечують виживання в умовах забруднення. Ще одним важливим значенням є те, що водорості, які зв'язуються специфічно здатні адаптуватися до високих концентрації важких металів у середовищі. Розуміння механізмів специфічного зв'язування іонів міді може сприяти розробці біотехнологій для очищення забруднених середовищ, використовуючи водорості.[31]

Дослідження специфічного зв'язування може включати в себе використання різних методів, таких як спектроскопія, мас-спектрометрія, флуоресцентна мікроскопія. Ці методи дозволяють вивчати взаємодію іонів міді з конкретними клітинними компонентами, встановлювати місця їх зв'язування та визначати можливі функціональні наслідки цієї взаємодії.[28]

Неспецифічне зв'язування компонентів клітинної водоростей іонів міді вже значно відрізняється від специфічного, цей процес відбувається без наявності спеціалізованих біомолекул або структур, які можуть специфічно взаємодіяти з міддю. Цей процес часто є пасивним і менш регульованим у порівнянні зі специфічним зв'язуванням. [7]

Даний процес базується на фізико-хімічних властивостях клітинних компонентів та іонів міді. Таке неспецифічне зв'язування може бути викликане електричним зарядом клітин, полісахаридами в клітинній стінці, хімічними взаємодіями з іншими іонами та речовинами, які присутні в довкіллі водоростей. Неспецифічне зв'язування може відбуватися в умовах високих концентрацій іонів міді, коли доступні специфічні механізми зв'язування вже насичені або неспроможні забезпечити достатню детоксикацію металу. І хоча неспецифічне зв'язування може відбуватися незалежно від наявності спеціалізованих біомолекул, його ефективність та

регулятивність можуть бути меншими, ніж у випадку специфічного зв'язку.[4]

Тож, розберемося, як відбувається процес неспецифічного зв'язування. По-перше, ми знаєм, що клітинна стінка водорості може складатися із полісахаридів, білків та інших компонентів, отже вони можуть неспецифічно зв'язувати іони міді через іонний обмін та адсорбцію. Це може бути перший бар'єр, який затримує іони міді до їх проникнення всередину клітини. Так як вони можуть неспецифічно з'єднуватись з полісахаридною стінкою, то вони утворюють слабкі комплекси. [7]

Адсорбція – це процес адгезії (притягання) молекул або іонів адсорбату до поверхні адсорбента за рахунок фізичних та хімічних взаємодій.[45]

Фізична взаємодія метал-біосорбент включає електростатичні сили та слабкі сили Ван-дер-Ваальса, тоді як хімічна основа пов'язана з іонним обміном, зрушенням протонів, утворенням комплексів і хелатуванням металів. Біосорбція є швидким і оборотним процесом, коли іони з водних розчинів зв'язуються з функціональними групами, присутніми на поверхні біомаси, незалежно від клітинного метаболізму(Рис 1.1).[44]



Рис 1.1 Приклад адсорбційного методу

Ван-дер-Ваальсовські сили - це слабкі притяжні сили між атомами чи молекулами, що виникають через тимчасові зміщення електронних оболонок. Ці сили можуть діяти між будь-якими молекулами, але вони

особливо важливі для молекул без заряду. У водоростей, наприклад, групи -ОН у клітинних стінках можуть мати такі слабкі зв'язки з іонами міді через ці сили. [36]

Поверхневі структури клітинних стінок водоростей можуть зв'язуватися з іонами міді через адсорбцію, яка може відбуватися за допомогою різних біологічно активних груп, що містяться у клітинній стінці. Наприклад, карбоксильні, амінні, гідроксильні та фосфатні групи можуть бути відповідальними за зв'язування з іонами міді. Наступним етапом є те, що іони міді (Cu^{2+}) наближаються до поверхні клітинних стінок водоростей. За науковими поняттями, якщо ми говоримо про клітини водоростей, то поверхня клітини чи клітинної стінки називається адсорбентом, а іони міді є адсорбатом. Отже, адсорбат (молекула чи іон, який адсорбується) зустрічається з поверхнею адсорбента (тверде тіло чи рідина). [44]

Іони міді адсорбуються на поверхні клітини водорості внаслідок фізико-хімічних властивостей клітинної мембрани за рахунок фізичних сил, таких як ван-дер-Ваальсівські сили або гідрофобні взаємодії. Ці сили виникають через тимчасові диполі, що утворюються внаслідок руху електронів. Ці сили є слабкими і виникають через миттєві дипольні моменти між іонами міді та молекулами поверхні водоростей. Створені тимчасові диполі взаємодіють між собою, створюючи слабкі притягальні сили, відомі як Ван-дер-Ваальсовські сили. Вони діють на невеликій відстані та є слабшими, ніж хімічні зв'язки. [44]

Електрони в атомах -ОН груп можуть тимчасово зміщатися, створюючи тимчасовий диполь в молекулі. Цей диполь може взаємодіяти з диполями в молекулі іону міді. Взаємодія між тимчасовим диполем в групі -ОН і диполями в молекулі іону міді створює слабку, але ефективну притягальну силу, що сприяє адсорбції іону на поверхні клітини. Створені тимчасові диполі можуть взаємодіяти між собою, створюючи слабкі

притягальні сили, відомі як Ван-дер-Ваальсовські сили. Це притягання може сприяти адсорбції іонів міді на поверхні клітини водоростей. [45]

Диполь - це молекула, у якій заряд від'єднаний. Це означає, що в молекулі існують два центри заряду: один позитивний, а інший негативний. Це створює різницю у потенціалі між двома центрами, що призводить до виникнення електричного поля навколо молекули.[44]

У водоростей, де процес адсорбції металевих іонів може відбуватися через Ван-дер-Ваальсовські сили, на поверхні клітин можуть знаходитися молекули з дипольними властивостями, такі як органічні сполуки з гідроксильними (-ОН) або карбоксильними (-COOH) групами. Ці групи можуть утворювати диполь, оскільки атоми водню (H) мають вищу електронегативність, ніж атоми карбону (C) або кисню (O), створюючи негативну та позитивну області у молекулі. [45]

Під час адсорбції, молекули з дипольними властивостями можуть взаємодіяти з іонами металів через електростатичні сили. Наприклад, негативна область диполя може притягати позитивно заряджені іони металів, такі як іони міді, що сприяє їх адсорбції на поверхні клітин.[44]

Наступним етапом відбувається десорбція, тобто етап, коли адсорбат відокремлюється від поверхні адсорбента. Цей процес може відбуватися спонтанно або за умови зміни умов, наприклад, температури, рН середовища тощо. [44]

Процес адсорбції іонів міді може впливати на клітини водоростей, змінюючи їх фізіологічні властивості або активуючи захисні механізми. Цей процес взаємодії може відігравати важливу роль у зміні властивостей клітин водоростей під час взаємодії з іонами міді. [45]

Іонний обмін - це процес, при якому іони в одній речовині або розчині заміщуються іонами із середовища, з яким вони контактують. Цей процес відбувається через взаємодію заряджених частинок, які можуть бути як атоми, так і молекули, і відіграє важливу роль у біологічних та хімічних процесах. [33]

Іонний обмін вважається одним із основних механізмів, за допомогою якого клітинні стінки водоростей взаємодіють з іонами міді. Щоб забезпечити ефективне зв'язування іонів міді, у клітинній стінці водоростей є така особливість містити безліч функціональних груп, здатних до іонного обміну. Відбувається цей іонний обмін між поверхневими структурами клітинних стінок водоростей та іонами міді через складну взаємодію між зарядженими частинками, які включають як іони металів, так і функціональні групи, що знаходяться на поверхні клітинних стінок (Рис. 1.1).[33]

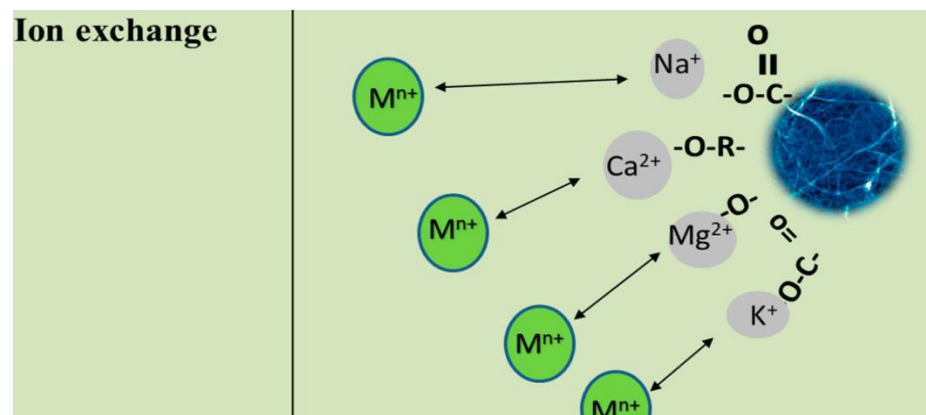


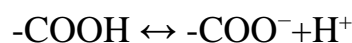
Рис.1.2 Приклад іонного обміну

Тобто, це означає зв'язування іонів міді клітинами водоростей за допомогою поверхневих заряджених груп компонентів клітин, такими як полісахариди, білки і інші біомолекул, які містять різні функціональні групи (карбокисильні, сульфатні, фосфатні та аміногрупи), за рахунок електростатичних взаємодій. Мембранні ліпіди можуть брати участь у зв'язуванні іонів міді шляхом гідрофобних взаємодій та іонних зв'язків з полярними головками фосфоліпідів. Цей механізм менш специфічний, ніж зв'язування білками, але все ж може сприяти зменшенню концентрації вільних іонів міді. Ці взаємодії не залежать від конкретних рецепторів або транспортерів, а тільки від загальної електростатичної сумісності між іонами міді і зарядженими компонентами клітинної поверхні.[33]

Такий процес відбувається тоді, коли іони міді наближаються до поверхні клітин водоростей. В цей час, клітинна поверхня водорості часто має негативний заряд із-за наявності хімічних груп на клітинній стінці та мембрані. Заряд може коливатися тоді коли відбувається зниження або підвищення рН, тоді негативний заряд поверхні збільшується, що підсилює електростатичне притягання катіонів. Процес дисоціації включає втрату або прийом протонів (H^+), що призводить до утворення заряджених іонів. Наприклад, функціональні групи на поверхні клітинних стінок можуть дисоціювати, залежно від рН середовища, утворюючи заряджені частинки, такі як:[33]

- Карбоксильні групи ($-COOH$) можуть дисоціювати до карбоксилатів ($-COO^-$). Якщо середовище кисле, тобто рН низьке, то карбоксильні групи існують в протонованій формі ($-COOH$). Але, якщо середовище перебуває у нейтральному або лужному середовищі, це тоді коли рН високе, карбоксильні групи дисоціюють до карбоксилатних аніонів ($-COO^-$).

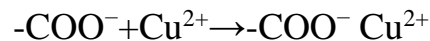
Реакція дисоціації:



- Сульфатні групи ($-SO_4$) можуть дисоціювати до сульфатних аніонів ($-SO_4^-$). Так само, як і в попередньому випадку, якщо середовище кисле, то сульфатні групи можуть бути частково протонованими ($-SO_4H$). А у нейтральному або лужному середовищі вони дисоціюють до сульфатних аніонів ($-SO_4^-$).
- Фосфатні групи ($-PO_4$) можуть дисоціювати до фосфатних аніонів ($-PO_4^-$).
- Аміногрупи ($-NH_2$) можуть протонуватися, утворюючи амонійні групи ($-NH_3^+$). [4]

Через наявність аніонних груп, клітини водоростей мають негативний заряд, тому це сприятливі умови для притягання катіонів, таких як Cu^{2+} . Іони міді (Cu^{2+}) у водному середовищі наближаються до

поверхні клітинних стінок, де вони можуть взаємодіяти з дисоційованими функціональними групами, утворюючи координаційні комплекси.



Координаційні зв'язки з важливими металами є важливими в цьому поєнні. Вони відіграють важливу роль у детоксикації та регуляції концентрацій цих металів у біологічних системах. За допомогою цих зв'язків можуть знижувати токсичність важких металів, зв'язуючи їх у стабільні комплекси і запобігаючи взаємодії з клітинними компонентами, такими як білки, нуклеїнові кислоти та мембрани, які можуть бути пошкоджені вільними іонами металів. [33]

Потім іони міді заміщують інші катіони (наприклад, H^+ , Na^+ , Ca^{2+}), які вже зв'язані з функціональними групами на поверхні клітинних стінок.

Іони, які були заміщені іонами міді, вивільняються у водне середовище. Наприклад, протони (H^+), іони натрію (Na^+), або іони кальцію (Ca^{2+}) можуть повернутися у розчин. Процес іонного обміну продовжується до досягнення рівноваги, коли концентрації іонів на поверхні клітинних стінок і в розчині стабілізуються.

Після того як іони міді зв'яжуться може виникнути зміни у структурі клітинних стінках водоростей. Ці зміни можуть включати [37]:

1. Зміни у конфігурації полісахаридів і білків.
2. Зміни у заряді та гідрофільності поверхні.
3. Підвищення механічної міцності клітинних стінок.

Іонний обмін між клітинними стінками водоростей та іонами міді є складним процесом, що включає взаємодію різних функціональних груп на поверхні клітинних стінок з іонами міді. Цей процес є важливим механізмом адаптації водоростей до високих концентрацій важких металів і відіграє ключову роль у детоксикації водного середовища. [33]

Ці процеси неспецифічного зв'язування відіграють роль у взаємодії клітини з іонами міді, проте їхній внесок у регулювання концентрації та

детоксикацію міді зазвичай менший порівняно зі специфічним зв'язуванням через металотіонеїни та фітохелатини.[38]

Неспецифічне зв'язування має важливе біологічне значення. Це наприклад, таке як захист від токсичності. Тобто таке зв'язування допомагає захистити, знизуючи концентрацію іонів міді у вільному стані, що зменшує токсичний вплив на клітини водоростей. Також до важливих біологічних значень можна віднести адаптацію до стресових умов, тобто тобі, коли водорості здатні зв'язуватись з іонами міді і виживати в забруднених середовищах, можна сказати що це їм дає еволюційну перевагу. І ще одне значення можна додати, а саме це біоремедіація. Так як, водорості здатні до неспецифічного зв'язування, вони можуть використовуватись для очищення водних середовищ від важких металів. [28]

Загалом вважається, що токсичність міді в основному спричинена неспецифічним зв'язуванням міді з фізіологічно важливими біомолекулами. Мідь може блокувати важливі біологічні функціональні групи біомолекул, витіснити основні метали в біомолекулах і змінювати активну конформацію біомолекул. Зокрема, мідь безпосередньо інгібує різні ферментні системи, наприклад, каталазу, лужну фосфатазу, а також має прямий вплив на окисне фосфорилування і фотосинтез. [8]

Нижче, я схематично представила порівняльну характеристику специфічного та неспецифічного зв'язування у вигляді таблиці.

Таблиця 1.1

Характеристика специфічного та неспецифічного зв'язування

Характеристика	Специфічне зв'язування	Неспецифічне зв'язування
Молекули	Металлотіонеїни, фітохелатини	Клітинні стінки, мембранні ліпіди, інші білки
Афінність	Висока	Низька

Функція	Детоксикація, транспортування, регуляція концентрації металів	Захисна, буферна
Локалізація	Цитоплазма, органели, мембрани	Клітинна стінка, мембрани
Механізм	Координаційні зв'язки з тіоловими групами цистеїну, утворення стабільних комплексів	Іонні та координаційні взаємодії з полісахаридами, ліпідами та іншими білками

У більшості випадків специфічне зв'язування виявляється більш ефективним для регулювання концентрації іонів міді в клітинах водоростей, оскільки воно дозволяє точно контролювати цей процес і виключити відповідь на випадкові зовнішні впливи.[25]

Специфічне зв'язування іонів міді компонентами клітин водоростей є важливим для ефективної детоксикації та регуляції концентрацій металів. Неспецифічне зв'язування, хоча й менш афінне, також відіграє роль у буферизації та захисті клітин від надлишкових іонів міді. Разом ці механізми забезпечують адаптацію водоростей до умов підвищеного металевого стресу та підтримують їх виживання в забруднених середовищах. [16]

1.2. Роль металлотіонеїнів та фітохелатинів у процесі адаптації до іонів міді

Такі організми як водорості можуть піддаватися стресовим чинникам як в природних так і в штучних умовах. Прикладами таких умов можна назвати такі фактори[1]:

1. Фізичні. До них належать температура, яка може бути або дуже висока або низька, також мікрородості можуть піддаватись стресу при перегріві чи переохолодженні. Коли дуже висока інтенсивність світла або навпаки назька. Також зазнають стресу, коли недостатньо води і виникає посуха.
2. Хімічні. Важжається вплив на водорості солями, важкими металами, кислотністю середовища.

До цих факторів стресу мікрородості можуть пристосовуватися, а називають таке явище терміном «акламація» або як всі звикли цей термін називати «адаптація». Тобто, даний термін означає, що біологічний об'єкт здатен змінювати наприклад, свою структуру або фізіологію або свою поведінку для того, щоб пристосуватися до певних змін. [1]

Адаптація мікрородостей до важких металів, таких як мідь є складним процесом, який включає ряд механізмів і стратегій, спрямованих на забезпечення виживання та функціонування клітин в умовах стресу від металів.[25]

Важливу роль у процесі адаптації до іонів міді відіграють металотіонеїни (МТ) і фітохелатини (ФХ). Металотіонеїни (МТ) та фітохелатини (ФХ) є класом малих цистеїнових білків, які відіграють важливу роль у метаболізмі металів у біологічних системах. Вони забезпечують детоксикацію, гомеостаз металів та захист від окислювального стресу. [13]

МТ — це білки з низькою молекулярною масою, багаті цистеїном, які беруть участь у детоксикації металів і регуляції іонів металів у клітинах. Вони можуть зв'язуватися з іонами металів, наприклад міді, і захищати клітини від їх токсичної дії. Залізо, цинк, марганець, нікель, кобальт, молібден і в тому ж числі мідь, являються дуже найнеобхіднішими для клітинного метаболізму, а також є частиною металопротейнів, які в свою чергу відіграють роль у деяких клітинних

функціях, особливо транспорт електронів і захист клітин від активних форм кисню.[5]

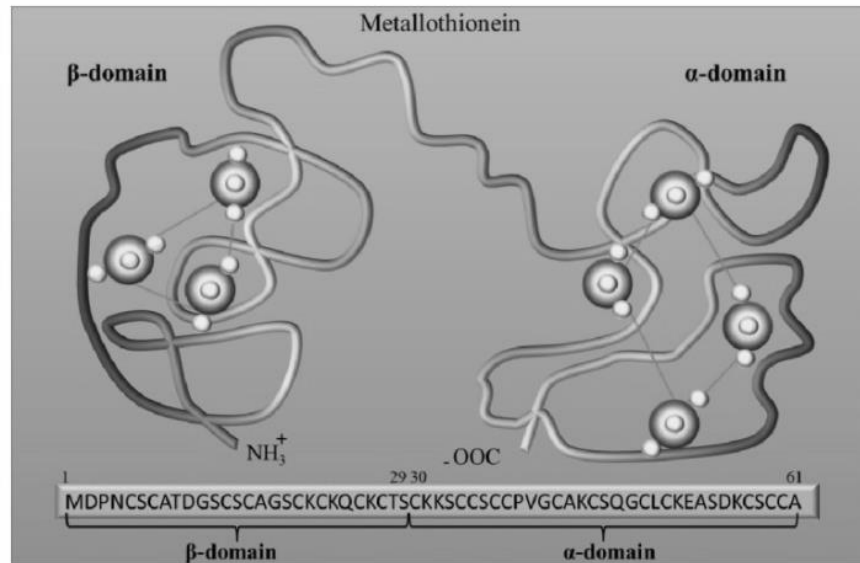


Рисунок 2.1 Структура металотіонеїну (МТ). Модель двох сайтів зв'язування металотіонеїну. Великі кульки - це атоми металу, а маленькі кульки - це атоми сірки.

Фітохелатини – це невеликі пептиди, багаті цистеїном, здатні зв'язувати метал, зокрема іони кадмію, ртуті, свинцю та інших. Виробляється ферментом фітохелатинсинтази. Фітохелатини синтезуються в реакції між глутатіоном (трипептидом, який містить глутамінову, цистеїнову та гліцинову залишки) та іонами важких металів. Цей процес сприяє детоксикації металів та їх виведенню з клітини. Фітохелатини складаються з послідовності амінокислот, включаючи цистеїн, які повторюються декілька разів у молекулі. Ці амінокислоти мають тіолові групи (-SH), які є активними центрами для зв'язування металів. Вони відіграють важливу роль у хелатуванні та детоксикації важких металів, включаючи мідь, у рослинах та мікробіотах.[24]

Металотіонеїни та фітохелатини - це специфічні біологічні молекули, які відіграють важливу роль у регуляції та детоксикації важких металів у клітинах багатьох організмів, включаючи рослини, водорості, гриби та тварин. [20]

Металотіонеїни та фітохелатини грають ключову роль у регуляції рівнів та детоксикації важких металів, включаючи іони міді (Cu). Їхні функції в адаптації до міді досить складні. [11]

Металлотіонеїни та фітохелатини часто діють разом у процесах детоксикації та регуляції металів. Металлотіонеїни можуть зв'язувати надлишкові іони міді та регулювати їхню концентрацію, тоді як фітохелатини забезпечують їхнє хелатування та транспортування до вакуолей для довготривалого зберігання. Ця синергічна дія дозволяє мікробдоростям ефективно адаптуватися до умов з підвищеною концентрацією міді, забезпечуючи їх виживання та збереження життєдіяльності. [32, 35]

Вони можуть утворювати комплекси, які будуть стійкі з іонами міді, і це дозволить їм зберігати метали в неактивній формі та запобігати їхній токсичності для клітин. А також вони можуть брати участь у тому, щоб транспортувати мідь через мембрани клітин, для того щоб регулювати її в концентрацію в клітині. Іони міді можуть спричиняти утворення вільних радикалів та інших окислювальних сполук в клітинах. Металотіонеїни та фітохелатини можуть допомагати у нейтралізації цих сполук та запобіганні окислювальному стресу. Обидва типи сполук мають антиоксидантні властивості, що допомагають клітинам захищатися від стресу, викликаного окиснювальною активністю металів. [21]

Антиоксидантні ферменти – це супероксиддисмутаза (SOD), яка розщеплює аніони супероксиду на пероксид водню, а також каталаза (КТ), глутатіонпероксидаза (ГП), аскорбатпероксидаза (АП) і пероксиредоксин (ПРК), які перетворюють пероксид водню на воду і кисень. А каталаза і пероксидази, здатні розкладати H_2O_2 до води і кисню, зменшуючи оксидативний стрес. Також в процесі є важливі низькомолекулярні антиоксиданти, такі як глутатіон (GSH), він важливий для детоксикації активних форм кисню та підтримання редокс-гомеостазу. Аскорбат (вітамін С), залучений до знешкодження вільних радикалів. [6]

Обидва ці класи молекул важливі для водоростей, оскільки допомагають їм виживати та адаптуватися до навколишнього середовища, яке може містити різні токсичні метали.[43]

Металотіонеїни знаходяться скрізь в живих організмах і відіграють таку важливу роль як у постачанні необхідних металів до клітини, так і в транспортуванні токсичних металів в інші органели, де вони потрібні для функціонування білків та ферментів. У мікрководоростей металлотіонеїни допомагають адаптуватися до умов з високим вмістом важких металів, забезпечуючи детоксикацію та зберігання іонів міді. А також було припущено, що вони діють як поглиначі вільних радикалів, таким чином захищаючи клітини від окислювального стресу. [23]

Нижче представлено ще декілька пунктів про роль металотіонеїнів у процесі адаптації до іонів міді [5] :

1. МТ мають високу афінність до іонів міді та інших важких металів. Це дозволяє їм утворювати стабільні комплекси з металами, зменшуючи їх токсичність для клітин. Таким чином, МТ допомагають зберегти життєздатність клітин при високих концентраціях металів.
2. МТ можуть брати участь у внутрішньоклітинному транспорті міді, що дозволяє клітині регулювати концентрацію міді у відповідь на зовнішні стресові умови. Це важливо для підтримки оптимального рівня металу для клітинних процесів.
3. МТ можуть брати участь у різних метаболічних процесах, що сприяє підтримці життєдіяльності клітин під час стресу від металів.
4. синтез МТ може бути збільшений у відповідь на стресові умови, такі як високі концентрації металів. Це дозволяє клітині швидше адаптуватися до стресу та зберігати життєздатність.

Отже, узагальнюючи, можна зробити такі висновки, що металотіонеїни виконують таку важливу роль у забезпеченні клітини міддю

та іншими важкими металами, контролюючи їхню концентрацію та забезпечуючи їхню доступність для клітинних процесів. Різноманітні методи аналізу, включаючи хроматографічні, електрофоретичні, спектроскопічні, біохімічні та генетичні техніки, дозволяють детально досліджувати металотіонеїни та їхню функціональність.[24]

Фітохелатини також є важливими у процесі адаптації клітин водоростей до іонів міді. Фітохелатини є важливими компонентами захисної системи мікрободоростей від токсичної дії важких металів, включаючи мідь, і виконують ключову роль у детоксикації та збереженні рівноваги металів у клітинах. У мікрободоростей фітохелатини відіграють важливу роль у детоксикації важких металів та підтримці гомеостазу металів, що дозволяє їм виживати в умовах підвищеної концентрації міді. Їх роль в адаптації до іонів міді включає [27] :

1. Утворення комплексів з іонами міді та іншими важкими металами, знижуючи їхню токсичність для клітин. Це допомагає зберегти життєздатність клітин при високих концентраціях металів. Ці комплекси можуть транспортуватися до вакуолей, де мідь зберігається в ізольованій формі, що додатково захищає клітину від токсичного впливу.
2. Стимулювання синтезу металотіонеїнів, інших білкових комплексів, що зв'язують метали та допомагають в їхній детоксикації.
3. Участь у транспорті металів через клітинну мембрану та внутрішньоклітинних процесах обміну міді, сприяючи збереженню оптимального рівня міді у клітині.
4. Захищення клітини від окислювального стресу, що часто виникає при взаємодії з металами, включаючи мідь.
5. Фітохелатини можуть впливати на генетичну експресію, активуючи генів, що кодують фактори захисту від стресу, що допомагає клітинам вижити під час стресових умов.

6. Фітохелатини захищають клітину від оксидативного стресу, викликаного іонами міді, знижуючи утворення вільних радикалів.
7. Фітохелатини допомагають підтримувати оптимальну концентрацію іонів міді в клітинах, що необхідно для нормального функціонування багатьох ферментів та метаболічних шляхів. Це дозволяє клітинам адаптуватися до змін у зовнішньому середовищі.
8. Вони також сприяють підтримці гомеостазу міді в клітині, регулюючи її концентрацію і доступність для біологічних процесів.

Таким чином, фітохелатини відіграють важливу роль у захисті клітин від токсичності міді та інших важких металів, а також у підтримці оптимального функціонування клітин у стресових умовах. Різні методи аналізу, включаючи хроматографічні, електрофоретичні та спектроскопічні техніки, дозволяють досліджувати фітохелатини з високою точністю та детальністю. [27]

У цілому, металлотіонеїни та фітохелатиніни грають важливу роль у захисті клітин від токсичності міді та інших важких металів, а також у підтримці оптимального функціонування клітин у стресових умовах, де концентрація металів є високою. Металлотіонеїни та фітохелатини є важливими компонентами клітин водоростей, які забезпечують адаптацію до високих концентрацій іонів міді. Вони виконують ключові функції у зв'язуванні, детоксикації та регуляції внутрішньоклітинного метаболізму міді, що дозволяє водоростям виживати і функціонувати в забруднених середовищах, де концентрація важких металів дуже висока. [11]

1.3. Часовий характер збереження стійкості (резистентності) культур мікрободоростей до високих концентрацій металів

З попереднього розділу про адаптацію мікрободоростей до іонів міді випливає, що саме адаптивні зміни формують стійкість об'єкта до стресових чинників. Стійкість означає, що організм здатен витримувати стресові чинники та виробляти стійкість на несприятливу реакцію, а отже нормально функціонувати. [1]

Як вже зазначалось, більшість важких металів є токсичними, якщо вони знаходяться у високих концентраціях. Високі концентрації важких металів можуть значно та негативно впливати на активність біологічно важливих молекул мікрободоростей. До таких молекул можна віднести ферменти та транспортні системи. [6]

Цікаво, що в навколишньому середовищі існує безліч металів і всі вони мають різний вплив на зелені мікрободорості, а отже і мають різну токсичність на них та впливають на різні метаболічні зв'язки. Можна навести такі приклади, мідь може викликати сильний окислювальний стрес, тоді як кадмій здатний порушувати функції білків. Високі концентрації металів можуть вимагати більш інтенсивної та швидкої адаптації. Низькі концентрації можуть сприяти поступовій адаптації без значного стресу.[17]

Мідь є есенціальним важким металом, так само як залізо, цинк та інші, оскільки вона необхідна для функціонування декількох білків і ферментів, таких як пластоціанін, цитохромоксидаза, лакказа, супероксиддисмутаза Cu/Zn та деяких інших оксидаз і дегідрогеназ. Однак надлишок цих есенціальних важких металів спричиняє стан окислювального стресу, який окислює біологічні макромолекули, такі як білки, жирні кислоти та нуклеїнові кислоти. [25]

А також важливо підкреслити, що важкі метали можуть замінювати необхідні іони металів у біомолекулах і можуть викликати у великих

кількостях виробництво (АФК), які, у свою чергу, можуть пошкодити важливі біомолекули. Серед АФК виділяють вільнорадикальні частинки – супероксидний аніон-радикал (O_2^-), гідроксильний радикал (ОН), пероксидні радикали (RO_2) і нейтральні молекули, такі як пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень, озон (O_3) та ін.[41]

Так, дійсно, більшість важких металів при високій концентрації дуже токсичні для мікрободоростей, але виходячи з цього, можна впевнено сказати, що їх токсичність може змінюватись навіть у межах однієї таксономічної групи.[14]

Токсичність або дефіцит міді залежить від потреб певного виду водоростей та вмісту міді в клітинах. Для *Scenedesmus vacuolatus* оптимальний діапазон для росту був визначений в лабораторних експериментах як $10-13 \cdot 10^{-10}$ М вільної міді (Cu^{2+}). Для прикладу, *Phaeodactylumtricornutum* перестає рости при концентраціях міді (II) $>1,5$ мкМ, а от діатомова водорість, *Thalassiosira pseudonana*, здатна рости при концентраціях міді та кадмію до 3 і 10 мкМ відповідно. Деякі Chlorophyta, здається, переносять навіть вищі концентрації міді, оскільки *Tetraselmis* sp. і *Dunaliellatertiolecta* можуть рости з 15 мкМ розчиненої міді. [15]

Існує таке поняття як часовий характер збереження стійкості (резистентності) культур мікрободоростей до високих концентрацій металів. Що означає це поняття?

Часовий характер збереження стійкості (резистентності) культур мікрободоростей до високих концентрацій металів описує, як мікрободорості реагують і адаптуються до токсичного впливу металів протягом певного часу. Цей процес включає декілька етапів і механізмів, які змінюються залежно від тривалості впливу металів, концентрації та умов середовища. Часовий характер збереження стійкості (резистентності) культур мікрободоростей до високих концентрацій металів визначається часом, тобто це означає, що протягом якогось часу культури можуть

зберігати свою здатність до росту і розвитку при впливі високих концентрацій металів у середовищі. [28]

Цей час є індивідуальним для різних видів мікрободоростей, а також залежить від їхніх адаптивних механізмів до металевого стресу. Деякі культури можуть бути стійкими до металів протягом тривалого часу, а інші можуть втрачати стійкість після певного періоду.

Часовий характер збереження стійкості культур мікрободоростей до високих концентрацій металів може бути важливим для оцінки ризику впливу металів на водні екосистеми та для розробки стратегій збереження біорізноманіття та екосистемної стійкості.[28]

Часовий характер збереження стійкості (резистентності) культури мікрободоростей до високих концентрацій металів може залежати від кількох індивідуальних факторів, таких як вид водорості, тип металу та умов середовища. [28]

Як відомо, мікрободорість може демонструвати певні ознаки стресу при високих концентраціях металів, таких як гемоліз, зупинка росту та, збільшення клітинної структури, наприклад клітини можуть змінювати свою форму, щоб зменшити площу контакту з металом. Але з часом, деякі культури водоростей можуть розвивати механізми адаптації до високих концентрацій металів, таких як активний транспорт та накопичення металів у вакуолях чи інших компартментах клітини. Існують й такі випадки, коли вони можуть зберегти стійкість до високих концентрацій металів протягом тривалого терміну, за умови, що їх середовище залишається стійким та незабрудненим. А також вони можуть розвинути ще більшу стійкість до цих металів. Протягом тривалого експонування до високих концентрацій металів може відбуватися еволюція мікрободоростей, що може призвести до появи нових видів резистентності.[21]

Відомо, що у водоростей, мідь призводить до пригнічення поділу клітин і, таким чином, до збільшення об'єму клітин з часом. Цей ефект,

ймовірно, пов'язаний з реакцією міді з глутатіоном у цитоплазмі, що призводить до зменшення співвідношення між відновленим та окисленим глутатіоном, що, в свою чергу, впливає на мітоз. Крім того, у чутливих до міді рослин спостерігається зміна ультраструктури хлоропластів. Токсичність або дефіцит міді залежить від потреб певного виду водоростей та вмісту міді в клітинах. [28]

Часовий характер збереження стійкості (резистентності) культур мікрободоростей до високих концентрацій металів визначається динамікою стресових відповідей та механізмів адаптації клітин до цих умов.[26]

У перші години після впливу високих концентрацій металів, мікрободорості швидко активують внутрішньоклітинні механізми захисту. На початковому етапі під впливом високих концентрацій металів відбуваються швидкі процеси, що можуть включати збудження або стресові відповіді в клітинах. Це включає: синтез металотіонеїнів і фітохелатинів, які зв'язують метали і знижують їх токсичність. Активацію антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза), що знижують рівень оксидативного стресу. Наприклад, супероксиддисмутаза (SOD), каталізує дисмутацію супероксидного радикала (O_2^-) до перекису водню (H_2O_2).[41]

Коли стрес триває, мікрободорості можуть розвивати специфічні механізми адаптації до високих концентрацій металів, такі як вироблення металотіонеїнів та фітохелатинів, які допомагають зберегти резистентність протягом тривалого часу та активувати різні механізми адаптації, що сприяють хелатуванню металів та детоксикації.[34]

Після певного часу може наступити стабілізація рівня резистентності, коли мікрободорості досягають сталого стану, де баланс між надходженням та виведенням металів зберігається на стійкому рівні. Якщо стрес продовжується і метал перевищує механізми захисту, це може призвести до подальшого погіршення стану мікрободоростей і навіть

до їх загибелі. Культури мікрободоростей можуть піддастися акліматизації до високих концентрацій металів, що може призводити до збільшення їхньої резистентності протягом деякого часу. Але ця адаптація може бути тимчасовою і втрачатися під впливом зміни умов. [38]

Мікрободорості адаптуються до присутності металів шляхом зміни метаболічних шляхів. Це може відбуватися декілька тижнів. Мікрободорості здатні перебудовувати метаболізм, тобто можуть виробляти певні речовини, які допомагають виживати в умовах стресу, а також можуть збільшувати ефективність енергетичних процесів.[20] Перебудова метаболізму мікрободоростей під впливом високих концентрацій металів є комплексним процесом, який включає адаптивні зміни у різних метаболічних шляхах. Це дозволяє організмам ефективніше справлятися зі стресом, зумовленим присутністю токсичних металів. Вони також змінюють мембрані структури і клітинні стінки це дає їм змогу допомогти ізолювати або видалити токсичні метали. [34]

Також існує довгострокова адаптація, яка триває від тижня до місяця. За тривалого впливу металів можуть відбуватися генетичні зміни (мутації), які підвищують стійкість до токсичних речовин. Підвищена експресія генів, що відповідають за синтез захисних білків і антиоксидантів.

У реальних умовах багато факторів можуть вплинути на збереження стійкості культури мікрободоростей до високих концентрацій металів, тому для кожної конкретної ситуації необхідно проводити індивідуальні дослідження з урахуванням умов середовища, виду мікрободоростей та типу металів.[21]

Чому так важливо вивчати часову стійкість мікрободоростей до високих концентрацій важких металів? З наукової точки зору, вивчення часового характеру стійкості мікрободоростів до збереження високих концентрацій металів має велике значення у наукових, екологічних та практичних напрямів. Здатність мікрободоростей протистояти високим

концентраціям важких металів може бути корисною для вирішення різноманітних екологічних проблем, це важливо для того, щоб розробити стратегії щодо збереження довкілля та оцінити екологічну безпеку. [45]

Наприклад, досліджуючи часовий характер збереження стійкості мікроводоростей до важких металів можна досконало зрозуміти, які саме механізми використовуються при адаптації до цих важких металів. Це може пролити світло на біологічні процеси, які відбуваються в клітинах під час стресу. Також, досліджуючи резистентність мікроводоростей до високих концентрації металів, можна побачити значення для оптимізації використання мікроводородів у біотехнології, у наприклад водоочищенні, фітормедії або біореакторах. Також можна додати, що вивчення даного розділу дозволяє нам зрозуміти такі механізми, які можуть змінити, сприяти або обмежувати розвиток стійкості до важких металів. це може бути корисно для розробки стратегій управління стійкістю.[40]

Отже, тепер виникає питання, яким чином можна дослідити резистентність? Існує низка методів за допомогою яких можна визначити резистентність культур мікроводоростей до високих концентрацій металів. До таких методів можна віднести тест на токсичність, за допомогою такого тесту можна визначити порогові концентрації металів, які викликають токсичність та вивчення адаптаційних відповідей мікроводоростей. Також, можна визначити зміни в експресії генів, пов'язаних з детоксикацією та адаптацією до металів. Цей аналіз допомагає зрозуміти молекулярні механізми адаптації та визначити ключові гени, які беруть участь у процесах детоксикації та резистентності. Генетичний аналіз дозволяє виявити молекулярні механізми, які забезпечують стійкість мікроводоростей до високих концентрацій металів. Це включає вивчення експресії генів, білків та метаболітів, пов'язаних з адаптаційними процесами. Розуміння цих механізмів є ключовим для розвитку ефективних стратегій біоремедіації та використання мікроводоростей у біотехнологіях. До цього списку можна віднести біохімічні тести, за

допомогою таких тестів можна вимірювати рівні хелатуючих агентів, таких як металлотіонеїни та фітохелатини, а також антиоксидантних ферментів. Такий тест можна зроби, наприклад, за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії (AAS). Аналіз використовуються для кількісного визначення концентрацій металів у клітинах мікрободоростей. Також за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) або мас-спектрометрії (MS) можна зроби аналіз кількості та структури фітохелатинів. Біохімічний аналіз відіграє ключову роль у розумінні механізмів адаптації мікрободоростей до високих концентрацій металів. Визначення концентрацій металів у клітинах, аналіз хелатуючих агентів, дослідження активності антиоксидантних ферментів та метаболомний аналіз допомагають розкрити складні біохімічні процеси, що забезпечують стійкість до металів. [42]

Дослідити резистентність можна таким чином як визначення концентрації металлотіонеїнів за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (PAGE) з подальшим фарбуванням сріблом або специфічними антитілами, для того щоб виявити низькі концентрації білків. [42]

Також сюди можна віднести морфологічні зміни, завдяки зміні структури та органел водорості під впливом токсичного металу можна зроби певні висновки. Щоб спостерігати за морфологічними змінами, зазвичай, використовують різні види мікроскопії, наприклад, світлова мікроскопія дозволяє спостерігати загальну морфологію клітин мікрободоростей, зміни у формі клітин, розмірах, наявність вакуолей та інших структур. Або, наприклад електронна мікроскопія, яка дозволяє детально аналізувати внутрішні структури клітин, включаючи ультраструктуру органел, розташування металів у клітинах та вплив металів на мембрани та інші клітинні компоненти, а також дає можливість детально вивчати поверхневу морфологію клітин та вплив металів на клітинну стінку та мембрани.[42]

Використання різних методів мікроскопії дозволяє виявити структурні зміни в клітинах та органелах, які допомагають їм виживати у несприятливих умовах.

Таким чином, вивчення часового характеру збереження стійкості мікроводоростей до високих концентрацій металів є місцем для розуміння біологічних процесів, прогнозування екологічних наслідків та оптимізації біотехнологічних процесів. Часовий характер збереження стійкості культур мікроводоростей до високих концентрацій металів є складним процесом, який включає кілька етапів адаптації. Ці етапи охоплюють негайні біохімічні реакції, короткострокові генетичні адаптації та довгострокові морфологічні зміни. Розуміння цього процесу є важливим для ефективного використання мікроводоростей у біоремедіації та інших біотехнологічних застосуваннях.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Об'єкт дослідження та умови культивування

Культура *Dunaliella viridis* Teod. var. *viridis* f. *euchlora*, штам IBASU-AN29.

Морські мікроводорості з роду *Dunaliella* Teodoresco (1905) належать до відділу *Chlorophyta* (зелені водорості), порядку *Chlamydomonadales* та родини *Dunaliellaceae* [17]. В даний час рід *Dunaliella* включає 26 різних видів, які є загальноприйнятими таксономічно. Найбільш визнаними видами *Dunaliella* є *D. salina* (Dunal) Teodoresco 1905, *D. tertiolecta* Butcher 1959 та *D. viridis* Teodoresco 1905 [5].

Dunaliella є планктонними, одноклітинними, фотосинтезуючими, рухливими дводжгутиковими водоростями. Клітини радіально симетричні, злегка асиметричні, еліпсоїдні, овальні, яйцеподібні або близькі до цих форм. Два джгутики (однакової довжини) можуть бути навіть у 2,5 рази довгими за довжину клітини. Один задній хлоропласт (часто чашоподібної форми) займає більшу частину цитозолу і містить аксіальний (майже медіальний) або базальний піреноїди, а також стигму (у частці хлоропласта), яка може бути не чітко відмежованою [42]. Передня частина клітини безбарвна і не містить хлоропластів. Цікаво, що у всіх представників *Dunaliella* відсутня клітинна стінка, що робить ці організми більш гнучкими, можуть міняти форму, тобто забезпечує морфологічну пластичність в межах одного виду. Безстінна форма є незвичайна особливість, яка відрізняє *Dunaliella* spp. від інших зелених мікроводоростей. Така унікальна властивість означає, що *Dunaliella* можуть бути легко засвоюються більшістю тварин, включаючи людину [5].

Однак клітини *Dunaliella* не завжди повністю голі, про що іноді свідчить слизова оболонка (що містить глікопротеїни) [19]. Ця оболонка з губчастою структурою, що називається перичелюлярним матриксом, може

бути навіть приблизно в 20 разів ширшою за саму плазматичну мембрану(на основі аналізу *D. salina*) [19].

На жаль, склад цього шару все ще погано вивчений. Клітини *Dunaliella*, у яких природним чином відсутні стінки, роблять їх придатними модельними організмами для вивчення стресової сигналізації [5]. Відсутність жорсткої клітинної стінки (що усуває значний фізичний бар'єр) робить ці мікроводорості більш проникними для екзогенних речовин/молекул [5].

Таким чином, осморегуляція, вуглецевий метаболізм, експресія генів, швидкість фотосинтезу та швидкість росту були протестовані в контексті різних умов навколишнього середовища, забруднювачів і токсикантів. Цікаво, що в умовах стресу *Dunaliella* посилюють біосинтез білка та накопичують низькомолекулярні органічні сполуки(наприклад, гліцерин і каротиноїди), а також біополімери на основі цукру (наприклад, крохмаль) [22, 30, 39, 49]. Таким чином, відзначимо потенціал цих мікроводоростей як модельного об'єкта для різних досліджень так і для використання в промислових масштабах.

Умови культивування маткової культури: живильне середовище Артарі 20 мл, плоскодонні конічні колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, температура 24-26 °С, освітленість цілодобово на поверхні колби, лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм., періодичне ручне перемішування.

За прописом готували середовище Артарі модифікації Масюк для вирощування мікроводоростей *D. viridis*. Для приготування розчину використовували дистильовану воду та мінеральні солі, що вказані нижче. Кожну сіль зважували окремо, розчиняли, переливали в мірну колбу і доводили об'єм до 1 літра. Після фільтрували через скляний фільтр і визначали рН приготовленого середовища.

Склад середовища (г/л):

- NaCl – 116 г/л

- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 50 г/л
- KNO_3 – 2,5 г/л
- K_2HPO_4 – 0,2 г/л
- pH – 6,3 -7

Водорості *D. viridis* були вирощені за стандартними умовами у плоских конічних колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл. Культурний об'єм становив 100 мл, а початкова концентрація клітин склала 1,3 мільйона на мілілітр.

2.2. Процедура отримання маткової культури *D. viridis*

Включала наступні кроки:

1. Культуру з різних колб переливали у одну колбу Ерленмейера та переносили в центрифужні пластикові пробірки.
2. Після цього проводили центрифугування протягом 15 хвилин при швидкості 5000 обертів за хвилину для осадження клітин.
3. Після відділення надосадової рідини, до осаду додавали чисте середовище Артарі у об'ємі 5 мл.
4. Клітини ресуспендували у свіжому середовищі, і відбирали зразок для підрахунку клітин, який розводили в 40 разів.
5. Після цього проводили підрахунок клітин мікрководоростей у камері Горяєва для визначення необхідної кількості для досягнення вихідної концентрації 1,3 мільйона клітин на мілілітр.
6. Клітини *D. viridis* 5% спиртовим розчином йоду, досягаючи кінцевої концентрації йоду 0,05%.

Підрахунок числа клітин проводили з об'єктивом 10x або 20x. Число клітин підраховували в 25 великих квадратах сітки, вибираючи 3 стовпець камери. Враховували всі клітини, що лежали в квадраті сітки, а також перетинали верхню і праву сторони квадрата. При підрахунку число клітин в великому квадраті не повинно перевищувати 20 - 30, в іншому випадку вихідну суспензію клітин розводили дистильованою водою. Для

отримання достовірного результату брали 2-3 краплі культури після ретельного перемішування. Кількість клітин у 1 кубічному сантиметрі вихідної суспензії: $C = a \times 1000 / h \times S \times n$, де: a - середнє число клітин в квадраті сітки;

h - глибина камери, мм; 0,1 мм

S - площа квадрата сітки, мм кв.; 1/25 мм

n - розведення вихідної суспензії (за наявності);

1000 мм куб. = 1 см куб. = 1 мл, переведення в мл

Отримали: $C = a \times 1000 / 0,1 \times 1/25 \text{ мм} \times 25 \text{ квадратів} = a \times 10000 \text{ тис.}$

клітин в мл або $C = a \times 0,01 \text{ млн} / \text{мл}$.

Розрахунок посівного інокуляту. Обсяг поживного середовища колби 100 мл, в 1 мл повинно міститися 1,3 млн./мл клітин, в 100 мл – 130млн / мл. В 1 мл маткового концентрату міститься A клітин, необхідно внести X мкл, щоб вихідна концентрація клітин в 100 мл склала 130 млн / мл. Отримуємо: $x = 130 / A$. Отриманий в результаті розрахунку обсяг маткової культури вносили в кожену колбу.

2.3 Спосіб отримання хелатної форми міді в клітинах мікроводоростей *Dunaliella viridis*

Раніше в нашій лабораторії було отримано штам мікроводоростей *D. viridis*, здатний виживати в середовищі з високою концентрацією сірчаної кислоти міді - 75 мг/л, тобто резистентний до високої концентрації міді - *D.v.CuR*, на відміну від вихідного штаму, чутливого до іонів міді - *D.v.CuS*. Понад 90 % міді у складі клітин пов'язана з білками і більша її частина знаходиться в цитозолі клітин [9].

Для отримання іонів міді, пов'язаної з компонентами клітин, 27 добову культуру *D. viridis* осаджували центрифугуванням за 5000 обертів упродовж 15 хв при кімнатній температурі (кількість клітин двох штамів у суспензії була однаковою - $3,9 \times 10^9$ і об'єм клітинних суспензій був вирівняний). Надосадову збирали для визначення вмісту міді. Осад клітин

промивали дистильованою водою (відповідно до вихідного об'єму) і осаджували центрифугуванням за 5000 обертів упродовж 15 хв. Надосадову зливали, а осад клітинсуспендували в 5 мл дистильованої води, руйнували осмотичним шоком із подальшою гомогенізацією. Незруйновані клітини та фрагменти клітин осаджували центрифугуванням за 6000 g протягом 15 хв за кімнатної температури. Отриману водну фазу, до складу якої входили іони міді в комплексі з білками, визначали як хелатну форму міді. Як контроль використовували культуру клітин *D. viridis*, яка культивувалася на стандартному середовищі без внесення міді (D.v.CuS).

2.4 Спосіб отримання іонної форми міді в клітинах мікроводоростей *Dunaliellaviridis*

Для отримання іонної форми міді додатково вносили в гомогенати клітин *Dunaliella* сірчанокислу мідь до кінцевої концентрації 7 г/л, з подальшим визначенням кількості міді, що зв'язалася з біомасою D.v-Cu.S і D.v-Cu.R, і кількістю міді, що залишилася, не зв'язаною, в середовищі. Культуру перемішували та витримували протягом 30 хв. Після цього суспензію клітин гомогенізували, зразки центрифугували за 6000 g протягом 15 хв за кімнатної температури. На завершальному етапі визначали кількість міді, що легко видаляється, - «слабко зв'язаної» міді з біомасою D.v-Cu.S і D.v-Cu.R, шляхом водної екстракції.

2.5 Визначення вмісту міді

В осадах фрагментів клітин та отриманій водній фазі, після осадження фрагментів клітин, визначали вміст міді на атомно-адсорбційному спектрофотометрі іCE3500, як описано в роботі [2].

2.6 Визначення екстрактивності компонентів водоростей

З метою визначення зміни ступеня екстрактивності компонентів мікроводоростей після внесення сірчаної кислоти міді визначали спектри поглинання водорозчинних компонентів на спектрофотометрі ShimadzuUV-2600 за хвильових хвиль 200-400 нм.

2.7 Статистичні методи

Усі експерименти повторювали щонайменше тричі, за кількох аналітичних повторностей. Отримані результати піддавали статистичному опрацюванню результатів із використанням пакета програм Statistica 5.0. На графіках наведено середні значення з їх стандартними помилками.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження «здатності» біомаси культур мікроводоростей *D.v-Cu.S* і *D.v-Cu.R* зв'язувати іони міді

Виявили, що в клітинах *D.v-Cu.S*, які культивуються в стандартних умовах на середовищі Артарі містилося 0,15 мкг іонів міді в 10^6 клітинах, що є фізіологічним рівнем для цих мікроводоростей. У клітинах *D.v-Cu.R*, які були адаптовані до росту на середовищі, що містить іони міді, та вже понад 25 років культивувалися на середовищі Артарі з додатковим внесенням 75 мг/л сірчаноокислої міді, містилося 32,3 мкг міді на 10^6 клітин, що в 215 разів більше порівняно з *D.v-Cu.S* (рис.3.1).

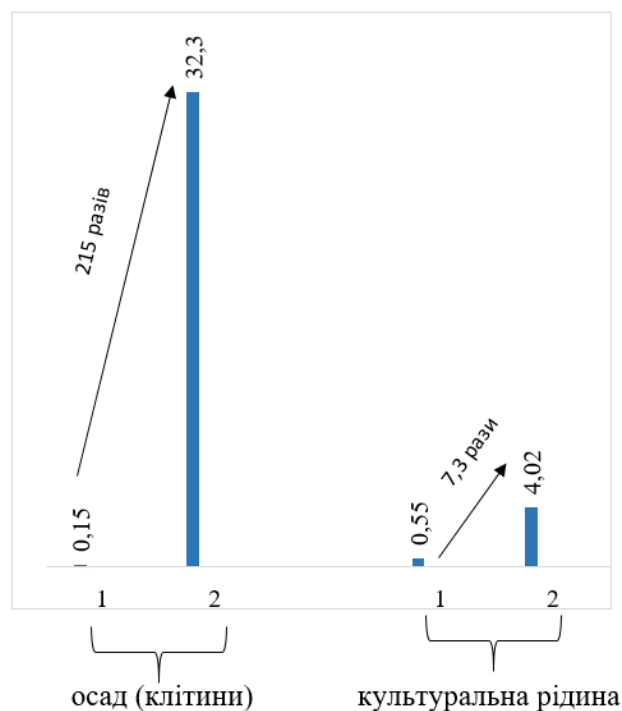


Рис. 3.1. Кількість іонів міді (мкг в 10^6) в клітинах та у культуральній рідині *D.v-Cu.S* (1) і *D.v-Cu.R* (2) культур мікроводоростей.

Важливо відзначити, що в культуральній рідині, де росла *D.v-Cu.S* (куди не вносили мідь), було виявлено 0,55 мкг/мл міді, що може бути

фоновим рівнем для цієї культури (рис.3.1). У культуральній рідині D.v-Cu.R, куди вносили 75 мг/л сірчаноокислої міді, містилося лише в 7 разів більше міді, порівняно з культуральною рідиною D.v-Cu.S, а не в 215 разів, ніж у клітинах цих культур (рис. 3.1). Це свідчить про те, що іони міді після внесення в середовище, де культивувалась D.v-Cu.R, досить швидко проникали і накопичувалися в клітинах, зв'язуючись із білками та іншими компонентами клітин, тобто більша частина міді перебуває в клітинах у хелатній формі.

З метою визначення здатності біомаси клітин додатково «зв'язувати» іони міді, клітини мікрободоростей руйнували шляхом гомогенізації й одержували клітинну суспензію біомаси відповідно D.v-Cu.S і D.v-Cu.R культур. До суспензії біомас вносили додатково сірчаноокислу мідь до 7 г/л, а після інкубації впродовж 15 хвилин фрагменти клітин (біомасу) відокремлювали від водного середовища центрифугуванням за 15000g впродовж 15 хвилин.

Виявили, що в суспензії біомаси клітин D.v-Cu.S було присутнім - 443,0 мкг/мл біомаси іонів міді, тобто кількість міді в біомасі збільшувалась у 2950 разів порівняно з кількістю міді в клітинах (рис.3.1, 3.2). За таких самих умов і з такою самою кількістю біомаси D.v-Cu.R зв'язувалося 966,0 мкг/мл міді, тобто кількість міді в біомасі D.v-Cu.R збільшилась після додаткового внесення 7 г/л сірчаноокислої міді лише у 29 разів, порівняно з вмістом міді в клітинах (рис.3.1, 3.2).

Отже, біомаса D.v-Cu.R зв'язувала у 100 разів менше міді порівняно з біомасою D.v-Cu.S за однакових умов (рис.3.2).

На користь того, що суспензія біомаси клітин D.v-Cu.R зв'язує відносно менше іонів міді, порівняно з D.v-Cu.S після внесення до них 7 г/л сірчаноокислої міді, свідчать і результати щодо вмісту іонів міді, що залишалися у водному середовищі після осадження клітинної біомаси. Так, у варіанті з біомасою D.v-Cu.S, у водному середовищі залишалася невелика кількість іонів міді (13,2 мкг/мл), тобто більша частина

внесеної міді зв'язувалася з біомасою клітин, тоді як для варіанту D.v-Cu.R. у водному середовищі за тих самих умов містилося у 100 разів більше міді, порівняно з водним середовищем для D.v-Cu.S (рис.3.2). Ці результати можуть свідчити про те, що біомаса клітин D.v-Cu.R. майже досягала своєї «межі» насичення іонами міді.

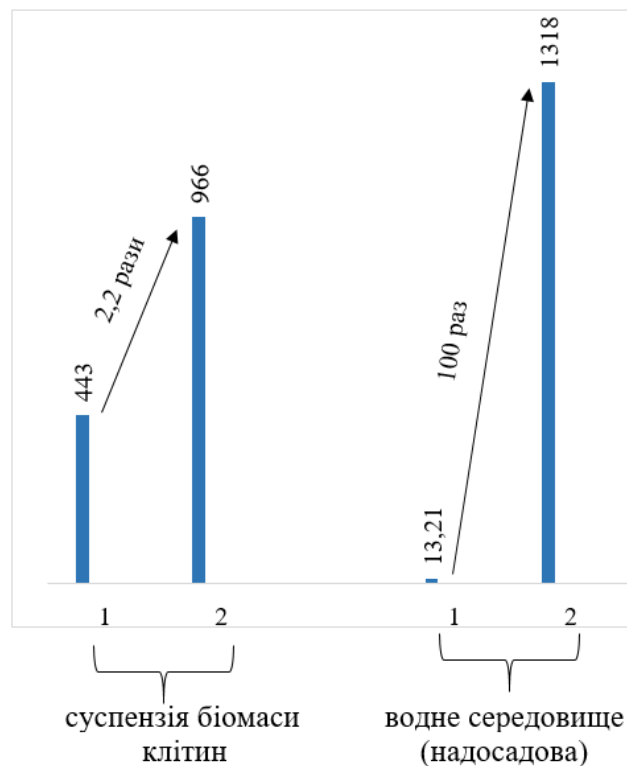


Рис. 3.2. Кількість іонів міді (мкг/мл) в клітинах та у водному середовищі D.v-Cu.S (1) і D.v-Cu.R (2) культур мікробіодоростей після гомогенізації та додаткового внесення сірчаної міді до 7 г/л.

До того ж, «ступінь» зв'язування іонів міді з біомасою клітин D.v-Cu.S був набагато «міцнішим» порівняно з біомасою D.v-Cu.R. Так, якщо з біомасою, «навантаженою» міддю, провести додаткову водну екстракцію, то у водну фазу з біомаси D.v-Cu.S переходило 10,5 мкг/мл іонів міді, а з біомаси D.v-Cu.R у 5 разів більше (56,4 мкг/мл) (рис.3.3).

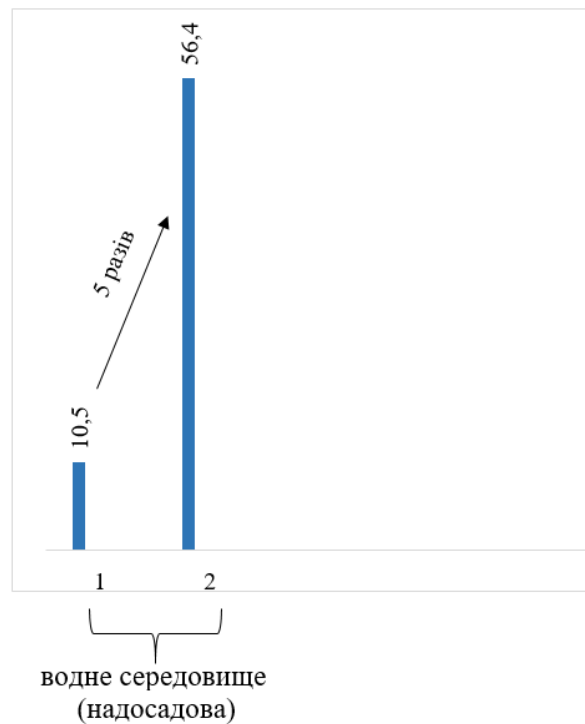


Рис. 3.3. Кількість іонів міді (мкг/мл) у водному середовищі D.v-Cu.S (1) і D.v-Cu.R (2) після додаткової водної екстракції.

Отже, у біомасі клітин D.v-Cu.S і D.v-Cu.R співвідношення між іонною формою і хелатною формою міді різні, крім того, ступінь зв'язування міді з компонентами клітин D.v-Cu.R менш міцна порівняно з D.v-Cu. S. Можна припустити, що біомаси D.v-Cu.S і D.v-Cu.R розрізнятимуться і за здатністю їхніх компонентів «переходити» у водну фазу, тобто за екстрактивністю, що також може впливати на їх біологічну активність.

3.2. Дослідження «екстрактивності» біологічно активних компонентів із біомас клітин D.v-Cu.S та D.v-Cu.R. після додаткового внесення до них 7 г/л сірчаноокислої міді

Для відмивання клітин від солей, що містяться в культуральній рідині, до однакових за масою осадів клітин додавали по 10

мл стерильної дистильованої води, перемішували їх упродовж 5 хв, знову осаджували центрифугуванням за 3000g і у водній фазі визначали досліджувані параметри.

Виявили, що після суспендування біомаси клітин *D.v-Cu.S* у водну фазу екстрагувалася невелика кількість амінокислот (ділянка поглинання 220 нм) і білків (ділянка поглинання 260 нм) (рис. 3.4 А). У той же час, з такої ж кількості біомаси клітин *D.v-Cu.R* за тих самих умов, у водну фазу переходило значно менше амінокислот і слідові кількості білків порівняно з *D.v-Cu.S* (рис.3.4 А, В).

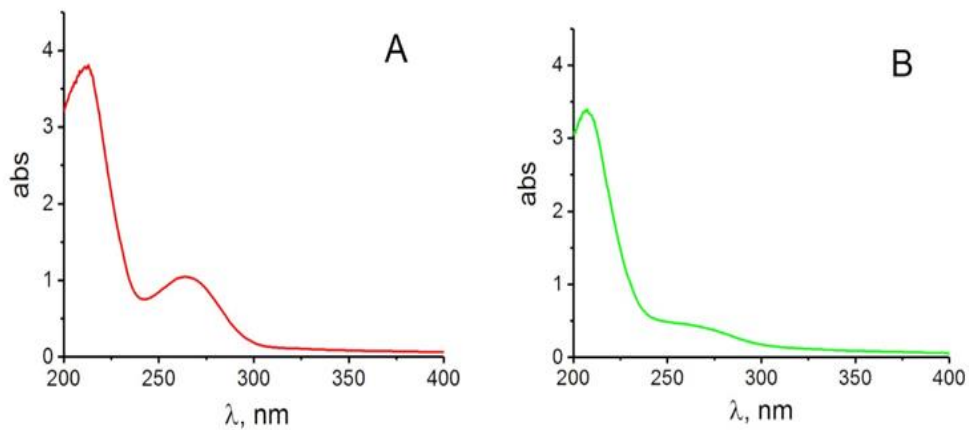


Рис. 3.4 Спектри поглинання в УФ-області водного середовища після відмивання клітин *D.v-Cu.S* (А) і *D.v-Cu.R* (В).

Ці результати свідчать про те, що наявність іонів міді в клітинах *D.v-Cu.R* призводить до зменшення екстрактивності компонентів клітин, ймовірно, за рахунок утворення асоціатів не тільки з фітохелатинами, металотіонеїнами, які специфічно зв'язують іони міді [10], а й з іншими компонентами клітин, що й може супроводжуватися глобальною кооперативною структурно-функціональною перебудовою в таких клітинах. Необхідно зазначити, що такі адаптовані до росту клітини *D.v-Cu.R* зберігали основні характеристики для цих мікробіодоростей і культивуються в лабораторії вже понад 25 років.

Якщо дійсно, клітини *D.v-Cu.R* розрізняються за своєю структурно-функціональною організацією завдяки присутності в них великої кількості міді, порівняно з клітинами *D.v-Cu.S*, то можна очікувати, що вони будуть «стійкішими» і до механічних впливів. На наступному етапі роботи клітини піддавалися гомогенізації у водному середовищі.

Результати показали, що біомаси, отримані з клітин *D.v-Cu.S* та *D.v-Cu.R*, різнилися між собою за кольором, що вказує на зміну структури пігментів (хлорофіл, каротиноїди), та за ступенем агрегованості клітинних компонентів (рис. 3.5 А, Б).

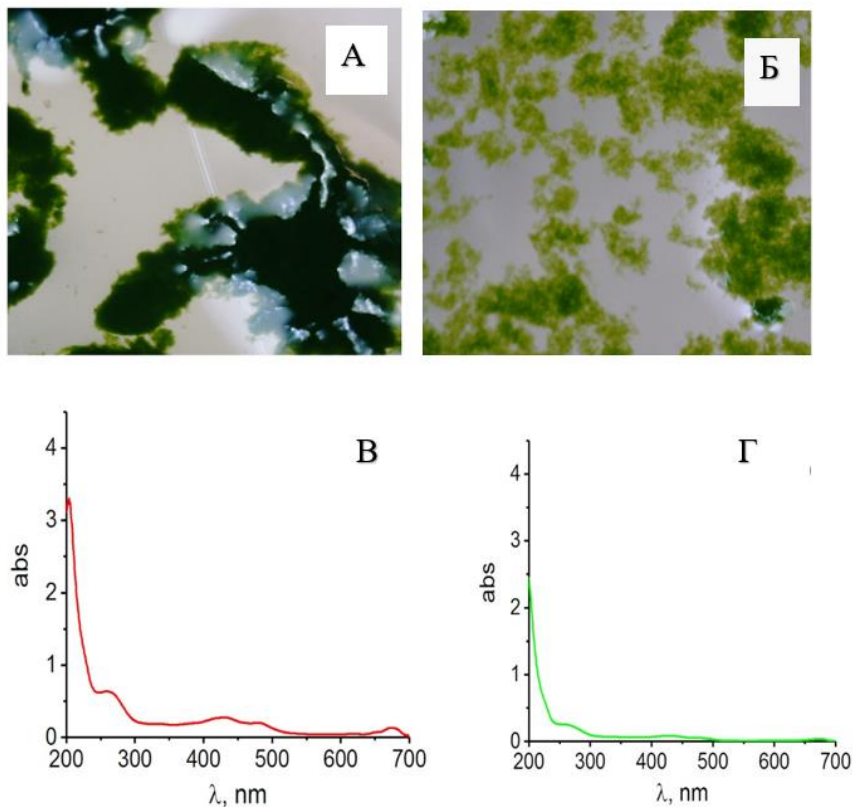


Рис.3.5 Зовнішній вигляд сформованих агрегатів із компонентів біомаси *Cu.S* (А) та *D.v-Cu.R* (Б) після їхньої гомогенізації за однакових умов, спектри поглинання (abs -абсолютна величина числа) компонентів водного середовища після осадження компонентів біомаси клітин *D.v-Cu.S* (В) та *D.v-Cu.R* (Г).

Водночас механічне руйнування клітин D.v-Cu.R не приводило до екстракції у водне середовище цих компонентів клітин (рис.3.5 В); тобто справді іони міді спричиняли структурні зміни в клітинах, які можуть бути умовно визначені як утворення надмолекулярних механічно стійких комплексів (рис.3.5 Г).

У наступній серії експериментів до біомас клітин D.v-Cu.S та D.v-Cu.R вносили сірчаноокислу мідь до кінцевої концентрації 7 г/л, після цього переводили фрагменти клітин в осад центрифугуванням за 15000 g, а у водному середовищі визначали кількість екстрактивних речовин. Показали, що у водному середовищі були відсутні екстрактивні речовини, тобто оптично вони були «порожні» (рис. 3.6 А, В). Це вказує на те, що після внесення великих концентрацій іонів міді у біомасу D.v-Cu.S, також формувалися агрегати з компонентів клітин, як і для D.v-Cu.R. Це підтверджує той факт, що іони міді беруть участь в утворенні комплексів з компонентами клітин.

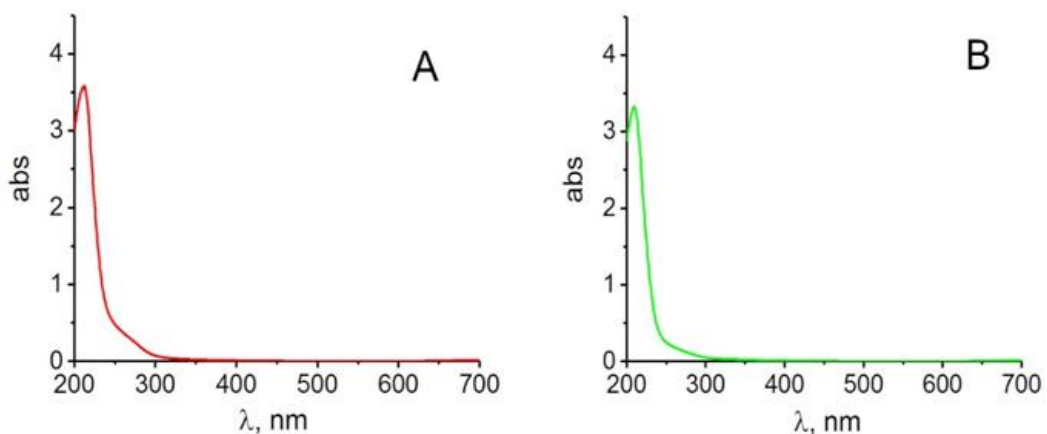


Рис.3.6. Спектри поглинання екстрактивних речовин із біомаси клітин D.v-Cu.S (А) та D.v-Cu.R (В), які отримували після додаткового внесення до них сірчаноокислої міді до кінцевої концентрації 7г/л та подальшого осадження біомаси клітин центрифугуванням при 15 000g.

У висновку зазначимо, що додаткове внесення до біомас водоростей 7 г/л сірчаноокислої міді, може пояснити те, що у D.v-Cu.R співвідношення між іонною формою та хелатною формою міді зміщене у бік іонної форми, а частина міді, що зв'язана «неспецифічно» із компонентами клітин, що має місце при насичувальних концентраціях міді, відносно легко переходить в іонну форму. Вважаємо, що штам D.v-Cu.R може розглядатися як «носій» або «депо» для міді, яка може проявити різні ефекти, наприклад антибактеріальні.

Слід зазначити, що іони міді є життєво-необхідними (есенціальними) мікроелементами для всіх форм життя і водночас вони є надзвичайно токсичними. Це пов'язано з тим, що в біологічних системах мідь може перебувати в різних станах: Cu^0 (наночастинки); Cu^{1+} ; Cu^{2+} та Cu-ліганд (хелатна форма), крім того, іони міді утворюють комплекси з різними типами макромолекул, і її біологічна активність, зокрема й антибактеріальна, може залежати від балансу між іонними формами, хелатними формами та наночастинками в організмі та від концентрації.

ВИСНОВКИ

1. Біомаса клітин мікроводоростей D.v-Cu.S і D.v-Cu.R мала відмінності у здатності депонування іонів міді, що виявлялося у кількості зв'язаної міді та більшому ступені утримання, зокрема після гомогенізації біомаси та додаткового внесення сірчаноокислої міді.
2. У біомасі клітин D.v-Cu.R співвідношення між іонною формою і хелатною формою міді зміщене в бік іонної форми міді.
3. Додаткове внесення сірчаноокислої міді до біомаси D.v-Cu.S і D.v-Cu.R мікроводоростей супроводжувалося значним зменшенням екстрактивності клітинних компонентів мікроводоростей у водне середовище, що зумовлено формуванням мідьвмісних біокомплексів.
4. Вважаємо, що штам D.v-Cu.R може розглядатися як «носій» або «депо» для міді, яка може проявити різні ефекти, наприклад антибактеріальні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Колупаєв Ю.Є. 2001. Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень / Ю.Є. Колупаєв. Х.
2. Юрченко, О. І., Черножук, Т. В., Ніколенко, М. В., Бакланов, О. М., & Кравченко, О. А., 2024. Атомно-абсорбційне визначення міді та цинку у фармацевтичних препаратах. *Issues of Chemistry & Chemical Technology/Voprosy Khimii & Khimicheskoi Tekhnologii*, DOI: 10.32434/0321-4095-2024-152-1-115-121.
3. Aharon Oren. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments 23 (2014) Dec 18. [doi: 10.1186/s40709-014-0023-y](https://doi.org/10.1186/s40709-014-0023-y)
4. Ahmad Mohammadi and Fahimeh Mahmoudnia. Biological Treatment of Heavy Metals with Algae 18 October 2023 [DOI: 10.5772/intechopen.110301](https://doi.org/10.5772/intechopen.110301)
5. A. Hosseini Tafreshi, M. Shariati, *Dunaliella* biotechnology: methods and applications, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 14–35, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>.
6. Beatrycze Nowicka Heavy metal–induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response Volume 29, pages 16860–16911, (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18419-w>
7. Bilal Muhammad , Tahir Rasheed, Juan Eduardo Sosa-Hernández, Ali Raza, Faran Nabeel, and Hafiz M. N. Iqbal. Biosorption: An Interplay between Marine Algae and Potentially Toxic Elements—A Review. 16(2), 2018, 65; <https://doi.org/10.3390/md16020065>.
8. Blindauer C.A., Leszczyszyn O.I. Metallothioneins: Unparalleled diversity in structure and functions for metal ions homeostasis and more. *Nat. Prod. Rep.* 2010;27:720–741 <https://doi.org/10.1039/b906685n>

9. Bozhkov, A. I., Goltvyanskiy, A. V., Kovaleva, M. K., Menzyanova, N. G., 2018. On the Inheritance of Induced Resistance to Toxic Concentrations of Sulfur Acid of Copper by Subsequent Cell Generations of *Dunaliella viridis* Teodoresco. *International Journal on Algae*, 20(4).
- 10.Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., Akzhyhitov, R. A., Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., ... & Gromovoi, T. Y., 2021. The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*, 5, 62-74.
- 11.Cobbett C., Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Role in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002;53:159–182. [doi: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154).
- 12.Elena Cavalletti, Giovanna Romano, Fortunato Palma Esposito, Lucia Barra, Pasquale Chiaiese, Sergio Balzano, Angela Sardo. Copper Effect on Microalgae: Toxicity and Bioremediation Strategies. 10 (9), 2022, 527; <https://doi.org/10.3390/toxics10090527>
- 13.Flores-Cáceres M.L., Hattab S., Bousetta H., Banni M., Hernández L.E. Specific mechanisms of tolerance to copper and cadmium are compromised by a limited concentration of glutathione in alfalfa plants. *Plant Sci.* 2015;233:165–173. [doi: 10.1016/j.plantsci.2015.01.013](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.013)
- 14.G Çetinkaya, Dönmez, Z Aksu, A Öztürk, T Kutsal A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae October 1999, Pages 885-892 [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00005-9)
- 15.Guoming Zeng, Yu He, Dong Liang, Fei Wang, Yang Luo, Haodong Yang, Quanfeng Wang, Jiale Wang, Pei Gao, Xin Wen, Chunyi Yu, and Da Sun. Adsorption of Heavy Metal Ions Copper, Cadmium and Nickel by *Microcystis aeruginosa* 2022 Oct 25. 19 (21), 13867; <https://doi.org/10.3390/ijerph192113867>
- 16.Javier I. Ordóñez , Sonia Cortés, Pablo Maluenda and Ignacio Soto Biosorption of Heavy Metals with Algae: Critical Review of Its

- Application in Real Effluents 15 (6), 2023, 5521;
<https://doi.org/10.3390/su15065521>
17. Jenifer Calvo Hunmin Jung Gabriele Meloni. Copper Metallothioneins Volume 69, Number 4, April 2017, Pages 236–245 <https://doi.org/10.1002/iub.1618>
 18. J.E.W. Polle, R. Roth, A. Ben-Amotz, U. Goodenough, Ultrastructure of the green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18 (Chlorophyta) as investigated by quickfreeze deep-etch electron microscopy, *Algal Res.* 49 (2020), 101953, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101953>.
 19. J.E.W. Polle, R. Roth, A. Ben-Amotz, U. Goodenough, Ultrastructure of the green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18 (Chlorophyta) as investigated by quickfreeze deep-etch electron microscopy, *Algal Res.* 49 (2020), 101953, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101953>.
 20. Ju-Chen Chia Phytochelatin Synthase in Heavy Metal Detoxification and Xenobiotic Metabolism 14 September 2021 DOI: [10.5772/intechopen.99077](https://doi.org/10.5772/intechopen.99077)
 21. Kong, L. Copper Requirement and Acquisition by Marine Microalgae. *Microorganisms* 10, 2022, 1853. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091853>
 22. K.W.M. Tan, H. Lin, H. Shen, Y.K. Lee, Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinants of carbon allocation in *Dunaliella tertiolecta*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep37235>.
 23. Leszczyszyn O.I., Iman H.T., Blindauer C.A. Diversity and distribution of metallothioneins: A review of structure, properties and function. *Metallomics*. 2013;5:1146–1169. doi: 10.1039/c3mt00072a
 24. Lucia Barra and Silvestro Greco The Potential of Microalgae in Phycoremediation 12 December 2023 DOI: [10.5772/intechopen.1003212](https://doi.org/10.5772/intechopen.1003212)
 25. Md. Kamrul Hasan, Yuan Cheng, Mukesh K. Kanwar, Xian-Yao Chu, Golam J. Ahammed, Zhen-Yu Qi Responses of Plant Proteins to Heavy

Metal Stress—A Review Volume 8 – 2017, 05 September 2017
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>

26. Moenne A., González A., Sáez C.A. Mechanisms of metal tolerance in marine macroalgae, with emphasis on copper tolerance in Chlorophyta and Rodophyta. *Aquat. Toxicol.* 2016;176:30–37. doi: [10.1016/j.aquatox.2016.04.015](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.015)
27. Mohammad Faizan, Pravej Alam, Anjuman Hussain, Fadime Karabulut, Sadia Haque Tonny, Shi Hui Cheng, Mohammad Yusuf, Muhammad Faheem Adil, Shafaque Sehar, Sarah Owdah Alomrani, Thamer Albalawi, Shamsul Hayat. Phytochelatin: Key regulator against heavy metal toxicity in plants Volume 11, March 2024, 100355
<https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100355>
28. Mohita Chugh, Lakhan Kumar, Maulin P Shah, Navneeta Bharadvaja Algal Bioremediation of heavy metals: An insight into removal mechanisms, recovery of by-products, challenges, and future opportunities Volume 7, September 2022, 100129
<https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100129>
29. M. Guiry, G. Guiry, Algaebase, World-Wide Electron, Publ. Natl. Univ. Ireland, Galway, 2021. <https://www.algaebase.org>
30. M.H. Liang, Y.F. Hao, Y.M. Li, Y.J. Liang, J.G. Jiang, Inhibiting lycopene cyclases to accumulate lycopene in high β -carotene-accumulating *Dunaliella bardawil*, *Food Bioprocess Technol.* 9 (2016) 1002–1009, <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1681-6>.
31. Muhammad Bilal, Tahir Rasheed, Juan Eduardo Sosa-Hernández, Ali Raza, Faran Nabeel and Hafiz M. N. Iqbal. Biosorption: An Interplay between Marine Algae and Potentially Toxic Elements—A Review 16 (2), 2018 Feb 19, 65; <https://doi.org/10.3390/md16020065>
32. Palacios O., Atrian S., Capdevila M. Zn- and Cu-thioneins: A functional classification for metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011;16:991–1009. doi: [10.1007/s00775-011-0827-2](https://doi.org/10.1007/s00775-011-0827-2)

- 33.P. Mazur a b, Tatiana A. Pozdniakova a, Diego A. Mayer c, Selene M.A. Guelli U. de Souza c, Rui A.R. Boaventura a, Vítor J.P. Cation exchange prediction model for copper binding onto raw brown marine macro-algae *Ascophyllum nodosum*: Batch and fixed-bed studies. Volume 316, 15 May 2017, Pages 255-276 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.01.080>
- 34.Rodríguez-Rojas F., Celis-Plá P.S.M., Méndez L., Moenne F., Muñoz P.T., Lobos M.G., Díaz P., Sánchez-Lizaso J.L., Brown M.T., Moenne A., et al. MAPK pathways under chronic copper excess in green macroalgae (Chlorophyta): Involvement in the regulation of detoxification mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4546
- 35.Roncarati F., Sáez C.A., Greco M., Gledhill M., Bitonti M.B., Brown M.T. Response differences between *Ectocarpus siliculosus* populations to copper stress involve cellular exclusion and induction of the phytochelatin biosynthetic pathway. *Aquat. Toxicol.* 2015;159:167–175. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.12.009.
- 36.Saba Shamim. Biosorption of Heavy Metals 18 July 2018 DOI: [10.5772/intechopen.72099](https://doi.org/10.5772/intechopen.72099)
- 37.Sabeeha S. Merchant, Stefan Schmollinger, Daniela Strenkert, Jeffrey L. Moseley, and Crysten E. Blaby-Haas From economy to luxury: copper homeostasis in *Chlamydomonas* and other algae Volume 1867, Issue 11, November 2020, 118822 <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118822>
- 38.Sergio Balzano, Angela Sardo, Martina Blasio, Tamara Bou Chahine, Filippo Dell'Anno, Clementina Sansone, Christophe Brunet. Microalgal Metallothioneins and Phytochelatins and Their Potential Use in Bioremediation. Volume 11 2020 Apr 28 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00517>.
- 39.S. Wei, Y. Bian, Q. Zhao, S. Chen, J. Mao, C. Song, K. Cheng, Z. Xiao, C. Zhang, W. Ma, H. Zou, M. Ye, S. Dai, Salinity-induced palmella formation mechanism in halotolerant algae *Dunaliella salina* revealed by

- quantitative proteomics and phosphoproteomics, *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 810, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00810>.
40. Wei Guo, Yadi Xing, Xiumei Luo, Fuguang Li, Maozhi Ren, Yiming Liang Reactive Oxygen Species: A Crosslink between Plant and Human Eukaryotic Cell Systems 24(17), 22 August 2023, 13052; <https://doi.org/10.3390/ijms241713052>
41. Woyda-Ploszczyca A.M., Rybak A.S. How can the commercial potential of microalgae from the *Dunaliella* genus be improved? The importance of nucleotide metabolism with a focus on nucleoside diphosphate kinase (NDPK). *Algal Research*. 2021. Vol. 60. P. 102474 (10 p).
42. Y. Sui, S.E. Vlaeminck, *Dunaliella* microalgae for nutritional protein: an undervalued asset, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 10–12, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.07.011>.
43. Zarifeh Raji, Ahasanul Karim, Antoine Karam and Seddik Khalloufi Adsorption of Heavy Metals: Mechanisms, Kinetics, and Applications of Various Adsorbents in Wastewater Remediation—A Review 1(3), 6 September 2023 775-805; <https://doi.org/10.3390/waste1030046>
44. Zhonghao Chen, Ahmed I. Osman, David W. Rooney, Wen-Da Oh, Pow-Seng Yap Remediation of Heavy Metals in Polluted Water by Immobilized Algae: Current Applications and Future Perspectives 15 (6), 14 March 2023, 5128; <https://doi.org/10.3390/su15065128>