П.О. МУШАК

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
Вул. Терещенківська, 2, Київ, МСП-1, 01601

АБСОРБЦІЯ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ СИНЬОЗЕЛЕНОЮ ВОДОРІСТЮ *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDTS.) GEITL.

Ключові слова: іони, важкі метали, залізо, цинк, мідь, стронцій, селен, інтактні клітини, глікопротеїди, поглинання

Індустралізація й розвиток нових галузей промисловості призводять до різкого збільшення концентрації солей важких металів, зокрема іонів міді, цинку, свинцю, ртуті, заліза у навколишньому середовищі [22]. Це згубно впливає на обмін речовин у водоростей [16]. Останні здатні поглинати й нагромаджувати важкі метали в кількості, яка в десятки тисяч разів перевищує їх вміст у воді [25]. Встановлено, що абсорбція металів значною мірою залежить від фізіологічної активності клітин водоростей. Зокрема, інтактні клітини нагромаджують значно більшу кількість металу, ніж інактивовані. Кількість металу, що акумулюється одиницею біомаси водоростей, залежить від співвідношення метал : біомаса, тривалості інкубування, pH, складу й концентрації іонів у середовищі й освітленості, а також від видових особливостей водоростей [4, 6]. Досліджуючи дію хрому (Cr) на ріст і розвиток синьозелених водоростей *Synechococcus* PCC 7942 і *Nostoc* PCC 7120 ми встановили, що рівень поглинання й токсичність цього металу залежать від його валентності [23]. Так, ступінь поглинання іонів Cr (VI) водорістю *S. platensis* із живильного середовища на два порядки нижчий порівняно з іонами Cr (III) [9].

За комбінованої дії *Se* (IV) і *Cr* (III) на *S. platensis* під час її культивування виявлено антагоністичний характер взаємодії цих елементів, що проявлялося у пригніченні процесу акумуляції *Se* (IV) [1]. Встановлено, що нагромадження важких металів починається з їх абсорбції на клітинній оболонці. Потім вони проникають у протоплазму. Біосорбція як початковий етап біологічного концентрування важких металів визначається площею поверхні клітини, фазою її розвитку, складом і структурою поверхневих оболонок, а також фізіологічним станом організму [20]. Показано, що водорості здатні адаптуватися до присутності важких металів у середовищі, хоча механізми адаптації остаточно не з'ясовані [2, 18]. Відомо, що метали в організмі зв'язані зі специфічними білками, серед яких, окрім металоферментів, є особливі неензиматичні білки, які відіграють важливу роль у метаболізмі важких металів. Іони металів, потрапляючи в живу клітину, зв'язуються з низькомолекулярними білками. Водночас ці білки активно синтезуються в організмі у відповідь на дію підвищеної концентрації деяких важких металів. Такі білки отримали назву металотіонеіни, а їхні апоформи, що не містять металів, — тіонеіни [3].

© П.О. МУШАК, 2006

Завдяки здатності зв'язувати велику кількість металів, металотіонеіни є внутрішньоклітинним резервуаром для надлишку низки елементів, наприклад цинку й міді. Відомо, що іони цих металів необхідні для біосинтезу металоферментів і водночас токсичні для багатьох компонентів клітини, а тому металотіонеіни не тільки сприяють розподілу металу в тканинах, а й видаленню його з організму шляхом зв'язування, підтримуючи таким чином гомеостаз металів у клітині. Металотіонеіноподібні білки виявлені в синьозелених водоростях [3]. Значну роль у внутрішньоклітинному зв'язуванні важких металів відіграють тіолові сполуки: цистеїн, тіогліколева кислота й особливо глютатіон [19]. Глютатіон бере участь у синтезі низькомолекулярних *SH*-вмісних цитоплазматичних білків — металотіонеінів, які забезпечують специфічне зв'язування більшої частини поглинених клітинами металів суміжними залишками цистеїну в їх молекулі. Є припущення, що глютатіонова система може бути «першою лінією оборони» в системі захисту клітин від важких металів у період, що передує формуванню такого важливого інструменту захисту, як металозв'язуючі білки [13]. Молекулярна маса цих білків становить 10 кДа, високим є вміст тіолових груп. Металотіонеіни та їхні рослинні аналоги — фітохелатини — зв'язують до 7 двовалентних (до 12 одновалентних) іонів важких металів на молекулу. Крім цього, вони беруть участь у процесах транспорту і екскреції металів [3, 7, 24]. Важкі метали утворюють стійкі комплексні сполуки з білками, порфіринами, ліпідами, які беруть участь в обмінних процесах [15]. Встановлено, що ліпіди зв'язують до 19 % *Pb* і до 15 % *Zn*. Білкова фракція клітин морських мікроводоростей зв'язує до 27 % *Cu* й до 19 % *Pb* [25]. Таким чином, основна функція сполук класу металотіонеінів, які містяться у клітинах мікроводоростей, полягає в усуненні надлишку іонів токсичних металів шляхом їх зв'язування з білком і дозволяє використовувати їх як біоіндикатори наявності в середовищі токсичних концентрацій важких металів [7].

Одним із важких металів, що нагромаджуються у великій кількості у водному середовищі, є мідь. Ступінь її накопичення клітинами водоростей прямо залежить від концентрації металу в середовищі, а токсичність визначається швидкістю надходження до клітини, включенням міді у різні фізіологічні процеси та взаємодією з органелами клітин [17, 21]. Слід зазначити, що механізми взаємодії хлориду міді у різних концентраціях з клітинами водоростей різні. Задіяння того чи іншого механізму залежить від співвідношення процесів акумуляції та екскреції міді клітинами водоростей, а також від ступеня її участі у різних біокаталітичних реакціях [5]. Як свідчать результати досліджень, іони міді здатні проникати до клітин і розподілятись між різними компартментами з найбільшою кількістю у фракції цитозолю. Ступінь їхньої абсорбції на плазматичній мембрані незначний. Комплекси з металами в цитозолі і вакуолях утворюють деякі органічні кислоти [17].

До важких металів, надмірні концентрації яких згубно діють на водорості, належить цинк. Він входить до складу ферментів, які беруть участь в обміні

речовин. Дослідження синьозеленої водорості *Anacystis nidulans* показали, що підвищені концентрації іонів цинку в середовищі пригнічують ріст культури, змінюють форму й розмір клітин. Слід зазначити, що існує пряма залежність між концентрацією іонів цинку та кількістю морфологічних деформацій [14].

Враховуючи викладені вище літературні дані, нашою метою було вивчення поглинання іонів важких металів, зокрема заліза, цинку, міді, стронцію й аніонів селену, клітинами й глікопротеїдами синьозеленої водорості *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl., 26.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єктом досліджень була нитчаста синьозелена водорість *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl., 26. Її вирощували у колбах Ерленмейєра ємністю 750 мл на стерильному живильному середовищі Заррука [8]. Усі операції, пов'язані з висівом культури, здійснювали в умовах стерильності. Колби освітлювали люмінесцентними лампами типу ДС-40 (3 тис. лк) протягом 12 год за температури 25—27 °С. Досліди проводили таким чином: водорості вирощували протягом 20 діб, суспензію водоростей відцентрифуговували, декілька разів промивали дистильованою водою. Потім готували розчин солей: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $SrCl_2 \cdot 6H_2O$; Na_2SeO_3 на дистильованій воді. Кожної солі брали по 15 мг/л розчину. Загальний об'єм розчину становив 8 л. Частину біомаси водоростей висушували при 45 °С — вона була контролем. Решту їх біомаси вносили у розчин солей з розрахунку 5,6 г/л і залишали на світлі впродовж 48 год. Після закінчення інкубації водорості відцентрифугували та висушили при 45 °С. Аналогічні досліди з поглинання іонів вищезгаданих металів проводили з препаратами глікопротеїдів. Глікопротеїди з біомаси *S. platensis* одержували за допомогою 0,2 %-го розчину NaOH [10]. Частину отриманого у такий спосіб препарату глікопротеїдів висушували у термостаті при 45 °С. Решту цього препарату переносили у розчин зазначених солей, концентрація кожної солі становила 15 мг/л. Загальний об'єм розчину — 2 л. Препарату глікопротеїдів було внесено у розчин 2,0 г. Інкубація, як і в разі інтактних клітин водоростей становила 48 годин. Після інкубації глікопротеїди осаджували 10 %-ю трихлороцтовою кислотою, осад відцентрифуговували й висушували при 45 °С. Висушену біомасу водоростей і глікопротеїдів спалювали у муфельній печі, золу аналізували на ступінь поглинання іонів заліза, цинку, міді, стронцію та аніонів селену за допомогою енергодисперсійного рентгено-флуоресцентного спектрометра.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведені дослідження засвідчують, що інтактні клітини *S. platensis* поглинають іони заліза, цинку, міді, стронцію. Згідно з нашими даними (табл. 1), клітини дослідного варіанта містили в десятки й сотні разів більше цих металів, аніж контрольні клітини. Так, у відсотковому відношенні вміст заліза

в дослідних клітинах у 75, цинку — 87, міді — 125, стронцію — у 26 разів перевищував контроль. Ступінь поглинання іонів заліза, цинку, міді, стронцію інтактними клітинами *S. platensis*, залежно від їхнього вмісту в живильному середовищі, є різним (табл. 2). Як свідчать дані, наведені у табл. 2, інтактні клітини водоростей найбільшою мірою абсорбують із живильного середовища цинк, відсоток поглинання якого становить 59,4. Іони заліза абсорбувалися дещо менше — 50,84 %, ще менше мідь (44,56 %), а відсоток поглинання стронцію набагато нижчий, аніж цинку й міді, — 20,36 %.

У результаті наших досліджень поглинання препаратом глікопротеїдів водорості іонів заліза, цинку, міді, стронцію встановлено, що останні містять у багато разів більше вищезгаданих металів, ніж глікопротеїди, які не зазнавали їх дії. Так, у відсотковому відношенні кількість заліза в 92, цинку — в 100, міді — в 166, стронцію — в 30 разів більша у глікопротеїдах дослідного варіанта, ніж у контролі. Що ж до ступеня поглинання металів препаратами глікопротеїдів *S. platensis*, то тут спостерігається така сама закономірність, що й у дослідах з інтактними клітинами водорості: найбільшою мірою поглинається цинк (52,19 %), дещо менше — залізо (42,35 %) й мідь (38,80 %), а найменше — стронцій, відсоток поглинання якого становить 16,67 (табл. 2). Порівнюючи ступінь поглинання металів інтактними клітинами й глікопротеїдами *S. platensis*, бачимо, що інтактні клітини більшою мірою поглинають

Таблиця 1. **Акумуляція іонів важких металів (заліза, цинку, міді, стронцію) та аніонів селену клітинами і глікопротеїдами *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl., 26 (% сухої маси)**

Варіант	Іони				Аніони
	Fe^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Sr^{2+}	Se^{2-}
1	0,0024	0,0027	0,0016	0,0030	0,0001
2	0,180	0,235	0,200	0,104	0,0105
3	0,0014	0,0018	0,0009	0,0028	0,0001
4	0,130	0,180	0,150	0,085	0,0081

Примітка: 1 — інтактні клітини (контроль); 2 — оброблені клітини (дослід); 3 — препарат глікопротеїдів (контроль); 4 — оброблений препарат глікопротеїдів (дослід)

Таблиця 2. **Ступінь поглинання іонів заліза, цинку, міді, стронцію та аніонів селену клітинами і глікопротеїдами *S. platensis* (% від наявності металів у живильному середовищі)**

Варіант	Іони				Аніони
	Fe^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Sr^{2+}	Se^{2-}
1	50,84	59,40	44,56	20,68	12,32
2	42,35	52,19	38,80	16,67	9,18

Примітка: 1 — інтактні клітини; 2 — препарат глікопротеїдів

залізо, цинк і мідь, аніж препарати глікопротеїдів. Це, можливо, пояснюється тим, що в інтактних клітинах, окрім глікопротеїдів, метали поглинають й інші біополімери — кислі поліцукри, гліколіпіди, фікоціанін. Як уже згадувалося, кількість металу, яку акумулює одиниця біомаси водоростей, залежить від співвідношення метал : біомаса, тривалості інкубування, pH, складу й концентрації іонів у середовищі, освітленості. Відомо, що інтактні клітини нагромаджують значно більшу кількість металу, ніж інактивовані [6].

Останнім часом у харчуванні людини використовують нетрадиційні джерела біологічно активних добавок. Завдяки високому вмісту білка й незамінних амінокислот, широкому спектру вітамінів, унікальних пігментів, жирних кислот водорість *S. platensis* є цінною харчовою та вітамінною добавкою до раціону людини й тварин. Тут доречно сказати кілька слів про селен. Він належить до числа досить рідкісних елементів. Нестача селену в організмі спричинює такі самі зміни, як і нестача вітаміну Е. Більше того, було встановлено пряму залежність між гостротою зору й вмістом селену у тканинах ока. Селен впливає на ферментативні реакції; виявлені також захисні властивості його деяких сполук у разі променевого ураження. Потреба людини й тварин у селені становить 50—100 мкг на кілограм раціону. У великих дозах селен уповільнює окисно-відновні реакції в організмі, порушує синтез незамінної амінокислоти метіоніну, нестача якої призводить до тяжких функціональних розладів [12]. А тому одержання біомаси *S. platensis* з певним вмістом селену сьогодні є актуальним для багатьох регіонів України, де нестача селену в традиційних продуктах харчування стає причиною виникнення серцево-судинних, онкологічних та інших захворювань. Для отримання біомаси водорості, збагаченої селеном, необхідно визначити його концентрацію, яка вноситься в живильне середовище, у складі яких сполук селен нагромаджується у клітині, а також дослідити склад основних компонентів біомаси водорості під впливом певних концентрацій селену [11].

Враховуючи важливе значення селену для людини, ми досліджували його поглинання інтактними клітинами й глікопротеїдами *S. platensis* (табл. 1). Результати засвідчують, що в дослідному варіанті його кількість у відсотковому відношенні в 105 разів більша, ніж у контролі. Що ж до ступеня поглинання аніонів селену клітинами водорості, то він значно менший за ступінь поглинання іонів заліза, цинку, міді, стронцію й становить 12,32 %. Глікопротеїди водорості, які інкубувались у середовищі з аніонами селену, містять його у відсотковому відношенні у 81 раз більше, ніж у контролі. Ступінь поглинання аніонів селену глікопротеїдами становить 9,12 % (табл. 2). Зауважимо, що незначне поглинання аніонів селену клітинами й глікопротеїдами *S. platensis* пояснюється, мабуть, нетривалим витримуванням останніх в інкубаційній суміші.

Таким чином, наші дослідження показали, що ступінь поглинання іонів заліза, цинку, міді, стронцію, а також аніонів селену інтактними клітинами *S. platensis* і глікопротеїдами є різним. Найбільшою мірою акумулюються іони цинку й заліза.

1. *Белокобыльский А.И., Гинтури Э.И., Кучава П.Е. и др.* Аккумуляция селена и хрома клетками *Spirulina platensis* в динамике роста // Препр. ОИЯИ. — 2002. — № Д 142002-130. — С. 1—7.
2. *Божков А.И., Могилянская С.М.* Адаптация *Dunaliella viridis* Teod. к различным концентрациям сернокислой меди. Роль системы экскреции ионов меди в среду // Альгология. — 1996. — **6**, № 2. — С. 122—132.
3. *Бурдин К.С., Полякова Е.Е.* Металлотионеины, их строение и функции // Усп. совр. биол. — 1987. — **103**. — С. 390—402.
4. *Горюнова С.В., Максимов В.Н., Плеханов С.Е.* Поглощение смесей цинка, кадмия и кобальта водорослями *Scenedesmus quadricauda* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биол. — 1996. — № 1. — С. 54—60.
5. *Дмитриева А.Г., Даллакян Г.А., Лысенко Н.Л.* Анализ функциональных показателей популяции водорослей в условиях накопления меди // Альгология. — 1992. — **2**, № 2. — С. 30—36.
6. *Карамушка В.И., Скляров А.Г., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р.* Реакции клеток *Chlorella vulgaris* Beijer на медь (II) и золото (III) // Альгология. — 1991. — **1**, № 2. — С. 27—31.
7. *Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Гусев М.В.* Устойчивость цианобактерий и микроводорослей к действию тяжелых металлов; роль металлосвязующих белков // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. — 1998. — № 2. — С. 42—49.
8. *Михайлов А.А., Верзилин В.В., Шаренкова А.А.* Влияние температурных и световых условий культивирования на продуктивность *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. — 1972. — Вып. 2. — С. 67—73.
9. *Мосулишвили Л.М., Белокобыльский А.И., Киркисали Е.И. и др.* Исследование взаимодействия соединений хрома с синезеленой водорослью *Spirulina platensis* // Препр. ОИЯИ. — 2002. — № Д 14-2002-19. — С. 1—11.
10. *Плешков В.П.* Практикум по биохимии растений. — М.: Колос, 1968. — С. 45—53.
11. *Пронина Н.А., Ковшова Ю.И., Попова В.В. и др.* Влияние селенит-ионов на рост и накопление селена у *Spirulina platensis* // Физиология растений. — 2002. — **49**, № 2. — С. 264—271.
12. *Решетник Л.А., Парфенова Е.О.* Селен и здоровье человека (обзор литературы) // Экология моря. — 2000. — **54**. — С. 20—25.
13. *Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л.* Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей // Вестн. МГУ. Сер. 16. — 2003. — № 3. — С. 29—37.
14. *Савельев И.Б., Селях И.О.* Влияние ионов цинка на морфологию и ультраструктуру клеток цианобактерии *Anacystis nidulans* // Вест. МГУ. Сер. 16. — 2000. — № 3. — С. 39—44.
15. *Тропин И.В., Золотухина Е.Ю.* Влияние экзо- и катаболитов бурых водорослей на аккумуляцию металлов талломами морских макрофитов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. — 1996. — № 1. — С. 47—53.
16. *Усенко Т.Е., Божков А.И., Догадина Т.В.* Влияние ионов меди на содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках водорослей рода *Dunaliella* Teod. // Биол. науки. — 1991. — № 7. — С. 103—108.
17. *Boshkov A.I., Mogilyanskaya S.M.* Relationship between Cu^{2+} ion concetration in medium, bioaccumulation and toxicity for the microalgae *Dunaliella viridis* Teod. // Альгология. — 1994. — **4**, № 3. — С. 22—29.
18. *Jeanne N., Renoux A., Heuillet E.* Cadmium cytotoxicity on a marine unicellular alga *Dunaliella bioculata* // Mar. Environ. Res. — 1989. — **28**, № 1—4. — P. 538—539.
19. *Kaplan D., Haimer Y.M., Abeliovich A., Gollasbrouch P.B.* Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. // Plant. Sci. — 1995. — **109**, № 2. — P. 129—137.
20. *Kumar D., Jha M., Kumar H.D.* Copper toxicity in the fresh water cyanobacterium *Nostoc linckia* // J. Gen. and Appl. Microbiol. — 1985. — **31**, N 1. — P. 165—169.
21. *Mierle G., Stokes O.* Copper-induced cation exchange in *Scenedesmus acuminatus* // J. Phycol. — 1979. — **15**. — P. 28—35.

22. *Rodrigues-Ariza A., Dorado G., Peinado J. et al.* Biochemical effects of environmental pollution in fishes from the Spanish South-Atlantic littoral // Biochem. Soc. Trans. — 1991. — **19**, N 3. — P. 301.
23. *Thompson S.L., Manning F.C.R., Mc Coll S.M.* Comparison of the toxicity of chromium III and chromium VI to cyanobacteria // Bull. Environ. Contam. and Toxicol (КЭ). — 2002. — **69**, N 2. — P. 286—293.
24. *Webb M.* Metallothionein in regeneration, reproduction and development // Exp. Suppl. — 1987. — **52**. — P. 483—498.
25. *Whiston A.I., McAuley P.J., Smith V.J.* Removal of heavy metals from wasterwater by marin microalgae // J. Exp. Bot. — 1995. — **46**. — Suppl. 1. — P. 13.

Рекомендує до друку
С.Я. Кондратюк

Надійшла 02.11.2005

П.А. Мушак

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

АБСОРБЦИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ СИНЕЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛЬЮ *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDTS.) GEITL.

Изложены результаты исследований абсорбции ионов тяжелых металлов (железа, цинка, меди и стронция) интактными клетками и гликопротеидами синезеленой водоросли *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl., 26. Установлено, что интактные клетки и препараты гликопротеидов водоросли опытного варианта накапливали в десятки и сотни раз больше этих элементов, нежели клетки и гликопротеиды в контроле, причем в наибольшей мере абсорбируются цинк и железо. Следует отметить, что степень поглощения ионов вышеупомянутых элементов интактными клетками водоросли выше, чем препаратами гликопротеидов.

Ключевые слова: ионы, тяжелые металлы, железо, цинк, медь, стронций, селен, интактные клетки, гликопротеиды, поглощение

P.O. Mushak

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

ABSORBTION OF HEAVY METAL IONS BY BLUE-GREEN ALGAE *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDTS.) GEITL.

The results of investigations of heavy metal ions absorption (iron, zinc, copper, strontium) by intact cells and glycoproteins of the blue-green algae *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl., strain 26, have been presented in the article. It was determined that intact cells and preparations of algae glycoproteins of the experimental variant accumulated tens and hundreds times as many these elements, compared to cells and glycoproteins in the control; moreover, zinc and iron are accumulated to a higher degree. It should be noted that the degree of ions absorption of the mentioned elements by intact algae cells is higher than by glycoprotein's preparations.

Key words: ions, heavy metals, iron, zinc, copper, strontium, selenium, intact cells, glycoproteins, absorption