

УДК [(577.125 + 581.174):582.263] 574.64

А. И. Луцив, В. В. Грубинко

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИПИДОВ У
CHLORELLA VULGARIS ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНОВ
ЦИНКА, СВИНЦА И ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА**

Представлены данные об интенсивности биосинтеза липидов различных классов в клеточных структурах *Chlorella vulgaris* Beijer. при воздействии Zn^{2+} , Pb^{2+} и дизельного топлива. Показано, что суммарное содержание липидов и их различных классов в хлоропластах и цитоплазматической фракции изменяется в зависимости от природы токсиканта. Включение ^{14}C -ацетата в липиды различных классов свидетельствует о перемещении синтеза адаптивных классов липидов из хлоропластов в цитоплазматические структуры. Содержание пигментов (хлорофиллов *a* и *b*, феопигментов) при воздействии цинка и свинца увеличивается, а дизельного топлива — уменьшается. При этом наряду с увеличением количества хлоропластов их размеры существенно уменьшаются.

Ключевые слова: хлорофиллы, феопигменты, включение ^{14}C -ацетата, липиды, ионы цинка, ионы свинца, дизельное топливо, *Chlorella vulgaris*.

Известно, что синтез липидов у растений локализован преимущественно в хлоропластах [32], в которых *de novo* синтезируется большинство жирных кислот, и лишь незначительно — в митохондриях [29]. Цитозоль клеток растений в синтезе жирных кислот участия не принимает, однако в нем функционирует система удлинения ацильной цепи за счет присоединения двухуглеродных фрагментов к ацильной цепи C_{16} и C_{18} кислот, при этом получают жирные кислоты, используемые при образовании восков и запасных липидов [26]. Кроме того, синтез липидов в клетках растений возможен и в цитоплазме за счет ацетил-КоА, образующегося в процессе окисления жирных кислот, которые экспортируются в цитоплазму из пластид, где их количество особенно велико (в основном 18 : 1 и 16 : 0) [32]. Однако при воздействии стрессоров, например у *Potamogeton perfoliatus* L., выращенного в присутствии Cd^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} , происходит активная структуризация метаболизма с целью поддержания функционального статуса клеточных структур [31]. При этом липидсинтезная активность может увеличиваться не только в хлоропластах [27], но и в других пластидах, которые берут на себя функцию поддержания гомеостатического уровня липидного состава клеток, синтезируя липиды, необходимые для адаптивной перестройки клеточных мембран при формировании токсикорезистентности клеток [32]. Ранее нами установлено, что при воздействии ионов цинка и свинца у хлореллы возрастает включение ^{14}C -ацетата в липиды, но содержание хлорофил-

© Луцив А. И., Грубинко В. В., 2012

лов a и b уменьшается [3]. При перестройке клеточного метаболизма часто происходит и импорт липидов обратно из цитоплазмы в пластиды (противоток липидов), что необходимо для адаптивной структурно-функциональной перестройки мембран клеток и пластид [32]. В связи с этим возникает вопрос об изменении локализации и интенсивности синтеза липидов различных классов в растительных клетках при стрессовых, в том числе токсических, воздействиях. При изучении водорослей этот вопрос важен как с точки зрения понимания формирования токсикорезистентности в условиях загрязнения водоемов, так и для выяснения механизмов регуляции синтеза липидов различных классов при культивировании [7, 24]. Согласно предварительным исследованиям, ионы некоторых металлов и нефтепродукты влияют на интенсивность и направленность биосинтеза липидов у хлореллы [3—5].

Цель работы — установить локализацию и интенсивность биосинтеза липидов и их качественный состав у *Chlorella vulgaris* Beijer. при воздействии ионов Zn^{2+} , Pb^{2+} и дизельного топлива (ДТ).

Материал и методика исследований. Хлореллу выращивали в условиях накопительной культуры в люменостате при освещении лампами дневного света (2500 лк) и температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ на питательной среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горема (№ 11) [14]. В экспериментах к культуре добавляли водные растворы солей металлов $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $Pb(NO_3)_2$ из расчета на ион: Zn^{2+} — $5,0 \text{ мг/дм}^3$, Pb^{2+} — $0,5 \text{ мг/дм}^3$, что соответствует 5 ПДК_{рыбхоз}, и дизельное топливо в количестве $0,5 \text{ мл/дм}^3$, что соответствует 10 ПДК_{рыбхоз} [6, 21]. В качестве контроля использовали клетки, выращенные в среде без токсикантов. Период инкубации водорослей составлял 1 и 7 суток. Концентрация токсикантов и продолжительность их воздействия выбраны с учетом ранее установленной нами наибольшей выраженности структурно-метаболических перестроек в клетках хлореллы при указанных значениях [4, 5, 11].

Клетки хлореллы гомогенизировали в механическом гомогенизаторе (7000 об/мин) в инкубационном растворе и центрифугировали (3000 г, 10 мин). Надосадочную жидкость рассматривали как цитоплазматическую фракцию, которая, по результатам микроскопического контроля, не содержала хлоропластов. Их выделяли из осадка по методу [8] с использованием ступенчатого центрифугирования в градиенте плотности перкола (40/70%). Хлоропласты отбирали на границе фаз 40/70% перкола и растворяли в буфере (0,33 М сорбит, 50 мМ трицин, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ β -меркаптоэтанол, pH 8,0).

Интенсивность биосинтеза липидов оценивали по включению $[1-^{14}\text{C}]$ -ацетата натрия. Цитоплазматическую фракцию и выделенные хлоропласты инкубировали с 200 кБк $[1-^{14}\text{C}]$ -ацетата натрия при температуре 20°C и освещении 2500 лк в течение 90 мин. После остановки реакции трихлоруксусной кислотой (10%) экстракты центрифугировали (3000 г, 15 мин), затем отделяли осадок, из которого липиды экстрагировали хлороформ-метанольной смесью в соотношении 2 : 1 по методу Фолча [9]. Нелипидные примеси из хлороформ-метанольного экстракта удаляли отмыванием

1%-ным раствором KCl [19]. Количество общих липидов определяли весовым методом после отгонки экстрагирующей смеси [9]. Разделение липидов на фракции осуществляли методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии в силикагеле на стеклянных пластинках после предварительного активирования разделяющего слоя [10] с использованием в качестве подвижной фазы смеси гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты в соотношении 70 : 30 : 1. Хроматограммы проявляли в парах кристаллического йода. Количество неполярных липидов определяли бихроматным методом [19] спектрофотометрически при длине волны 615 нм. Содержание фосфолипидов находили по количеству неорганического фосфора по методу Васьяковского после их минерализации при температуре 180°C [33]. Радиоактивность образцов измеряли на сцинтилляционном счетчике LS-100C Beckman (США) и выражали в имп/мин·мг липидов.

Хлоропласты исследовали при помощи микроскопа МБИ-15, увеличение $\times 600$. Количество хлорофилла и феопигментов определяли спектрофотометрически по дифференциальным спектрам их поглощения [16, 17]. Содержание белка устанавливали общепринятым методом Лоури. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики [13].

Результаты исследований и их обсуждение

Известно [36], что водоросли могут накапливать металлы в количестве, в десятки тысяч раз превышающем их содержание во внешней среде. Так, установлено, что у морских микроводорослей клеточные липиды связывают 19% свинца и 15% цинка, а белковая фракция их клеток — 27% меди и свинца — до 19% общего содержания металлов в среде. Поскольку хлоропласты являются высокобелковыми структурами и в них преимущественно локализован синтез липидов, можно предположить прямое воздействие ионов металлов на структуру хлоропластов и содержание в них пигментов [32].

Полученные данные показали (табл. 1), что содержание хлорофилла *a* при воздействии Zn^{2+} в течение 7 сут возрастало на 25%, хлорофилла *b* — на 18%, феопигментов — на 6,4% по сравнению с контролем. При воздействии Pb^{2+} в течение 1 сут количество хлорофиллов *a* и *b* также увеличивалось соответственно на 12 и 25%, а феопигментов — на 12%. При воздействии ДТ в течение 1 сут содержание хлорофилла *a* уменьшалось на 20%, хлорофилла *b* — на 23%, феопигментов — на 9% по сравнению с контролем. Влияние цинка на этот показатель можно объяснить высокой проницаемостью клеточных мембран для его ионов, их подвижностью в клетке и комплексообразующей способностью, а свинца — высоким сродством к белкам и прочным удерживанием этого металла в составе металлотионеинподобных комплексов [15, 35]. Нефтепродукты, как органические вещества с поверхностно-активным эффектом, обладают мембранотропным действием, в связи с чем их влияние на пигменты может быть косвенным и связанным с модификацией структуры и проницаемостью мембран клеток. Преобладание в их составе ароматических углеводородов и высокая вязкость способствует более длительному контакту токсиканта с поверхностью клеток [30]. Кроме того, у большинства водорослей при остром воздействии нефти и нефтепродуктов происходит снижение интенсивности фотосинтеза и усиление дыхания,

1. Содержание хлорофиллов и феопигментов (мкг/дм³ культуральной среды) у *Ch. vulgaris* при воздействии Zn²⁺, Pb²⁺ и дизельного топлива ($M \pm m$, $n = 5$)

Варианты опыта	Содержание пигментов				Феопигменты/хл. <i>a</i>
	хл. <i>a</i>	хл. <i>b</i>	хл. <i>a+b</i>	феопигменты	
Контроль (1—7 сут)	108,41 ± 16,78	64,29 ± 7,62	172,70	258,9 ± 18,38	2,39
Zn ²⁺ (7 сут)	135,25 ± 13,36*	75,64 ± 6,14*	210,89	275,5 ± 16,46*	2,04
Pb ²⁺ (1 сут)	121,77 ± 16,96*	80,61 ± 7,38*	202,38	290,6 ± 16,71*	2,39
ДТ (1 сут)	86,99 ± 7,34*	49,65 ± 6,67*	136,64	236,3 ± 12,79*	2,70

* Различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,02—0,05$.

приводящее к адаптивным перестройкам фотосинтетического аппарата хлоропластов, что влияет на содержание хлорофиллов [20]. Свидетельством этого является и то, что поверхностно-активные вещества способствуют выходу из клеток водорослей ионов марганца и цинка [25], связанных с фотосинтезом и необходимых для образования кислорода [22]. Таким образом, воздействие ионов металлов и ДТ на содержание пигментов разноплановое, вероятно вследствие различных механизмов их проникновения в клетки и влияния на структурно-функциональные компоненты мембран и пигменты.

Соотношение содержания феопигментов и хлорофилла *a* показывает, что при воздействии ионов цинка оно снижалось на 15% по сравнению с контролем, ионов свинца — было близким к контрольным значениям, а дизельного топлива — возрастало на 13%. В целом незначительное количество хлорофилла *a* и преобладание феопигментов (феофитин, феофорбид, хлорофиллид) можно объяснить тем, что они являются продуктами распада хлорофилла *a*.

Общее содержание липидов в контроле в цитоплазматической фракции было на 41% меньше, чем в хлоропластах (рис. 1), что согласуется с общим представлением о преимущественной локализации синтеза липидов в пластидах [32]. Содержание липидов в цитоплазматической фракции и хлоропластах при воздействии ионов цинка и свинца различалось, что, очевидно, связано с природой токсиканта. Так, ионы Zn²⁺ практически не влияли, а ионы свинца увеличивали его в цитоплазматической фракции на 44%. В хлоропластах этот показатель практически не изменился (см. рис. 1).

Интенсификация синтеза липидов в цитоплазматической фракции при воздействии Pb²⁺ совпадает с увеличением содержания феопигментов (см. табл. 1).

Нами установлено, что дизельное топливо обуславливает увеличение содержания липидов в цитоплазматической фракции на 46%, а в хлоропластах — на 13%. В целом при действии ионов свинца и ДТ как типичных токсикан-

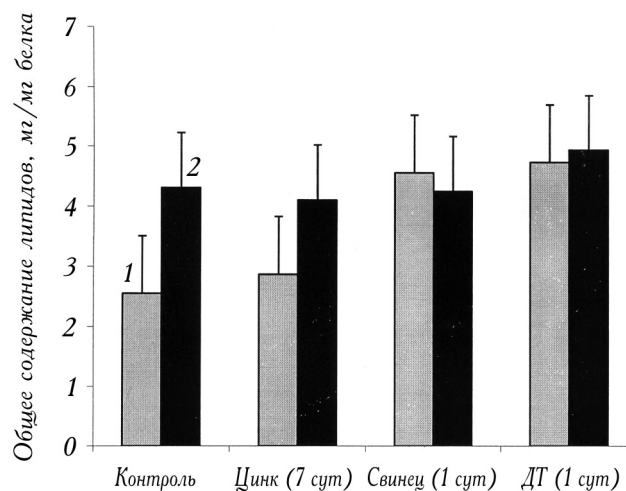
тов возрастает содержание липидов в цитоплазматической фракции, а также изменяется их соотношение в пользу последней, что согласуется с данными об активации синтеза липидов во внехлоропластных структурах при воздействии ионов металлов [31].

В связи с вышеизложенным важно было установить особенности фракционного состава липидов в цитоплазматической фракции и хлоропластах хлореллы. Оказалось, что содержание триацилглицеролов (ТАГ) в контроле в цитоплазматической фракции и хлоропластах практически не различалось (рис. 2). При этом количество диацилглицеролов (ДАГ) в хлоропластах было на 124%, а фосфолипидов (ФЛ) — на 22% больше, чем в цитоплазматической фракции. Содержание неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в хлоропластах также было выше (в 4,8 раза). Полученные данные согласуются с известным фактом преобладания в тилакоидах растений углеводных производных ДАГ, большего количества фосфатидилглицеролов и свободных высших жирных кислот, используемых для синтеза липидов [32]. Практически одинаковое содержание ТАГ в обеих фракциях может быть связано с их накоплением растительными клетками при воздействии токсикантов [5].

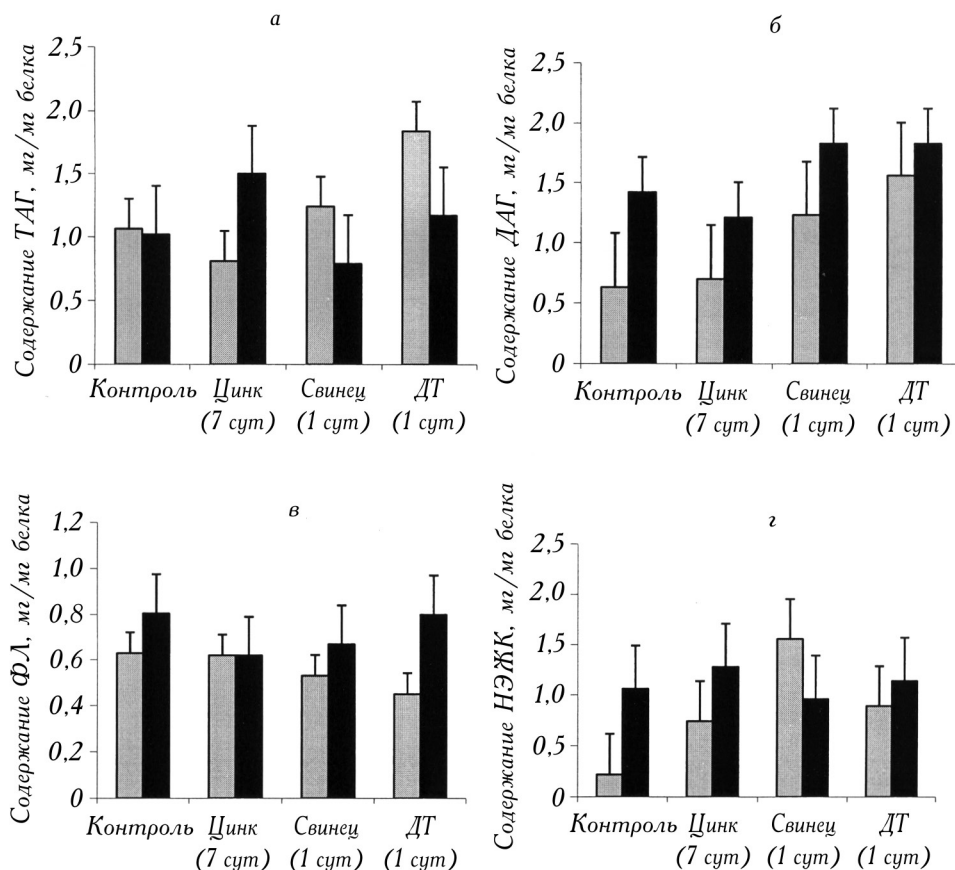
В опытных образцах содержание ТАГ в цитоплазматической фракции при воздействии ионов цинка уменьшалось на 24% (по сравнению с контролем), а ионы свинца и дизельное топливо стимулировали его накопление соответственно на 16 и 73% (см. рис. 2).

Следует отметить, что при воздействии ионов цинка и дизтоплива содержание ТАГ в хлоропластах увеличивалось соответственно на 47 и 15% по сравнению с контролем, при воздействии свинца — уменьшалось на 23%. Значительное увеличение содержания ТАГ в хлоропластах при воздействии Zn^{2+} может быть связано с его стимулирующим влиянием на синтез липидов, а накопление в цитоплазматической фракции при воздействии ионов свинца и ДТ — уплотнением мембран [11].

В цитоплазматической фракции ДАГ накапливались при воздействии всех исследованных веществ, в наибольшей степени Pb^{2+} и ДТ (в 2,0—2,5



1. Содержание липидов в клеточных фракциях *Ch. vulgaris* при воздействии токсикантов ($M \pm m$, $n = 5$). Здесь и на рис. 2: 1 — цитоплазматическая фракция; 2 — хлоропласты.



2. Содержание триацилглицеролов (ТАГ), диацилглицеролов (ДАГ), фосфолипидов (ФЛ) и неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в клеточных фракциях *Ch. vulgaris* при воздействии токсикантов ($M \pm m$, $n = 5$).

раза по сравнению с контролем). В хлоропластах относительное содержание ДАГ при воздействии Pb^{2+} и ДТ возросло на 30%, а Zn^{2+} — снижалось на 15%. Таким образом, в цитоплазматической фракции активируется образование ДАГ, что также согласуется с мембранными перестройками в клетках водных растений при воздействии ионов металлов [11, 31].

В отличие от ДАГ содержание ФЛ в цитоплазматической фракции при воздействии Pb^{2+} и ДТ снизилось соответственно на 16 и 29%, а в хлоропластах при воздействии Zn^{2+} и Pb^{2+} — соответственно на 23 и 17%. Это может быть обусловлено как перестройкой мембран (уплотнением), так и их расщеплением из-за активации фосфолипаз [31], а также с участием фосфатных составляющих в других метаболических процессах (функционирование АТФ-аз, обмен фосфатов) [1, 11].

2. Соотношение относительного содержания ТАГ : ДАГ : ФЛ : НЭЖК у *Ch. vulgaris* при воздействии токсикантов, %

Варианты опыта	Цитоплазматическая фракция	Хлоропласты
Контроль (1—7 сут)	42 : 25 : 25 : 8	24 : 33 : 19 : 24
Zn ²⁺ , 5 ПДК (7 сут)	28 : 25 : 22 : 25	31 : 29 : 14 : 26
Pb ²⁺ , 5 ПДК (1 сут)	27 : 26 : 12 : 34	18 : 44 : 17 : 21
ДТ, 10 ПДК (1 сут)	40 : 31 : 11 : 18	23 : 37 : 17 : 23

Содержание НЭЖК в цитоплазме при воздействии исследованных веществ увеличивалось по сравнению с контролем, в наибольшей степени (в 7 раз) — Pb²⁺. В хлоропластах их количество при воздействии ионов цинка и ДТ увеличивалось соответственно на 21 и 7,5%, а Pb²⁺ — уменьшалось на 9% по сравнению с контролем. Увеличение содержания НЭЖК связано с расщеплением фосфолипидов, которые, как отмечалось, могут не только служить источником фосфатов, но и использоваться в энергетическом обеспечении клеток, усиливающимся при воздействии токсикантов [1].

Выявленные нами изменения связаны, очевидно, с выполнением липидами различных адаптивных функций при воздействии веществ разной химической природы. Относительное содержание ТАГ в цитоплазматической фракции при воздействии ионов Zn²⁺ снижалось на 33%, а ФЛ — на 12% (табл. 2). При воздействии Pb²⁺ и ДТ относительное содержание ТАГ также снижалось — соответственно на 33 и 5%, а ФЛ — на 52 и 56%, тогда как количество ДАГ возрастало на 4 и 24% по сравнению с контролем. Доля НЭЖК при воздействии цинка, свинца и ДТ возрастала соответственно в 3,00, 4,25 и 2,25 раза.

В хлоропластах при воздействии ионов цинка относительное содержание ТАГ и НЭЖК увеличивалось соответственно на 29 и 8%, а ДАГ и ФЛ уменьшалось соответственно на 12 и 26%. Ионы свинца снижали относительное содержание ТАГ на 25%, ФЛ — на 11%, НЭЖК — на 12,5%, ДТ — в несколько меньшей степени (ТАГ — на 4%, ФЛ — на 11%, НЭЖК — на 4%), при этом доля ДАГ возрастала соответственно на 33 и 12%.

Усиление синтеза ТАГ в хлоропластах при воздействии ионов цинка обусловлено, вероятно, уплотнением мембран в клетках водоросли, что может быть защитным механизмом от повреждающего действия и проникновения металла в клетку. Так, количество ТАГ в клетках хлореллы в стрессовых условиях может достигать 80% их сухой биомассы [2]. Снижение их содержания в хлоропластах при воздействии ионов свинца и в цитоплазматической фракции при воздействии всех исследованных токсикантов сопровождается иными перестройками мембраны (изменение вязкости и текучести) [11].

Фосфолипиды входят в состав клеточных мембран, влияют на их текучесть, регулируют связь клеток со средой обитания [23]. В наших опытах содержание фосфолипидов в цитоплазматической фракции и хлоропластах

3. Включение ^{14}C -ацетата в липиды *Ch. vulgaris* при воздействии Zn^{2+} , Pb^{2+} и дизельного топлива ($M \pm m, n = 5$)

Варианты опыта	Включение ^{14}C -ацетата в липиды, имп/мин·мг			
	ТАГ	ДАГ	ФЛ	НЭЖК
Цитоплазматическая фракция				
Контроль (1—7 сут)	48,50 ± 2,12	46,25 ± 1,77	43,75 ± 4,59	52,00 ± 5,19
Zn^{2+} (7 сут)	40,75 ± 3,89*	58,75 ± 6,83*	43,25 ± 2,77*	52,25 ± 3,18*
Pb^{2+} (1 сут)	50,00 ± 1,41*	48,50 ± 5,6*	57,00 ± 4,24*	45,50 ± 4,49*
ДТ (1 сут)	46,00 ± 4,38*	46,50 ± 4,24*	50,67 ± 4,02*	49,33 ± 2,08*
Хлоропласты				
Контроль (1—7 сут)	47,00 ± 2,18	49,17 ± 4,93	55,50 ± 5,19	49,00 ± 5,61
Zn^{2+} (7 сут)	49,67 ± 3,31*	50,83 ± 5,51*	49,33 ± 4,04*	54,67 ± 3,61*
Pb^{2+} (1 сут)	45,83 ± 2,75*	46,00 ± 2,29*	43,83 ± 2,04*	48,00 ± 5,14*
ДТ (1 сут)	48,17 ± 2,75*	50,33 ± 5,51*	44,83 ± 2,75*	48,33 ± 5,43*

* Различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,02—0,05$.

при влиянии ионов цинка, свинца и ДТ снижалось. Это может быть следствием связывания металлов фосфолипидами, которые обладают высокой сорбционной способностью по отношению к металлам [34] и их извлечением из метаболического пула. Действие дизтоплива можно объяснить способностью нефтепродуктов разрушать плазмалемму, замещая мембранные липиды, в состав которых входят и фосфолипиды [20]. Полученные данные подтвердились при изучении синтеза липидов, оцененного по включению ^{14}C -ацетата (табл. 3).

Так, при воздействии Zn^{2+} включение ^{14}C -ацетата в ТАГ и ФЛ в цитоплазматической фракции снижалось соответственно на 16,0 и 1,2%, а в ДАГ — возрастало на 27% по сравнению с контролем, тогда как включение метки в НЭЖК практически не изменялось. Включение ^{14}C -ацетата в ТАГ, ДАГ и ФЛ цитоплазматической фракции при воздействии Pb^{2+} увеличивалось соответственно на 3, 5 и 30%, а в НЭЖК — уменьшалось на 12,5%. При воздействии дизельного топлива включение ^{14}C -ацетата в ТАГ и НЭЖК снижалось на 5%, в ФЛ — возрастало на 16%, в ДАГ — не изменялось.

Таким образом, при воздействии всех исследованных токсикантов синтез липидов активируется преимущественно в цитоплазматической фракции. Однако Zn^{2+} как биогенный элемент усиливает образование ДАГ, а Pb^{2+} и ДТ — ФЛ, что может быть связано с разным механизмом действия этих веществ на клеточные мембраны хлореллы [11].

4. Количество и размеры хлоропластов *Ch. vulgaris* при воздействии токсикантов ($M \pm m, n = 5$)

Варианты опыта	Количество хлоропластов в 1 мл гомогената	Диаметр хлоропластов, мкм
Контроль(1—7 сут)	437,59 ± 50,58	11,88 ± 2,11
Zn ²⁺ (7 сут)	3706,46 ± 471,40*	4,48 ± 1,36*
Pb ²⁺ (1 сут)	352,69 ± 49,05*	11,20 ± 1,64*
ДТ (1 сут)	2051,89 ± 152,15*	6,80 ± 1,32*

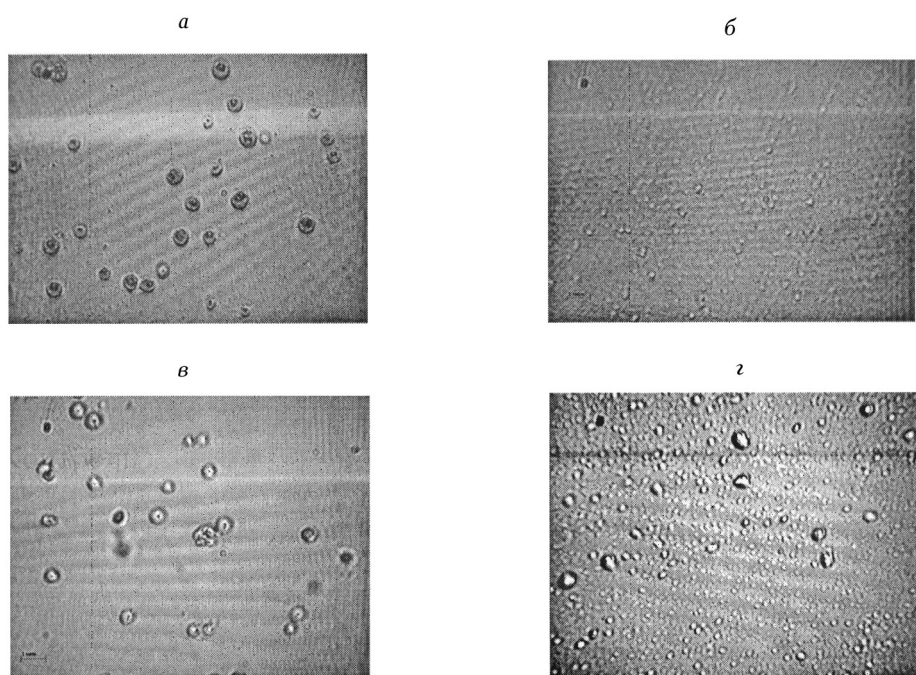
* Различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,01-0,05$.

Включение ¹⁴C-ацетата в липиды хлоропластов при воздействии цинка увеличивалось (в ТАГ — на 5,7%, в ДАГ — на 3,5%, в НЭЖК — на 12,0%) и только в ФЛ — снижалось на 11%. При воздействии свинца включение ¹⁴C-ацетата в ТАГ, ДАГ, ФЛ и НЭЖК уменьшалось соответственно на 2,5, 6,5, 21,0 и 2,0%, тогда как при воздействии дизтоплива включение ¹⁴C-ацетата в ТАГ и ДАГ возрастало на 2,5%, в ФЛ — снижалось на 19%, а в НЭЖК — практически не изменялось.

В целом следует отметить усиление синтеза липидов в хлоропластах, что, наряду с образованием их отдельных классов в цитоплазматической фракции, свидетельствует о перемещении синтеза липидов из хлоропластов в цитоплазматические структуры.

В связи с полученными данными было интересно исследовать морфологическое состояние хлоропластов. Их количество в гомогенате клеток при воздействии цинка и дизельного топлива увеличивалось в 8,5 и 4,7 раза по сравнению с контрольными показателями, а при воздействии свинца — уменьшалось на 19% (табл. 4). При воздействии токсикантов заметно уменьшался диаметр хлоропластов: Zn²⁺ — на 63%, Pb²⁺ — на 6%, ДТ — на 43% (рис. 3).

Общей закономерностью является то, что при увеличении количества хлоропластов их линейные размеры существенно уменьшались, особенно при действии ионов цинка, в меньшей степени — ДТ. Ионы свинца, скорее всего, ингибируют синтез липидов в хлоропластах, поскольку незначительно снижает их количество и размеры. Ионы цинка и ДТ, вероятно, снижают способность хлоропластов к синтезу липидов, что сопровождается изменением их морфологии (уменьшаются размеры) и интенсивностью образования (их количество в клетках значительно возрастает). Ранее показано [28], что в клетках мезофилла листьев пшеницы количество хлоропластов на клетку медленно снижалось в процессе старения листьев, когда происходила быстрая дегградация хлоропластов. Их размеры также постепенно уменьшались, наиболее значительно в конце старения. Пожелтевшие листья при этом содержали многочисленные структуры, напоминающие капельки жира, как при воздействии на клетки хлореллы дизельного топлива (см. рис. 3, г). В связи этим, полученные нами результаты могут свидетельствовать о



3. Микрофотографии хлоропластов *Ch. vulgaris* при воздействии токсикантов, $\times 600$: а — контроль; б — Zn^{2+} (7 сут); в — Pb^{2+} (1 сут); г — ДТ (1 сут).

вероятной деградации хлоропластов при интоксикации. Однако механизм действия Pb^{2+} , Zn^{2+} и ДТ на хлоропласты и их липидсинтезную способность, вероятно, различен.

Заключение

В результате проведенных опытов установлено, что в связи с разным механизмом воздействия исследованных веществ на растительные клетки в исследованных фракциях наблюдаются изменения интенсивности синтеза как липидов в целом, так и их отдельных классов. Поэтому оценка отклика клеток водорослей на воздействие токсикантов по валовому содержанию липидов не является достаточно объективной. Более информативно, на наш взгляд, содержание отдельных классов липидов в клеточных фракциях, поскольку оно отражает их участие в обеспечении адаптивных структурно-функциональных перестроек в клеточных структурах, прежде всего в клеточных мембранах. Вероятно, синтез липидов активируется в других клеточных структурах, в первую очередь в митохондриях и эндоплазматической сети [18]. В хлоропластах, скорее всего, снижается образование адаптивных форм липидов, необходимых клетке для защиты от токсиканта. Кроме того, некоторые вещества, например Zn^{2+} и ДТ, существенно изменяют количество и размеры хлоропластов, вызывая их деградацию. В связи с этим синтез необходимых адаптивных форм липидов, участвующих в формировании токсикорезистентности клеток, активизируется и в других цитоплазматических структурах.

**

Наводяться дані про інтенсивність біосинтезу різних класів ліпідів у клітинних структурах *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії іонів цинку, свинцю і дизельного палива. Загальний вміст ліпідів їх окремих класів у хлоропластах і цитоплазматичній фракції змінюється залежно від природи токсиканту. Включення ^{14}C -ацетату в ліпиди різних класів за дії досліджуваних токсикантів свідчить про те, що їх синтез переміщується з хлоропластів в цитоплазматичні структури. Вміст пігментів (хлорофілів а і b, феопігментів) за дії іонів цинку і свинцю збільшується, а за дії дизельного палива – зменшується. Одночасно із збільшенням кількості хлоропластів їх розміри суттєво зменшуються, особливо за дії іонів цинку і, меншою мірою, дизельного палива.

**

The article deals with intensity of the lipids synthesis and their qualitative composition in different cell structures of *Chlorella vulgaris* Beijer. under the impact of Zn^{2+} , Pb^{2+} and diesel fuel. The content of pigments (chlorophylls a and b, phaeopigments) increased under the impact of Zn^{2+} , Pb^{2+} , and decreased under the impact of diesel fuel. The content of lipids and their different classes in the cytoplasm fraction and chloroplasts varied depending on the toxicant's nature. Inclusion of ^{14}C -acetate into different classes of lipids indicated replacement of lipid synthesis from chloroplast to cytoplasm structures. Number of chloroplasts increased, whereas their dimensions significantly decreased, especially under the impact of Zn^{2+} , and to a less extent under the impact of diesel fuel.

**

1. Богнар О.І. Адаптивні властивості водоростей за дії іонів металів : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2008. — 22 с.
2. Верещагин А.Г. Биохимия триглицеридов. — М.: Наука, 1972. — 307 с.
3. Горга А.И. Регуляция биосинтеза липидов у *Chlorella vulgaris* Beijer. ионами цинка и свинца // Тез. докл. III междунар. конф.-шк. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». — Петрозаводск, 2010. — С. 40—42.
4. Горга А.І., Грубінко В.В. Інтенсивність біосинтезу протеїнів, вуглеводів та ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. за дії іонів цинку і свинцю // Укр. біохім. журн. — Т. 82, № 4 (доп. 1). — С. 167.
5. Грубінко В.В., Костюк К.В. Липидные перестройки в клеточных мембранах водорослей при воздействии ионов цинка и свинца // Там же. — С. 24.
6. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века. — М., 2002. — 140 с.
7. Золоторьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. — К.: Альтерпрес, 2008. — 234 с.
8. Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Применение метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии пластидного генома // Физиология растений. — 2008. — Т. 55, № 1. — С. 114—122.
9. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 322 с.

10. *Копытов Ю.П.* Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов // Экология моря. — 1983. — Вып. 12. — С. 76—80.
11. *Костюк К.В.* Влияние токсикантов на проницаемость мембран у пресноводных водорослей // Тез. докл. III междунар. конф.-шк. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». — Петрозаводск, 2010. — С. 82—83.
12. *Костюк К.В., Грубинко В.В.* Роль мембранных АТФ-аз в адаптации гидробионтов к факторам водной среды // Гидробиол. журн. — 2010. — Т. 46, № 4. — С. 49—62.
13. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
14. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике* / Под ред. А. В. Топачевского. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
15. *Мецлер Д.* Биохимия. Химические реакции в живой клетке. — М.: Мир, 1980. — Т. 1. — С. 264—267.
16. *Определение содержания хлорофилла в планктоне пресных водоемов* / Сост. Л.А. Сиренко, А.В. Курейшевич. — Киев: Наук. думка, 1982. — 52 с.
17. *Оцінка стану водоймищ шляхом визначення пігментів фітопланктону* / Методичний посібник з визначення якості води. — К., 2005. — С. 16—19.
18. *Патологическая анатомия и физиология* // Ультраструктурная патология клетки. <http://www.nedug.ru/library/doc.aspx?item = 34099>.
19. *Прохорова М.И.* Методы биохимического исследования. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 222 с.
20. *Степаньян О.В., Воскобойников Г.М.* Влияние нефти и нефтепродуктов на морфофункциональные особенности морских макроводорослей // Биология моря. — 2006. — Т. 32, № 4. — С. 241—248.
21. *Тяжелые металлы как фактор экологической опасности: Метод. указ.* / Сост. Ю. А. Холопов. — Самара: СамГАПС, 2003. — 16 с.
22. *Хум О.* Фотосинтез (физиологические аспекты). — М.: Мир, 1971. — С. 106—107.
23. *Abbas C.A., Card G.L.* The relationship between growth temperature, fatty acid composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica* // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 602, N 3. — P. 469—476.
24. *Aullon Alcaine A.* Biodiesel from microalgae. — http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/9406/1/micoralgae_thesis-Aullon2%5B1%5D.pdf.
25. *Chawla G., Viswanathan P.N., Devi S.* Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture // Environ. Exp. Bot. — 1987. — Vol. 27, N 3. — P. 311—323.
26. *Dörmann P.* Lipid synthesis, metabolism and transport / The structure and function of plastids / Ed. by R. R. Wise, J. K. Hooper. — Dordrecht: Springer, 2007. — Vol. 23. — P. 335—353.
27. *Froehlich, J.E., Benning C., Dormann E.* The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGDI is inserted into the outer envelope membrane of

- chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 31806—31812.
28. Kiyomi Ono, Haruki Hashimoto, Sakae Katoh. Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions // Plant and Cell Physiology. — 1994. — Vol. 36, N 1. — P. 9—17.
29. Ohlrogge J.B., Kuhn D.N., Stumpf P.K. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea* // Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). — 1979. — Vol. 76. — P. 1194—1198.
30. Reddin A., Prendeville G.N. Effect of oils on cell membrane permeability in *Fucus serratus* and *Laminaria digitata* // Mar. Pollut. Bull. — 1981. — Vol. 12, N 1. — P. 339—342.
31. Rozentsvet O.A., Bosenko E.S., Guschina I.A. Effect of heavy metals upon lipid metabolism in *P. perfoliatus* / 16th Intern. Plant Lipid symp., Budapest, Hungary, 1—4 June 2004. — Budapest, 2004. — P. 202—204.
32. Schmid K.M., Ohlrogge J.B. Lipid metabolism in plants // Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes / Ed. by D.E. Vance, J.E. Vance. 4th Edition. — Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2002. — P. 93—126.
33. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatography A. — 1975. — Vol. 114, N 1. — P. 129—141.
34. Wang L., Zhou Q., Chua H. Contribution of cell outer membrane and inner membrane to Cu^{2+} adsorption by cell envelope of *Pseudomonas putida* 5-x // J. Environ. Science and Health, Part A. — 2004. — Vol. 39, N 8. — P. 2071—2080.
35. Webb M. Metallothionein in regeneration, reproduction and development // Exp. Suppl. — 1987. — Vol. 52. — P. 483—498.
36. Whiston A.I., McAuley P.J., Smith V.J. Removal of heavy metals from wastewater by marine microalgae // J. Exp. Bot. — 1995. — Vol. 46, N 1. — P. 13.