

В. В. Дячок, С. І. Гуглич, В. В. Катишева
 Національний університет “Львівська політехніка”,
 кафедра екології та збалансованого природокористування
dyachokvasil@gmail.com, zvit.reagent@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДІОКСИДУ СУЛЬФУРУ НА ДИНАМІКУ ПРИРОСТУ ХЛОРОФІЛСИНТЕЗУЮЧИХ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

© Дячок В. В., Гуглич С. І., Катишева В. В., 2017

Досліджено вплив діоксиду сульфуру на швидкість приросту хлорофілсинтезуючих мікроводоростей. Отримано експериментальні залежності приросту біомаси залежно від концентрації діоксиду сульфуру. Експериментальні дані опрацьовано на основі теорії Лайнуївера-Берка та визначено основні кінетичні константи процесу. Встановлено зворотне неконкурентне інгібування діоксидом сульфуру приросту хлорофілсинтезуючих мікроводоростей.

Ключові слова: фотосинтез, діоксид сульфуру (SO₂), мікроводорості, дифузія, математична модель, кінетика, ферментативний каталіз, інгібітор.

V. V. Dyachok, S. I. Huhlych, V. V. Katysheva

RESEARCH ON THE EFFECT OF A SULFUR DIOXIDE ON THE DYNAMICS OF POPULATION GROWTH OF CHLOROPHYLL-SYNTHESIZING MICROALGAE

© Dyachok V. V., Huhlych S. I., Katysheva V. V., 2017

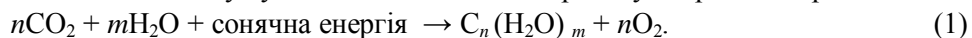
The effect of SO₂ on the rate of growth chlorophyllsynthesizing microalgae has been studied. The experimental dependence of growth of biomass, depending on the concentration of a sulfur dioxide has been obtained. The experimental data based on the kinetics of enzymatic catalysis has been processed and a graphic by Laynuiver-Burke on which the kinetic constants are based has been graphed. The reversible, non-competitive inhibition have been established.

Key words: photosynthesis, sulfur dioxide (SO₂), microalgae, diffusion, mathematical model, kinetics, enzymatic catalysis, inhibitor.

Постановка проблеми. Сьогодні людство змушене вирішувати велику кількість екологічних проблем. Стрімке підняття температури Землі – одне з найобговорюваніших питань науковців та світових лідерів держав сьогодні. Експерти стверджують, що вже давно минули ті часи, коли середня температура Землі була майже незмінною. Клімат почав дуже змінюватися з часів появи індустрії, і чим далі, тим гірше. Екологи звертаються до урядів усіх країн світу з проханням зменшити кількість викидів в атмосферу. Якщо не вирішувати це питання у терміновому порядку, то середня температура Землі підніметься на 5° за Цельсієм до кінця нинішнього століття, а це, своєю чергою, загрожує підняттям рівня Світового океану та катастрофічними наслідками для усього людства. Існують засоби для вирішення цієї проблеми, зокрема, використання фотосинтетичних властивостей рослин та хлорофілсинтезуючих одноклітинних водоростей у промисловості.

Фотосинтез – унікальний у фізико-хімічному відношенні процес, який збільшує вільну енергію біосфери за рахунок зовнішнього джерела – Сонця та забезпечує існування як рослин, так і усіх гетеротрофних організмів, зокрема, людини. Зараз важко знайти будь-які природні явища, які не поєднані з фотосинтезом. Фотосинтез сприяє зменшенню діоксиду вуглецю (CO₂). Рослини

засвоюють із повітря CO₂ та будують з нього свою біомасу. Водорості, як і інші зелені рослини, потребують діоксид вуглецю, а також невелику кількість мінералів для приросту біомаси. На відміну від наземних рослин, вони ростуть у 7–10 разів швидше та відповідно “вбивають” більше діоксиду вуглецю та здатність адаптуватися у несприятливих умовах. Такі властивості мікродоростей є об’єктивною умовою для впровадження таких процесів з метою очищення промислових газових викидів від діоксиду вуглецю. Хімізм цього процесу зображений реакцією:



Основною умовою фотосинтезу є присутність молекул діоксиду вуглецю у повітрі. У ньому також можуть міститися й інші оксиди, зокрема діоксид сульфуру. Присутність SO₂ у промисловому повітрі зумовлена спалюванням палива, природні поклади якого містять сполуки сірки. За своєю хімічною будовою молекули діоксиду сульфуру подібні до молекул вуглекислого газу і тому є припущення, що на етапі транспортування CO₂ у внутрішній об’єм клітини мікродорості, яка не завжди розрізняє ці молекули, SO₂ блокує процес фотосинтезу. Відтак існує необхідність дослідження процесу очищення газових викидів за участі хлорофілсинтезуючих мікродоростей у присутності SO₂, що адекватні вивченню впливу діоксиду сульфуру на процес фотосинтезу.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Проблема очищення викидів у довкілля є надзвичайно серйозною, а для її вирішення застосовують найрізноманітніші методи та способи. Знешкодження намагаються проводити за допомогою сильнодіючих хімічних речовин – кислот, лугів тощо. Однак результат такого знезараження залишається не менш небезпечним для довкілля, ніж самі забрудники.

Згодом людина зрозуміла, що немає нічого безпечнішого, ніж методи природного розкладання органіки. Потрібно тільки трохи “пришвидшити” ці процеси, змусивши перебігати біохімічні реакції з більшою швидкістю [1].

Серед відомих методів біологічне очищення має багато істотних переваг, завдяки здатності мікроорганізмів адаптуватися до несприятливих умов, наприклад, високої концентрації та токсичності, складної суміші забруднювальних речовин тощо, що робить його найефективнішим та найбезпечнішим [2].

У літературі немає даних про вплив діоксиду сульфуру на швидкість приросту біомаси мікродоростей, тому важливо дослідити вплив діоксиду сульфуру на фотосинтез хлорофілсинтезуючих мікродоростей.

Мета роботи – вивчити вплив діоксиду сульфуру на приріст біомаси хлорофілсинтезуючих мікродоростей.

Теоретична частина. У внутрішньому середовищі клітини мікроорганізмів безперервно відбувається складний процес біохімічних перетворень. У чіткій послідовності з великою швидкістю відбуваються численні біохімічні реакції. Швидкість реакцій та їхня послідовність визначаються наявністю специфічних ферментів – каталізаторів.

Механізм дії ферментів полягає у тому, що вони утворюють з речовиною-субстратом специфічний фермент-субстратний комплекс. Приєднання субстрату до фермента відбувається у зоні каталітичного центра, який і сприяє перебігу біохімічної реакції. Внаслідок біохімічної еволюції каталітичний центр набуває такої структури та просторової конфігурації, яка дає змогу взаємодіяти лише з певною речовиною-субстратом [3, 4].

Речовини, що здатні гальмувати ферментативні реакції, називаються інгібіторами. У процесі вивчення впливу інгібіторів на ферментативні реакції була одержана інформація щодо субстратної специфічності ферментів, природи функціональних груп, що входять до складу активного центра ферментів, механізму дії ферментів та участі певних функціональних груп у підтримці специфічної конформації молекули фермента. Інгібіювання різних ферментів специфічними клітинними компонентами є одним із факторів, що регулюють процес ферментативних реакцій у клітині. Таким клітинним компонентом у цьому випадку виступає діоксид сульфуру, який, проникаючи через клітинну мембрану у внутрішнє середовище клітини мікродорості, виконує роль інгібітора.

Інгібітори, які знижують активність ферментів за умови взаємодії з тими самими функціональними групами активних центрів, що й субстрати, називають конкурентними. Інгібітори, які знижують активність ферментів за умови взаємодії з іншими функціональними групами, називаються неконкурентними. Конкурентне інгібування можна послабити або зовсім усунути підвищенням концентрації субстрату. На неконкурентне інгібування концентрація субстрату не впливає.

Конкурентне інгібування найлегше виявити, побудувавши графіки Лайнуівера-Берка, тобто графіки у координатах $1/v$ від $1/[S]$ за різних концентрацій інгібітора. За дійсного конкурентного інгібування – це прямі лінії, що відрізняються між собою тангенсом кута нахилу та перетинають вісь ординат в одній точці (рис. 1, а). Наявність конкурентного інгібітора не змінює максимального значення швидкості реакції V_{max} . У присутності конкурентного інгібітора уявна величина константи Міхаеліса K_m більша, ніж її значення на величину, що дорівнює різниці у довжині відрізків, які відсікаються на осі абсцис.

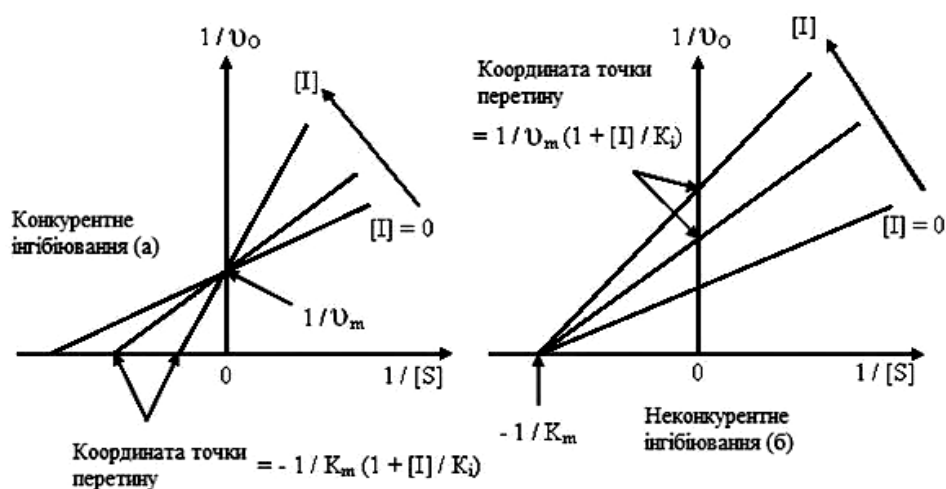


Рис. 1. Графік Лайнуівера-Берка для конкурентного (а) та неконкурентного (б) інгібування за літературними даними [3]

За графіком Лайнуівера-Берка, побудованого для як мінімум трьох різних концентрацій інгібітора, можна зробити висновок про те, що неконкурентний інгібітор знижує значення V_{max} , тоді як величина K_m залишається сталою (рис. 1, б).

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Об'єктом цих досліджень була культура зелених мікроводоростей – *Chlorella*. Її культивували протягом 12 діб у чотирьох ємкостях об'ємом $1,5 \text{ дм}^3$. Базове живильне середовище містило однакову кількість інокулянту із культурою мікроводоростей *Chlorellavulgaris*. Живильні речовини – вуглекислий газ та елементи мінерального живлення клітини – водорості отримують безпосередньо з навколишнього рідкого середовища, засвоюючи їх усією своєю поверхнею. Для дослідження впливу інгібування у першу посудину було додано діоксид сульфуру з концентрацією $0,001 \text{ мг/мл}$, у другу – $0,002 \text{ мг/мл}$, у третю – $0,003 \text{ мг/мл}$, а у четверту – $0,004 \text{ мг/мл}$.

Приріст біомаси хлорофілсинтезуючих мікроводоростей за таких умов визначали фотоколориметричним методом з використанням синього світлофільтра згідно з законом Бугера-Ламберта-Бера. Оскільки оптична густина пропорційна до концентрації, тому одержані експериментальні дані накопичення біомаси мікроводоростей залежно від часу у межах досліджуваної концентрації інгібітора (SO_2) відповідають значенням оптичних густин.

На основі результатів експериментальних досліджень та розрахункових величин було отримано графічні залежності збільшення концентрації мікроводоростей від часу за різних значень діоксиду сульфуру у розчині за умов його одноразового введення (рис. 2).

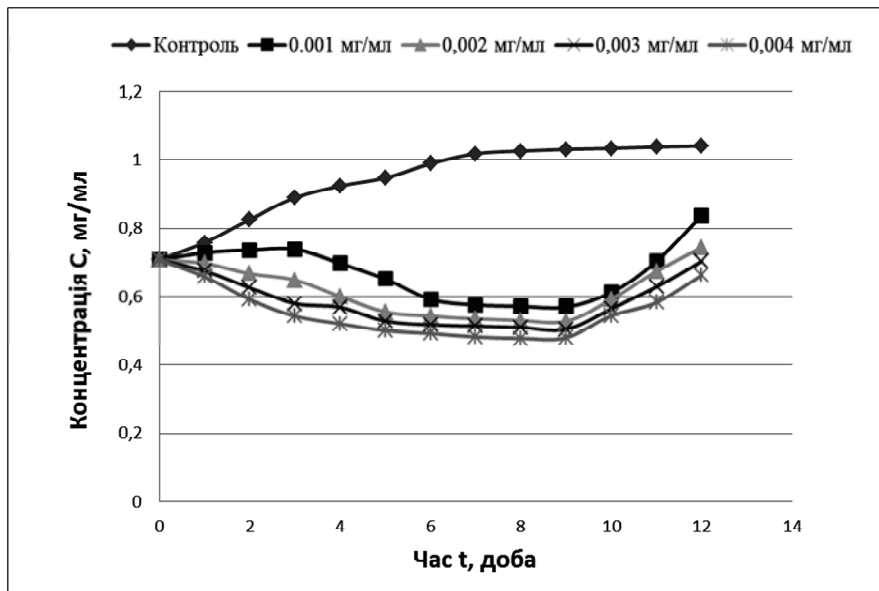


Рис. 2. Залежність зміни концентрації клітин мікрободоростей у часі за відповідних концентрацій інгібітора

За зміною концентрації клітин (кількості клітин ув одиниці об'єму суспензії) чи густиною мікроорганізмів (суха маса мікроорганізмів в одиниці об'єму суспензії) визначали швидкість приросту мікрободоростей.

Аналізуючи дані (рис. 2), потрібно зазначити, що зменшення вмісту клітин мікрободоростей істотно залежить від концентрації інгібітора (SO_2) порівняно з контрольним. Так, приріст мікрободоростей у рідкому середовищі, яке добре перемішується, змінюється у часі залежно від концентрації діоксиду сульфуру.

Із зростанням концентрації інгібітора зменшується приріст маси мікрободоростей, водночас спостерігається збільшення маси клітин мікрободоростей у контрольній ємкості, яка не зазнала впливу інгібітора. Основний параметр, який характеризує приріст мікрободоростей $\Delta\mu$, – це питома швидкість приросту P :

$$\Delta\mu = \Delta C_1 / C \times \Delta T, \quad (3)$$

де C – концентрація мікрободоростей; $\Delta\mu$ – питома швидкість росту або коефіцієнт питомого приросту (s^{-1}).

З іншого боку, коефіцієнт приросту може бути визначений з рівняння

$$\Delta C / \Delta t = \mu \times C. \quad (4)$$

Згідно з рівнянням, коефіцієнт приросту характеризує відносний приріст густини мікрободоростей за одиницю часу. Якщо протягом певного часу $\Delta\mu$ залишається незмінним, то такий приріст називатиметься експоненційним, а відповідний йому проміжок часу – експоненційною фазою приросту [5].

Проінтегрувавши рівняння (4), постійну інтегрування визначаємо за умови, що в початковий момент часу $t=0$ наявна вихідна густина клітин мікрободоростей C_0 буде:

$$C = C_0 \times \exp(\mu t). \quad (5)$$

Оскільки логарифмічна залежність концентрації клітин мікрободоростей від часу у період експоненційного приросту є лінійною залежністю, тому це дає можливість визначити коефіцієнт приросту μ як тангенс кута нахилу прямої. Тому, підставивши експериментальні дані у рівняння (5), отримуємо залежність $\ln C = f(t)$, яку зображено на рис. 3 (1–2).

З отриманих залежностей визначаємо коефіцієнт приросту μ як тангенс кута нахилу експериментальних прямих, які становлять: для контрольної прямої – $0,0517 s^{-1}$; за концентрації інгібітора $0,001$ мг/мл – $-0,0406 s^{-1}$; за концентрації інгібітора $0,002$ мг/мл – $-0,0543 s^{-1}$; за концентрації інгібітора $0,003$ мг/мл – $-0,0537 s^{-1}$; за концентрації інгібітора $0,004$ – $-0,0563 s^{-1}$.

Оскільки у контрольній ємкості наявне збільшення приросту біомаси мікродоростей, тому значення коефіцієнта приросту буде додатне. У разі, коли присутня певна концентрація інгібітора – відбувається зменшення приросту мікродоростей, тому значення коефіцієнта приросту μ є від'ємним.

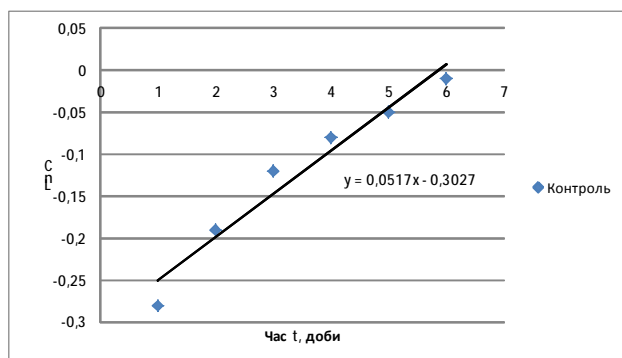


Рис. 3.1. Залежність зміни логарифму концентрації суспензії клітин мікродоростей від часу (контроль)

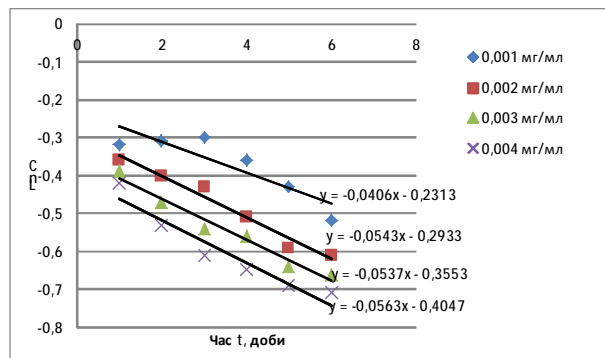


Рис. 3.2. Залежність зміни логарифму концентрації суспензії клітин від часу (за відповідних концентрацій інгібітора)

Згідно з отриманими експериментальними даними SO_2 виступає як інгібітор. Тому у подальших дослідженнях важливим було встановити інгібування конкурентним або неконкурентним. Для цього на основі отриманих експериментальних даних був побудований графік Лайнуівера-Берка в координатах $1/S$ від $1/V$ (рис. 4).

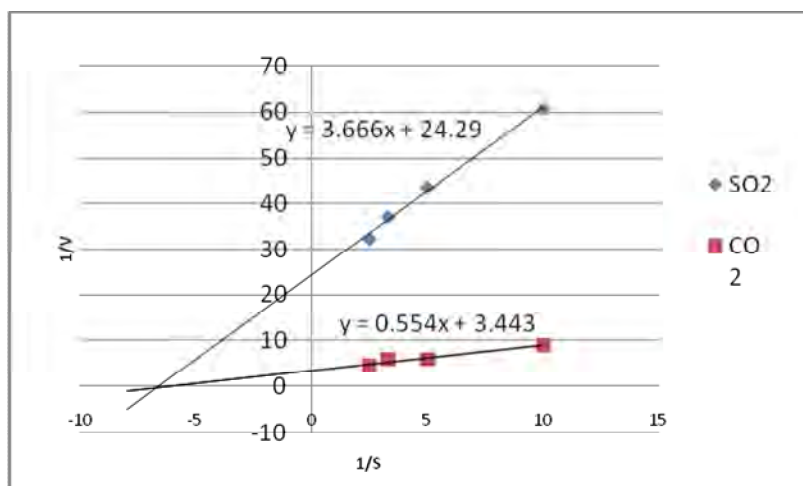


Рис. 4. Графік Лайнуівера-Берка для визначення типу інгібування SO_2

Порівнюючи дані з літератури, графік Лайнуівера-Берка (рис. 1) з експериментально одержаним графіком (рис. 4), потрібно зауважити подібність отриманих прямих з прямими (рис. 1, б), тому існує неконкурентне інгібування, тобто інгібітор приєднується до фермента не в активному центрі, де зв'язується субстрат, а в іншому місці молекули. За таких умов конформація молекули фермента змінюється у такий спосіб, що відбувається оборотна інактивація його каталітичного центра. Неконкурентний інгібітор SO_2 зв'язується зворотно як з вільним ферментом, так і з комплексом фермент-субстрат, утворюючи неактивні комплекси.

За допомогою цього графіка, побудованого за різних концентрацій інгібітора (SO_2), визначаємо відрізок, який відсікає пряма від осі ординат, та відповідає величині $1/V_{max}$, а продовження прямої відсікає на осі абсцис відрізок, що дорівнює $-1/K_m$. Звідси обчислено значення

K_m та V_{max} за умови присутності інгібітора (SO_2) становить $K_m = 0,16$ мг/мл, а $V_{max} = 0,041$ мг/мл·доба, для контрольного значення визначено $K_m = 0,16$ мг/мл, а $V_{max} = 0,29$ мг/мл·доба та $-1/K_m = -6,6$.

Висновок. Вивчено вплив діоксиду сульфуру за умов одноразового внесення на динаміку поглинання вуглекислого газу хлорофілсинтезуючими мікроводоростями, визначено питому швидкість приросту мікроводоростей, проаналізовано кінетику ферментативного каталізу, теоретично обгрунтовано на основі теорії Лайнуївера-Берка та експериментально доведено наявність неконкурентного інгібування ферментативного каталізу CO_2 з хлорофілсинтезуючими мікроводоростями.

1. *Розвиток і відтворення ресурсного потенціалу суб'єктів еколого-економічних, туристичних та екоінформаційних систем: моногр. / за наук. ред. М. С. Мальованого. – Л.: Видавництво Львівської політехніки, 2015. – 340 с.* 2. Дячок В. В., Гуглич С. І., Левко О. Б. Вивчення впливу температури на кінетику поглинання вуглекислого газу мікроводоростями // Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування”. – 2015. – № 812. – С. 365–372. 3. О. В. Стеценко, Р. П. Виноградова. Біоорганічна хімія – К.: Вища шк., 1992. – 278 с. 4. Губський Ю. І. Біологічна хімія. К. – В.: Нова книга, 2007. – 137 с. 5. Золотарьова О. К., Шнюкова Є. І., Сиваш О. О., Михайленко Н. Ф. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології; під ред. О. К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес, 2008. – 234 с.