

УДК 582.263:546.742:577.112:577.151.45

И.А. ИЛЮЧИК

старший преподаватель
кафедры биохимии и биоинформатики¹

Д.М. НИКИТИН

студент¹

А.А. ШУЛЬГАН

студент¹

Е.Д. ГРЕЧНАЯ

студент¹

В.Н. НИКАНДРОВ, д-р биол. наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии¹

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 13 октября 2020 г.

**ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТА НИКЕЛЯ НА УРОЖАЙ БИОМАССЫ
И СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В КЛЕТКАХ *CHLORELLA VULGARIS* В ДИНАМИКЕ
РОСТА КУЛЬТУРЫ**

Добавление NiSO₄ в питательную среду Chlorella vulgaris штамма IBCE C-19 в концентрации 10⁻⁴–10⁻¹ М вызвало угнетение роста водоросли уже через сутки, а при концентрации ≥10⁻² М – гибель культуры через 13 суток. Однако не выявлена гибель культуры хлореллы при концентрации эффектора, более чем в 5 раз превышающей указанную в источниках литературы – 10 мг/л. При концентрации сульфата никеля 10⁻³ М через 5 и 9 суток уровень биомассы превышал значения контрольного варианта на 16 и 19% соответственно. Даже через 19 суток урожай биомассы этого экспериментального варианта принципиально отличался от контроля не более чем на 10%. Сдвиги концентрации внутриклеточного белка имели сложный характер. Однако изменения его уровня не были фатальны и не были напрямую вызваны сдвигами (угнетением ≤ 18%) активности нейтральных внутриклеточных казеинолитических и желатинолитических протеиназ.

Ключевые слова: хлорелла, культивирование, сульфат никеля, биомасса, внутриклеточный белок, протеолитическая активность.

ILYUCHYK Irina A.

Senior Lecturer of the Department of Biotechnology¹

NIKITIN D.M., Student¹

SHULGAN A.A., Student¹

GRECHNAYA E.D., Student¹

NIKANDROV Vitaliy N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor

Professor of the Department of Biotechnology¹

¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**THE INFLUENCE OF NICKEL SULFATE ON BIOMASS YIELD
AND PROTEIN CONTENT IN CHLORELLA VULGARIS IN THE DYNAMICS
OF CULTURE GROWTH**

The addition of NiSO₄ to the Chlorella vulgaris IBCE C-19 nutrient medium sat a concentration of 10⁻⁴...10⁻¹ M caused inhibition of algal growth after a day, and at a concentration of ≥10⁻² M – the death of

culture after 13 days. However, the death of the chlorella culture was not observed at this effector concentration more than 5 times higher than that indicated in the publications (10 mg/l). At nickel sulfate concentration of 10^{-3} M after 5 and 9 days, the biomass level exceeded the values of the control variant by 16% and 19%, respectively. Even after 19 days, the biomass yield of this experimental case was deeply different from control by no more than 10%. Intracellular protein concentration shifts were of complex nature. However, changes in its level were not fatal and were not directly caused by shifts (depression \leq 18%) in the activity of neutral intracellular caseinolytic and gelatinolytic proteinases.

Keywords: chlorella, culture, nickel sulfate, biomass, cellular protein, proteolytic activity.

Введение. Ранее в предыдущих статьях мы отмечали, что проблема масштабного производства «одноклеточного» белка, обозначающая фотосинтезирующую водоросль *Chlorella vulgaris* в качестве его продуцента, вызвала необходимость изыскания путей обогащения биомассы хлореллы белком, в том числе путем изменения состава питательной среды. К подобным путям относится дополнительное введение в питательную среду микроэлементов [1, 2]. Вместе с тем, ряд микроэлементов при превышении определенного концентрационного диапазона оказывает токсическое действие. Таковым, в частности, является никель.

Никель является естественным компонентом воды и почвы. В низких концентрациях он необходим для роста и развития растений. Интересно, что никель не может быть заменен алюминием, кадмием, хромом или свинцом. Однако в высоких концентрациях никель токсичен [3].

Установлено, что никель входит в состав Ni-CO-дегидрогеназ карбоксиобактерий, окисляющих CO до CO₂. Причем эти дегидрогеназы в зависимости от структуры активного центра, содержания железа и никеля разделяются на два класса. Ряд анаэробных микроорганизмов имеет ген, кодирующий синтез ацетил-КоА-синтазы, образующей гетеротетрамерный комплекс с Ni-CO-дегидрогеназой. Все метаногенные организмы продуцируют метан в ходе катализа метил-КоМ-редуктазой, также имеющей в структуре никель-содержащие активные сайты [4, 5].

Наконец, синтезируемая широким спектром эукариотов и прокариотических организмов уреазы является мультимерным никель-содержащим энзимом [6, 7]. Кроме того, никель найден в Ni-супероксиддисмутазе, глиоксилазе I и *cis-trans*-изомеразе [8].

В высоких же концентрациях никель токсичен и вызывает повреждения фотосинтетического аппарата сельскохозяйственных культур [3].

Однако в литературе отсутствуют какие-либо данные о влиянии никеля на жизнедеятельность *Chlorella vulgaris* штамма IBCE C-19.

В связи с этим, целью настоящей работы и явилось выявление состояния физиолого-биохимического состояния клеток *Chlorella vulgaris* штамма IBCE C-19 в динамике роста культуры на питательной среде, содержащей сульфат никеля (NiSO₄) в широком диапазоне концентраций.

Материалы и методы. Исследования выполнены на альгологически чистой культуре микроводоросли *Chlorella vulgaris*, штамм C 111 IBCE C-19 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Хлореллу выращивали в условиях периодической культуры на среде Таммий без ЭДТА, включающей (г/л): KNO₃ – 5; MgSO₄×7H₂O – 2,5; KH₂PO₄ – 1,25; FeSO₄×7H₂O – 0,003; а также H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂×4H₂O – 0,00181; MoO₃ – 0,000018; ZnSO₄×7H₂O – 0,000222; NH₄VO₃ – 0,000023, при температуре 23 ± 1 °C, освещенности на поверхности сосуда – 5000 лк, в прозрачных сосудах объемом 0,1 л продолжительности световых и темновых фаз – 12ч/12ч. Суспензию культуры перемешивали два раза в сутки. Посевная доза составляла $3,28 \pm 0,28$ млн клеток/мл. Концентрацию клеток хлореллы определяли с помощью камеры Горяева, расчет вели по формуле:

$$\text{Млн кл./мл} = \frac{\sum \text{клеток в 25 квадратах}}{100} \cdot 10^6$$

В питательную среду дополнительно внесли раствор сульфата никеля до конечной концентрации 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} М. Питательная среда контрольного варианта соль никеля не содержала.

На 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-е сутки определяли уровень биомассы, отбирали аликвоты культуры. Клетки отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин и дважды отмывали дистиллированной водой от среды культивирования. Их разрушали при 4 °С в 0,50 мл дистиллированной воды, как описано [9]. Полученный гомогенат использовали для анализа.

В динамике роста культуры определяли содержание внутриклеточного белка колориметрическим методом Bradford [в описании 10].

Протеолитическую активность гомогенатов определяли по расщеплению казеина и желатина в тонком слое агарового геля [11] на 7, 14 и 21-е сутки культивирования (как было ранее установлено – временные точки проявления перестроек культуры [1, 2]). В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,15 М раствор хлорида натрия после доведения величины рН к 7,4.

Исследования проведены не менее чем шестикратно. Результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t), для принятого уровня значимости ($P \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Развитие культуры хлореллы в контрольном варианте на протяжении пяти суток не сопровождалось значимым увеличением концентрации клеток: колебания их количества не превысили 6% (таблица 1, рисунок). Через 7 суток урожай биомассы возрос в сравнении с началом культивирования лишь на 11,5%. И только через 11 суток увеличение уровня биомассы составило 27,6%. На 13-е сутки прирост в сравнении с началом культивирования достигал уже 68,8% и существенно не менялся в период до 19-х и 21-х суток, когда урожай биомассы возрастал в сравнении с началом культивирования в 2,6 и 2,8 раза со-

ответственно. В целом, это соответствовало ранее описанным нами временным периодам функционально-метаболических перестроек клеток хлореллы в динамике роста культуры [1, 2].

Вместе с тем, концентрация внутриклеточного белка в контрольном варианте постепенно увеличивалась, начиная уже с 5-х суток (на 23%). В период 7–11 сутки этот рост составил 2,2–2,8 раза в сравнении с началом культивирования. Дальнейшее развитие культуры хлореллы в период 13–17 суток в контрольном варианте сопровождалось нарастанием концентрации внутриклеточного белка в 3,4–3,6 раза по сравнению с началом культивирования. Максимум уровня внутриклеточного белка отмечен к концу культивирования: он в 4 раза превышал исходные значения.

Добавление в питательную среду сульфата никеля уже через сутки обусловило снижение уровня биомассы на 13–40% по сравнению с контрольным вариантом. Это отличалось от изложенного в литературе мнения о том, что токсичность никеля может проявляться лишь спустя 2–3 дня [12].

Вместе с тем, примечательно увеличение уровня биомассы в культуре при добавлении в питательную среду сульфата никеля в концентрации 10^{-3} М в сравнении с контрольным вариантом через 5 и 9 суток: на 16 и 19% соответственно. В сравнении же с началом культивирования такой рост составил 58 и 80% соответственно. Это существенно превосходило нарастание уровня биомассы в контрольном варианте. Однако при дальнейшем культивировании, начиная с 11 суток, воздействие эффектора в указанной концентрации вело, в целом, к снижению концентрации клеток хлореллы в сравнении с контрольным вариантом. Тем не менее, даже через 15, 17 и даже 19 суток урожай биомассы этого экспериментального варианта принципиально не отличался от контроля: не более 10%. И лишь к концу культивирования концентрация клеток в этом экспериментальном варианте была ниже на 27% в сравнении с контролем.

Таблица 1. – Динамика биомассы и внутриклеточного белка в клетках культуры *Chlorella vulgaris* при росте на питательной среде с добавлением сульфата никеля; ($n = 6$)

Концентрация NiSO ₄ , М	Биомасса, млн кл./мл	Содержание белка, мкг/млн кл.	Биомасса, млн кл./мл	Содержание белка, мкг/млн кл.
	1-е сутки		3-и сутки	
Контроль	3,30 ± 0,05	17,35 ± 0,08	3,49 ± 0,07	19,31 ± 0,09
10 ⁻⁴	2,87 ± 0,01*	14,27 ± 0,02*	2,82 ± 0,07*	16,05 ± 0,19*
10 ⁻³	2,40 ± 0,08*	13,75 ± 0,08*	2,94 ± 0,09*	14,55 ± 0,09*
10 ⁻²	2,00 ± 0,08*	12,96 ± 0,05*	2,25 ± 0,14*	13,05 ± 0,10*
10 ⁻¹	2,43 ± 0,09*	13,62 ± 0,05*	2,11 ± 0,06*	14,76 ± 0,03*
	5-е сутки		7-е сутки	
Контроль	3,27 ± 0,06	21,31 ± 0,04	3,68 ± 0,06	37,37 ± 0,04
10 ⁻⁴	3,05 ± 0,13	19,24 ± 0,04	2,74 ± 0,22*	39,24 ± 0,11
10 ⁻³	3,79 ± 0,09*	17,02 ± 0,08*	3,60 ± 0,09	25,16 ± 0,04*
10 ⁻²	2,55 ± 0,14*	18,31 ± 0,04*	3,13 ± 0,08*	22,85 ± 0,09*
10 ⁻¹	1,76 ± 0,12*	25,12 ± 0,06*	1,68 ± 0,12*	24,13 ± 0,08*
	9-е сутки		11-е сутки	
Контроль	3,65 ± 0,05	43,59 ± 0,05	4,21 ± 1,06	48,32 ± 0,03
10 ⁻⁴	3,38 ± 0,06	33,24 ± 0,06*	3,90 ± 1,82	46,94 ± 0,02
10 ⁻³	4,33 ± 0,06*	35,12 ± 0,08*	3,93 ± 0,06	42,93 ± 0,07
10 ⁻²	2,74 ± 0,11*	33,91 ± 0,09*	1,72 ± 1,45*	45,30 ± 0,01
10 ⁻¹	2,05 ± 0,12*	28,51 ± 0,08*	1,92 ± 0,22*	38,61 ± 0,07*
	13-е сутки		15-е сутки	
Контроль	5,57 ± 0,25	59,31 ± 0,09	5,54 ± 0,25	63,23 ± 0,09
10 ⁻⁴	4,00 ± 1,08*	34,14 ± 0,04*	4,38 ± 1,17*	48,16 ± 0,06*
10 ⁻³	4,18 ± 0,03*	38,36 ± 0,06*	5,23 ± 0,09	43,58 ± 0,08*
10 ⁻²	культура погибла	–	–	–
10 ⁻¹	1,90 ± 0,62*	40,99 ± 0,09*	культура погибла	–
	17-е сутки		19-е сутки	
Контроль	5,81 ± 0,91	60,87 ± 0,02	8,59 ± 0,02	55,44 ± 0,02
10 ⁻⁴	5,34 ± 1,96	40,07 ± 0,03*	6,63 ± 1,07*	33,07 ± 0,07*
10 ⁻³	5,60 ± 0,04	39,35 ± 0,08*	8,22 ± 0,07*	32,78 ± 0,07*
	21-е сутки			
Контроль	9,12 ± 0,04	69,36 ± 0,03		
10 ⁻⁴	6,78 ± 0,25*	44,66 ± 0,08*		
10 ⁻³	6,60 ± 0,07*	49,17 ± 0,05*		

Примечание – Здесь и далее * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Вместе с тем, примечательно увеличение уровня биомассы в культуре при добавлении в питательную среду сульфата никеля в концентрации 10⁻³ М в сравнении с контрольным вариантом через 5 и 9 суток: на 16 и 19% соответственно. В сравнении же с началом культивирования такой рост составил 58 и 80% соответственно. Это существенно превосходило нарастание уровня биомассы в контрольном варианте. Однако при дальнейшем культивировании, начиная с 11 суток,

воздействие фактора в указанной концентрации вело, в целом, к снижению концентрации клеток хлореллы в сравнении с контрольным вариантом. Тем не менее, даже через 15, 17 и даже 19 суток урожай биомассы этого экспериментального варианта принципиально не отличался от контроля: не более 10%. И лишь к концу культивирования концентрация клеток в этом экспериментальном варианте была ниже на 27% в сравнении с контролем.

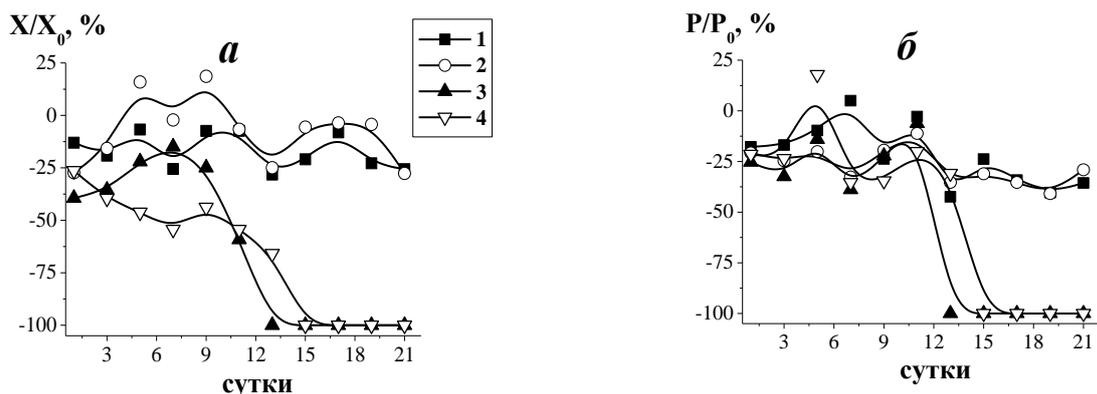


Рисунок – Изменения (% по отношению к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (а) и внутриклеточного белка (б) в клетках культуры *Chlorella vulgaris* при росте на питательной среде, содержащей сульфат никеля: 1 – 10^{-4} , 2 – 10^{-3} , 3 – 10^{-2} , 4 – 10^{-1} М

При этой концентрации эффектора содержание собственно никеля составляет 54 мг/л. Однако мы не наблюдали гибели культуры, которую уже при концентрации 10 мг/л отмечал [12]. Такое различие может быть обусловлено особенностями использованных видов и (или) штаммов хлореллы, состава питательной среды и условий культивирования.

На наш взгляд, это несколько необычные сдвиги, поскольку при более низкой концентрации сульфата никеля – 10^{-4} М ни через 5, ни через 9 суток прироста биомассы в сравнении с контрольным вариантом не выявлено. А через 15 и 19 суток концентрация клеток в этом экспериментальном варианте, в сравнении с контролем, падала на 21 и 23% соответственно.

Увеличение концентрации соли никеля в питательной среде до 10^{-2} М вело к стойкому снижению уровня биомассы, особенно сильно – через 11 суток – в 2,45 раза в сравнении с контролем. В дальнейшем наблюдали гибель культуры.

Необычно, что при дальнейшем увеличении концентрации эффектора в питательной среде до 10^{-1} М через 13 суток культура не погибла, хотя уровень биомассы в сравнении с контролем снизился почти в 3 раза. Гибель наступила при последующем культивировании водоросли.

Что касается концентрации внутриклеточного белка, то при воздействии сульфата никеля она снижалась в сравнении с контрольным вариантом (таблица 1, рисунок). Однако снижение не было резким и постоянным. Так, через 5 суток при добавлении в питательную среду соли никеля в максимальной концентрации содержание внутриклеточного белка на 18% превысило контроль, а при минимальной концентрации эффектора величина этого показателя через 7 суток не отличалась от контроля. Через 11 суток роста культуры на всех экспериментальных вариантах питательной среды, за исключением максимальной концентрации соли никеля уровень внутриклеточного белка снизился не более, чем на 11% в сравнении с контролем. Только при максимальной концентрации соли металла это снижение достигало 20%. Но даже к концу культивирования в оставшихся живых экспериментальных вариантах концентрация внутриклеточного белка падала в сравнении с контролем не более, чем на 36%.

Исследования показали, что уровень казеинолитической и желатинолитической активности клеток хлореллы в контрольном варианте через 7, 14 и 21 сутки от начала роста культуры, в целом, заметно не различался: колебания активности не превышали 10% (таблица 2).

Таблица 2. – Расщепление белков-субстратов (мм² зон лизиса) гомогенатами клеток хлореллы при росте культуры на питательной среде с добавлением различных концентраций NiSO₄ при pH 7,4; (n=8)

Концентрация NiSO ₄ , М	Время культивирования, сутки					
	7 сутки		14 сутки		21 сутки	
	Площадь расщепления, мм ²					
	казеин	желатин	казеин	желатин	казеин	желатин
Контроль	86,0 ± 1,3	80,6 ± 1,4	92,2 ± 1,6	75,5 ± 1,1	89,4 ± 1,2	82,6 ± 1,1
10 ⁻⁴	93,4 ± 1,2	81,1 ± 1,3	98,1 ± 1,4	83,0 ± 0,9*	95,8 ± 1,0	85,3 ± 0,8
10 ⁻³	86,3 ± 1,5	75,1 ± 1,3	89,1 ± 1,3	80,3 ± 1,4	91,8 ± 0,9	79,5 ± 1,7
10 ⁻²	80,8 ± 1,3	68,9 ± 1,0*	75,9 ± 1,4*	65,6 ± 1,2*	-	-
10 ⁻¹	83,3 ± 1,1	70,2 ± 1,4*	79,5 ± 1,2*	68,5 ± 1,2*	-	-

Небольшое, но статистически значимое, угнетение казеинолитической активности клеток хлореллы наблюдалось через 14 суток роста культуры на питательных средах, содержащих сульфат никеля в концентрации 10⁻² и 10⁻¹ М: на 18 и 14% соответственно (таблица 2).

Снижение же желатинолитической активности наступало при этих же концентрациях эффектора уже через 7 суток от начала культивирования и составило 13–15%. Эта же величина через 14 суток не превысила 10–13%.

Следует отметить, что эффекты сульфата никеля на растущую культуру данного штамма хлореллы значительно отличались от действия хлорида марганца. Как видно из представленных выше результатов, при добавлении соли никеля в концентрации 10⁻⁴ М на 7-е сутки не отмечено резкое увеличение уровня биомассы в сравнении с предыдущим периодом, как это было выявлено при действии MnCl₂ в концентрации 2•10⁻⁴ М [1]. Соответственно, и через 21 сутки при добавлении в питательную среду соли никеля уровень биомассы не возрастал в такой мере, как при влиянии хлорида марганца. Более того, добавление в питательную среду MnCl₂ в концентрации 2•10⁻⁴ М практически на всем протяжении культивирования (до 22 суток) сопровождалось увеличением концентрации внутриклеточного белка на 22,3–91,5%, что не характерно для действия сульфата никеля. Это отражает иную специфику изменений физиолого-биохимического статуса клеток хлореллы под влиянием никеля.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют явное токсическое действие никеля при добавлении его сульфата в пита-

тельную среду в концентрации ≥ 10⁻² М. В отличие от известных данных литературы, мы не отметили гибель культуры хлореллы при концентрации эффектора, более чем в 5 раз превышающей указанную в источниках литературы. Кроме того, согласно полученным нами данным, угнетение роста культуры хлореллы сульфатом никеля проявилось уже через сутки после роста на питательной среде с этой солью. Примечательно действие эффектора в концентрации 10⁻³ М в сравнении с контрольным вариантом, когда в отличие от последнего через 5 и 9 суток выявлен рост биомассы. Причем уровень ее мало отличался от контроля даже через 19 суток от начала культивирования. Сдвиги концентрации внутриклеточного белка имели сложный характер. Однако складывалось впечатление, что изменения его уровня не были фатальны, клетки «сопротивлялись» действию эффектора в концентрации, не превышающей 10⁻³ М. Изменения уровня внутриклеточного белка, судя по полученным результатам, не были напрямую вызваны сдвигами активности нейтральных внутриклеточных протеиназ.

Изложенные материалы логически позволяют думать о необходимости исследования влияния сульфата никеля на культуру хлореллы в концентрациях на несколько порядков более низких, чем использованы в настоящей работе.

Список литература

1. Ильючик, И. А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении MnCl₂ в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага

- ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2018. – № 1. – С. 53–64.
- Ильючик, И. А. Изменения протеолитической активности гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* и функционально-метаболические перестройки культуры при росте в присутствии $MnCl_2$ / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2018. – № 2. – С. 25–33.
 - Hassan, M. U. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities – a review / M. U. Hassan, M. U. Chattha, I. Khan [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – Vol. 26. – P. 12673-12688. DOI:10.1007/s11356-019-04892-x
 - Ragsdale, St. W. Nickel and the carbon cycle / St. W. Ragsdale // J. Inorganic Biochemistry. – 2007. – Vol. 101. – P. 1657–1666.
 - Liao, R.-Z. Energetics for the mechanism of nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase / R.-Z. Liao, P. E. M. Siegbahn // Inorganic Chemistry. – 2019. – Vol. 58. – P. 7931–7938.
 - Sebbane, F. Genes encoding specific nickel transport systems flank the chromosomal urease locus of pathogenic *Yersinia* / F. Sebbane, M.-A. Mandrand-Berthelot, M. Simonet // J. Bacteriology. – 2002. – Vol. 184. – N. 20. – P. 5706–5713.
 - Spears, J. W. Boron, chromium, manganese, and nickel in agricultural animal production / J. W. Spears // Biological Trace Element Research – 2019. – Vol.188. – P. 35–44. DOI:10.1007/s12011-018-1529-1
 - Denkhaus, E. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity / E. Denkhaus, K. Salnikow // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2002. Vol. 42. – N. 1. – P. 35–56. DOI: 10.1016/S1040-8428(01)00214-1
 - Ильючик, И. А. Влияние неорганического ортофосфата на динамику накопления хлорофиллов микроводорослью *Chlorella vulgaris* / И. А. Ильючик, А. И. Лакишик, В. Н. Никандров // Биотехнология: взгляд в будущее: материалы VI межд. научно-практ. конф., Ставрополь, 16 апреля 2020 г. – С. 230–233.
 - Ильючик, И. А. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*) / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с.
 - Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132–157.
 - Упитис, В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Р.: Зинатне, 1983. – 240 с.

References

- П'іучык І.А., Никандров В.Н. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) і накопленне белка пры даваўленні $MnCl_2$ в пітацельнай сроду [*Chlorella vulgaris* culture growth and protein accumulation at $MnCl_2$ addition in nutrient medium]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhhaunaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in natural sciences], 2018, no. 1, pp. 53-64. (In Russian)
- П'іучык І.А., Никандров В.Н. Змяненні пратэолітычнай актывнасці гомогенатаў клетак *Chlorella vulgaris* і функцыянальна-метаболічныя перастройкі культуры пры росце ў прысутствіі $MnCl_2$ [Changes in the proteolytic activity of *Chlorella vulgaris* cell homogenates and functional-metabolic rearrangements of the culture during growth in the presence of $MnCl_2$]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhhaunaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in natural sciences], 2018, no. 2, pp. 25–33. (in Russian).
- Hassan M. U., Chattha M. U., Khan I., Chattha M. B., Aamer M., Nawaz M., Ali A., Khan M. A. U., Khan T. A. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities – a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, vol. 26, pp. 12673-12688. DOI: org/10.1007/s11356-019-04892-x
- Ragsdale St. W. Nickel and the carbon cycle. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, vol. 101, pp. 1657–1666.
- Liao R.-Z., Siegbahn P. E. M. Energetics for the mechanism of nickel-containing carbon

- monoxide dehydrogenase. *Inorganic Chemistry*, 2019, vol. 58, pp. 7931–7938.
6. Sebbane F., Mandrand-Berthelot M.-A., Simonet M. Genes encoding specific nickel transport systems flank the chromosomal urease locus of pathogenic *Yersinia*. *Journal of Bacteriology*, 2002, vol. 184, no. 20, pp. 5706–5713.
 7. Spears J. W. Boron, chromium, manganese, and nickel in agricultural animal production. *Biological Trace Element Research*, 2019, vol.188, pp. 35–44. DOI: [org/10.1007/s12011-018-1529-1](https://doi.org/10.1007/s12011-018-1529-1)
 8. Denkhaus E., Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2002, vol. 42, no. 1, pp. 35–56. DOI: [10.1016/S1040-8428\(01\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00214-1)
 9. Il'uchik I.A., Lakishik A. I., Nikandrov V.N. Vliyanie neorganicheskogo ortofosfata na dinamiku nakopleniya chlorofillov mikrovdoroslyu *Chlorella vulgaris* [Influence of inorganic orthophosphate on the dynamics of chlorophyll accumulation by microalga *Chlorella vulgaris*]. *Biotekhnologiya: vzglyad v budushchee: materialy VI mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii*. Stavropol, 2020, pp.230–233. (In Russian)
 10. Il'uchik I.A., Nikandrov V.N. *Metodicheskie rekomendaczii po izucheniyu biokhimicheskikh svojstv odnokletochnyh zelenyh vdoroslei (na primere Chlorella vulgaris)* [Methodological recommendations for the study of biochemical properties of unicellular green algae (for example, *Chlorella vulgaris*)]. Pinsk, Polesky State University, 2020. 29 p. (In Russian)
 11. Nikandrov V.N., Pyizhova N.S. Metody issledovaniya proteoliza. [Methods for the study of proteolysis]. *Sovremennye problemy biokhimii. Metody issledovaniya* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk, Vysheishaia shkola Publ., 2013, pp. 132-157. (In Russian)
 12. Uptis V.V. Makro- i mikroelementy v optimizatsii mineral'nogo pitaniia mikrovdoroslei [Macro and microelements in the optimization of mineral nutrition of microalgae]. Riga, Zinatne Publ., 1983. 240 p. (In Russian)

Received 13 October 2020