

УДК 581.1

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ МАРГАНЦА В ДВУХ ВИДАХ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ЕГО ПОВЫШЕННЫМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ

© 2022 г. С. Г. Васильева^{a, b, *}, О. А. Горелова^a, О. И. Баулина^a, Е. С. Лобакова^a

^aБиологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^bТамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

*e-mail: vankat2009@mail.ru

Поступила в редакцию 10.02.2022 г.

После доработки 03.03.2022 г.

Принята к публикации 05.03.2022 г.

Впервые исследована толерантность клеток двух видов зеленых микроводорослей *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 к повышенным концентрациям марганца (в форме $MnCl_2$). Анализ фотосинтетической активности клеток, проведенный методом флуориметрии, и оценка динамики изменения оптической плотности суспензий клеток в области максимума поглощения хлорофилла показали различную толерантность микроводорослей к марганцу. Острая токсичность, определяемая в течение 4-х суток, проявлялась при концентрациях марганца от 1 г/л для клеток *M. simplicissimum* и от 10 г/л — для клеток *Lobosphaera* sp. Методом просвечивающей электронной микроскопии в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией исследовано субклеточное распределение марганца в клетках микроводорослей в условиях повышенных, но нетоксичных концентрациях марганца в среде. Установлено отсутствие обособленных марганецсодержащих включений на поверхности и в клетках *Lobosphaera* sp. и дисперсное распределение марганца в клетках с концентрированием в области тилакоидов и пластоглобул. Марганец и фосфор впервые выявлены в пластоглобулах, что возможно связано с их поступлением и концентрированием в этих структурах, сопряженным с транслокацией компонентов тилакоидов в процессе их разборки при стрессе. Для клеток *M. simplicissimum* показана способность к экзоплазматическому окислению и образованию наночастиц марганца в межклеточном матриксе, на поверхности и в клеточных стенках, а также компартментация поступившего внутрь клеток марганца в вакуолях и связывания его с полифосфатными гранулами.

Ключевые слова: *Lobosphaera*, *Micractinium simplicissimum*, аналитическая электронная микроскопия, внутриклеточная локализация, микроводоросли, наночастицы марганца, толерантность, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S0015330322050220

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все более распространенными становятся биотехнологии с применением кислородных фототрофных микроорганизмов, а именно цианобактерий и микроводорослей, для получения биомассы обогащенной целевыми продуктами — белками, углеводами, полиненасыщенными жирными кислотами, минералами, витаминами, антиоксидантами, микоспорин-подобными аминокислотами [1], очистки водных акваторий и сточных вод от тяжелых металлов, биогенных элементов и органических соединений, а также в качестве биосенсоров для оценки степени загрязненности водных сред [2, 3].

Широкое применение кислородных фототрофных микроорганизмов и, в первую очередь, микроводорослей в сфере охраны окружающей среды, обусловлено возможностью проследить воздействие неблагоприятного фактора, как на клетку, так и на популяцию в целом на протяжении многих поколений и выявить отдаленные последствия подобного воздействия [4, 5]. Исследования чувствительности микроводорослей к различным воздействиям требуют поиска видов-индикаторов загрязнения и видов, способных к быстрому поглощению, накоплению и инактивации в биомассе загрязняющих веществ в водоемах (биоремедиации).

Известно, что проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами становится все более актуальной [6]. В настоящее время для очистки сточных вод активно применяются технологии с участием кислородных фототрофных микроорганиз-

Сокращения: ЭДРС — энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия; ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия; ФСА — фотосинтетическая активность.

мов, клетки которых способны накапливать в высоких концентрациях многие элементы, включая тяжелые металлы [7]. Марганец — один из самых распространенных в природе тяжелых металлов, является опасным загрязнителем водных экосистем и сточных вод [6]. Среди наиболее частых причин попадания металла в стоки можно назвать процессы обогащения марганцевых окисленных руд, производство гальванических элементов, керамики и органический синтез. Следует отметить, что марганец повсеместно используется как компонент топливных добавок для повышения октанового числа [8].

Известно, что поступая в клетки тяжелые металлы реагируют с функциональными группами белков и других соединений, что может являться одним из механизмов детоксикации (образование металлотионеинов и фитохелатинов), но вместе с тем приводит к многочисленным нарушениям метаболизма, что лежит в основе их высокой токсичности [9]. Существуют данные, касающиеся токсического действия марганца в высоких концентрациях на растительные клетки [10], однако работы, изучающие, наряду с токсичностью, внутриклеточное распределение марганца в клетках микроводорослей практически не встречаются.

Поиск культур микроводорослей, толерантных к высоким концентрациям марганца, исследование диапазонов концентраций, при которых их клетки сохраняют высокую метаболическую активность, а также изучение внутриклеточного распределения марганца, может иметь как практическое, так и фундаментальное значение, позволяющее расширить представления о механизмах адаптации клеток микроводорослей к действию этого тяжелого металла.

В настоящей работе исследовано влияние высоких концентраций марганца на фотосинтетическую активность зеленых микроводорослей родов *Micractinium* и *Lobosphaera* для оценки пределов их толерантности и особенности субклеточного распределения токсиканта методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

Объектами исследования служили суспензионные культуры зеленых микроводорослей *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 (далее в тексте *Lobosphaera* sp.) и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 (далее в тексте *M. simplicissimum*). Культуры микроводорослей выращивали в периодическом режиме в стеклянных колбах (объем 750 мл) в среде BG-11 [11], на инкубационном шейкере Innova 44 (“New Brunswick”, США) со скоростью перемешивания 150 об/мин, при постоянной температуре 25°C и круглосуточном освещении 40 мкмоль фотонов/(м² с) ФАР.

Для экспериментов с культивированием микроводорослей в присутствии избыточных количеств ионов Mn²⁺ (далее марганец) клетки предкультур осаждали центрифугированием (3000 g, 5 мин) на шейкере (“Eppendorf”, Германия), ресуспендировали в среде BG-11 до плотности по содержанию хлорофилла 30 мг/л. Содержание хлорофилла в клетках определяли по методике, описанной ранее [12]. Отдельно готовили растворы хлорида марганца (MnCl₂) в среде BG-11 для каждой заданной концентрации. Инкубацию микроводорослей с повышенными концентрациями марганца проводили в 12 луночных планшетах (“Eppendorf”, Германия). Культивирование в планшетах проводили в соответствии с рекомендациями по определению толерантности культур к различным поллютантам [13, 14]. В лунки планшетов вносили по 1 мл концентрированной суспензии клеток и 2 мл среды BG-11 с заданной концентрацией марганца. Таким образом, в лунках планшета содержалось по 3 мл суспензии клеток одинаковой плотности (10 мг/л по хлорофиллу) и различной концентрацией марганца.

Суспензии клеток *Lobosphaera* sp. инкубировали в средах, содержащих следующие концентрации марганца: 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 и 25.0 г/л. Суспензии клеток *M. simplicissimum* — в средах с 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 и 5.0 г/л марганца. Выбор диапазона концентраций марганца основан на результатах предварительных экспериментов, показавших, что для этих культур микроводорослей значения летальных (остротоксичных) концентраций марганца существенно различались, при этом клетки *Lobosphaera* sp. проявляли большую толерантность к высоким концентрациям марганца в сравнении с *M. simplicissimum*. Контролем служили культуры, растущие в стандартной среде BG-11, содержащей 0.005 г/л марганца. Культивирование продолжали в люминостате при постоянном освещении 40 мкмоль фотонов/(м² с) ФАР и температуре 23°C в течение 4 сут.

Для анализа с помощью ЭДРС внеклеточного и субклеточного распределения Mn при его повышенных концентрациях в средах клетки микроводорослей осаждали центрифугированием (3000 g, 5 мин) и ресуспендировали в среде BG-11 до плотности по хлорофиллу 10 мг/л. Затем к суспензиям микроводорослей *Lobosphaera* sp. и *M. simplicissimum* добавляли 5.0 и 0.5 г/л марганца, соответственно. Культивирование продолжали при описанных выше условиях в течение 5 сут.

Определение оптической плотности суспензий микроводорослей

Контроль физиологического статуса микроводорослей осуществляли непосредственно в лунках планшетов с помощью спектрофотометра In-

finite M200PRO (“Tecan”, Австрия), определяя разность оптической плотности суспензий клеток при длинах волн 678 нм (максимум полосы поглощения хлорофилла адсорбционного спектра суспензии клеток) и 750 нм (область не специфического поглощения в спектре). Регистрацию оптической плотности проводили через 3 ч, 2 и 4 сут культивирования в средах с повышенной концентрацией марганца.

Определение фотосинтетической активности (ФСА)

ФСА клеток оценивали методом импульсно-моделированной флуориметрии [15], основанного на измерении флуоресценции хлорофилла, для регистрации которой использовали флуориметр FluorCam FC 800-C (“Photon Systems Instrument”, Чехия). ФСА определяли как значения максимального фотохимического квантового выхода фотосистемы II $\phi(\text{ФС II}) = F_v/F_m$ [16]. Перед измерением ФСА клетки микроводорослей адаптировали к темноте в течение 10 мин.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Ультраструктурную организацию микроводорослей контролировали с помощью традиционной ПЭМ ультратонких (менее 70 нм) срезов. Элементный анализ проводили методом аналитической ПЭМ, а именно ЭДРС полутонких (200–250 нм) срезов. Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 5 мин) и фиксировали стандартно по протоколу [17], используя последовательно 2% (по объему) раствор глutarового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере (pH 6.8–7.2 в зависимости от pH культуры) в течение 30 мин и 1% (по массе) раствор тетраоксида осмия в том же буфере в течение 4 ч при комнатной температуре.

Обезвоживание фиксированных образцов проводили в серии водных растворов этилового спирта возрастающих концентраций от 30 до 96% (по объему) и втроекратно в 100% этиловом спирте (“Sigma”, США). Последнюю процедуру обезвоживания сочетали с контрастированием 2% (по массе) раствором уранилацетата в абсолютном этиловом спирте (“Sigma”, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее образцы заключали в эпоксидную смолу Araldite (“Sigma-Aldrich”, США), проводили полимеризацию при 56°C и получали срезы заданной толщины на ультрамикротоме LKB-8800 (“LKB”, Швеция). Срезы монтировали на медные сеточки для электронной микроскопии с ультратонкой подложкой из формвара (“Ted Pella”, США). Для изучения ультраструктуры клеток методом ПЭМ срезы дополнительно контрастировали раствором цитрата свинца [18]. Изображения получали на электронном микроскопе JEM-1011 (“JEOL”, Япония). Измерение

размеров структур проводили по изображениям ПЭМ в программе Fiji (ImageJ) v. 20200708-1553 (“NIH”, США).

ЭДРС полутонких срезов проводили, как описано ранее [19], на аналитическом электронном микроскопе JEOL-2100 (“JEOL”, Япония), оснащенном светлопольным детектором для работы в режиме сканирующей ПЭМ (СПЭМ) (“JEOL”, Япония) и рентгеновским кремний-дрейфовым детектором X-Max с активной площадью кристалла 80 мм² (“Oxford Instruments”, Великобритания). Энергодисперсионные рентгеновские спектры от выбранных точечных или зональных участков образца регистрировали в диапазоне энергий рентгеновского излучения от 0 до 10 кэВ в режиме светлопольной СПЭМ. Время набора сигнала для одного спектра составляло 120 с. Регистрацию и обработку энергодисперсионных спектров проводили в режиме “Point&ID” в программе INCA (“Oxford Instruments”, Великобритания). Полученные спектры приводили в диапазоне 0.15–7.5 кэВ, в который входят наиболее интенсивные пики всех биологически значимых элементов, включая Mn.

Статистическая обработка полученных результатов

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $P \leq 0.05$. Обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Excel. На рисунках представлены средние значения и соответствующие стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка толерантности культур

Оценку толерантности культур микроводорослей проводили по стандартной процедуре биотестирования по ГОСТ Р 54496-2011 [20], экспериментально определяя диапазон концентраций марганца от минимально действующих до токсичных для клеток. Согласно ГОСТу, если для исследуемых параметров физиологического состояния культуры наблюдается снижение до 20% в сравнении с контролем, то концентрация поллютанта считается нетоксичной для клеток микроводорослей, при этом снижение более чем на 50% в сравнении с контролем указывает на проявление острой токсичности.

Установлено, что уже при 3-часовой инкубации *Lobosphaera* sp. в среде BG-11 при максимальной концентрации марганца 25.0 г/л и *M. simplissimum* при концентрации марганца 3.0–5.0 г/л оптическая плотность суспензии клеток умень-

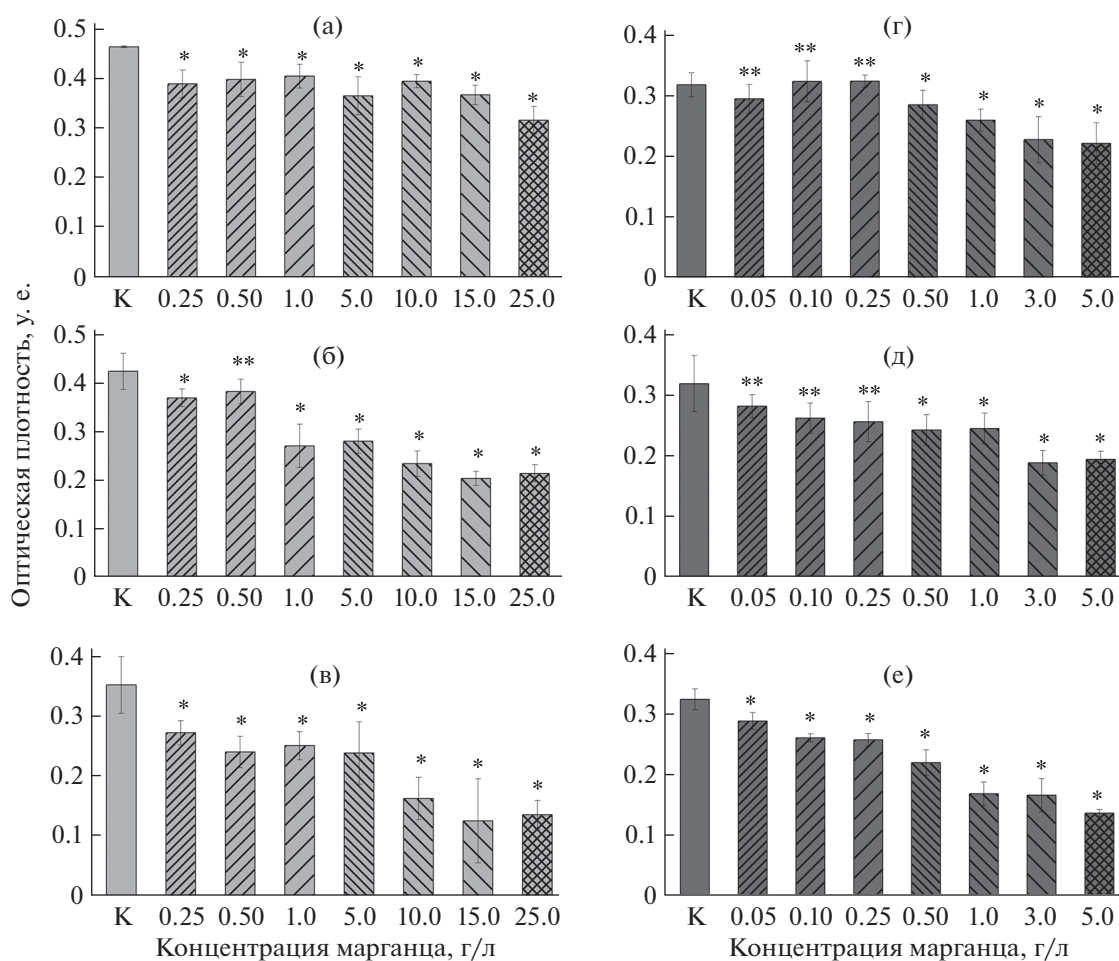


Рис. 1. Оптическая плотность суспензий клеток микроводорослей *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 (а, б, в) и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 (г, д, е) при культивировании в средах BG-11, содержащих 0.005 г/л марганца (К) или его повышенные концентрации, в течение 3 ч (а, г), 2-х (б, д) и 4-х суток (в, е). Данные представлены в виде средних значений для трех биологических повторностей и стандартных отклонений. Достоверность различий оценивалась по *t*-критерию Стьюдента (* $P \leq 0.05$, ** $P > 0.05$).

шилась на 31–32%, что свидетельствует о начинающемся проявлении токсичности марганца для обеих культур (рис. 1а). Следует отметить, что при концентрации марганца в среде до 15.0 г/л плотность суспензии *Lobosphaera* sp. снижалась не более чем на 20%, указывая на чрезвычайно высокую толерантность исследуемой культуры к этому тяжелому металлу.

В течение последующих 2 суток культивирования *Lobosphaera* sp. в среде BG-11, содержащей от 1.0 до 25.0 г/л марганца наблюдали значительное снижение оптической плотности суспензии от 37 до 50% в сравнении с контролем (рис. 1б). Для клеток *M. simplicissimum* снижение оптической плотности на 38–42% наблюдалось при концентрации марганца выше 3.0 г/л (рис. 1д). На 4 сутки оптическая плотность суспензии клеток *Lobosphaera* sp. продолжала снижаться в присутствии всех тестируемых концентраций марганца в срав-

нении со 2 сутками (рис. 1в). Оптическая плотность суспензии клеток *M. simplicissimum* при концентрации марганца до 0.5 г/л практически не изменялась по сравнению со 2 сутками, в то время как при концентрации марганца от 1.0 до 5.0 г/л продолжала снижаться (рис. 1д, е).

Исследование реакции фотосинтетического аппарата клеток микроводорослей на повышенные концентрации марганца методом флуориметрии показало, что снижение фотосинтетической активности более чем на 30% в сравнении с контролем в суспензии клеток *Lobosphaera* sp. происходит при концентрации марганца выше 10 г/л, а в суспензии клеток *M. simplicissimum* — при концентрации выше 1.0 г/л (рис. 2).

Сравнение токсичности различных концентраций марганца для клеток *Lobosphaera* sp. и *M. simplicissimum* на основании рассчитанного в % ингибирования фотосинтетической активности и

снижения оптической плотности относительно этих свойств суспензии на стандартной среде представлено в табл. 1. Результаты сравнения показали, что марганец в концентрации до 5.0 г/л не вызывал острого токсического эффекта в клетках *Lobosphaera* sp., указывая на высокую толерантность этой культуры к тестируемому тяжелому металлу. При этом концентрации от 10.0 до 25.0 г/л марганца вызывали снижение оптической плотности на 55% и более, а ФСА клеток — на 32–54% в зависимости от концентрации марганца в среде (рис. 1, 2, табл. 1). Схожую картину наблюдали для клеток *M. simplicissimum* при концентрациях марганца более 1.0 г/л, что указывает на более высокую чувствительность клеток этого вида к повышенному количеству марганца.

Детекция субклеточного распределения марганца в клетках микроводорослей

Ультраструктурная организация исследуемых микроводорослей соответствует таковой для представителей родственных таксонов. Их основные черты включают одноклеточность, наличие одного ядра, одного пристеночного хлоропласта с пиреноидом, окруженным крахмальной обкладкой в виде скорлупы у *M. simplicissimum* или множеством вытянутых зерен у *Lobosphaera* sp. (рис. 3а, б). Клеточная стенка у обеих культур состоит из 2–3 слоев, различающихся по электронной плотности, но не имеет трехламеллярного слоя. В цитоплазме выявляются регулярные органеллы: рибосомы, митохондрии, элементы аппарата Гольджи и вакуоли. Среди запасующих структур кроме крахмальных зерен присутствуют олеосомы в цитоплазме, включения в вакуолях и пластоглобулы в хлоропласте. Культивирование в средах с повышенной, но не вызывающей острой токсической реакции концентрацией марганца (для *Lobosphaera* sp. 5.0 г/л и *M. simplicissimum* 0.5 г/л), не вызвало принципиальных изменений ультраструктуры клеток. Однако аналитическая микроскопия выявила особенности субклеточного распределения марганца в исследуемых микроводорослях.

Исследование полутонких срезов клеток *Lobosphaera* sp. из культуры на среде с 5.0 г/л марганца в каких-либо клеточных (суб)компартаментах (клеточная стенка, хлоропласт, олеосомы, вакуоли, цитозоль) не выявило образования марганец-содержащих обособленных включений. Во всех спектрах ЭДРС приведенных в диапазоне 0.15–7.50 кэВ (рис. 4), присутствовали полосы характеристического рентгеновского излучения углерода ($K\alpha = 0.28$ кэВ) и кислорода ($K\alpha = 0.53$ кэВ) — основных химических элементов органических соединений биологических образцов и эпоксидной смолы, используемой в процедуре пробоподготовки. Также в спектрах выявлялся пик меди ($L\alpha = 0.93$ кэВ) — основного компонента сеточек,

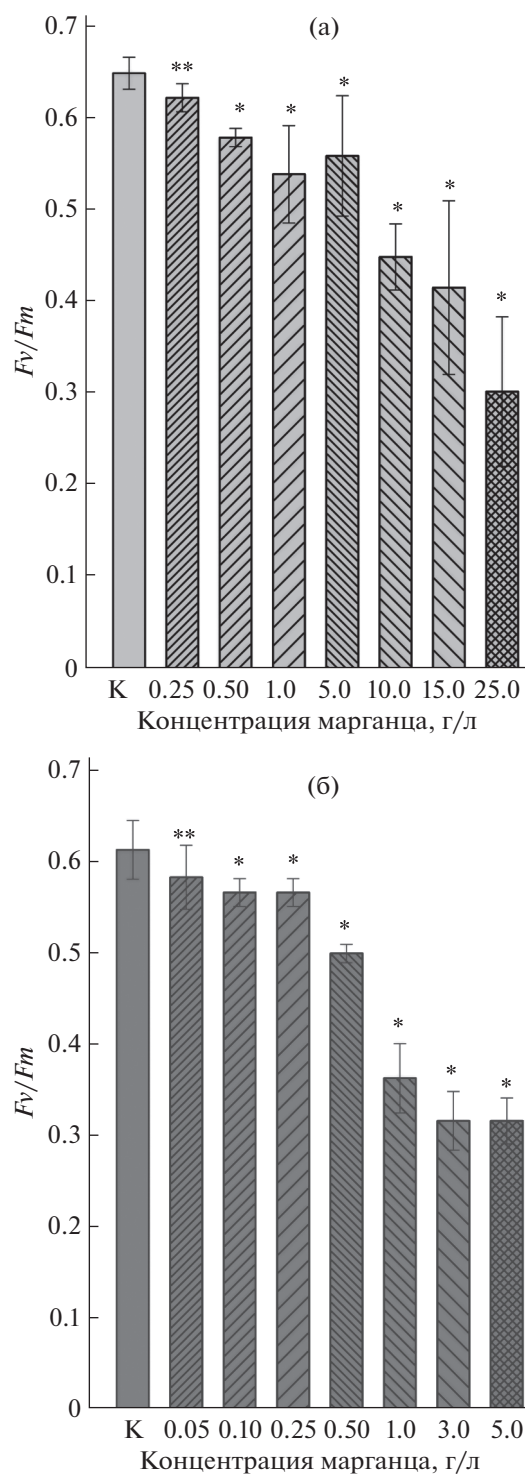


Рис. 2. Фотосинтетическая активность клеток микроводорослей *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 (а) и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 (б) при культивировании в средах BG-11, содержащих 0.005 г/л марганца (К) или его повышенные концентрации, в течение 4 суток. Данные представлены в виде средних значений для трех биологических повторностей и стандартных отклонений. Достоверность различий оценивалась по *t*-критерию Стьюдента (* $P \leq 0.05$, ** $P > 0.05$).

Таблица 1. Изменение оптической плотности и фотосинтетической активности суспензии клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 при культивировании с повышенными концентрациями марганца в течение 4 суток

Концентрация Mn ²⁺ , г/л	Относительное снижение параметров по сравнению с контролем, %		Наличие/отсутствие токсичности
	оптическая плотность суспензии	фотосинтетическая активность (F_v/F_m)	
<i>Lobosphaera</i> sp.			
0.25	21.8 ± 3.5	5 ± 1	Не токсичная
0.5	31.0 ± 2.8	11 ± 2	Не токсичная
1.0	27.9 ± 3.3	17 ± 2	Не токсичная
5.0	31.4 ± 5.7	14 ± 3	Острая токсичность не доказана
10.0	55.0 ± 4.2	32 ± 3	Токсичная
15.0	62.6 ± 7.0	37 ± 5	Токсичная
25.0	60.7 ± 4.6	54 ± 6	Токсичная
<i>M. simplicissimum</i>			
0.05	6.1 ± 1.5	5 ± 1	Не токсичная
0.10	15.1 ± 0.9	8 ± 2	Не токсичная
0.25	16.2 ± 0.7	8 ± 1	Не токсичная
0.50	28.4 ± 1.9	18 ± 2	Острая токсичность не доказана
1.0	42.1 ± 2.1	40 ± 2	Острая токсичность не доказана
3.0	45.9 ± 3.8	53 ± 3	Токсичная
5.0	55.5 ± 1.3	55 ± 4	Токсичная

на которые монтировали срезы перед их ПЭМ-анализом и осмия ($K\alpha = 1.91$ кэВ), использованного при фиксации клеток. Только в спектрах ЭДРС области тилакоидов (рис. 3в, 4а) и пластоглобул (рис. 3г, 4б) регистрировали небольшие пики в областях 5.90 и 6.49 кэВ, соответствующие полосам характеристического излучения марганца. Следует отметить, что в спектрах, полученных в области пластоглобул *Lobosphaera* sp. наряду с марганцем регистрировался пик фосфора ($K\alpha = 2.01$ кэВ) (рис. 4б).

В спектрах ЭДРС, полученных из других субкомпарментов клеток, как, например, клеточная стенка (рис. 4в) и крахмальные зерна (рис. 4г), достоверного пика марганца зафиксировано не было, или уровень характеристического излучения марганца в цитозоле и вакуолярных включениях был очень слабым и не превышал 10–12 отн. ед.

Анализ срезов клеток *M. simplicissimum* показал наличие скопления электронно-плотных наночастиц размером 10–20 нм на поверхности клеток (рис. 3д, ж), во внешнем слое клеточной стенки (рис. 3е) и в межклеточном матриксе (рис. 3д, ж). В последнем случае размер наночастиц иногда достигал 40–60 нм. В ЭДРС-спектрах, регистрируемых от скоплений наночастиц (рис. 4д, е), присутствовали 3 пика разной интенсивности характеристического излучения марганца ($L\alpha = 0.64$ кэВ;

$K\alpha = 5.89$ кэВ и $K\alpha = 6.49$ кэВ). Уровень интенсивности и наличие всех пиков марганца достоверно указывает на обогащенность этим элементом исследуемых наночастиц. В вакуолярных включениях *M. simplicissimum*, характеризовавшихся, судя по спектрам ЭДРС (рис. 4ж), содержанием преимущественно фосфора (P) ($K\alpha = 2.01$ кэВ) и азота (N) ($K\alpha = 0.39$ кэВ) регистрировали небольшие пики, соответствующие элементам Ca ($L\alpha = 3.69$ кэВ) и Mn ($K\alpha = 5.90$ кэВ). Анализ других компарментов клеток *M. simplicissimum* (цитозоль, крахмальные зерна, тилакоиды, пиреноид, липидные глобулы, область ядра и т.д.) не обнаружил пиков марганца в спектрах ЭДРС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из важнейших задач экофизиологии микроводорослей является изучение ответной реакции клеток на ионы тяжелых металлов, которые при повышенных концентрациях оказывают токсическое действие на самые разнообразные физиологические процессы. Данная проблема имеет не только очевидное практическое значение, которое связано со все возрастающим загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами и использованием для биоиндикации и биотестирования водных сред [21], но также фундаментальное зна-

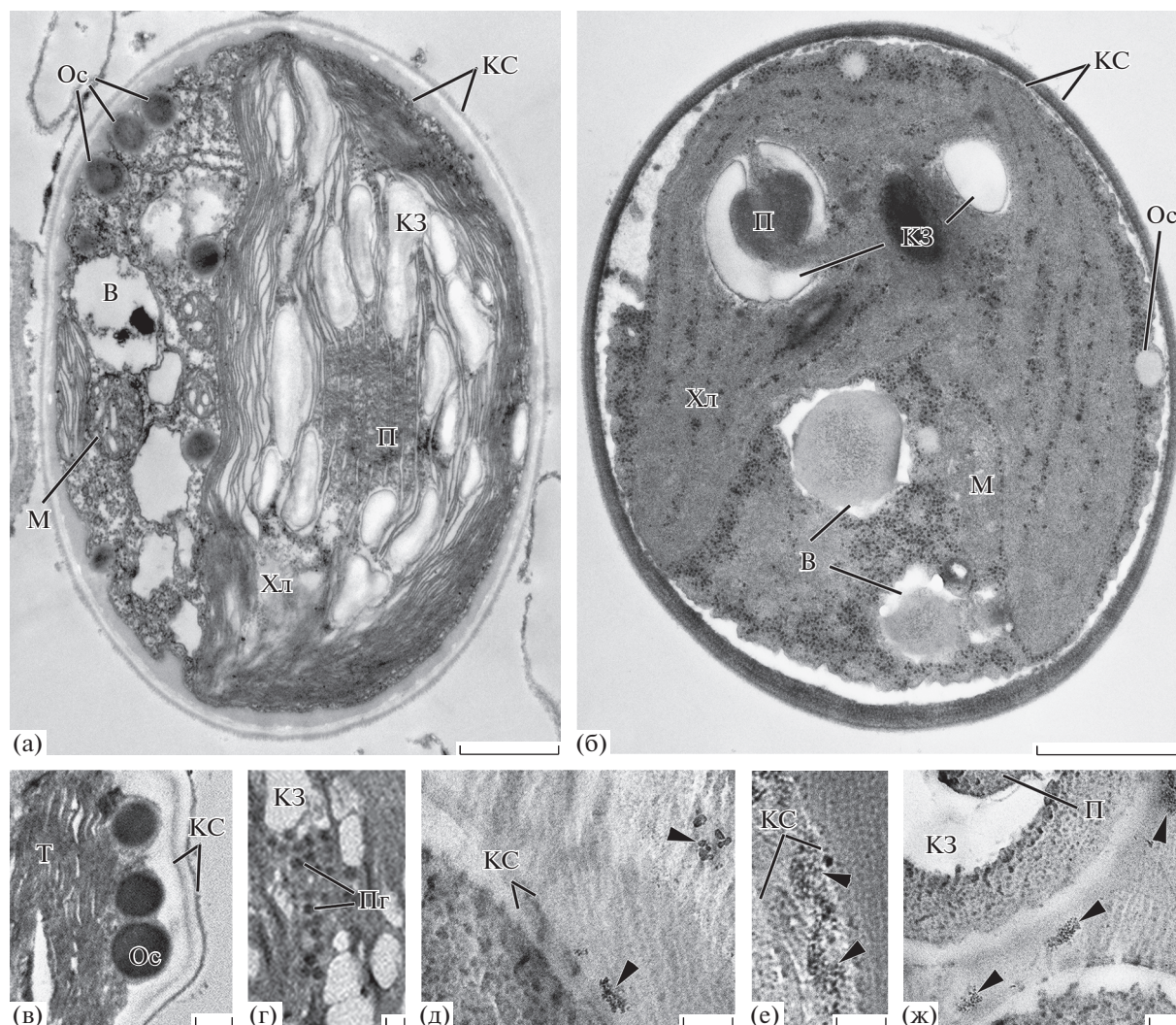


Рис. 3. Ультратонкая организация клеток микроводорослей *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 (а) и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 (б) (ПЭМ-изображения ультратонких срезов), а также репрезентативные изображения участков клеток, анализированных ЭДРС (СПЭМ-изображения полутонких срезов): *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 в области тилакоидов (в) и пластоглобул (г) в хлоропласте; *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 с наночастицами на клеточной поверхности и в межклеточном матриксе (д, ж), в клеточной стенке (е). В – вакуоль, КЗ – крахмальное зерно, КС – клеточная стенка, М – митохондрия, П – пиреноид, Ос – олеосома, Хл – хлоропласт. Наночастицы указаны наконечником стрелки. Масштабные отрезки: 1 мкм (а, б); 0,2 мкм (в-ж).

чение для исследования механизмов адаптации, устойчивости микроводорослей и биоизъятия тяжелых металлов, которые они способны накапливать в биомассе в больших количествах.

Известно, что фотосинтетический аппарат микроводорослей чрезвычайно чувствителен к наличию поллютантов, в том числе тяжелых металлов в окружающей среде [16]. Исследование состояния фотосинтетического аппарата микроводорослей методом флуориметрии является одним из самых популярных методов анализа ФСА [15].

Как показали результаты исследования, снижение ФСА зависело от концентрации марганца в среде, указывая на токсическое действие повышенных концентраций этого металла на фото-

синтетический аппарат клеток обеих культур. Снижение оптической плотности суспензий клеток в области максимума поглощения хлорофилла, с одной стороны, могло указывать на уменьшение содержания хлорофилла в клетках и редукцию фотосинтетического аппарата в ответ на стрессовое воздействие, а с другой стороны, на сокращение количества клеток в суспензии.

Результаты исследований показали, что культуры *Lobosphaera* sp. и *M. simplicissimum* характеризуются различной толерантностью к повышенным концентрациям марганца в среде.

Пределы толерантности к высоким концентрациям марганца отличаются для различных культур оксигенных фототрофных микроорганизмов [8] и

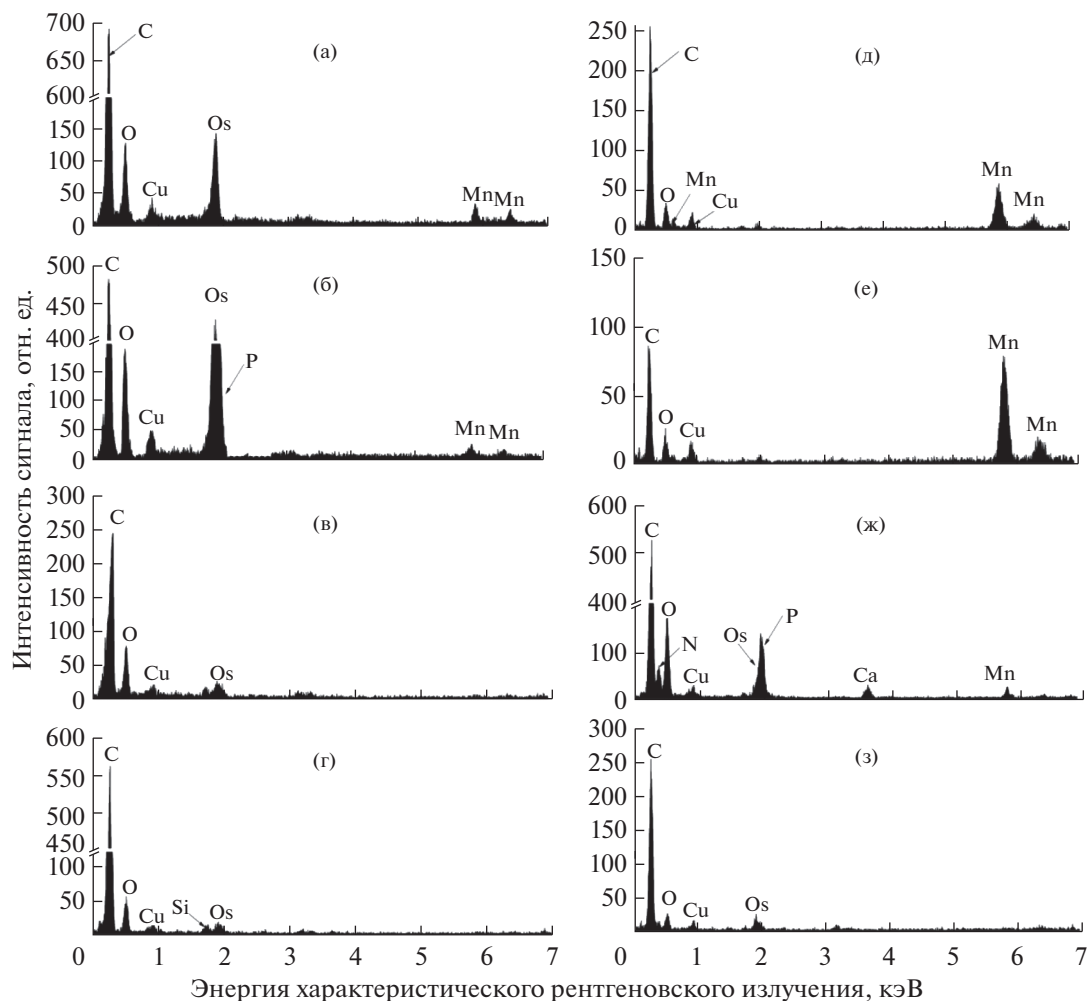


Рис. 4. Репрезентативные спектры энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии клеток микроводорослей *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 (а-г) и *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 (д-з) в области тилакоидов (а), пластоглобулы (б), клеточной стенки (в), крахмального зерна (г), скоплений наночастиц на поверхности клеток (д), клеточной стенке (е), вакуолярных включений (ж), пиреноида (з).

определяются способностью организма адаптироваться к высоким концентрациям металлов посредством уменьшения поступления ионов металла в клетки, а также способностью связывать или изолировать ионы металла во внеклеточном полимерном матриксе или поверхностных структурах клетки [22].

Результаты проведенных экспериментов показали, что клетки *M. simplicissimum* устойчивы к концентрациям марганца в среде от 0.05 до 0.5 г/л. Такое заключение основано на установленном незначительном снижении оптической плотности суспензии на 2 сутки в сравнении с контролем, отсутствии усиления снижения на 4 сутки, а также стабильности уровня ФСА. Напротив, при концентрациях выше 1.0 г/л наблюдали значительное снижение оптической плотности суспензии, продолжающееся на протяжении всего эксперимента, а также низкую ФСА клеток, что указывает на отно-

сительно низкую толерантность культуры к этим концентрациям марганца. Культивирование клеток *Lobosphaera* sp. в среде, содержащей от 0.25 до 5.0 г/л марганца, показало, что на 4 сутки оптическая плотность суспензий и ФСА клеток практически не зависела от концентрации марганца в среде, при этом дальнейшее увеличение концентрации приводило, по-видимому, к значительному превышению адаптационного диапазона культуры.

Известно, что токсичность высоких концентраций марганца для растительных клеток, в основном, связывают с окислительным стрессом, в частности, с нарушением окислительного баланса хлоропластов. При избытке марганца наблюдается увеличение активности Mn-супероксиддисмутазы [23], может наблюдаться снижение роста, хлороз и некроз тканей [10, 24]. Различия в толерантности к повышенным концентрациям марганца может

быть связано с различием в механизмах акклимации, в том числе, и с особенностями субклеточного распределения марганца в клетках *Lobosphaera* sp. и *M. simplicissimum*.

В микроводоросли *Lobosphaera* sp. новообразование обособленных марганецсодержащих включений не было обнаружено. Наибольший уровень характеристического излучения марганца наблюдали в области тилакоидов и пластоглобул, тогда как в цитозоле и вакуолях сигнал марганца детектирован недостоверно, в остальных внутриклеточных компартментах и клеточной стенке марганец в детектируемом количестве отсутствовал. Наблюдаемая картина, скорее всего, указывает на дисперсное распределение марганца в клетках с избирательным его концентрированием в области хлоропластов.

Известно, что марганец является кофактором для ряда ферментов, а также содержится в хлоропластах в составе Mn-кластера кислородвыделяющего комплекса ФС II [25]. Исследование срезов клеток *Lobosphaera* sp., культивируемых при обычных концентрациях Mn, показало отсутствие сигнала марганца во всех компартментах, в том числе и хлоропластах, что скорее всего, обусловлено ограничениями метода ЭДРС для детекции низких концентраций этого элемента.

Следует отметить, что характеристические рентгеновские излучения как марганца, так и фосфора в пластоглобулах, судя по доступным нам публикациям, выявлены впервые. Можно предположить, что обнаружение марганца и фосфора связано с их поступлением и концентрированием в пластоглобулы, сопряженным с транслокацией компонентов тилакоидов в процессе их сборки при стрессе. Пластоглобулы, как известно, представляют собой липопротеиновые микрокомпартменты с интегрированными в метаболизм пластид функциями, включая адаптацию к окружающей среде [26]. Представленные результаты, очевидно, демонстрируют ранее не известные свойства пластоглобул и расширяют представления об особенностях их сетей фосфорилирования и потенциала в стрессовых условиях.

На поверхности клеток, а также в клеточной стенке и в межклеточном пространстве культуры *M. simplicissimum* наблюдали скопление наночастиц марганца (рис. 3, 4). Известно, что некоторые виды бактерий и грибов участвуют в процессе образования наночастиц марганца, связанном с окислением Mn^{2+} до Mn^{4+} и образованием нерастворимого оксида марганца [27]. Экзоплазматический процесс окисления марганца и образования наночастиц описан и для некоторых видов микроводорослей, в том числе одного представителя рода *Micractinium* [8]. Окисление марганца происходит не только в поверхностных структурах клеток, но и во внеклеточном матриксе, и в среде

культивирования, что связано, во-первых, с увеличением рН среды в процессе фотосинтетической фиксации углерода, и во-вторых, с участием супероксидных радикалов, продуцируемых внеклеточными белками, экскретируемыми клетками некоторых микроорганизмов, в том числе и микроводорослей [8, 28]. Процесс образования наночастиц марганца в среде, на поверхности клеток и клеточных стенках можно рассматривать как адаптационную стратегию клеток микроводорослей в ответ на повышенное количество марганца в среде, позволяющее ограничивать его проникновение внутрь клетки.

Следует отметить, что в настоящее время активно развиваются нанобиотехнологии, связанные с синтезом наночастиц марганца клетками микроорганизмов [29]. Наночастицы марганца характеризуются электрокаталитическими, магнитными и флуоресцентными свойствами, антибактериальной и противогрибковой активностью, в связи с чем могут применяться в производстве суперконденсаторов, литиевых аккумуляторов, в медицине, в аналитической химии, для детоксикации опасных микрополлютантов и других областях [29].

Анализ срезов *M. simplicissimum* показал отсутствие характеристических пиков марганца во внутриклеточных субкомпартментах, за исключением вакуолей, в которых марганец обнаружен в составе фосфорсодержащих включений, по элементному составу схожих с гранулами полифосфатов [19]. Накопление резерва P в такой форме известно для многих микроводорослей [19, 30, 31], в том числе для представителя рода *Lobosphaera* [32, 33]. В работе [31] толерантность микроводорослей к таким тяжелыми металлам, как Cd и Pb, объясняют процессом их связывания вакуолярными полифосфатными гранулами, позволяющими исключить токсиканты из активного метаболизма клеток. Марганец, как показано на примере *Chlamydomonas reinhardtii* [34], в значительной степени локализован в вакуоле совместно с фосфором и кальцием. Хотя накопление марганца зависело от содержания клеточных полифосфатов, только небольшое количество его ионов (Mn^{2+}) образовывало устойчивые комплексы с полифосфатами.

Толерантность клеток *M. simplicissimum* к повышенным концентрациям марганца, по-видимому, может быть следствием, во-первых, способности клеток к экзоплазматическому окислению и накоплению нерастворимых форм марганца, во-вторых, с компартментацией поступившего внутрь клеток марганца в вакуолях и связывания его с полифосфатными гранулами или иными лигандами. Снижение толерантности культуры при концентрациях марганца выше 1.0 г/л может быть связано с увеличением количества наночастиц марганца в клеточных стенках, которые могут нару-

шать работу транспортеров, переносящих питательные вещества в клетку и экскреции клеточных метаболитов [35]. Известно, что высокая толерантность микроорганизмов к действию тяжелых металлов связана со способностью индуцировать синтез специфических металлсвязывающих белков и пептидов богатых цистеином, таких как металлотионеины и фитохелатины [36]. Образование металлотионеинов и фитохелатинов описано, в том числе и для представителей семейства *Trebouxiophyceae*, в частности для некоторых видов *Chlorella* и *Micractinium* [9]. Механизмы толерантности клеток к марганцу связывают также с его взаимодействием с отрицательно заряженными группами в составе поверхностных структур клеток микроводорослей [37]. Участками связывания металла в клеточной стенке микроводорослей могут быть тиоловые группы белков, аминокислот, карбоксильные группы пектинов, белков, уроновых кислот.

Таким образом, в результате исследования показано различие в пределах толерантности клеток *Lobosphaera* sp. и *M. simplicissimum* к повышенному количеству марганца, которое может объясняться различием в механизмах, обеспечивающих устойчивость клеток к этому тяжелому металлу и связано с особенностями субклеточного распределения марганца в клетках исследованных культур.

Электронно-микроскопические исследования были проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа по детекции субклеточного распределения марганца выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 21-74-20004). Работа по оценке толерантности культур микроводорослей выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-25050).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borowitzka M.A.* Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters // *J. Biotechnol.* 1999. V. 70. P. 313. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Junior W.G.M., Gorgich M., Corrêa P.S., Martins A.A., Mata T.M., Caetano N.S.* Microalgae for biotechnological applications: cultivation, harvesting and biomass processing // *Aquac.* 2020. V. 528. P. 735562. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735562>
- Vasilieva S., Lobakova E., Grigoriev T., Selyakh I., Semanova L., Chivkunova O., Gotovtsev P., Antipova C., Zagoskin Y., Scherbakov P., Lukyanov A., Lukanina K., Solovchenko A.* Bio-inspired materials for nutrient bio-capture from wastewater: microalgal cells immobilized on chitosan-based carriers // *J. Water Process Eng.* 2021. V. 40. P. 101774. <https://doi.org/10.1016/j.jppe.2020.101774>
- Boyle T.P.* The effect of environmental contaminants on aquatic algae // *Algae as ecological indicators* / Ed. L. E. Shubert. Academic press. 1984. P. 237.
- Дмитриева А.Г., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л.* Физиология растительных организмов и роль металлов. Москва: МГУ, 2002. 160 с.
- Masindi V., Muedi K. L.* Environmental contamination by heavy metals // *Heavy metals* / Eds. H. Saleh, R. Aglan. 2018. V. 10. P. 115. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>
- De-Bashan L.E., Bashan Y.* Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects // *Bioresour. technol.* 2010. V. 101. P. 1611. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- Chaput D.L., Fowler A.J., Seo O., Duhn K., Hansel C.M., Santelli C.M.* Mn oxide formation by phototrophs: spatial and temporal patterns, with evidence of an enzymatic superoxide-mediated pathway // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 18244. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54403-8>
- Balzano S., Sardo A., Blasio M., Chahine T.B., Dell'Anno F., Sansone C., Brunet C.* Microalgal metallo-thioneins and phytochelatin and their potential use in bioremediation // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 517. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00517>
- Baldisserotto C., Ferroni L., Anfuso E., Pagnoni A., Fasulo M.P., Pancaldi S.* Responses of *Trapa natans* L. floating laminae to high concentrations of manganese // *Protoplasma.* 2007. V. 231. P. 65. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0242-2>
- Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // *Bacteriol. Rev.* 1971. V. 35. P. 171. <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
- Solovchenko A., Merzlyak M.N., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S.* Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incise* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in $\Delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light // *J Phycol.* 2010. V. 46. P. 763. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849>
- Blaise C.* Algal microplate toxicity test // *Small-scale freshwater toxicity investigations* / Eds. C. Blaise, J. F. Ferrard. Springer Netherlands. 2005. P. 137.
- Pacheco A., Hernández-Mireles I., García-Martínez C., Álvarez M.M.* Microplates as a microreactor platform for microalgae research // *Biotechnol. Progr.* 2013. V. 29. P. 638. <https://doi.org/10.1002/btpr.1721>
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A.* Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient // *Chlorophyll a fluorescence* / Eds. G. C. Papageorgiou and Govindjee. Springer Netherlands. 2004. P. 321. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Маторин Д.Н., Рубин А.Б.* Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей. Ижевск: ИКИ-РХД, 2012. 256 с.

17. *Gorelova O.A., Baulina O.I., Solovchenko A.E., Chekanov K.A., Chivkunova O.B., Fedorenko T.A., Lobakova E.S.* Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with White Sea invertebrates // *Protoplasma*. 2015. V. 252. P. 489. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0694-0>
18. *Reynolds E.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
19. *Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., Moiseenko A., Shaitan K., Polishakov V., Nedbal L., Gorelova O.* Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy // *Protoplasma*. 2017. V. 254. P. 1323. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1024-5>
20. ГОСТ Р 54496-2011 Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. Москва: Стандартинформ. 2012.
21. *Филенко О.Ф.* Биологические методы в контроле качества окружающей среды // *Экологические системы и приборы*. 2007. № 6. С. 18.
22. *Silver S., Phung L.T.* Bacterial heavy metal resistance: new surprises // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 753. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.753>
23. *González A., Steffen K.L., Lynch J.P.* Light and excess manganese: implications for oxidative stress in common bean // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 493. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.493>
24. *Mills R.F., Doherty M.L., Lorpez-Marque R.L., Weimar T., Dupree P., Palmgren M.G., Pittman J.K., Williams L.E.* ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 116.
25. *Svensson B., Tiede D.M., Nelson D.R., Barry B.A.* Structural studies of the manganese stabilizing subunit in photosystem II // *Biophys. J.* 2004. V. 86. P. 1807.
26. *Klaas J. van Wijk and Felix Kessler.* Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. V. 68. P. 253. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111737>
27. *Tebo B., Bargar J., Clement B., Dick G., Murray K., Parker D., Verity R., Samuel M. Webb S.* Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2004. V. 32. P. 287.
28. *Learman D.R., Voelker B.M., Vazquez-Rodriguez A.I., Hansel C.M.* Formation of manganese oxides by bacterially generated superoxide // *Nat. Geosci.* 2011. V. 4. P. 95.
29. *Hoseinpour V., Ghaemi N.* Green synthesis of manganese nanoparticles: applications and future perspective – a review // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2018. V. 189. P. 234.
30. *Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Selyakh I., Semenova L., Ismagulova T., Lukyanov A., Mamedov I., Vinogradova E., Karpova O., Konyukhov I., Vasilieva S., Mojzeš P., Dijkema C., Veckerskaya M., Zvyagin I. et al.* Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited // *Algal Res.* 2019. V. 43. P. 101651. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>
31. *Sanz-Luque E., Bhaya D., Grossman A.R.* Polyphosphate: a multifunctional metabolite in cyanobacteria and algae // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 938.
32. *Kokabi K., Gorelova O., Ismagulova T., Itkin M., Malitsky S., Boussiba S., Solovchenko A., Khozin-Goldberg I.* Metabolomic foundation for differential responses of lipid metabolism to nitrogen and phosphorus deprivation in an arachidonic acid-producing green microalga // *Plant Sci.* 2019. V. 283. P. 95. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.02.008>
33. *Kokabi K., Gorelova O., Zorin B., Didi-Cohen S., Itkin M., Malitsky S., Solovchenko A., Boussiba S., Khozin-Goldberg I.* Lipidome remodeling and autophagic response in the arachidonic-acid-rich microalga *Lobosphaera incisa* under nitrogen and phosphorus deprivation // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614846>
34. *Tsednee M., Castruita M., Salomé P.A., Sharma A., Lewis B.E., Schmollinger S.R., Strenkert D., Holbrook K., Otegui M., Khatua K., Das S., Datta A., Chen X., Ramon C., Ralle M. et al.* Manganese co-localizes with calcium and phosphorus in *Chlamydomonas acidocalcisomes* and is mobilized in manganese-deficient conditions // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. P. 17626. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009130>
35. *Knauer K., Jabusch T., Sigg L.* Manganese uptake and Mn(II) oxidation by the alga *Scenedesmus subspicatus* // *Aquat. Sci.* 1999. V. 61. P. 44.
36. *Arunakumara K., Xuecheng Z.* Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae // *J. Ocean Univ. Chin.* 2008. V. 7. P. 60.
37. *Csonto J., Kadukova J., Polak M.* Artificial life simulation of living alga cells and its sorption mechanisms // *J. Med. Syst.* 2001. V. 25. P. 221.