

На правах рукописи



ЧЕРНИКОВА Анна Александровна

**НАКОПЛЕНИЕ МЕДИ И МАРГАНЦА
В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИИ
*SPIRULINA PLATENSIS***

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва -2009

Работа выполнена в Лаборатории управляемого фотобиосинтеза
Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им.
К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук,
профессор

Пронина Наталия Александровна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук,
профессор

Тамбиев Александр Хапачевич

кандидат биологических наук

Серегин Илья Владимирович

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

Институт фундаментальных
проблем биологии РАН

Защита состоится 30 июня 2009 г. в 14 ч. 30 мин. на заседании совета по
защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при
Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им.
К.А. Тимирязева РАН по адресу:
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977-80-18
e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «26» мая 2009 г.

Учёный секретарь
совета по защите докторских и
кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук



М. И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) становится все более актуальной. Металлы представляют серьезную угрозу для биоты вследствие острой токсичности и постепенного накопления в окружающей среде до опасного значения.

В последние годы экологи наряду с оценкой уровня загрязнений и определения их источников всё больше обращают внимание на выявление «судьбы» попавших в природную среду веществ, их превращений и взаимодействий с живыми организмами. Удобным объектом для таких исследований служат цианобактерии, которые способны накапливать в высоких концентрациях многие элементы и переводить их в нетоксичную форму, что в настоящее время широко применяется в целях биоремедиации - для очистки водных стоков (Жубанова & Заядан, 2004; do Nascimento & Xing, 2006; Saeed & Iqbal, 2006).

Поскольку процесс поступления металлов в окружающую среду является неизбежным по мере интенсификации промышленности и сельского хозяйства, следует признать актуальным вопрос прогнозирования развития водных биоценозов в условиях загрязнения водной среды. В этой связи возникает необходимость исследований устойчивости широкого круга микроорганизмов к различным химическим элементам.

Металлы, как главные природные ресурсы, образуют группу опасных загрязнителей среды, и, в то же время, они являются необходимой частью ферментативных систем живых организмов (Babula et al., 2008). Физиологическая роль меди и марганца, а также их фитотоксичность (в высоких концентрациях) определяют важность изучения закономерностей их накопления и распределения у разных видов растений и цианобактерий.

Цианобактерия *Spirulina platensis* широко распространена в природе и является перспективным объектом биотехнологии благодаря богатству белкового состава, наличию витаминов и высших жирных кислот (Richmond, 1986; Mosulishvini et al. 2002; Тамбиев и др., 2006). Пластичность метаболизма *S. platensis* позволяет получать биомассу, обогащенную необходимыми элементами, путем направленного изменения условий культивирования, что используется при создании биологически активных добавок (Мазо и др., 2004; Попова и др., 2006; Кравченко и др., 2008). Для понимания физиологических механизмов адаптации цианобактерий к действию ТМ и оптимизации условий культивирования с целью получения биомассы, обогащенной эссенциальными микроэлементами, представляется важным выявить специфику накопления и токсического действия ионов Cu и Mn в клетках цианобактерии *Spirulina platensis*.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было исследование возможности адаптации *Spirulina platensis* к действию ионов меди и марганца, а также способности клеток к накоплению металлов для получения биомассы, обогащенной этими элементами.

В связи с этим были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить влияние меди и марганца на рост *S. platensis*, определить оптимальные и летальные концентрации этих элементов.
2. Исследовать влияние меди и марганца на ультраструктурную организацию клеток *S. platensis*.
3. Изучить динамику накопления Cu и Mn в клетках *S. platensis*.
4. Исследовать влияние света на накопление Cu и Mn.
5. Исследовать включение Cu и Mn в состав клеточных компонентов.
6. Идентифицировать металлсвязывающие внутриклеточные компоненты.

Научная новизна. Показана высокая степень устойчивости *S. platensis* к ионам меди и марганца на различных стадиях роста культуры. Впервые показано, что цианобактерия способна восстанавливать Cu^{2+} до Cu^+ и переводить ТМ в недоступную для клетки форму. Впервые показано, что Cu и Mn накапливаются в клетках в основном в составе низкомолекулярных белков, которые по ряду характеристик могут быть отнесены к фитохелатинам или металлотионеинам. Впервые показано влияние света на накопление Cu и Mn. Показано влияние меди и марганца на изменение ультраструктурной организации клетки.

Практическая значимость. Полученные в работе данные об особенностях накопления меди и марганца имеют существенное значение для выяснения хода формирования адаптационных процессов и механизмов устойчивости цианобактерий к действию ТМ. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование цианобактерии *S. platensis* для биоремедиации промышленных стоков и городских водоемов от тяжелых металлов, а также могут быть использованы в биотехнологии для получения биомассы обогащенной Cu и Mn при производстве биологически активных добавок к пище человека и животных (патент РФ № 2277124).

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международном симпозиуме «Molecular genetics and biotechnology» (Москва, 2001); на международной конференции «Biotechnology of Microalgae» (Германия, 2003); на 5-ом съезде Всероссийского общества физиологов растений (Пенза, 2003); на 6-м съезде Всероссийского общества физиологов растений (Сыктывкар, 2007); на Всероссийской научной конференции «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, включая патент РФ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, заключения и выводов. Работа изложена на ... стр. машинописного текста, включая ... таблиц, ... рисунок, библиография содержит ... источника.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования использовали термофильную нитчатую цианобактерию *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. IPPAS B-256 из коллекции культур микроводорослей Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (IPPAS).

Культивирование цианобактерии осуществляли на среде Заррука в стерильных условиях при круглосуточном освещении (30 Вт/м²) и непрерывном барботировании газо-воздушной смесью содержащей 1.7-2% CO₂, при 35°C (Семененко, 1991). В опытных вариантах в стандартную среду Заррука добавляли сульфат меди или хлорид марганца в концентрациях: 0.04; 0.06; 0.08 мМ и 1.3; 2.5; 5.1 мМ соответственно. Соли вводили в питательные среды либо одновременно с внесением посевного инокулята, либо при выходе культуры на линейную фазу.

Биохимические анализы проводили на линейной стадии роста в клеточной массе предварительно отмытой от культуральной среды. Образцы хранили при -20°C.

Содержание белка определяли по методу Lowry (Lowry et al., 1951).

Содержание хлорофилла измеряли спектрофотометрически в метанольных экстрактах (Porra et al., 1989).

Содержание липофильных соединений оценивали весовым методом в пробах, экстрагированных метанолом при 60°C (Клячко-Гурвич, 1966).

Разрушение клеток проводили в гомогенизаторе Retsch-MM2 (Германия) в течение 10 мин при 90000 уд/мин с использованием стеклянных бус, при соотношении бусы/суспензия 1:1.

Фракционирование бесклеточного гомогената на фракции, обогащенные растворимыми белками и нерастворимыми клеточными компонентами осуществляли центрифугированием при 14000 об/мин, 30 мин при 4°C. Экстракцию липофильных соединений проводили при обработке фракции нерастворимых клеточных компонентов метанолом при 60°C.

Хроматографический анализ белков проводили с использованием колоночной хроматографии высокого давления на колонке 1,6×50 см. В качестве матрицы использовали Superosa-12 («Pharmacia», Швеция). Белок элюировали с колонки

фосфатным буфером, содержащим 0,05М KH_2PO_4 , 0,15М NaCl (рН 6,8), со скоростью 2 мл/мин.

Электрофоретическое разделение белков проводили в 12% трицин-ПААГ (Schagger & Jagow, 1987).

Хелатирование меди и марганца осуществляли с использованием ЭДТА (Steiner & Winden, 1970).

Содержание меди и марганца в культуральной среде, а также в биомассе *S. platensis* или выделенных из нее фракциях, озоленных путем мокрого сжигания в смеси азотной и хлорной кислот, определяли на атомно-адсорбционном спектрофотометре («Hitachi 270», Япония).

Определение Cu^+ проводили аналитическим методом путем проведения качественной реакции с N-диметиламино-бензилиденроданином (Грива и др., 1967).

Для получения **электронно-микроскопических снимков** клетки обрабатывали по методике Владимировой с соавт. (1978).

Статистическая обработка результатов. Для получения достоверных результатов эксперименты проводили в 2-3-х биологических и не менее чем в 3-х аналитических повторностях. В результатах работы представлены данные характерных опытов и относительные стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние меди и марганца на рост *S. platensis*. Добавление CuSO_4 (0.04 и 0.06 мМ Cu) в начальный период культивирования одновременно с внесением инокулята приводило к удлинению лаг-фазы, которая составляла около суток в контроле и 5 суток в опыте, с последующим более быстрым линейным ростом (рис. 1А). Внесение 0.04 мМ меди на 2-е сутки культивирования (в начале линейной фазы) приводило к активации роста культуры (рис.1Б), но снижению ее продуктивности. При увеличении концентрации меди до 0.06 мМ скорость роста и продуктивность культуры снижались и к 4-м суткам культура погибала, чего не происходило при внесении меди одновременно с инокулятом. В присутствии 0.08 мМ меди клетки погибали независимо от времени внесения соли.

Сравнение ростовых кривых рис. 1А и Б показывает, что при внесении металла на логарифмической стадии роста порог чувствительности культуры к меди снижается. Вероятно это связано с тем, что в течение индукционного периода, в который не происходит сколько-нибудь значительного увеличения биомассы, клетки лучше адаптируются к новым условиям, что позволяет цианобактерии увеличить устойчивость к более высоким концентрациям меди.

Введение хелатирующего агента повышало устойчивость *S. platensis* к токсическому действию меди. В присутствии комплексов Cu с ЭДТА культура сохраняла способность к росту даже при летальной концентрации меди (0.08 мМ).

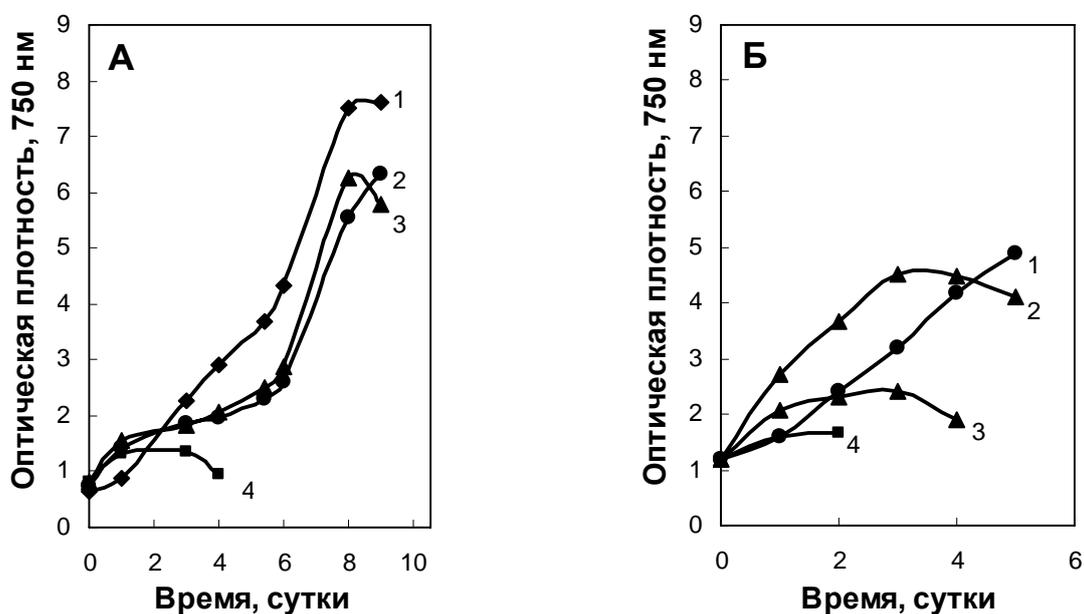


Рис. 1. Влияние CuSO_4 на рост *S. platensis*.

Соль вносили вместе с инокулятом (А) и на 2-е сутки после начала культивирования (Б). Количество добавленной в среду Заррука меди составляло (мМ): 0 (1, контроль), 0.04 (2); 0.06 (3); 0.08 (4).

При внесении марганца в концентрациях до 2.5 мМ одновременно с инокулятом не отмечено расхождений с контролем в ходе ростовых кривых в течение лаг-фазы и на линейном участке (рис. 2А).

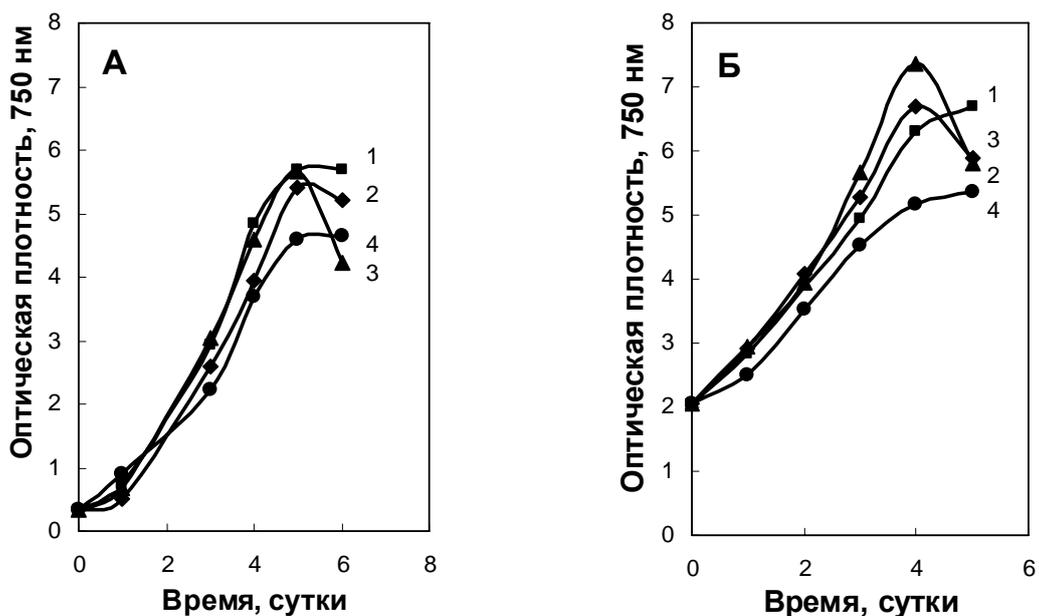


Рис. 2. Влияние MnCl_2 на рост *S. platensis*.

Соль вносили вместе с инокулятом (А) и на 2-е сутки после начала культивирования (Б). Количество добавленного в среду марганца составляло (мМ): 0 (1, контроль), 1.3 (2); 2.5 (3), 5.1 (4).

Внесение таких же концентраций Mn на 2-е сутки культивирования приводило к активации роста культуры (рис. 2Б) по сравнению с контролем. При этом максимальная плотность биомассы была выше, чем в контроле и при действии эквивалентной концентрации Mn, добавленной одновременно с инокулятом.

Однако независимо от времени внесения $MnCl_2$ в присутствии 1.3 и 2.5 мМ марганца наблюдалось существенное сокращение стационарной фазы с последующим быстрым лизисом клеток. Возможно, на фоне отсутствия активного деления клетки и замедления метаболизма токсичность Mn проявляется острее в силу снижения способности *S. platensis* включать поглощенный клетками марганец в метаболические процессы. При увеличении концентрации марганца до 5.1 мМ скорость роста снижалась независимо от стадии внесения металла.

Накопление меди и марганца клетками *S. platensis*. Анализ накопления меди в процессе культивирования *S. platensis* при внесении в культуральную среду соли с содержанием меди 0.06 мМ показал, что содержание Cu в клетках резко (на 2 порядка) возросло уже через 1 ч и в дальнейшем в течение 6 сут постепенно снижалось с 13.4 до 7.7 мкмоль/г сухой массы (рис. 3).

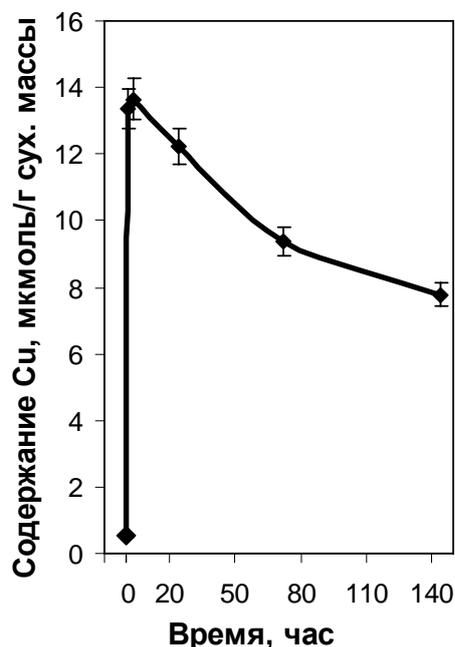


Рис. 3. Динамика накопления меди клетками *S. platensis* при культивировании в присутствии сульфата меди.

Соль с содержанием 0.06 мМ меди вносили вместе с инокулятом.

Как видно из рис. 4А, с повышением концентрации меди в среде наблюдалось увеличение ее содержания в биомассе, которое зависело от времени инкубации цианобактерии с металлом. Через час при всех концентрациях металла в среде до 0.06 мМ его содержание в клетках было значительно выше (кривая 1), чем через 1 сутки (кривая 2), 3 суток (кривая 3) и 6 суток (кривая 4). Однако, при культивировании клеток в присутствии 0.08 мМ Cu^{2+} эта закономерность

нарушалась, что говорит о подавлении механизмов, ограничивающих поступление и накопление меди. Содержание металла одинаково высокое (17,3 мкмоль/г сухой массы) через 1 ч и через 1 сут, что приводило в дальнейшем к гибели клеток как это видно из ростовой кривой на рис. 1А, кривая 4.

Снижение содержания меди у *S. platensis* в ходе адаптации цианобактерии к избытку металла (рис. 3) свидетельствует об индукции механизмов, способствующих выносу Cu из клетки.

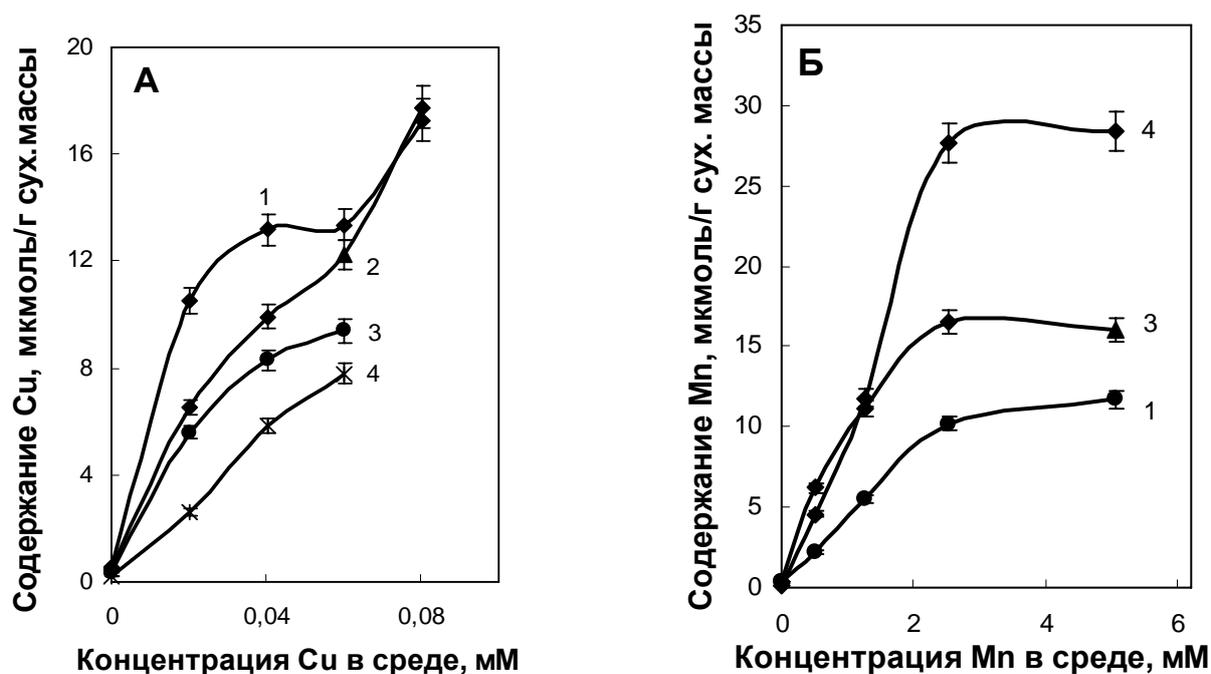


Рис. 4. Зависимость количества связанных меди (А) и марганца (Б) в клетках *S. platensis* от количества элементарных Cu^{2+} и Mn^{2+} , введенных в среду культивирования.

Пробы отбирали через 1 ч (1), 1 сут (2), 3 сут (3) и 6 сут (4) после внесения разных концентраций CuSO_4 и MnCl_2 в среду культивирования.

Накопление марганца клетками *S. platensis* происходило пропорционально времени культивирования и увеличению концентрации металла в среде с выходом на насыщение около 2.5 мМ (рис. 4Б). Пороговой внутриклеточной концентрацией этого металла, по-видимому, следует считать около 30 мкмоль/г сухой. Выход кривых накопления марганца на плато показывает, что клетки способны каким-то способом ограничивать поступление и накопление Mn, защищая их от токсического действия этого металла.

Влияние света на накопление меди и марганца клетками *S. platensis*. Анализ кинетики содержания меди в биомассе при инкубировании *S. platensis* в присутствии 0.06 мМ Cu^{2+} на свету и в темноте показал, что клетки не способны накапливать медь в темноте (табл. 1). Таким образом, накопление меди является

светозависимым процессом, что также установлено и для других организмов (Verma & Singh, 1990).

Таблица 1. Накопление Cu и Mn при внесении металла в суспензию *S. platensis* на свету и в темноте

Металл	Время	Содержание металла в клетке (мкмоль/г сух. массы)	
		свет	темнота
0.06 mM Cu	1 час	13.5±0.8	следы
	1 сут	12.0±0.9	следы
	3 сут	9.5±0.5	следы
	6 сут	7.7±0.4	следы
2.5 mM Mn	1 час	9.5±0.7	7.2±0.5
	1 сут	11.6±1.0	56.0±2.9
	3 сут	16.9±0.9	20.1±2.5

В отличие от меди марганец накапливался в клетках *S. platensis* как в темноте, так и на свету (табл. 1). При внесении соли в темноте содержание марганца в клетках в 1 сутки, в расчете на единицу сухой массы, было почти в 5 раза выше, чем на свету. Далее содержание металла в клетках снижалось, приближаясь через 3 суток к значению установленному на свету. Возможно, что различие в динамике содержания марганца в темноте и на свету связано с особенностями сорбции металла клеточными стенками *S. platensis*.

Биотрансформация и вынос меди из клетки. Для изучения природы механизмов ограничивающих аккумуляцию меди (рис. 3, 4А), мы исследовали изменение содержания металла в среде культивирования и в клетках. Для сопоставления выноса меди из среды и включения ее в клеточные структуры суспензию *S. platensis*, выращенную в присутствии 0.04 mM Cu²⁺, центрифугировали для полного отделения клеток от среды. На поверхности осадка содержащего клетки, обнаруживался слой красноватого цвета, который был нами отобран и проанализирован на присутствие меди. Содержание меди определяли также в супернатанте (среда) и в осадке (клетки), трижды промытом буфером для полного отделения клеток от элементов среды.

Анализ хода кривых 1 и 2 рис. 5 показал, что количество меди, вынесенной из среды, значительно превышает количество меди, включенной в биомассу в течение всего цикла культивирования. Это различие показано на рис. 5 пунктирной линией 3. Мы предположили, что баланс распределения меди в среде и биомассе не сошелся из-за возможного образования нерастворимых комплексов меди, которые

осаждались вместе с клетками и были утрачены при многократной отмывке клеток от среды. С этой целью мы провели анализ красноватого осадка, полученного при отделении клеток от среды, который показал наличие в нем восстановленной меди (Cu^+). Поскольку в среду добавляли сульфат меди можно полагать, что *S. platensis* способна восстанавливать Cu^{2+} и переводить ее в недоступную для клетки форму.

Процессы поглощения (кривая 1) и восстановления (кривая 3) меди являются достаточно быстрой ответной реакцией цианобактериальной клетки и сопоставимы по масштабам. Уже через 1 ч после внесения сульфата меди отмечается высокое содержание Cu^+ , а в дальнейшем накопление в среде восстановленной меди замедляется.

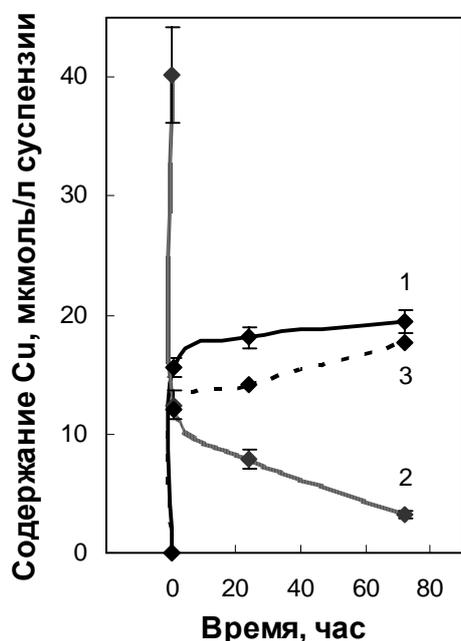


Рис. 5. Изменение содержания меди в клетках *S. platensis* (1) и в среде культивирования (2).

Культуру выращивали в присутствии CuSO_4 (0.04 мМ Cu^{2+}). Пунктиром (3) отмечена расчетная кривая концентрации восстановленной меди (Cu^+), рассчитанная по формуле:

$$C_{\text{вос}} = C_{\text{вн}} - (C_{\text{кл}} + C_{\text{сп}}),$$

где $C_{\text{вос}}$ – конц. восстановленной меди, $C_{\text{вн}}$ – конц. меди, внесенной в среду культивирования, $C_{\text{кл}}$ – конц. меди в клетке, $C_{\text{сп}}$ – конц. меди в среде культивирования.

Осаждение металла из среды культивирования снижает токсическое действие меди и ограничивает накопление меди в клетке, позволяя пройти полный цикл развития. При концентрации меди свыше 0.08 мМ клетки утрачивали способность к выносу металла в среду (рис. 4А), что вызывало лизис клеток уже на ранних этапах культивирования (рис 1). Очевидно также, что секреция ТМ из клетки (рис. 3) по крайней мере, отчасти может быть связана с образованием восстановленной меди Cu^+ .

Адсорбция меди и марганца сухой биомассой *S. platensis*. Для исследования вклада биосорбции в накопление меди и марганца лиофилизированную биомассу *S. platensis* ресуспендировали в среде, содержащей 0.06 мМ меди и 2.5 мМ марганца. В «мертвых клетках» уже через 1 час наблюдалось резкое увеличение количества металлов, которое далее не изменялось (рис. 6).

Таким образом, показана принципиальная возможность клеточных стенок *S. platensis* сорбировать ТМ. Однако отсутствие какого-либо накопления меди в темноте (табл. 1.) может указывать, что вклад биосорбции в накопление металлов живыми и «мертвыми» клетками может различаться.

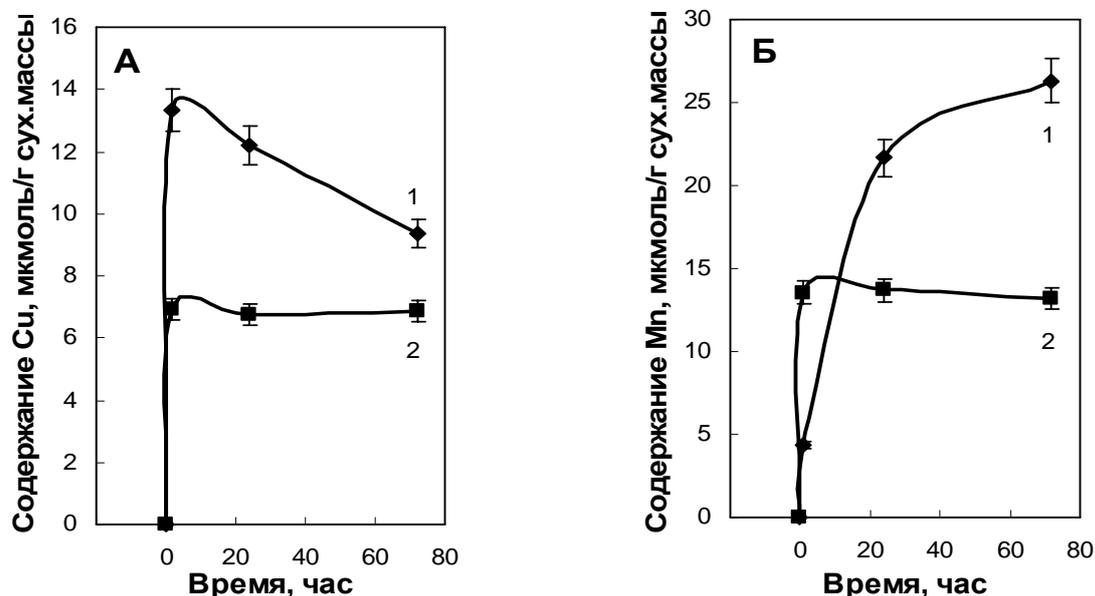


Рис. 6. Динамика накопления меди (А) и марганца (Б) при внесении 0.06 мМ Cu^{2+} и 2.5 мМ Mn^{2+} в суспензию *S. platensis* (1) и сухую биомассу (2).

Содержание Cu и Mn в живых клетках *S. platensis* значительно выше, чем у «мертвых» (рис. 6), что свидетельствует о включении металлов в состав внутриклеточных структур.

Идентификация металлсвязывающих клеточных компонентов. Для оценки способности клеток *S. platensis* сорбировать металлы, а также включать медь и марганец в состав клеточных компонентов, на первом этапе было проведено разделение биомассы на отдельные фракции – растворимых белков, нерастворимых клеточных компонентов и липофильных соединений.

Как видно из рис. 7, большая часть ТМ содержалась в составе фракции обогащенной растворимыми белками - меди около 55%, марганца более 80%. Около 20% меди обнаруживалось в липофильных соединениях, содержащих в основном пигменты и липиды тилакоидных мембран. Во фракции нерастворимых клеточных компонентов, которая включала белки тилакоидных мембран, элементы клеточных стенок и углеводы, содержалось около 17 % меди и марганца. Таким образом, можно полагать, что доля сорбированных живыми клетками металлов не превышает 20 – 30 %.

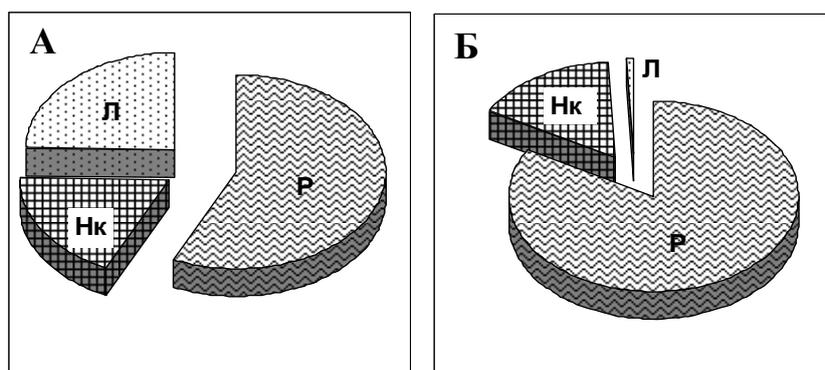


Рис. 7. Распределение Cu (А) и Mn (Б) в биомассе *S. platensis*.

Л – липофильные соединения, Нк – фракция нерастворимых клеточных компонентов, Р – фракция растворимых белков.

Для поиска металлсвязывающих белков было проведено разделение растворимых белков, выделенных из клеток *S. platensis*, с использованием колоночной хроматографии высокого давления. На рис. 8А, Б представлены профили белков из клеток, выращенных на стандартной среде (контроль) и при внесении 0.06 мМ меди или 2.5 мМ марганца (опыт).

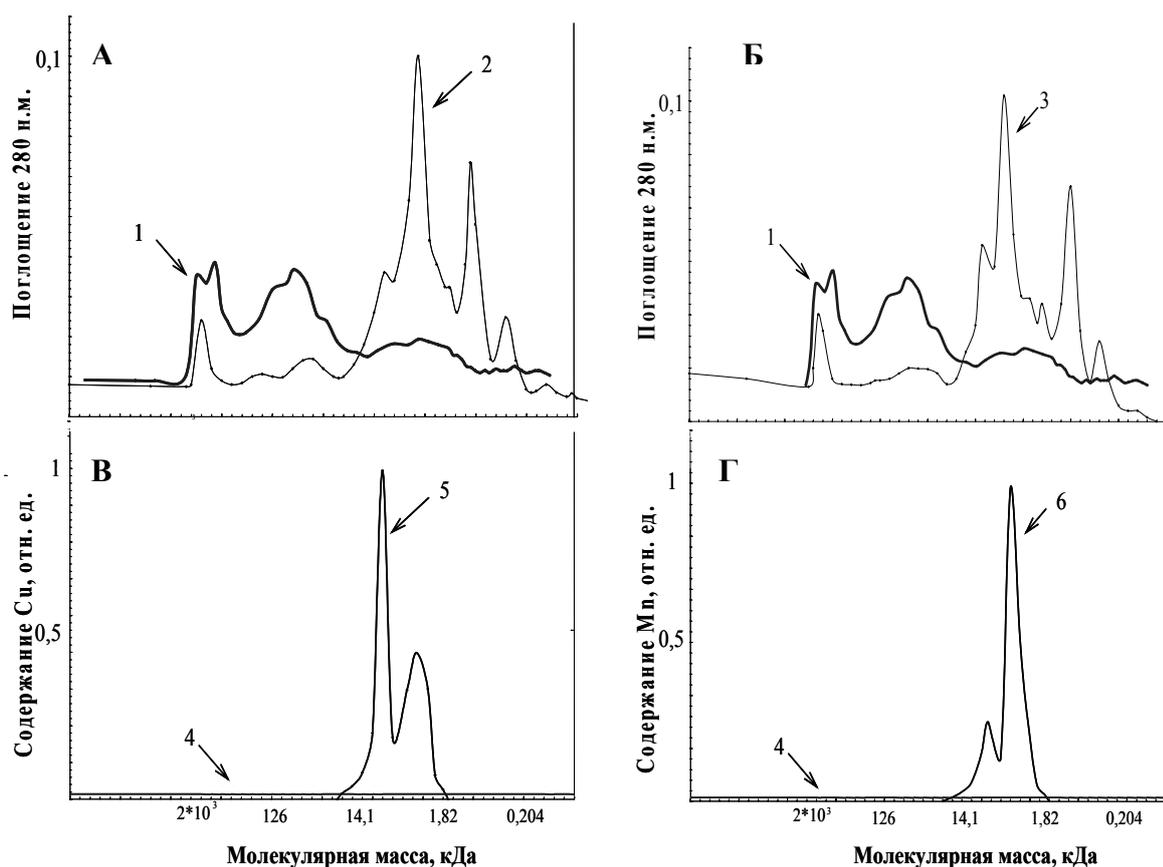


Рис. 8. Спектры хроматографического разделения белков (HPLC) *S. platensis* и идентификация металлсвязывающих белков.

А, Б - профиль элюции белка, выделенного из клеток, выращенных на стандартной среде Заррука (1) и при добавлении 0.06 мМ меди (2) или 2.5 мМ марганца (3).

В, Г - содержание металлов в расчете на единицу белка в контроле (4) и при добавлении меди (5) или марганца (6).

Сравнение профилей элюции белков показало, что количественное содержание низкомолекулярных белков возросло более чем в пять раз, по сравнению с контролем при культивировании *S. platensis* в присутствии металлов. При этом анализ полученных в ходе хроматографического разделения фракций на содержание металлов показал, что именно эти белки с молекулярными массами 2 – 15 кДа содержат медь и марганец (рис. 8В, Г). Можно полагать, что данные белки относятся к классу металлсвязывающих белков *S. platensis*.

При электрофоретическом разделении медь- и марганец-содержащих белковых фракций было обнаружено несколько полос, соответствующих белкам с молекулярными массами 13 кДа и 8-9 кДа (рис. 9).

Таким образом, *S. platensis* обладает способностью синтезировать специфические индуцируемые белки, связывающие тяжелые металлы, что способствует повышению устойчивости клетки к стрессовому воздействию ТМ.

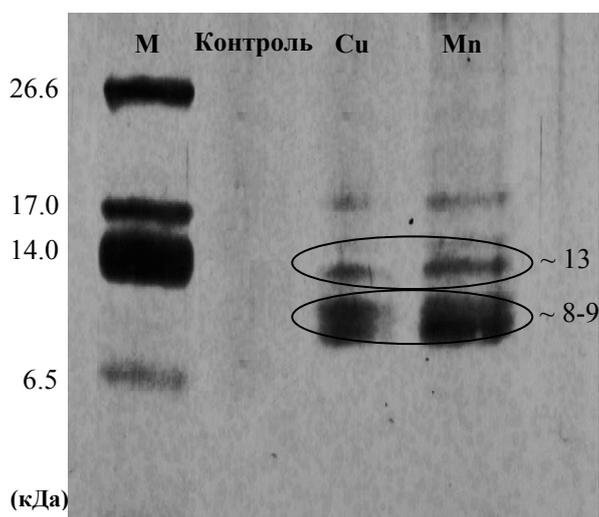


Рис. 9. Электрофоретическое разделение Cu- и Mn-содержащих белков *S. platensis*.
М – маркеры молекулярной массы.

Влияние меди и марганца на ультраструктуру клетки. Анализ влияния повышенных концентраций меди на ультраструктуру *S. platensis* показал, что в присутствии Cu ламеллы утрачивают параллельную ориентацию и закручиваются. Под действием Cu увеличивалось количество запасующих продуктов: появляются цианофициновые и полифосфатные гранулы, повышается количество карбоксисом (рис. 10Б).

При выращивании клеток *S. platensis* в присутствии марганца ультраструктура клеток также менялась (рис. 10В). Отмечалось существенное увеличение расстояния между ламеллами. В промежутках между тилакоидами накапливалось значительное количество углеводов. В то же время, при инкубировании клеток *S. platensis* в

темноте в присутствии эквивалентной концентрации марганца ультраструктура клеток не подвергалась существенным изменениям по сравнению со световыми условиями (рис. 10Г). В клетках обнаруживалось увеличение количества цианофициновых и α -гликановых гранул, что может быть обусловлено действием темноты.

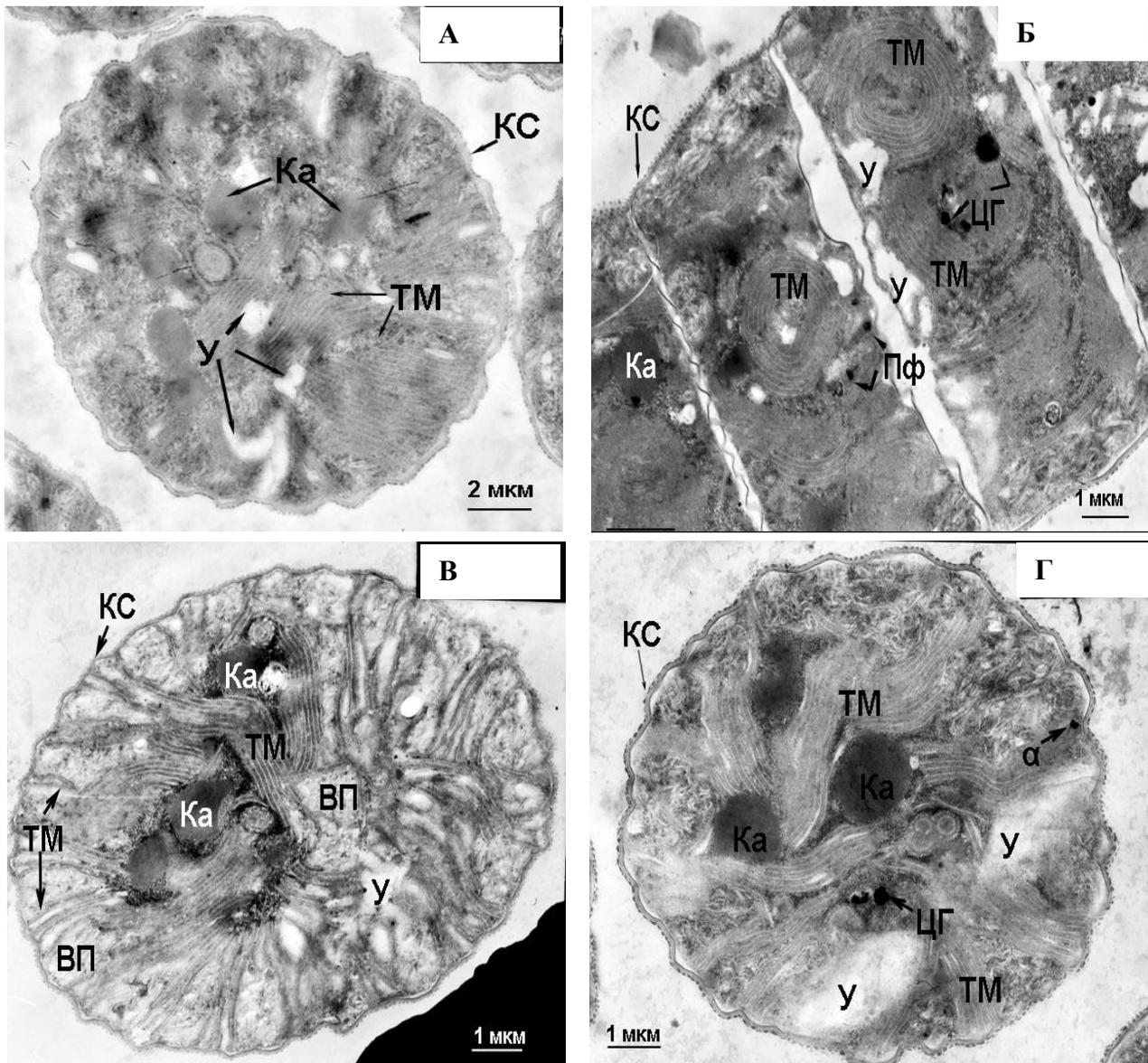


Рис. 10. Влияние меди и марганца на изменение ультраструктуры клеток *S. platensis*.

Цианобактерию выращивали на стандартной среде Заркука (А), при добавлении 0.06 мМ меди (Б), 2.5 мМ марганца (В). Г – клетки инкубировали в присутствии 2.5 мМ марганца в темноте.

ВП – внутритилакоидное пространство, Ка – карбоксисома, КС – клеточная стенка, Пф – полифосфатные гранулы, ТМ – тилакоидные мембраны, У – углеводы, ЦГ – цианофициновые гранулы, α – гликоген.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, *Spirulina platensis*, в отличие от большинства фотосинтезирующих микроорганизмов, проявляет высокую толерантность к меди и марганцу. Согласно предложенной Baker (1981) классификации растений и микроорганизмов по степени накопления ТМ *S. platensis* можно отнести к гипераккумуляторам меди. Клетки способны накапливать около 1 мг/г сухой массы Cu, что является пороговой величиной накопления меди клетками-гипераккумуляторами. По способности *S. platensis* накапливать марганец (1,6 мг/г сух. массы) культуру можно отнести к аккумуляторам. Пороговое значение концентрации марганца в клетках водорослей-гипераккумуляторов значительно выше и составляет около 10 мг/г сух. массы (Baldisserotto et al, 2007).

Механизмы детоксикации токсического действия меди и марганца в клетках *S. platensis* связаны с сорбцией ТМ на клеточной поверхности, ограничением их поступления в клетку, индукцией синтеза металлсвязывающих белков и, возможно, компартментацией ТМ в полифосфатные гранулы и липиды тилакоидных мембран. При адаптации к высоким концентрациям меди клетки *S. platensis* могут восстанавливать Cu (II) до Cu (I) с последующим экспортом в среду культивирования в недоступных для клетки соединениях восстановленной меди. Способность *S. platensis* к выносу меди является условием выживания клеток в присутствии этого ТМ.

Проведенные комплексные исследования позволяют определить оптимальные концентрации меди и марганца для внесения в среду культивирования, которые не вызывают ингибирования роста культуры, изменений биохимического состава биомассы и ультраструктуры клеток для оптимизации внутриклеточного накопления этих элементов и получения биомассы, обогащенной медью и марганцем.

ВЫВОДЫ

1. *S. platensis* устойчива к действию высоких концентраций меди и марганца. Культура сохраняет способность к росту при концентрациях меди до 0.06 мМ, марганца до 5 мМ.
2. Содержание внутриклеточной меди находится в прямой зависимости от концентрации металла в среде, что, очевидно, говорит о неспособности клеток *S. platensis* лимитировать накопление Cu вплоть до летальных величин.
3. В присутствии неингибирующих рост концентраций меди (до 0.06 мМ) максимальное накопление Cu клетками *S. platensis* наблюдается уже в первый час, с последующим выносом металла из клетки. Способность *S. platensis* к выносу меди является условием выживания клеток в присутствии этого ТМ.
4. *S. platensis* восстанавливает Cu^{2+} до Cu^+ , с последующим экспортом в среду в недоступной для клеток форме, что ограничивает поступление металла в клетку и снижает его токсическое действие.
5. Накопление марганца происходит пропорционально времени культивирования и увеличению его концентрации в среде с выходом на насыщение при 2.5 мМ. Пороговой внутриклеточной концентрацией Mn следует считать 30 ± 3 мкмоль/г сухой массы.
6. Накопление Mn и Cu зависит от освещения. В отличие от марганца, медь не накапливается клетками *S. platensis* в темноте.
7. Показано, что медь и марганец преимущественно включаются в белковую фракцию. Хроматографический анализ белков с последующим электрофоретическим разделением показал, что металлы обнаруживаются в полипептидах с молекулярной массой около 13 и 8-9 кДа.
8. Способность *S. platensis* сорбировать металлы на клеточной поверхности, восстанавливать металлы и переводить их в нетоксичную форму, хелатировать с помощью металлсвязывающих белков обеспечивает устойчивость цианобактерии к тяжелым металлам.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Nalimova A.A. (Chernikova A.A.)**, Popova V.V., Pronina N.A. Enrichment of *Spirulina platensis* cells with Cu and Zn.// Molecular genetics and biotechnology: Abstr. Intern. Symp. Moscow. 2001.
2. Попова В.В., **Налимова А.А. (Черникова А.А.)**, Пронина Н.А. Накопление эссенциальных микроэлементов клетками *Spirulina platensis*.// Тез. Докл. 5-го съезда ВОФР. Пенза. 2003. С.321.
3. **Nalimova A.A. (Chernikova A.A.)**, Pronina N.A. The effect of light on the accumulation of Cu and Mn in *Spirulina cells*.// Biotechnology of Microalgae: Abstr. 5th European Workshop. Germany. 2003.
4. **Налимова А.А. (Черникова А.А.)**, Попова В.В., Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Влияние меди и цинка на рост и аккумуляция клетками *Spirulina platensis* тяжелых металлов.// Физиология растений. 2005. Т.52. №2. С.259-265.
5. Попова В.В., **Черникова А.А.**, Бедбенов В.С., Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Способ получения биомассы спирулины (*Spirulina platensis*). Патент РФ № 2277124. 2006.
6. **Черникова А.А.**, Цоглин Л.Н., Маркелова А.Г., Зорин С.Н., Мазо В.К., Пронина Н.А.. Способность *Spirulina platensis* к накоплению марганца и его распределение в клетке.// Физиология растений. 2006. Т.53. №6. С.903-909.
7. **Черникова А.А.**, Пронина Н.А. Способность *S. platensis* к накоплению марганца и его распределение в клетке.// Тезисы 6-го съезда ВОФР. Сыктывкар. 2007. часть 2. С. 419.
8. **Черникова А.А.**, Пронина Н.А., Маркелова А.Г. Влияние меди и марганца на ультраструктурную организацию клетки *S. platensis*. // Тезисы Всероссийская науч. конф. «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах». Москва. 2009.