

# Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 73 • № 3 • 2018 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзор

- Духинова М.С., Пономарёв Е.Д. Роль тромбоцитов в нейровоспалительных заболеваниях. Обзор . . . . . 125
- Лысак Л.В., Максимова И.А., Никитин Д.А., Иванова А.Е., Кудинова А.Г., Соина В.С., Марфенина О.Е. Микробные сообщества почв российских полярных станций Восточной Антарктиды . . . . . 132

### Биофизика

- Давлетшина Л.Н., Семин Б.К. Кинетика индукции флуоресценции в мембранных препаратах фотосистемы 2 с гетерогенными кластерами металлов (Mn/Fe) в кислород-выделяющем комплексе . . . . . 141
- Кузнецов А.Г., Погосян С.И., Конюхов И.В., Васильева С.Г., Лукьянов А.А., Зотов В.С., Недбал Л., Соловченко А.Е. Возможности оптического мониторинга фосфорного голодания в суспензионных культурах микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) . . . . . 146

### Геронтология

- Моргунова Г.В., Клебанов А.А. Ухудшение жизнеспособности трансформированных клеток китайского хомячка в непереживаемой культуре под влиянием экзогенного окисленного гуанозида проявляется только в стационарной фазе роста . . . . . 153

### Гидробиология

- Ильяш Л.В., Белевич Т.А., Дриц А.В. Пространственное распределение пикофитопланктона в Белом море в начале лета . . . . . 160

### Зоология

- Кузьмина Т.В., Темерева Е.Н. Особенности работы плектолофного лобофора брахиоподы *Coptothyris grayi* (Terebratulida, Rhynchonelliformea) . . . . . 166

### Методы

- Чертков О.В., Карлова М.Г., Герасимова Н.С., Соколова О.С. Очистка элонгационных комплексов РНК-полимеразы для изучения методом криоэлектронной микроскопии . . . . . 173

### Микробиология

- Булаев А.Г., Ерофеева Т.В., Воробьева К.С., Челидзе Г.Г., Рамонова А.А. Влияние органических субстратов на активность архей семейства Ferrogplasmaceae . . . . . 178
- Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Применение штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG для очистки промышленных сточных вод . . . . . 185

**Молекулярная биология**

- Феофанов А.В., Андреева Т.В., Студитский В.М., Кирпичников М.П. Обратимость индуцированных ионной силой структурных перестроек в мононуклеосомах . . . . . 191

**Физиология растений**

- Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Штонда Н.И., Халмурзаева А.И., Рахматуллина Н.Ш. Экологическая пластичность фотосинтетического аппарата *Hibiscus syriacus* L. в условиях высокой температуры, инсоляции и загрязнения. . . . . 197
- Ахиярова Г.Р., Коробова А.В., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р., Веселов Д.С. Влияние удаления корней на содержание цитокининов в клетках апекса побега арабидопсиса . . . . . 208

**Экология**

- Попов С.Ю. О распространении *Pleurozium schreberi* (Bryophyta, Nylocomiaceae) на территории Восточно-Европейской равнины и Восточной Фенноскандии . . 215

## CONTENTS

**Review**

- Dukhinova M.S., Ponomarev E.D. Role of platelets in neuroinflammatory disorders. A review . . . . . 125
- Lysak L.V., Maksimova I.A., Nikitin D.A., Ivanova A.E., Kudina A.G., Soina V.S., Marfenina O.E. Microbial communities of soils of East Antarctica . . . . . 132

**Biophysics**

- Davletshina L.N., Semin B.K. Fluorescence induction kinetics in the membrane preparation of photosystem II with heterogeneous metal clusters (Mn/Fe) in the oxygen-evolving complex . . . . . 141
- Kuznetsov A.G., Pogosyan S.I., Konyukhov I.V., Vasilieva S.G., Lukyanov A.A., Zotov V.S., Nedbal L., Solovchenko A.E. Possibilities of optical monitoring of phosphorus starvation in suspensions of the microalga *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) . . . . . 146

**Gerontology**

- Morgunova G.V., Klebanov A.A. Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth . . . . . 153

**Hydrobiology**

- Ilyash L.V., Belevich T.A., Drits A.V. Spatial distribution of The White Sea picophytoplankton in the beginning of the summer . . . . . 160

**Zoology**

- Kuzmina T.V., Temereva E.N. Rejection mechanism of plectolophous lophophore of brachiopod *Coptothyris grayi* (Terebratulida, Rhynchonelliformea) . . . . . 166

**Methods**

- Chertkov O.V., Karlova M.G., Gerasimova N.S., Sokolova O.S. Purification of RNA-polymerase elongation complexes for cryo-electron microscopy investigation . . . . . 173

**Microbiology**

- Bulaev A.G., Erofeeva T.V., Vorobeva K.S., Chelidze G.G., Ramonova A.A. Effect of organic nutrients on the activity of archaea of the Ferropasmaceae family. . . . . 178
- Korobov V.V., Zhurenko E.Yu., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Application of phenol-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* 21SG for treatment of industrial wastewater. . . . . 185

**Molecular Biology**

- Feofanov A.V., Andreeva T.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Reversibility of structural rearrangements in mononucleosomes induced by ionic strength . . . . . 191

**Plant Physiology**

- Akinshina N.G., Azizov A.A., Shtonda N.I., Khalmurzayeva A.I., Rakhmatullina N.Sh. Ecological plasticity of the photosynthetic apparatus of *Hibiscus syriacus* L. under pressure of high temperature, insolation and air pollution . . . . . 197

- Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R.,  
Veselov D.S. Effects of root cutting on cytokinin content in the cells of shoot apix of  
Arabidopsis plants. . . . . 208

*Ecology*

- Попов S.Yu. On the distribution of *Pleurozium schreberi* (Bryophyta, Hylocomiaceae)  
on the East European plain and Eastern Fennoscandia . . . . . 215

## ОБЗОР

УДК 616-002

РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В НЕЙРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ.  
ОБЗОР

М.С. Духинова\*, Е.Д. Пономарёв

*School of Biomedical Sciences, The Chinese University of Hong Kong; Lo Kwee-Seong Integrated Biomedical Sciences building, Area 39, CUHK, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, China*  
\*e-mail: marina\_dukhinova@mail.ru

Тромбоциты участвуют в процессах воспаления и заживления ран, локально стимулируя активацию иммунного ответа и регенерацию в организме. Ряд воспалительных заболеваний центральной нервной системы, таких как травмы головного мозга, болезнь Альцгеймера и инсульт, характеризуются нарушением проницаемости гемато-энцефалического барьера, при котором клетки крови, в том числе тромбоциты, проникают в нервную ткань. Однако роль тромбоцитов в контексте нейровоспаления остается малоизученной. Недавние исследования показывают, что при патологиях центральной нервной системы активированные тромбоциты выделяют широкий спектр коагуляционных и сосудистых факторов и участвуют в развитии нейрососудистых заболеваний. Кроме того, тромбоциты стимулируют иммунный ответ и регулируют воспаление в центральной нервной системе. Трофические и ростовые факторы, содержащиеся в тромбоцитах, регулируют регенерацию нервной ткани. При активации тромбоциты выделяют нейротрансмиттеры, серотонин, допамин, гистамин и глутамат и могут влиять на работу нейронов при патологиях нервной системы. В обзоре описываются основные аспекты и механизмы участия тромбоцитов в нейровоспалении, а также терапевтическая значимость тромбоцитов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

**Ключевые слова:** *тромбоциты, нейровоспаление, нейрососудистые заболевания, травмы головного мозга, инсульт, болезнь Альцгеймера*

Центральная нервная система (ЦНС) в организме взрослых млекопитающих отделена от кровяного русла гемато-энцефалическим барьером (ГЭБ). Образованный эндотелиальными клетками и их базальной мембраной, перicyтами и околососудистыми астроцитами, ГЭБ изолирует ЦНС от нейротоксичных агентов, в частности, ионов железа, металлопротеаз, свободных радикалов и патогенов, и регулирует транспортный обмен между ЦНС и остальным организмом.

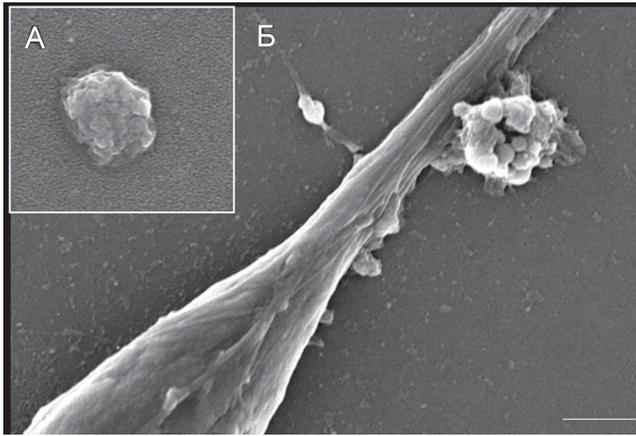
Нарушение структуры ГЭБ является характерной чертой различных воспалительных заболеваний ЦНС (травматических повреждений, инсульта, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, инфекций), во время которых в нервную ткань проникают периферические кровяные и иммунные клетки: макрофаги, Т- и В-лимфоциты, нейтрофилы и тромбоциты. Макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы вместе с резидентными иммунными клетками ЦНС, микроглией, являются основными участниками нейровоспаления. Тромбоциты регулируют гомеостаз крови и тромбообразование, воспаление и заживление ран, в то время как их роль при заболеваниях ЦНС остается менее изученной.

Тромбоциты млекопитающих являются безъядерными кровяными клетками миелодного происхождения и образуются из предшественников, мегакариоцитов, путем фрагментации. Неактивированные тромбоциты представляют собой округлые клетки

размером 2–3 мкм, циркулирующие в сосудистом русле (рис. 1А). Тромбоциты содержат гранулы трех типов: плотные гранулы,  $\alpha$ -гранулы и лизосомы [1, 2] (таблица). Содержимое этих гранул секретруется при активации тромбоцитов под действием определенных стимулов и обеспечивает основные функции тромбоцитов, связанные с поддержанием кровяного гомеостаза, тромбообразования, а также регуляцией процессов воспаления и заживления ран [3]. Под действием сильных активационных стимулов тромбоциты распадаются на микрочастицы, также содержащие различные факторы (рис. 1Б). Тромбоцитарные микрочастицы играют важную роль в межклеточном взаимодействии и коммуникации тромбоцитов с различными типами клеток, в частности, при воспалении [4]. С помощью всех этих механизмов тромбоциты первыми отвечают на изменения в гомеостазе крови или сосудистые повреждения [5].

### Тромбоциты и мозговое кровообращение

Тромбоциты играют важную роль в поддержании гемостаза крови и тромбообразовании при различных повреждениях сосудов. Тромбоцитарные гранулы содержат ряд важнейших факторов свертывания крови: факторы V, XI, XIII, фибриноген, фибронектин, протромбин, фактор фон Виллебранда (таблица). Тромбоциты являются структурной основой тромбов и регулируют их архитектуру,



**Рис. 1.** Сканирующая электронная микрофотография тромбоцитов. А – покоящийся тромбоцит, Б – активированный тромбоцит, взаимодействующий с нейрональным отростком и распадающийся на микрочастицы. Шкала – 1 мкм (неопубликованные результаты)

контролируя укладку фибрина [6]. Хемокин CXCL7 (Chemokine (C-X-C motif) ligand), выделяемый тромбоцитами, привлекает предшественники эндотелиальных клеток и способствует восстановлению эндотелия и целостности сосудов при повреждении [7]. Адгезия тромбоцитов к активированному эндотелию провоцирует образование атеросклеротических бляшек [8].

Роль тромбоцитов в тромбообразовании и свертывании крови имеет непосредственное отношение к травматическому повреждению и инсульту в ЦНС.

С одной стороны, активированные тромбоциты ограничивают кровотечение в ЦНС [9]. Так, у пациентов с низким уровнем активации тромбоцитов после внутримозгового кровотечения также наблюдалось сильное кровоизлияние в желудочках головного мозга [10]. В экспериментальной модели инсульта у крыс местное применение обогащенной тромбоцитами плазмы сокращало зону ишемического повреждения головного мозга [11]. С другой стороны, активированные тромбоциты формируют агрегаты и могут способствовать блокаде микрососудистого русла и ишемическому повреждению нейронов [12]. Кроме того, прокоагулянтная активность тромбоцитарных микрочастиц, системно возрастающая после травмы головного мозга, может стать причиной посттравматического тромбоза и способствовать развитию атеросклероза сосудов головного мозга [13, 14]. Известно, что антитромбоцитарная терапия (например, применение аспирина), широко применяемая для лечения последствий инсульта, препятствует повышенному тромбообразованию, но повышает риск кровотечений. При более направленном ингибировании гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов Ib и VI у мышей удалось снизить тромбообразование после инсульта, избежав при этом усиления кровоизлияния [15]. Представляется перспективным продолжать исследования по модуляции работы тромбоцитов при травмах и инсультах, чтобы расширить применение тромбоцитов при лечении.

Таблица

**Разнообразие тромбоцитарных факторов и функций тромбоцитов**

Функциональная роль	Альфа-гранулы	Плотные гранулы
Гомеостаз крови Свертывание крови Тромбообразование	Альбумин Факторы V, XI, XIII [6] Фибриноген [6] Фибронектин [70] Протромбин [71] Фактор фон Виллебранда [71]	АТФ [1] АДФ [1] Полифосфат [72] Ca <sup>2+</sup> [1] Серотонин [73]
Воспаление	CD31 Цитокины [71] Интерлейкин-1 $\alpha$ , $\beta$ [71] Фактор активации тромбоцитов (PAF) [74] Фактор тромбоцитов-4 (PF4) и др. хемокины (CCL2,4 CXCL7, 8) [7] P-селектин [71] Регулятор активации нормальной T-клеточной экспрессии и секреции (Regulated upon activation normal T expressed and secreted – RANTES) [20]	Серотонин [46] Гистамин [75] P-селектин [1]
Заживление ран Сосудообразование	Эндотелиальный фактор роста (EFG) Фактор роста фибробластов (FGF) Инсулиноподобный фактор роста (IGF) Трансформирующий ростовой фактор $\beta$ Сосудистый эндотелиальный фактор роста Ангиопоэтины [76]	P-селектин
Регенерация в ЦНС	Нейротрофический фактор мозга (BDNF) [62] Фактор роста фибробластов (FGF) Фактор роста нервов (NGF) [63] Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) Трансформирующий ростовой фактор $\beta$ (TGF $\beta$ )	АТФ Допамин Гистамин Серотонин
Нейродегенерация	Белок-предшественник $\beta$ -амилоида [54]	Глутамат [77]

### Тромбоциты и нейровоспаление

Тромбоциты активно участвуют не только в регуляции гемостаза и свертывания крови, но и в воспалительных и иммунных процессах в организме. Субэндотелиальный матрикс и провоспалительные факторы, секретируемые лимфоцитами, а также поврежденный эндотелий активируют тромбоциты при воспалении [16]. Тромбоциты могут быть отнесены к системе врожденного иммунитета, поскольку они: а) способны узнавать патогены с помощью различных рецепторов (толл-подобных, CD14 и Fc), б) секретируют антимикробные молекулы (PF4, RANTES), в) привлекают другие иммунные клетки (нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты) к очагу воспаления, г) являются антигенпредставляющими клетками [17–22].

Основными участниками нейровоспаления являются микроглия (тканевые макрофаги ЦНС) и астроциты, а также ряд периферических кровяных и иммунных клеток (тромбоциты, макрофаги, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты) [23, 24]. Воспаление в ЦНС имеет как отрицательные, так и положительные последствия. Иммунные клетки выделяют ряд нейротоксических факторов – активные формы кислорода, металлопротеазы, интерлейкин-1 $\beta$ , NO, фактор некроза опухолей- $\alpha$  – и могут вызывать вторичное повреждение и гибель нейронов [25]. В некоторых случаях иммунная система приобретает аутореактивность против компонентов ЦНС, например, миелина, что ведет к развитию аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз [26, 27]. С другой стороны, активация иммунных клеток в ЦНС необходима для удаления патогенов, остатков мертвых клеток и клеточного дебриса, а также запуска процессов репарации при повреждении [28, 29].

Роль тромбоцитов в нейровоспалении остается не до конца изученной. Как и на периферии, тромбоциты, активирующиеся на ранних стадиях повреждения ЦНС, являются важными регуляторами дальнейшего развития иммунного ответа. Тромбоциты содержат в своих гранулах и избирательно выделяют при активации про- и противовоспалительные факторы [30–32]. Показано, что цитокин CD40L, секретируемый тромбоцитами, активирует микроглию и астроглию в модели гипертензии [33]. Также тромбоциты привлекают периферические иммунные клетки в очаги воспаления ЦНС. В частности, важную роль при инфильтрации нейтрофилов, макрофагов и Т-клеток в паренхиму мозга играют тромбоцитарные рецепторы GPIb  $\alpha$  и  $\beta$  [34, 35]. Тромбоцитарные микрочастицы участвуют и в регуляции макрофагов, стимулируя их альтернативную (M2) поляризацию с нейрозащитным фенотипом [36]. Активация Т-лимфоцитов при рассеянном склерозе происходит под действием серотонина, тромбоцитарного фактора 4 и фактора активации тромбоцитов, также секретируемых тромбоцитами и являющимися терапевтическими мишенями при

борьбе с нейровоспалением [37, 38]. Одним из механизмов действия Копаксона<sup>(C)</sup> (Cорaxone<sup>(C)</sup>), успешно применяемого для лечения рассеянного склероза, является подавление активации тромбоцитов [39]. В модели рассеянного склероза, экспериментальном аутоиммунном энцефалите, у мышей наблюдается сниженная воспалительная реакция при ингибировании активации тромбоцитов [40]. Интересно отметить, что тромбоциты способны регулировать функции иммунных клеток не только путем секреции про- и противовоспалительных факторов, но и с помощью непосредственного взаимодействия. Так, комплексы тромбоцит-моноцит обладают большей адгезией к микрососудистому эндотелию мозга и более эффективно пересекают ГЭБ, чем независимые моноциты [41]. При ишемическом инсульте тромбоциты также взаимодействуют с лейкоцитами через тромбоцитарный P-селектин и его лиганд, PSGL-1, экспрессируемый на лейкоцитах. Таким образом тромбоциты стимулируют экспрессию провоспалительных генов в лимфоцитах [42]. Фактор активации тромбоцитов дополнительно способствует проникновению периферических иммунных клеток в ЦНС, повышая проницаемость ГЭБ [43]. Таким образом, тромбоциты необходимы для инициации и регуляции воспаления в ЦНС.

### Тромбоциты и патологии ЦНС

У тромбоцитов и нейронов есть ряд общих функциональных особенностей, что позволяет использовать тромбоциты в диагностических целях и как модели для исследования патологий ЦНС [44]. Тромбоцитарные гранулы содержат ряд нейротрансмиттеров:  $\gamma$ -аминомасляная кислота, серотонин, глутамин, гистамин, допамин. Тромбоциты экспрессируют транспортеры к некоторым нейротрансмиттерам:  $\gamma$ -аминомасляной кислоте, серотонину, глутамину, допамину и таурину [45–47]. Молекулярные механизмы секреции гранул и системы “нейротрансмиттер–транспортер” в тромбоцитах сходны с синаптической секрецией и выделением нейротрансмиттеров в нейронах [48]. Известны примеры заболеваний (синдром Бернара-Сулье, биполярное расстройство), при которых нарушения в развитии головного мозга, умственная отсталость и психиатрические отклонения наблюдаются наряду с дефектами тромбоцитарной секреции и усиленными кровотечениями [49, 50]. Экспрессия серотонинового транспортера снижается у пациентов после эпилептических припадков [51]. У людей с расстройствами аутистического спектра повышено содержание тромбоцитов и серотонина в крови, при этом секреторная активность плотных гранул, напротив, снижена [52]. Снижение концентрации нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови, наблюдающееся при депрессии, также в значительной степени связано с активностью мегакариоцитов и тромбоцитов [53].

Тромбоциты попадают в центр внимания и при болезни Альцгеймера. Они являются основным источником белка-предшественника амилоида вне ЦНС. Тромбоциты могут синтезировать амилоид, однако в норме  $\gamma$ -секретаза и амилоидогенный путь в них практически не функционируют [54]. У больных Альцгеймером наблюдается усиленное накопление белка-предшественника  $\beta$ -амилоида, повышение активности  $\gamma$ -секретазы и образование амилоида [55]. Таким образом, тромбоциты могут быть использованы для дополнительной диагностики и изучения болезни Альцгеймера. Предшественник  $\beta$ -амилоида из тромбоцитов может также попадать в ЦНС при нарушении ГЭБ или участвовать в формировании околососудистых отложений [56–58].

Важно помнить, что при любых повреждениях ГЭБ, наблюдающихся при травме, инсульте и нейродегенеративных заболеваниях, тромбоциты обнаруживаются не только в сосудах, но и в тканях ЦНС, куда попадают вместе с другими клетками крови [12, 58, 59]. Таким образом, тромбоциты и секретируемые ими факторы могут проникать в паренхиму ЦНС и оказывать непосредственное влияние на нейроны, в том числе на их электрическую активность, однако этот вопрос остается малоизученным. Одним из возможных механизмов

является взаимодействие тромбоцитарных рецепторов сиглеков и П-селектина с сильнейшими агонистами тромбоцитов, мозгоспецифичными ганглиозидами, которые содержатся в нейрональных липидных рафтах [40, 60, 61].

### Тромбоциты и регенерация в ЦНС

Тромбоциты содержат ряд факторов, которые играют важную роль в заживлении ран и регенерации. Например, фактор роста нервов и нейротрофический фактор мозга являются важнейшими нейротрофинами (таблица) [62]. Все это свидетельствует о возможной роли тромбоцитов в регенерации ЦНС и подтверждается рядом исследований. Выделяемые тромбоцитами тромбоцитарный фактор роста (англ., platelet-derived growth factor, PDGF) и фактор роста нервов (англ., nerve growth factor, NGF) поддерживают выживание нейронов в первичных и органотипических культурах *in vitro* [63]. Известно, что PDGF защищает нейроны от нейротоксического действия вируса иммунодефицита [64, 65].

Обогащенная тромбоцитами плазма улучшает моторные функции у крыс после инсульта [11]. Лизат тромбоцитов также обладает нейрозащитными свойствами в моделях инсульта, болезни Пар-

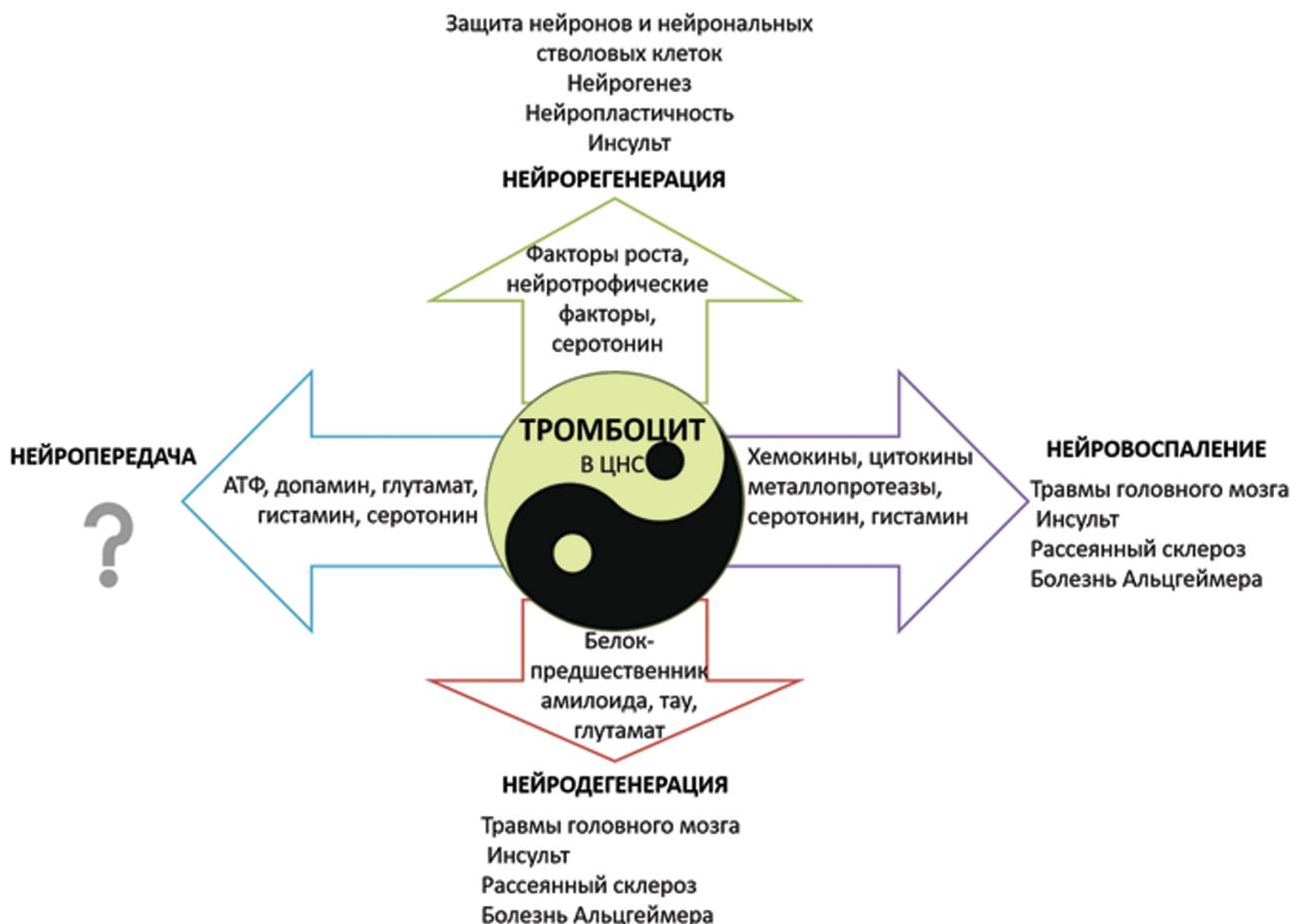


Рис. 2. Разнообразная роль тромбоцитов и секретируемых ими факторов в воспалении, дегенерации, регенерации и функциональной активности в центральной нервной системе. АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

кинсона и бокового амиотрофического склероза [66, 67]. Накапливаясь в очагах демиелинизации в ЦНС, тромбоциты способствуют выживанию нейрональных стволовых клеток [68]. Тромбоциты также предотвращают гибель нейронов после травмы головного мозга [69].

В заключение нужно отметить, что тромбоциты участвуют в важнейших процессах при нейрово-

спалительных заболеваниях, включая повреждения сосудистого русла, иммунный ответ, регенерацию и нейрональную активность в ЦНС (рис. 2). Кроме того, эти клетки являются периферическим источником амилоида и играют важную роль при болезни Альцгеймера. Необходимы более детальные исследования механизмов функционирования тромбоцитов и их роли при патологиях ЦНС.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McNicol A., Israels S.* Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis // *Thromb. Res.* 1999. Vol. 95. N 1. P. 1–8.
2. *Harrison P., Cramer E.* Platelet  $\alpha$ -granules // *Blood Rev.* 1993. Vol. 7. N 1. P. 52–62.
3. *Reed G., Fitzgerald M.L., Polgar J.* Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes // *Blood.* 2000. Vol. 96. N 10. P. 3334–3342.
4. *Varon D., Shai E.* Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses // *J. Thromb. Haemost.* 2015. Vol. 13. N S1. P. S40–S46.
5. *Rondina M., Weyrich A., Zimmerman G.* Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases // *Circ. Res.* 2013. Vol. 112. N 11. P. 1506–1519.
6. *Swieringa F., Baaten C., Verdoold R., Mastenbroek T., Rijnveld N., van der Laan K., Brel E., Collins P., Lancé M., Henskens Y., Cosemans J., Heemskerk J., van der Meijden P.* Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016. Vol. 36. N 4. P. 692–699.
7. *Gleissner C., von Hundelshausen P., Ley K.* Platelet chemokines in vascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. Vol. 28. N 11. P. 1920–1927.
8. *Massberg S., Brand K., Grüner S., Page S., Müller E., Müller I., Bergmeier W., Richter T., Lorenz M., Konrad I., Nieswandt B., Gawaz M.* A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 196. N 7. P. 887–896.
9. *Martínez C., Smith P., Palma-Alvarado V.* The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update // *Front. Physiol.* 2015. DOI: 10.3389/fphys.2015.00290.
10. *Naidech A., Bendok B., Garg R., Bernstein R., Alberts M., Bleck T., Batjer H.* Reduced platelet activity is associated with more intraventricular hemorrhage // *Neurosurgery.* 2009. Vol. 65. N 4. P. 684–688.
11. *Zhang Y., Ying G., Ren C., Jizhang Y., Brogan D., Liu Z., Li S., Ding Y., Borlongan C., Zhang J., Ji X.* Administration of human platelet-rich plasma reduces infarction volume and improves motor function in adult rats with focal ischemic stroke // *Brain Res.* 2015. Vol. 1594. P. 267–273.
12. *Sehba F., Mostafa G., Friedrich V.J., Bederson J.* Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage // *J. Neurosurg.* 2005. Vol. 102. N 6. P. 1094–1100.
13. *Midura E., Jernigan P., Kuethe J., Friend L., Veile R., Makley A., Caldwell C., Goodman M.* Microparticles impact coagulation after traumatic brain injury // *J. Surg. Res.* 2015. Vol. 197. N 1. P. 25–31.
14. *Lukasik M., Rozalski M., Luzak B., Michalak S., Kozubski W., Watala C.* Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke // *Thromb. Haemost.* 2010. Vol. 104. N 3. P. 644–650.
15. *Kraft P., Schuhmann M., Fluri F., Lorenz K., Zernecke A., Stoll G., Nieswandt B., Kleinschnitz C.* Efficacy and safety of platelet glycoprotein receptor blockade in aged and comorbid mice with acute experimental stroke // *Stroke.* 2015. Vol. 46. N 12. P. 3502–3506.
16. *May A., Seizer P., Gawaz M.* Platelets: Inflammatory firebugs of vascular walls // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. Vol. 28. N 3. P. S5–S10.
17. *Nguyen K., Hamzeh-Cognasse H., Palle S., Anselme-Bertrand I., Chavarin C.P., Pozzetto B., Garraud O., Cognasse F.* Role of Siglec-7 in apoptosis in human platelets // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. N 19. e106239.
18. *Nording H., Langer H.* Complement links platelets to innate immunity // *Semin. Immunol.* 2018. Vol. 37. P. 43–52.
19. *Li C., Li J., Li Y., Lang S., Youghbare S., Zhu G., Chen P., Ni H.* Crosstalk between platelets and the immune system: Old systems with new discoveries // *Adv. Hematol.* 2012. Vol. 2012. Article ID 384685.
20. *Li Z., Yang F., Dunn S., Gross A., Smyth S.* Platelets as immune mediators: Their role in host defense responses and sepsis // *Thromb. Res.* 2011. Vol. 127. N 3. P. 184–188.
21. *Wang Z., Zhao O., Zhang D., Sun C., Bao C., Yi M., Xing L., Luo D.* Essential roles for platelets during neutrophil-dependent or lymphocyte-mediated defense against bacterial pathogens // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2016. Vol. 27. N 6. P. 667–672.
22. *Chapman L., Aggrey A., Field D., Srivastava K., Ture S., Yui K., Topham D., Baldwin III W., Morrell C.* Platelets present antigen in the context of MHC class I // *J. Immunol.* 2012. Vol. 189. N 2. P. 916–923.
23. *Tian L., Ma L., Kaarela T., Li Z.* Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases // *J. Neuroinflammation.* 2012. Vol. 9:155.
24. *O’Sullivan S., O’Sullivan C., Healy L., Dev K., Sheridan G.* Sphingosine 1-phosphate receptors regulate TLR4-induced CXCL5 release from astrocytes and microglia // *J. Neurochem.* 2018. Vol. 144. N 6. P. 736–747.
25. *Skaper S., Facci L., Zusso M., Giusti P.* Neuroinflammation, mast cells, and glia: dangerous liaisons // *Neuroscientist.* 2017. Vol. 23. N 5. P. 478–498.
26. *Amor S., Puentes F., Baker D., van der Valk P.* Inflammation in neurodegenerative diseases // *Immunology.* 2010. Vol. 129. N 2. P. 154–169.
27. *Veremeyko T., Yung A., Dukhinova M., Kuznetsova I., Pomytkin I., Lyundup A., Strelakova T., Barteneva N., Ponomarev E.* Cyclic AMP pathway suppress autoimmune Neuroinflammation by inhibiting functions of encephalitogenic CD4 T cells and enhancing M2 macrophage polarization at the site of inflammation // *Front. Immunol.* 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00050.
28. *Mracsko E., Javidí E., Na S.Y., Kahn A., Liesz A., Veltkamp R.* Leukocyte invasion of the brain after experimental intracerebral hemorrhage in mice // *Stroke.* 2014. Vol. 45. N 7. P. 2107–2114.
29. *Almolda B., González B., Castellano B.* Are microglial cells the regulators of lymphocyte responses in the CNS? // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. Vol. 9:440.

30. *Frelinger A., Torres A., Caijafa A., Morton C., Berny-Lang M., Gerrits A., Carmichael S., Neculaes V., Michelson A.* Platelet-rich plasma stimulated by pulse electric fields: Platelet activation. Procoagulant markers, growth factor release and cell proliferation // *Platelets*. 2016. Vol. 27. N 2. P. 128–135.
31. *Jonnalagadda D., Izu L., Whiteheart S.* Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner // *Blood*. 2012. Vol. 120. N 26. P. 5209–5216.
32. *Dinkla S., van Cranenbroek B., van der Heijden W., He X., Wallbrecher R., Dumitriu IE., Koenen H., Joosten I.* Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin // *Blood*. 2016. Vol. 127. N 16. P. 1976–1986.
33. *Bhat S., Goel R., Shukla R., Hanif K.* Platelet CD40L induces activation of astrocytes and microglia in hypertension // *Brain Behav. Immun.* 2017. Vol. 59. P. 173–189.
34. *Giles J., Greenhalgh A., Denes A., Nieswandt B., Coutts G., McColl B., Allan S.* Neutrophil infiltration to the brain is platelet-dependent, and is reversed by blockade of platelet GPIIb // *Immunology*. 2018. Vol. 154. N 2. P. 322–328.
35. *Schuhmann M., Guthmann J., Stoll G., Nieswandt B., Kraft P., Kleinschnitz C.* Blocking of platelet glycoprotein receptor Ib reduces “thrombo-inflammation” in mice with acute ischemic stroke // *J. Neuroinflammation*. 2017. Vol. 14:18.
36. *Vasina E., Cauwenberghs S., Feijge M., Heemskerk J., Weber C., Koenen R.* Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation // *Cell Death Dis.* 2011. Vol. 2. N 9. e210.
37. *Starossom S., Veremeyko T., Yung Y., Dukhinova M., Au C., Lau A., Weiner H., Ponomarev E.* Platelets Play Differential role during the initiation and progression of autoimmune neuroinflammation // *Circ. Res.* 2015. Vol. 117. N 9. P. 779–792.
38. *Sheremata W., Jy W., Horstman L., Ahn Y., Alexander J., Minagar A.* Evidence of platelet activation in multiple sclerosis // *J. Neuroinflammation*. 2008. Vol. 5:27.
39. *Starossom S., Veremeyko T., Dukhinova M., Yung A., Ponomarev E.* Glatiramer acetate (copaxone) modulates platelet activation and inhibits thrombin-induced calcium influx: possible role of copaxone in targeting platelets during autoimmune neuroinflammation // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 5. e96256.
40. *Sotnikov I., Veremeyko T., Starossom S., Barteneva N., Weiner H., Ponomarev E.* Platelets recognize brain-specific glycolipid structures, respond to neurovascular damage and promote neuroinflammation // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N 3. e58979.
41. *Singh M., Davidson D., Jackson J., Singh V., Silva J., Ramirez S., Maggirwar S.* Characterization of platelet-monocyte complexes in HIV-1-infected individuals: possible role in HIV-associated neuroinflammation // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192. N 10. P. 4674–4684.
42. *Franks Z., Campbell R., Weyrich A., Rondina M.* Platelet–leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010. Vol. 1207. P. 11–17.
43. *Fang W., Zhang R., Sha L., Lv P., Shang E., Han D., Wei J., Geng X., Yang Q., Li Y.* Platelet activating factor induces transient blood–brain barrier opening to facilitate edaravone penetration into the brain // *J. Neurochem.* 2014. Vol. 128. N 5. P. 662–671.
44. *Barradas M., Mikhailidis D.* The use of platelets as models for neurons: possible applications to the investigation of eating disorders // *Biomed. Pharmacother.* 1993. Vol. 47. N 1. P. 11–18.
45. *Rainesalo S., Keranena T., Saransaari P., Honkanie-mi J.* GABA and glutamate transporters are expressed in human platelets // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005. Vol. 141. N 2. P. 161–165.
46. *Mercado C., Kilic F.* Molecular mechanisms of SERT in platelets: Regulation of plasma serotonin levels // *Mol. Interv.* 2010. Vol. 10. N 4. P. 231–241.
47. *Kaneez F., Saeed S.* Investigating GABA and its function in platelets as compared to neurons // *Platelets*. 2009. Vol. 20. N 5. P. 328–333.
48. *Goubau C., Buyse G., Di Michele M., Van Geet C., Freson K.* Regulated granule trafficking in platelets and neurons: A common molecular machinery // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2013. Vol. 17. N 2. P. 117–125.
49. *Bartsch I., Sandrock K., Lanza F., Nurden P., Hainmann I., Pavlova A., Greinacher A., Tacke U., Barth M., Busse A., Oldenburg J., Bommer M., Strahm B., Superti-Furga A., Zieger B.* Deletion of human GPIIb and SEPT5 is associated with Bernard-Soulier syndrome. Platelet secretion defect. Polymicrogyria, and developmental delay // *Thromb. Haemost.* 2011. Vol. 106. N 3. P. 475–483.
50. *Pandey G., Ren X., Dwivedi Y., Pavuluri M.* Decreased protein kinase C (PKC) in platelets of pediatric bipolar patients: effect of treatment with mood stabilizing drugs // *J. Psychiatr. Res.* 2008. Vol. 42. N 2. P. 106–116.
51. *Cupello A., Favale E., Audenino D., Scarrone S., Gastaldi S., Albano C.* Decrease of serotonin transporters in blood platelets after epileptic seizures // *Neurochem. Res.* 2005. Vol. 30. N 4. P. 425–458.
52. *Bijl N., Thys C., Wittevrongel C., De la Marche W., Devriendt K., Peeters H., Van Geet C., Freson K.* Platelet studies in autism spectrum disorder patients and first-degree relatives // *Mol. Autism*. 2015. Vol. 6:57.
53. *Chacón-Fernández P., Säuberli K., Colzani M., Moreau T., Ghevaert C., Barde Y.* Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. N 19. P. 9872–9881.
54. *Gowert N., Donner L., Chatterjee M., et al.* Blood platelets in the progression of Alzheimer’s disease // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 2. e90523.
55. *Vignini A., Morganti S., Salvolini E., Sartini D., Luzzi S., Fiorini R., Provinciali L., Di Primio R., Mazzanti L., Emanuelli M.* Amyloid precursor protein expression is enhanced in human platelets from subjects with Alzheimer’s disease and Frontotemporal lobar degeneration: A Real-time PCR study // *Exp. Gerontol.* 2013. Vol. 48. N 12. P. 1505–1508.
56. *Kokjohn T., Van Vickle G., Maarouf C., Kalback W., Hunter J., Dausg I., Luehrs D., Lopez J., Brune D., Sue L., Beach T., Castaño E., Roher A.* Chemical characterization of pro-inflammatory amyloid-beta peptides in human atherosclerotic lesions and platelets // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1812. N 11. P. 1508–1514.
57. *Kucheryavykh L., Dávila-Rodríguez J., Rivera-Aponte D., Zueva L., Washington A., Sanabria P., Inyushin M.* Platelets are responsible for the accumulation of  $\beta$ -amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis // *Brain Res. Bull.* 2017. Vol. 128. P. 98–105.
58. *Friedrich V., Flores R., Muller A., Sehba F.* Escape of intraluminal platelets into brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage // *Neuroscience*. 2010. Vol. 165. N 3. P. 968–975.
59. *Langer H., Choi E., Zhou H. et al.* Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis // *Circ. Res.* 2012. Vol. 110. N 9. P. 1202–1210.
60. *Cognasse F., Nguyen K., Damien P., McNicol A., Pozzetto B., Hamzeh-Cognasse H., Garraud O.* The inflammatory role of platelets via their TLRs and siglec receptors // *Front. Immunol.* 2015. Vol. 6:83.
61. *Schmaar R., Gerardy-Schahn R., Hildebrandt H.* Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration // *Physiol. Rev.* 2014. Vol. 94. N 2. P. 461–518.

62. Yamamoto H., Gurney M. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor // *J. Neurosci.* 1990. Vol. 10. N 11. P. 3469–3478.
63. Kniewallner, K., Grimm N., Humpel N. Platelet-derived nerve growth factor supports the survival of cholinergic neurons in organotypic rat brain slices // *Neurosci. Lett.* 2014. Vol. 574. P. 64–69.
64. Peng F., Dhillon N., Callen S., Yao H., Bokhari S., Zhu X., Baydoun H., Buch S. Platelet-derived growth factor protects neurons against gp120-mediated toxicity // *J. Neurovirol.* 2008. Vol. 14. N 1. P. 62–72.
65. Peng F., Yao H., Akturk H., Buch S. Platelet-derived growth factor CC-mediated neuroprotection against HIV Tat involves TRPC-mediated inactivation of GSK 3beta // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 10. e47572.
66. Gouel F., Do Van B., Chou M., Jonneaux A., Moreau C., Bordet R., Burnouf T., Devedjian J., Devos D. The protective effect of human platelet lysate in models of neurodegenerative disease: involvement of the Akt and MEK pathways // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017. Vol. 11. N 11. P. 3236–3240.
67. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Varon D., Leker R. Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke // *Thromb. Haemost.* 2013. Vol. 110. N 2. P. 323–330.
68. Kazanis I., Feichtner M., Lange S., Rotheneichner P., Hainzl S., Öller M., Schallmoser K., Rohde E., Reitsamer H., Couillard-Despres S., Bauer H., Franklin R., Aigner L., Rivera F. Lesion-induced accumulation of platelets promotes survival of adult neural stem / progenitor cells // *Exp. Neurol.* 2015. Vol. 269. P. 75–89.
69. Au A. E.-L., Sashindranath M., Borg R., Kleinfeld O., Andrews R., Gardiner E., Medcalf R., Samson A. Activated platelets rescue apoptotic cells via paracrine activation of EGFR and DNA-dependent protein kinase // *Cell Death Dis.* 2014. Vol. 5. N 9. e1410.
70. Wang Y., Rehemani A., Spring C., Kalantari K., Marshall A., Wolberg A., Gross P., Weitz J., Rand M., Mosher D., Freedman J., Ni H. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis // *J. Clin. Invest.* 2014. Vol. 124. N 10. P. 4281–4293.
71. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates // *Blood Rev.* 2009. Vol. 23. N 4. P. 177–189.
72. Morrissey J. Polyphosphate: a link between platelets, coagulation and inflammation // *Expert. Rev. Hematol.* 2012. Vol. 95. N 4. P. 346–352.
73. Ziu E., Mercado C., Li Y., Singh P., Ahmed B., Freyaldenhoven S., Lensing S., Ware J., Kilic F. Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. Vol. 52. N 5. P. 1112–1121.
74. Mitsios J., Vini M., Stengel D., Ninio E., Tselepis A. Human platelets secrete the plasma type of platelet-activating factor acetylhydrolase primarily associated with microparticles // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. Vol. 26. N 8. P. 1907–1913.
75. Ge S., Wittenberg N., Haynes C. Quantitative and real-time detection of secretion of chemical messengers from individual platelets // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47. N 27. P. 7020–7024.
76. Nurden A. Platelets, inflammation and tissue regeneration // *Thromb. Haemost.* 2011. Vol. 105. N S6. P. S13–S33.
77. Bell J., Thomas T., Lass E., Ai J., Wan H., Lifshitz J., Baker A., Macdonald R. Platelet-mediated changes to neuronal glutamate receptor expression at sites of microthrombosis following experimental subarachnoid hemorrhage // *J. Neurosurg.* 2014. Vol. 121. N 6. P. 1424–1431.

Поступила в редакцию  
17.03.2018

Принята к печати  
05.06.2018

## REVIEW

### ROLE OF PLATELETS IN NEUROINFLAMMATORY DISORDERS. A REVIEW

M.S. Dukhinova\*, E.D. Ponomarev

*School of Biomedical Sciences, The Chinese University of Hong Kong; Lo Kwee-Seong Integrated Biomedical Sciences building, Area 39, CUHK, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, China*  
\*e-mail: marina\_dukhinova@mail.ru

Platelets are important players in inflammation, wound healing, initiation of immune response and regeneration in peripheral tissues. Disruption of the blood-brain barrier occurs during certain neurological disorders, such as brain trauma, Alzheimer's disease or stroke, when blood cells including platelets can invade nervous tissue. However, the role of platelets in the context of neuroinflammation remains understudied. Recent works have showed that in activated platelets release a wide set of coagulative and vascular factors during neurovascular pathologies in the central nervous system. Moreover, platelets stimulate immunity and regulate inflammation in the central nervous system. Platelet-derived trophic and growth factors may play a role in neuronal regeneration. Activated platelets release neurotransmitters, serotonin, dopamine, histamine, and glutamate, and can modify neuronal cell activity in neuropathologies. This review focuses on the major aspects and mechanisms of platelet functions in neuroinflammation, and therapeutic potential of platelets for treatment of neurodegeneration.

**Keywords:** *platelets, neuroinflammation, neurovascular disorders, brain injury, stroke, Alzheimer's disease*

#### Сведения об авторах

*Духинова Марина Сергеевна* – канд. биомед. наук, науч. сотр. лаборатории нейроиммунологии Школы биомедицинских наук, Китайский университет Гонконга. Тел.: +852-3943-9620; e-mail: marina\_dukhinova@mail.ru

*Пonomarev Евгений Дмитриевич* – канд. биол. наук, зав. лабораторией нейроиммунологии Школы биомедицинских наук, Китайский университет Гонконга. Тел.: +852-3943-9620; e-mail: eponomarev@cuhk.edu.hk

## ОБЗОР

УДК: 579.26:631.46

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПОЧВ РОССИЙСКИХ ПОЛЯРНЫХ СТАНЦИЙ  
ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫЛ.В. Лысак<sup>1,\*</sup>, И.А. Максимова<sup>1</sup>, Д.А. Никитин<sup>1,2</sup>, А.Е. Иванова<sup>1,3</sup>,  
А.Г. Кудинова<sup>4</sup>, В.С. Соина<sup>1</sup>, **О.Е. Марфенина<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Почвенный институт имени В.В. Докучаева, Россия, 119017, г. Москва, Пыжевский пер., 7;<sup>3</sup>Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33;<sup>4</sup>Институт молекулярной генетики, Россия, 123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

\*e-mail: lvlysak@mail.ru

Изучение микробных сообществ почв Антарктиды является исключительно важным направлением исследований, которое позволяет расширить наши знания об участии микроорганизмов в первичном почвообразовании, особенностях формирования микробных сообществ в экстремальных местообитаниях и представляет значительный интерес для направленного поиска микроорганизмов – потенциальных объектов биотехнологии. В настоящем обзоре обобщены результаты многолетних (2012–2017 гг.) комплексных исследований микробных сообществ почв российских полярных станций Восточной Антарктиды – оазис Ширмахера (станция Новолазаревская), Холмы Ларсеманн (станция Прогресс) и Холмы Тала (станция Молодежная). Впервые для этого региона проведена оценка биомассы почвенных микроорганизмов с помощью методов прямой микроскопии. Общие запасы микробной биомассы невелики, в составе доминируют (77–99%) грибы. Особенностью антарктических почв является высокое содержание и морфологическое разнообразие мелких форм микроорганизмов: грибы представлены преимущественно одноклеточными структурами (спорами малых размеров и дрожжами), бактерии – фильтрующимися формами. В то же время микроорганизмы могут вносить существенный вклад в такие важные экологические функции почвы, как эмиссия парниковых газов, особенно в теплые периоды года при достижении почвой стойких положительных температур. Это следует учитывать при создании моделей и прогнозов глобального потепления климата. А использование различных методов изоляции для анализа микробного населения почв, в том числе сукцессионный подход, позволяет существенно расширить представления о таксономическом разнообразии культивируемых грибов и бактерий в почвах Антарктиды.

**Ключевые слова:** Антарктида, почвы, бактерии, грибы, биомасса микроорганизмов, биологическая активность

Исследования микроорганизмов в Антарктиде начаты еще в прошлом веке и проводились, главным образом, в районе Сухих Долин, станции Мак-Мердо, Трансантарктических гор, на Антарктическом полуострове и прилегающих островах [1–4].

Данные по численности отдельных эколого-трофических групп и разнообразию микроорганизмов в антарктических почвах, полученные традиционными классическими методами микробиологии, обобщены в работах зарубежных авторов и относятся, в основном, к территориям Западной Антарктиды [5–9]. Проводимые в последнее время интенсивные молекулярно-генетические исследования таксономического разнообразия микроорганизмов также были выполнены в этом районе [10–12]. Опубликованные данные свидетельствуют о значительной заселенности антарктических почв микроорганизмами.

Сравнительно недавно началось систематическое изучение примитивных почв, а также населяющих их микроорганизмов в районе российских антарктических станций, в неисследованных ранее оазисах береговой части Восточной Антарктиды [8, 12–20]. Здесь отсутствуют сосудистые растения с корневыми системами. Доминирование мхов, лишайников и цианобактерий на поверхности почвы и скальных пород создает уникальные экологические ниши для развития микроорганизмов. В этих местообитаниях ведущая роль в процессах почвообразования принадлежит грибам и бактериям как организмам, наиболее приспособленным к жизни в экстремальных условиях.

Изучение микробных сообществ почв Антарктиды представляется весьма важным как для понимания особенностей трансформации минеральных субстратов в условиях экстремального почвообразования, так и в плане изучения современных ана-

логов почв, существовавших на планете до появления высших сосудистых растений с корневыми системами.

В настоящем обзоре представлены результаты исследования микробных сообществ почв Восточной Антарктиды, проводившегося сотрудниками и аспирантами кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ в 2012–2017 гг.

Объектами исследования служили образцы почв, отобранные участниками 55–58-й Российских антарктических экспедиций в районе оазисов Ширмахер (станция Новолазаревская), Холмы Ларсеманн (станция Прогресс) и Холмы Тала (станция Молодежная). Изучены почвы с органогенными горизонтами (первичные продуценты – цианобактерии и зеленые водоросли; органогенные горизонты формируются под покровом естественных “каменных мостовых”, которые представляют собой скопление мелких обломков горных пород, сформировавшееся на дневной поверхности в результате дефляционных (удаление мелкозема ветром) и/или мерзлотных (вымораживание обломков к поверхности) процессов, а также почвы с поверхностными (эпипедифическими) органогенными горизонтами (моховой и лишайниковый покров, альго-бактериальные маты). Кроме того, изучены “безгумусные почвы” (почвы без макроскопических органогенных горизонтов) и эндолитные почвоподобные тела, развивающиеся на поверхности скальной породы. Всего проанализировано 76 образцов почв из 21 профиля.

#### **Микробная биомасса в почвах Восточной Антарктиды**

Большую часть микробной биомассы в изученных почвах Восточной Антарктиды составляют грибы (от 88 до 99%) [21]. Биомасса микроорганизмов (грибы и бактерии) в большинстве исследованных почв прибрежных оазисов Восточной Антарктиды невысока и варьирует от 72,0 до 308,0 мкг С/г почвы. Это на порядок меньше, чем в зональных почвах умеренных широт [22, 23] и сопоставимо с данными по таким экстремальным местообитаниям, как полярные пустыни Арктики. В большинстве изученных нами антарктических почв масса микробного углерода больше в подповерхностных горизонтах.

Вклад углерода биомассы микроорганизмов в общий органический углерод исследованных почв Антарктиды весьма велик и может достигать 9% в почвах с моховым покровом. Известно, что углерод клеток микроорганизмов составляет до 50% ее сухой массы [24].

Почвы Восточной Антарктиды можно разделить на два типа по распределению микробной биомассы. К первому типу отнесены почвы под моховым покровом, профиль которых содержит большую биомассу грибов и малую – бактерий. Ко второму типу принадлежат “каменные мостовые”, в профиле которых биомасса грибов мала, но относительно велико содержание бактерий.

#### **Бактериальная биомасса в почвах Восточной Антарктиды**

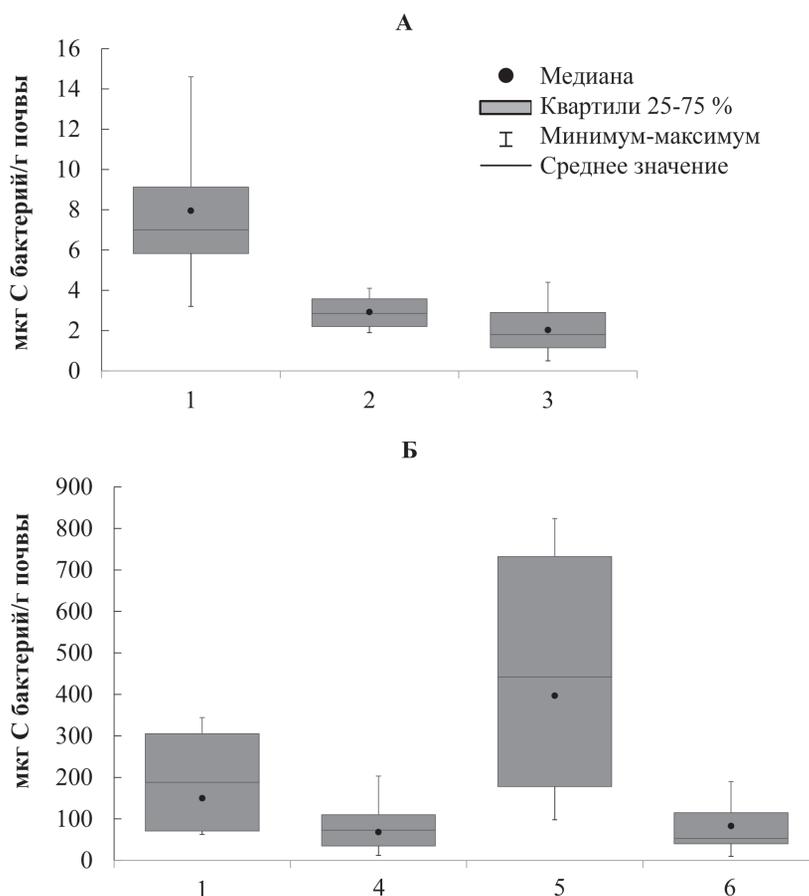
Численность бактерий в антарктических образцах варьирует от 30 до 1500 млн клеток/г почвы, что значительно (на 1–2 порядка) меньше, чем в почвах умеренного пояса [25–27]. Величина бактериальной биомассы составляет в образцах из оазиса Холмы Ларсеманн и с территории Холмов Тала, соответственно, 0,5–15,4 и 1,2–2,8 мкг С/г почвы (рис. 1). Меньшая биомасса бактерий в почвах оазиса Холмы Тала по сравнению с Холмами Ларсеманн может быть связана с отсутствием мохового покрова на поверхности почв. Средние значения биомассы бактерий выше в верхних горизонтах почв с развитым мохово-лишайниковым покровом и альго-бактериальными матами, и ниже в почвах без поверхностных органогенных горизонтов и в подповерхностных горизонтах (3–15 и 1–2 мкг С/г почвы, соответственно) (рис. 2). В некоторых верхних горизонтах почв (оазис Холмы Ларсеманн) содержание бактерий в составе микробной биомассы может достигать значений 11,7 и 6,6%, что даже выше, чем в почвах умеренных широт [22, 23].

Бактериальные сообщества почв в оазисах Ларсеманн и Холмы Тала содержат значительное количество фильтрующихся (проходящих через мембранные фильтры с размером пор менее 220 нм) форм бактерий [28]. Установлено их высокое (>50%) присутствие в исследованных образцах, доля их значительно выше, чем в зональных почвах средней полосы России [25, 29]. По-видимому, малые размеры бактерий следует рассматривать как адаптацию к суровым климатическим условиям Антарктиды.

Исследования фильтратов почвенной суспензии методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии свидетельствуют о значительном морфологическом разнообразии фильтрующихся форм бактерий. Встречаются, в основном, два типа клеток: первый характеризуется наличием толстых клеточных стенок, мощной капсулы, S-слоев, второй имеет обычное строение. Толстая клеточная стенка, капсула, S-слои, мелкие размеры клеток позволяют провести некоторую аналогию с цистоподобными клетками, ранее наблюдавшимися нами в мерзлотных почвах и подпочвенных слоях вечной мерзлоты тундровых почв Субарктики [6, 30, 31].

#### **Грибная биомасса в почвах Восточной Антарктиды**

Грибы в почвах Восточной Антарктиды в основном (до 80%) представлены мелкими (2–3 мкм) спорами, а не мицелием [21, 32]. Максимальная длина мицелия (380,2±29 м/г почвы) регистрируется в увлажненных почвах под моховым покровом. В почвах без органогенных горизонтов длина мицелия значительно меньше. В “безгумусных почвах” биомасса грибов (45,0±6 мкг С/г почвы) и



**Рис. 1.** Биомасса бактерий (А) и грибов (Б) в почвах оазисов Восточной Антарктиды [21]. Почвы: 1 – гиполитные органогенные горизонты с цианобактериями и зелеными водорослями; 2 – верхние горизонты почв без разрастаний цианобактерий и водорослей; 3 – минеральные горизонты; 4 – “каменные мостовые”; 5 – с моховым покровом; 6 – “безгумусовые почвы”

длина мицелия ( $35,2 \pm 6$  м/г почвы) являются минимальными. В антарктических почвах происходит истончение грибного мицелия, большая его часть (до 94%) представлена тонкими гифами диаметром менее 3 мкм. Численность грибных спор в почвах колеблется от  $10^2$  до  $10^4$  клеток/г почвы, что на 2–3 порядка ниже, чем в почвах умеренных широт. Микобиота влажных биотопов, богатых органическим веществом, согласно данным люминесцентной микроскопии, в основном представлена одноклеточными (до 85–95%), а не мицелиальными формами.

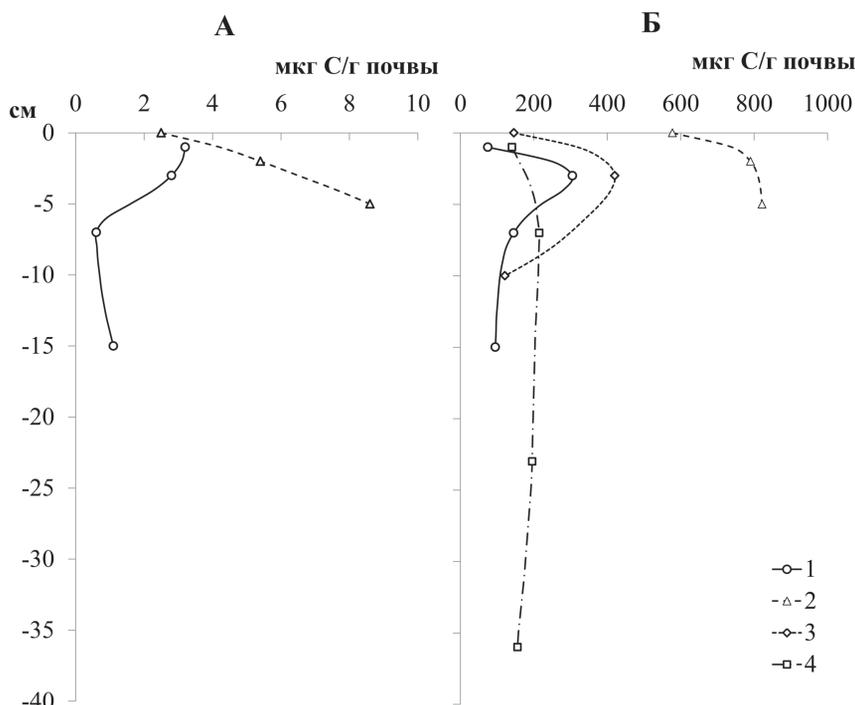
Грибная биомасса в большинстве изученных почв восточной части континента (“безгумусных почвах”, “каменных мостовых”, реголитах) составляет 47–70 мкг С/г почвы [32]. Низкие значения биомассы связаны с малой долей мицелия и элиминацией спор большого размера (>5 мкм) в почвах, подвергающихся низким отрицательным температурам. И только в некоторых биотопах, характеризующихся высокой влажностью и обилием органических веществ (донных грунтах озер, глееземах и мохово-торфяных горизонтах) грибная биомасса заметно выше и достигает 280–920 мкг С/г почвы (рис. 1) [21].

Наибольшее содержание грибной биомассы и минимальное количество меланизированного ми-

целия отмечается в подповерхностных горизонтах почв (рис. 2). Такой характер распределения нетипичен для большинства почв других географических регионов [22] и связан, по-видимому, с экстремальными экологическими условиями (избыточное ионизирующее излучение, резкие перепады температур и т.д.), создающимися на поверхности грунта [10, 33]. Среди биотопов Восточной Антарктиды максимальная доля меланизированного мицелия (>60%) выявлена в почвах “каменных мостовых” и реголитов, а минимальная (15 и 24%) – в донных осадках озера, глееземах и почвах под мхами (22–41%) [21].

### Биологическая активность почв Антарктиды

Поскольку до сих пор вопрос об участии микроорганизмов в процессах трансформации углерода и азота в антарктических почвах остается мало изученным, актуальна оценка показателей биологической активности микробных сообществ (продуцирование углекислого газа, денитрификация и азотфиксация) (таблица). Продуцирование углекислого газа в разных почвах Антарктиды варьирует от 0,47 до 2,34 мкг С- $\text{CO}_2$ /г · сут. Интенсивность процесса, как правило, снижается вниз по профилю. Максимальные показатели зафиксированы в верхних горизонтах (“каменные мостовые”)



**Рис. 2.** Распределение биомассы бактерий (А) и грибов (Б) в профилях различных почв Восточной Антарктиды [32].  
Почвы: 1 – “каменные мостовые”; 2 – с моховым покровом; 3 – реголит, 4 – глеезем

с гиполитными альго-бактериальными сообществами, минимальные – в нижних минеральных горизонтах почв.

Интенсивность азотфиксации низка (от 0,08 до 55,85 нг  $C_2H_4$ /г · сут) и наибольших значений достигает в горизонте с высоким содержанием бактериальной биомассы –  $4,4 \pm 0,21$  мкг С/г почвы.

Интенсивность денитрификации (эмиссия  $N_2O$ ) варьирует от 0,09 до 19,28 мкг  $N-N_2O$ /г · сут, достигая максимального значения в оторфованном горизонте. Несколько меньшие, но также высокие показатели денитрификации (12,94 и 13,87 мкг  $N-N_2O$ /г · сут.) наблюдаются в поверхностных гиполитных альго-бактериальных горизонтах.

Максимальных значений показатели потенциальной биологической активности достигают в горизонтах с высокой численностью бактерий и максимальной длиной мицелия грибов. В целом, биологическая активность в почвах Антарктиды менее интенсивна [21, 34] по сравнению с почвами умеренного пояса [35].

Очевидно, что в теплые периоды года, при достижении почвой стойких положительных температур, микроорганизмы могут вносить существенный вклад в такие важные экологические функции почвы, как эмиссия парниковых газов [36].

#### Таксономическое разнообразие бактериальных сообществ

Таксономическое разнообразие бактериальных сообществ антарктических почв исследовано при помощи метода FISH и классического метода посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду.

В этих почвах, согласно данным, полученным методом FISH, доминируют представители домена Bacteria (74,4% и более), содержание представителей домена Archaea не превышает 22% [27, 28]. Максимальная доля архей (22%) обнаруживается в горизонте с примесью торфяного материала. Это может быть связано с присутствием в подобных субстратах значительного количества метаногенов (филум Euryarchaeota) [26, 37, 38].

Среди домена Bacteria при помощи специфичных зондов выявляются филумы Proteobacteria (альфа-, бета- и гамма-протеобактерии), Actinobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria. В большинстве исследованных образцов содержание протеобактерий составляет более 50% от числа идентифицированных клеток бактерий, содержание филумов Actinobacteria (8–28%), Planctomycetes (8–24%) и Acidobacteria (1–8%) меньше. Среди филума Proteobacteria присутствие представителей отдельных классов различно, доля альфа-протеобактерий варьирует от 11 до 28%, бета-протеобактерий – от 7 до 28%, гамма-протеобактерий – от 4 до 38%.

Максимальное содержание ацидобактерий, типичных обитателей сфагновых болот [38], выявляется в горизонте с примесью торфянистого материала (8%) и более кислым pH, чем в выше- и нижележащих горизонтах (pH = 4,0–4,3 и 5,2–5,5 соответственно).

Классический метод посева разведений почвенной суспензии оказался малоэффективным для изучения таксономического разнообразия бактерий в почвах Антарктиды. Очевидно, что из-за особенностей, связанных с отбором и транспортировкой почвенных образцов из такого труднодоступ-

Таблица

## Показатели потенциальной биологической активности почв оазиса Холмы Ларсеманн [21]

№ разреза (образца)	Горизонт, глубина (см)	Интенсивность азотфиксации, $\text{нг C}_2\text{H}_4/\text{г} \cdot \text{сут.}$	Интенсивность денитрификации, $\text{мкг N}_2\text{O}/\text{г} \cdot \text{сут.}$	Продуцирование $\text{CO}_2$ , $\text{мкг CO}_2/\text{г} \cdot \text{сут.}$
I. Почвы с гиполитными органогенными горизонтами				
10-15L1	GP/B <sub>algae</sub> , 0–1	0,51±0,05	40,67±11,72	6,07±1,60
	B1, 1–3	55,85±3,17	14,78±4,04	5,51±2,23
	B2, 3–10	10,60±0,40	5,55±0,18	4,75±0,02
10-06	GP/B <sub>algae</sub> , 0–2	0,36±0,03	19,66±10,35	8,60±2,64
	T/Ah, 2–4	1,85±0,02	60,60±8,83	5,27±1,90
	B, 4–10	1,10±0,04	25,28±0,60	1,76±0,19
	B, 10–20	0,62±0,04	23,47±2,60	1,72±1,01
M1 10-15P1	GP/B <sub>algae</sub> , 0–1	0,52±0,13	43,58±5,45	6,65±0,42
	GP, 0–2	0,08±0,01	8,59±3,75	2,70±0,54
	B1, 2–10	11,80±1,75	4,38±0,19	5,80±1,17
II. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами (мохово-лишайниковый покров)				
M3	O, 0–1	3,75±1,85	0,28±0,03	2,58±1,31
	B, 1–2	0,35±0,01	10,23±5,60	2,82±0,50
10-20	O, 0–1	17,81±4,46	7,6±0,9	10,8±0,9
	B <sub>2 fungi</sub> , 2–3	18,7±0,57	10,1±2,6	14,8±0,8
III. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами (альго-бактериальные маты)				
NSM 10-32	GP/O <sub>algae-bact</sub> , 0–2	10,77±1,6	5,93±0,4	2,0±0,07
	B, 2–20	48,77±2,32	0,03±0,001	1,0±0,01
	B/B <sub>g</sub> , 20–30	38,87±2,83	0,01±0,001	1,0±0,2
	B <sub>gt</sub> , 30–50	27,93±8,8	1,3±0,05	0,9±0,01
	(B <sub>g2</sub> ) 50–60	7,67±1,1	1,6±1,2	1,0±0,03
NSM 10-04	B <sub>algae</sub> , 1–2	13,8±0,44	11,9±1,94	1,6±0,2
	B <sub>1</sub> , 2–10	15,37±0,54	0,7±0,47	1,0±0,04
	B <sub>2</sub> , 10–12	18,18±0,64	0,003±0,001	1,75±0,05
	B <sub>3</sub> , 50–70	26,6±3,74	0,1±0,01	1,3±0,02

ного региона, как Антарктида, необходимо использование приемов, с помощью которых можно было бы получить максимум информации о таксономическом разнообразии культивируемых бактерий в антарктических почвах. Одним из таких приемов служит сукцессионный подход [39, 40].

Длительная инкубация контрастных по содержанию органического вещества (0,14% и 0,41% углерода) образцов почвы при постоянных уровнях влажности (30% от полной полевой влагоемкости) и температуры (5°C и 20°C), а также регулярный высев образцов почвы (через 1, 4, 7, 14, 30, 45 и 60 сут инкубации) позволяют выделить представителей более широкого спектра родов бактерий.

Максимальное разнообразие бактерий наблюдается через 7–14 сут эксперимента. Помимо грамположительных бактерий (бацилл и коринеформ), которые обычно выделяются из образцов при единичных посевах, удается выделять широкий спектр грамотрицательных бактерий. На основании анализа последовательностей гена 16S рНК большинство штаммов относятся к филуму протеобактерий (виды родов *Acinetobacter*, *Aquaspirillum*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*). Среди них обнаружены известный психрофильный вид *Sphingopyxis bauzanensis* [41] и олиготрофный вид *Ralstonia picketti* [42], для которого характерны

размеры клеток менее 220 нм. Можно предположить, что данный вид бактерий присутствует во фракции фильтрующихся форм прокариот.

#### Таксономическое разнообразие культивируемых грибов

Для характеристики видового разнообразия культивируемых микроскопических грибов традиционно используется метод посева почвенных разведений на плотные питательные среды. Однако с учетом низкотемпературных условий исходных местообитаний, помимо стандартных температурных (25°C) условий инкубации посевов, целесообразно осуществлять культивирование и при 5°C [4, 32, 43].

Численность культивируемых представителей микобиоты в образцах почв Антарктиды колеблется от  $0,8 \cdot 10^2$  до  $1,2 \cdot 10^4$  КОЕ/г почвы. Наибольшее количество грибов выявляется в образцах почв с развитым моховым покровом, наименьшее — в почвах, лишенных мхов и лишайников. Максимальная численность КОЕ микроскопических грибов, вне зависимости от биотопа и типа почвы, регистрируется в подповерхностных горизонтах. Такое распределение численности культивируемых пропагул согласуется с данными о характере распределения общей грибной биомассы и отличает почвы Антарктиды от почв других природных географических зон [36, 39].

В ходе данных работ выявлено 142 вида грибов, относящихся к 71 роду из 3 отделов (Mucoromycota, Ascomycota, Basidiomycota) [44]. Отдел Mucoromycota представлен видами родов *Absidia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus* и *Umbelopsis*. Отдел Ascomycota — видами родов *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Talaromyces*, *Pseudogymnoascus* и дрожжами *Debaryomyces hansenii*, а также большим разнообразием анаморфных мицелиальных микроскопических грибов родов *Penicillium* (27 видов), *Phoma* (11 видов), *Cladosporium* (9 видов), *Cadophora* (8 видов), *Aspergillus* (7 видов), *Thelebolus* (5 видов), *Alternaria* (4 вида). Отдел Basidiomycota представлен исключительно дрожжами, относящимися к 9 родам — *Filobasidium*, *Glaciozyma*, *Goffeauzyma*, *Hannaella*, *Leucosporidium*, *Mrakia*, *Phenoliferia*, *Rhodotorula*, *Vishniacozyma* [45].

В отдельных образцах антарктических почв обнаруживаются от 2 до 9 видов микромицетов и/или дрожжей. Максимальным видовым разнообразием характеризуются почвы, лишенные мохового и/или лишайникового покрова — “каменные мостовые”, “безгумусные почвы”; здесь доминируют меланизированные формы *Cladosporium*, *Cadophora*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Exophiala*. В почвах под моховым или лишайниковым покровом число видов грибов сокращается до 2–5, причем преобладают грибы с каротиноидными пигментами — представители родов *Phoma*, *Thelebolus*, *Ascochyta*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*. Преобладание пигментированных микромицетов является характерной чертой микобиоты экстремальных местообитаний [46–49].

В экспериментальных исследованиях устойчивость краснопигментированных видов к неблагоприятным факторам была неоднократно продемонстрирована ранее [50]. В придонных отложениях озер доминируют виды родов *Antarctomyces*, *Hyphozyma*, *Geotrichum*, *Phoma*, *Thelebolus*, *Tolypocladium*. Экологические предпочтения *Penicillium* были весьма разнородны: одни виды (*P. aurantiogriseum* Dierckx, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. citrinum* Thom, *P. chrysogenum* Thom, *P. funiculosum* Thom) часто встречаются в почвах, покрытых мхами, в то время как другие (*P. canescens* Sopp, *P. fellutanum* Biourge, *P. janczewskii* K.W. Zaleski) — в солончаках и “каменных мостовых” с альго-бактериальными пленками, большинство же видов этого рода отношения к конкретным типам биотопов не проявляют. В ряде почв Антарктиды, которым свойственны высокая влажность и обилие органических веществ, микобиота представлена исключительно дрожжами, среди которых доминирует *Goffeauzyma gilvescens* (Chernov & Bab'eva) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout [43], ранее встречавшийся в Арктике и высокогорных районах [51–53]. То, что дрожжи являются важным компонентом биогеоценозов Антарктиды, было показано и ранее как в работах отечественных ученых [54, 55], так и в зарубежных публикациях [56]. Большая часть выделенных нами в ходе данного исследования грибов являются диморфными, что можно рассматривать как адаптацию к существованию в экстремальных криоаридных условиях.

Для расширения выделяемого видового разнообразия культивируемых микроскопических грибов целесообразно применение сукцессионного подхода. Сукцессионный анализ двух контрастных по содержанию органического вещества и влажности почв — “каменной мостовой” и почвы под моховым покровом — позволил выявить в 2,5–3 раза большее, чем при единичных посевах, суммарное разнообразие микроскопических грибов (до 15–19 видов из каждого образца почвы) [43]. Состав выделяемых грибных сообществ зависит от температуры культивирования: при 25°C преобладают представители родов *Aspergillus* и *Penicillium*, а при 5°C — типичные полярно-альпийские виды *Thelebolus microsporus* (Berk. & Broome) Kimbr. и *G. gilvescens*.

В ходе проведенного исследования нами расширен список видов микромицетов на 15 видов, которые ранее не встречались в почвах и субстратах Антарктиды. Это *Cadophora novi-eboraci* R. Travadon, D.P. Lawr., Rooney-Lath., Gubler, Rolshausen & K. Baumgartner, *Coniothyrium glomeratum* Corda, *Cryptendoxyla hypophloia* Malloch & Cain, *Eurotium niveoglaucum* (Thom & Raper) Malloch & Cain, *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams, *Microascus cinereus* Curzi, *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Höhn., *Monocillium nordinii* (Bourch.) W. Gams, *Oedoecephalum nicotianaе* Oudem., *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Simplicillium aogashimaense* Nonaka, Kaifuchi &

Masuma, *Symptodiomyopsis kandeliae* G.Y. Liou, Y.H. Wei & F.L. Lee, *Paraphoma fimeti* (Brunaud) Gruyter, Aveskamp & Verkley, *Periconia igniaria* E.W. Mason & M.B. Ellis, *Peyronellaea calorpreferens* (Boerema, Gruyter & Noordel.) Aveskamp, Gruyter & Verkley. Почти половина из них (7 видов) обнаружена в ходе сукцессионного анализа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cameron R.E., Hanson R.B., Lacy G.N. and Morelli F.A. Soil microbial and ecological investigations in the Antarctic interior // *Antarct. J. US*. 1970. Vol. 5. N 4. P. 87–88.
2. Friedmann E.I. Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert // *Science*. 1982. Vol. 215. N 4536. P. 1045–1253.
3. Vishniac H.S. The microbiology of Antarctic soils // *Antarctic Microbiology* / Ed. E. J. Friedmann. N.Y.: Wiley-Liss., 1993. P. 297–341.
4. Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Karasev S.G., Gurina L.V., Evtushenko L.I., Ozerskaya S.M., Gavrish E.Yu., Spirina E.V., Gilichinskii D.A., Vorob'eva E.A. Survival of microfungi and actinobacteria under conditions of long-term natural cryopreservation // *Microbiology*. 2001. Vol. 70. N 3. P. 356–364.
5. Friedmann E.I., Weed R. Microbial trace-fossil formation, biogenous, and abiotic weathering in the Antarctic cold desert // *Science*. 1987. Vol. 236. N 4802. P. 703–705.
6. Gilichinsky D.A., Wilson G.S., Friedmann E.I., McKay C.P., Sletten R.S., Rivkina E.M., Vishnivetskaya T.A., Erokhina L.G., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Shcherbakova V.A., Soina V.S., Spirina E.V., Vorobyova E.A. Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology // *Astrobiology*. 2007. Vol. 7. N 2. P. 275–311.
7. Ludley K.E., Robinson C.H. 'Decomposer' Basidiomycota in Arctic and Antarctic ecosystems // *Soil Biol. Biochem.* 2008. Vol. 40. N 1. P. 11–29.
8. Gilichinsky D., Abakumov E., Abramov A., Fyodorov-Davydov D., Goryachkin S., Lupachev A., Mergelov N., Zazovskaya E. Soils of Mid and Low Antarctic: diversity, geography, temperature regime // *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil Solutions for a Changing World* (Brisbane, Australia, 1–6 August 2010). 2010. P. 32–35.
9. Wang N.F., Zhang T., Zhang F., Wang E.T., He J.F., Ding H., Tao B., Liu J., Xiang B.R., Zang J.Y. Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing // *Front. Microbiol.* 2015. Vol. 6. N 1188. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01188
10. Yergeau E., Kang S., He Z., Zhou J., Kowalchuk G.A. Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect // *ISME J.* 2007. Vol. 1. N 2. P. 163–179.
11. Zeng X., Xiao X., Wang F. Response of bacteria in the deep-sea sediments and the Antarctic soils to carbohydrates: effects on ectoenzyme activity and bacterial community // *J. Environ. Sci. (China)*. 2010. Vol. 22. N 11. P. 1779–1785.
12. Manucharova N.A., Troshcheva E.V., Kol'tsova E.M., Demkina E.V., Karaevskaya E.V., Rivkina E.M., Mardanov A.V., El'-Registan G.I. Characterization of the structure of the prokaryotic complex of Antarctic permafrost by molecular genetic techniques // *Microbiology*. 2016. Vol. 85. N 1. P. 102–108.
13. Абакумов Е.В. Почвы Западной Антарктики. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. 112 с.
14. Курцидели И.Ю., Власов В.Ю., Абакумов Е.В., Гиличинский В.Ф. Разнообразие и ферментативная активность микромицетов из почв Антарктики // *Микол. фитопатол.* 2010. Т. 44. № 5. P. 387–397.
15. Горячкин С.В., Гиличинский Д.А., Мergелов Н.С., Конюшков Д.Е., Лупачев А.В., Абрамов А.А., Долгих А.В., Зазовская Э.П. Почвы Антарктиды: первые итоги, проблемы и перспективы исследований // *Геохимия ландшафтов и география почв (к 100-летию М.А. Глазовской)*. Докл. Всеросс. научн. конф. (Москва, 4–6 апреля 2012 г.). М., 2012. С. 361–388.
16. Mergelov N.S., Goryachkin S.V., Shorkunov I.G., Zazovskaya E.P., Cherkinsky A.E. Endolithic pedogenesis and rock varnish on massive crystalline rocks in East Antarctica // *Eurasian Soil Sci.* 2012. Vol. 45. N 10. P. 901–917.
17. Bajerski F., Wagner D. Bacterial succession in Antarctic soils of two glacier forefields on Larsemann Hills, East Antarctica // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. Vol. 85. N 1. P. 128–142.
18. Kochkina G.A., Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Chigineva N.I., Vasilenko O.V., Spirina E.V., Gilichinsky D.A. Fungal diversity in the Antarctic active layer // *Microbiology*. 2014. Vol. 83. N 1–2. P. 94–101.
19. Караевская Е.С., Демидов Н.Э., Шмелев Д.Г., Ривкина Е.М., Булат С.А. Изучение бактериальных сообществ многолетнемерзлых пород оазисов Антарктиды методами культивирования // *Пробл. Аркт. Антарк.* 2017. № 2 (112). С. 27–42.
20. Mergelov N., Mueller C.W., Prater I., Shorkunov I., Dolgikh A., Zazovskaya E., Shishkov V., Krupskaya V., Abrosimov K., Cherkinsky A., Goryachkin S. Alteration of rocks by endolithic organisms is one of the pathways for the beginning of soils on Earth // *Sci. Rep. UK*. 2018. Vol. 8:3367.
21. Nikitin D.A., Marfenina O.E., Kudinova A.G., Lysak L.V., Mergelov N.S., Dolgikh A.V., Lupachev A.V. Microbial biomass and biological activity of soils and soil-like bodies in coastal oases of Antarctica // *Eurasian Soil Sci.* 2017. Vol. 50. N 9. P. 1086–1097.
22. Polyanskaya L.M., Zvyagintsev D.G. The content and composition of microbial biomass as an index of the ecological status of soil // *Eurasian Soil Sci.* 2005. Vol. 38. N 6. P. 625–633.
23. Polyanskaya L.V., Prikhod'ko V.E., Lomakin D.G., Chernov I.Yu. The number and biomass of microorganisms in ancient buried and recent chernozems under different land uses // *Eurasian Soil Sci.* 2016. Vol. 49. N 10. P. 1122–1135.
24. Ball B.A., Virginia R.A. Microbial biomass and respiration responses to nitrogen fertilization in a polar desert // *Polar Biology*. 2014. Vol. 37. N 4. P. 573–585.
25. Lysak L.V., Lapygina E.V., Konova I.A., Zvyagintsev D.G. Population density and taxonomic composition of bacterial nanoforms in soils of Russia // *Eurasian Soil Sci.* 2010. Vol. 43. N 7. P. 765–770.

26. *Lysak L.V., Lapygina E.V., Kadulin M.S., Konova I.A.* Number, viability, and diversity of the filterable forms of prokaryotes in sphagnum high-moor peat // *Biol. Bull.* 2014. Vol. 41. N 3. P. 228–232.
27. *Kudinova A.G., Lysak L.V., Lapygina E.V., Soina V.S., Mergelov N.S.* Diversity and viability of prokaryotes in primitive soils of the Larsemann oasis (East Antarctica) // *Biol. Bull.* 2015. Vol. 42. N 2. P. 92–97.
28. *Kudinova A.G., Lysak L.V., Soina V.S., Mergelov N.S., Dolgikh A.V., Shorkunov I.G.* Bacterial communities in the soils of cryptogamic barrens of East Antarctica (the Larsemann Hills and Thala Hills oases) // *Eurasian Soil Sci.* 2015. Vol. 48. N 3. P. 276–287.
29. *Kadulin M.S., Konova I.A., Lysak L.V., Soina V.S., Lapygina E.V., Zvyagintsev D.G.* Bacterial nanoforms of some soil concretions // *Moscow Univ. Soil Sci. Bull.* 2012. Vol. 67. N 1. P. 39–44.
30. *Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I., Manucharova N.A., Soina V.S.* Reactivation of dormant and nonculturable bacterial forms from paleosols and subsoil permafrost // *Microbiology.* 2012. Vol. 81. N 4. P. 435–445.
31. *Soina V.S., Lysak L.V., Konova I.A., Lapygina E.V., Zvyagintsev D.G.* Study of ultramicrobacteria (Nanoforms) in soils and subsoil deposits by electron microscopy // *Eurasian Soil Sci.* 2012. Vol. 45. N 11. P. 1048–1056.
32. *Marfenina O.E., Nikitin D.A., Ivanova A.E.* The structure of fungal biomass and diversity of cultivated microfungi in Antarctic soils (Progress and Russian stations) // *Eurasian Soil Sci.* 2016. Vol. 49. N 8. P. 934–941.
33. *Arenz B., Blanchette R.A., Farrell R.L.* Fungal diversity in Antarctic soils // *Antarctic terrestrial microbiology physical and biological properties of Antarctic soils* / Ed. D.A. Cowan. Berlin: Springer, 2014. 328 pp.
34. *Gregorich E.G., Hopkins D.W., Elberling B., Sparrow A.D., Novis P., Greenfield L.G., Rochette P.* Emission of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O from lakeshore soils in an Antarctic dry valley // *Soil Biol. Biochem.* 2006. Vol. 10. N 38. P. 3120–3129.
35. *Степанов А.Л.* Микробная трансформация парниковых газов в почвах. М.: ГЕОС, 2011. 192 с.
36. *Dobrovolskaya T.G., Zvyagintsev D.G., Chernov I.Y., Golovchenko A.V., Zenova G.M., Lysak L.V., Manucharova N.A., Marfenina O.E., Polyanskaya L.M., Stepanov A.L., Umarov M.M.* The role of microorganisms in the ecological functions of soils // *Eurasian Soil Sci.* 2015. Vol. 48. N 9. P. 959–967.
37. *Pankratov T.A., Kachalkin A.V., Korchikov E.S., Dobrovolskaya T.G.* Microbial communities of lichens // *Microbiology.* 2017. Vol. 86. N 3. P. 293–309.
38. *Dedysh S.N.* Cultivating uncultivated bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining // *Front. Microbiol.* 2011. Vol. 2. N 9. P. 184–190.
39. *Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Полянская Л.М., Чернов И.Ю.* Структурно-функциональная организация микробных сообществ наземных экосистем. Проблемы фундаментальной экологии. Экология в России на рубеже XXI века (наземные экосистемы). М.: "Научный мир", 1999. С. 147–180.
40. *Кожевин П.А.* Микробные популяции в природе. М.: Изд-во МГУ, 1989. 175 с.
41. *Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y.* Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. // *Microbiol. Immunol.* 1995. Vol. 39. N 11. P. 897–904.
42. *Oelschlagel M., Rckert C., Kalinowski J., Schmidt G., Schlammann M., Tischler D.* *Sphingopyxis fribergensis* sp. nov., a soil bacterium with the ability to degrade styrene and phenylacetic acid // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. Vol. 65. Part 9. P. 3008–3015.
43. *Никитин Д.А., Марфенина О.Е., Максимова И.А.* Использование сукцессионного подхода при изучении видового состава микроскопических грибов и содержания грибной биомассы в антарктических почвах // *Микол. фитопатол.* 2017. Vol. 51. № 5. P. 211–219.
44. *Spatafora J.W., Chang Y., Benny G.L., et al.* A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data // *Mycologia.* 2016. Vol. 108. N 5. P. 1028–1046.
45. *Liu X.Z., Wang Q.M., Gker M., Groenewald M., Kachalkin A.V., Lumbsch H.T., Millanes A.M., Wedin M., Yurkov A.M., Boekhout T., Bai F.Y.* Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes // *Stud. Mycol.* 2015. Vol. 81. P. 85–147.
46. *Vincent W.F.* Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism // *Antarct. Sci.* 2000. Vol. 12. N 3. P. 374–385.
47. *Singh J., Dubey A.K., Singh R.P.* Antarctic terrestrial ecosystem and role of pigments in enhanced UV-B radiations // *Rev. Environ. Sci. Bio.* 2011. Vol. 10. N 1. P. 63–77.
48. *Onofri S., Zucconi L., Isola D., Selbmann L.* Rock-inhabiting fungi and their role in deterioration of stone monuments in the Mediterranean area // *Plant Biosyst.* 2014. Vol. 148. N 2. P. 84–91.
49. *Villarreal P., Carrasco M., Barahona S., Alcano J., Cifuentes V., Baeza M.* Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content // *Curr. Microbiol.* 2016. Vol. 72. N 1. P. 94–101.
50. *Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Y., Zheltikova T.M.* Resistance of various yeast ecological groups to prolonged storage in dry state // *Microbiology.* 2015. Vol. 84. N 3. P. 442–448.
51. *Chernov, I.Yu., Bab'eva, I.P.* New species of *Cryptococcus* yeast from tundra soils // *Microbiology.* 1988. Vol. 57. N 6. P. 1031–1034.
52. *Чернов И.Ю.* Дрожжи в природе. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. 336 с.
53. *Buzzini P., Lachance M.-A., Yurkov A.* Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Springer. 2017. 293 pp.
54. *Бабьева И.П., Голубев В.И.* Психрофильные дрожжи в оазисах Антарктиды // *Микробиол.* 1969. Т. 38. № 3. С. 518–524.
55. *Бабьева И.П., Голубев В.И., Решетова И.С., Азиева Е.Е., Благодатская В.М.* Дрожжи в высокоширотных регионах Северного и Южного полушарий // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол., почвовед.* 1976. № 2. С. 76–82.
56. *Martinez A., Cavello I., Garmendia G., Rufo C., Cavalitto S., Veroet S.* Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms // *Extremophiles.* 2016. Vol. 20. N 5. P. 759–769.

Поступила в редакцию  
06.03.2018

Принята к печати  
07.06.2018

## REVIEW

## MICROBIAL COMMUNITIES OF SOILS OF EAST ANTARCTICA

L.V. Lysak<sup>1,\*</sup>, I.A. Maksimova<sup>1</sup>, D.A. Nikitin<sup>1,2</sup>, A.E. Ivanova<sup>1,3</sup>,  
A.G. Kudinova<sup>4</sup>, V.S. Soina<sup>1</sup>, O.E. Marfenina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Soil Biology, Soil Science Faculty, Moscow State University,  
Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Pyzhevsky lane 7–2, Moscow, 119017, Russia;

<sup>3</sup>A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Leninskiy prosp. 33, Moscow, 119071, Russia;

<sup>4</sup>Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,

Akademika Kurchatova square 2, Moscow, 123182, Russia

\*e-mail: lvlysak@mail.ru

The investigation of microbial communities of Antarctica soils is a very important direction of research that expands our knowledge of microbial participation in primary soil formation, their communities in extreme habitats features and is of considerable interest for directed search for microorganisms – potential biotechnological objects. In the present review results of long-term (2012–2017) of complex researches of soil microbial communities of the Russian polar stations of East Antarctica are presented (Shirmakher's (Novolazarevskaya station) oasis, Hills Larsemann (Progress station) and Hills Tala (Molodezhnaya station)). For the first time for this region the assessment of biomass of soil microorganisms by means of methods of direct microscopy is carried out. The general amount of microbial biomass are small, there the fungi are dominate (77–99%). The unique feature of the Antarctic soils is the high content and a morphological diversity of small forms of microorganisms: fungi are presented by mainly one-cells structures (the small spores and yeasts), bacteria - the ultrafine (filtering) forms. At the same time microorganisms can make a significant importance/contribution to such important ecological functions of the soil as the emission of greenhouse gases, especially during the warm season at achievement of resistant positive temperatures by the soil. It should be considered during creation of models and forecasts of global warming of climate. Both the use of various methods of isolation for the analysis of the microbial population of soils and the succession approach expand significantly the information about taxonomy diversity of the cultivated fungi and bacteria in soils of Antarctica.

**Keywords:** *Antarctica, soil, bacteria, fungi, biomass of microorganisms, biological activity*

#### Сведения об авторах

*Лысак Людмила Вячеславовна* – докт. биол. наук, проф. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел. 8-495-939-22-17; e-mail: lvlysak@mail.ru

*Максимова Ирина Аркадьевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-36-03; e-mail: maximova.irina@gmail.com

*Иванова Анна Евгеньевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ, вед. инженер лаборатории тропических технологий ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцева. Тел.: 8-495-939-35-86; e-mail: ivanovaane@gmail.com

*Никитин Дмитрий Алексеевич* – аспирант кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ, инж.-иссл. отдела биологии и биохимии Почвенного института им. В.В. Докучаева. Тел. 8-495-939-35-86; e-mail: dimnik90@mail.ru

*Кудинова Алина Гранитовна* – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории биологии РНК и эпигенетики ИМГ РАН. Тел.: 8-499-196-02-09; e-mail: alina-kudinova91@mail.ru

*Соина Вера Сергеевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-31-79; e-mail: soina@yandex.ru

*Марфенина Ольга Евгеньевна* – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел. 8-495-939-35-86; e-mail: marfenina@mail.ru

## БИОФИЗИКА

УДК 577.355.2

**КИНЕТИКА ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2 С ГЕТЕРОГЕННЫМИ КЛАСТЕРАМИ МЕТАЛЛОВ (Mn/Fe) В КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ****Л.Н. Давлетшина\*, Б.К. Семин***Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12**\* e-mail: davlet@biophys.msu.ru*

Электронный транспорт в фотосистеме 2 (ФС2) шпината с кислород-выделяющим комплексом (КВК), содержащим гетерогенные кластеры металлов  $2\text{Mn}2\text{Fe}$  и  $3\text{Mn}1\text{Fe}$ , был исследован с применением метода измерения кинетики индукции флуоресценции (КИФ). Препараты  $\text{ФС}2(2\text{Mn},2\text{Fe})$  и  $\text{ФС}2(3\text{Mn},1\text{Fe})$  были синтезированы из препаратов  $\text{ФС}2$  без кальция в КВК ( $\text{ФС}2(-\text{Ca})$ ). Мы установили, что КИФ в препаратах  $\text{ФС}2(2\text{Mn},2\text{Fe})$  имеет форму, аналогичную форме КИФ в препаратах  $\text{ФС}2$  без кальция, но с меньшим выходом флуоресценции. Наши результаты свидетельствуют о наличии электронного транспорта от кластера металлов в КВК к первичному пластохиноному акцептору электронов  $Q_A$ , как и в препаратах  $\text{ФС}2(-\text{Ca})$ , т.е. свидетельствуют об окислении молекул воды либо гетерогенным кластером, либо димером марганца. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что частичное замещение катионов марганца в КВК катионами железа не оказывает влияния на перенос электрона на акцепторной стороне  $\text{ФС}2$ . Установлено, что в препаратах  $\text{ФС}2(3\text{Mn},1\text{Fe})$  форма КИФ аналогична форме КИФ в  $\text{ФС}2(2\text{Mn},2\text{Fe})$ , но имеет немного больший уровень максимального выхода флуоресценции  $F_{\text{max}}$ . В присутствии экзогенного кальция скорость переноса электронов в препаратах  $\text{ФС}2(3\text{Mn},1\text{Fe})$  значительно (в два раза) возрастает, тогда как в  $\text{ФС}2(2\text{Mn},2\text{Fe})$  кальций практически не влияет на электронный транспорт. В  $\text{ФС}2$  без катионов марганца в КВК ( $\text{ФС}2(-\text{Mn})$ ) КИФ достигает максимума (так называемый пик К), после чего уровень выхода флуоресценции снижается в результате окисления восстановленного первичного пластохинона  $Q_A^-$  и отсутствия притока электронов с донорной стороны  $\text{ФС}2$ . Включение катионов железа вместо катионов марганца в препараты  $\text{ФС}2(-\text{Mn})$  приводит к насыщению флуоресценции и исчезновению пика К, вероятно, в результате замедления процесса рекомбинации зарядов между восстановленным пластохиноном  $Q_A^-$  и окисленным тирозином  $Y_Z^{++}$ , являющимся переносчиком электронов между КВК и первичным донором электронов P680.

**Ключевые слова:** фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, кинетика индукции флуоресценции, марганец, железо, кальций

Оксигенный фотосинтез является практически единственным источником кислорода на нашей планете. Реакцией, продуцирующей молекулярный кислород в процессе фотосинтеза, является окисление молекул воды, сопровождающееся синтезом межмолекулярной связи между двумя атомами кислорода двух молекул воды. Данная фундаментальная реакция осуществляется фотосистемой 2 (ФС2) – мембранным пигмент-белковым комплексом у высших растений, водорослей и цианобактерий. Процесс катализируется каталитическим центром  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ , состоящим из 4 катионов марганца, одного катиона кальция и пяти атомов кислорода, связывающих катионы металлов между собой [1], и называемым кислород-выделяющим комплексом (КВК). Рентгеноструктурный анализ с разрешением  $1,9 \text{ \AA}$  [1] позволил выявить также 4 молекулы воды внутри кластера и идентифицировать лиганды,

связывающие его. Согласно полученным данным, марганцевый кластер КВК представляет собой неправильный куб, образованный тремя катионами марганца и катионом  $\text{Ca}^{2+}$  вместе с кислородными мостиками. Один катион марганца расположен отдельно и соединен с кубом двумя кислородными мостиками. Однако, несмотря на доступность в настоящее время аккуратной, полученной с высоким разрешением атомной структуры КВК, механизм водоразлагающей реакции  $\text{ФС}2$  до сих пор остается во многом непонятным.

Согласно Армстронгу [2] “химия Fe очень напоминает химию Mn, и катализаторы, расщепляющие воду, на основе Mn (или Fe) крайне желательны”. Искусственные катализаторы окисления воды на основе железа в настоящее время исследуются [3, 4]. В предыдущих работах мы разработали методы замещения катионов марганца в КВК

катионами железа с целью исследования возможности участия вторых в реакции окисления воды [5–8]. Было обнаружено, что катионы железа с высокой эффективностью связываются с марганец-связывающими участками КВК в ФС2, из которой предварительно были удалены катионы марганца [5, 6]. Кроме того, нами был разработан метод замещения отдельных катионов марганца катионами железа и получены препараты ФС2, в которых 2 катиона марганца [7] или 1 катион марганца [8] замещены катионами железа. В настоящей работе мы исследовали полученные препараты с использованием метода измерения кинетики индукции флуоресценции (КИФ), позволяющего изучать особенности переноса электрона в ФС2.

### Материалы и методы

**Мембранные фрагменты, обогащенные ФС2** (так называемый препарат ВВУ-типа, название которого образовано из начальных букв фамилий авторов исходной методики), были приготовлены из рыночного шпината согласно методу Ганотакиса и Бабкока [9]. Кислород-выделяющая активность была измерена полярографически и варьировала в пределах 450–550 мкмоль  $O_2$  на 1 мг хлорофилла (Хл) в час при использовании в качестве экзогенного акцептора электронов 0,2 мМ 2,6-дихлоро-1,4-бензохинона. Препараты хранили при температуре  $-80^\circ C$  в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу и 50 мМ 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (рН 6,5). Концентрацию хлорофилла определяли по методу Порра и др. [10] в 80%-ном растворе ацетона.

**Скорость фотовосстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ)** определяли спектрофотометрически по изменению поглощения в области 600 нм, используя молярный коэффициент экстинкции для депротонированной формы ДХФИФ ( $\epsilon = 21,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [11]).

**Экстракцию катионов марганца из КВК ФС2** осуществляли раствором Триса. Мембраны ФС2 (0,5 мг Хл/мл) инкубировали в 1М Трис-НСl буфере (рН 9,4), содержащем 0,4 М сахарозу, в течение 30 мин при  $4^\circ C$  и комнатном освещении [12]. Далее полученный материал дважды промывали буфером А и осадок ресуспендировали в этом же буфере.

**При получении препарата ФС2(-Ca) кальций и периферические белки ФС2 PsbQ (белок с молекулярной массой 20 кДа) и PsbP (белок с молекулярной массой 17 кДа) были экстрагированы** из нативных мембран ФС2 буфером, содержащим 2 М NaCl, 0,4 М сахарозу и 25 мМ 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (рН 6,5) [13]. Препараты инкубировали в этом буфере в течение 15 мин при комнатной температуре и освещении 4–5 мкЕ/м<sup>2</sup>с. Далее полученный материал был промыт дважды буфером А.

**Измерение КИФ** проводили при постоянном насыщающем свете (1200 мкЕ/м<sup>2</sup>с) с помощью

прибора “Plant Efficiency Analyser” (Hansatech Instruments, Ltd., Англия). В качестве источника возбуждающего света использовали светодиоды ( $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ нм}$ ; спектральный диапазон 580–710 нм). Временное разрешение системы регистрации флуоресценции составляло 10 мкс (в пределах первоначальных 2 мс), 1 мс (в пределах временного интервала от 2 мс до 1 с) и 100 мс (в интервале  $>1 \text{ с}$ ). Уровень сигнала флуоресценции в точке 50 мкс после включения источника света использовали в качестве величины  $F_0$ . Время освещения образца (мембранный препарат ФС2 с концентрацией 25 мкг Хл/мл) составляло 2 с. При построении графиков КИФ использована общепринятая логарифмическая шкала.

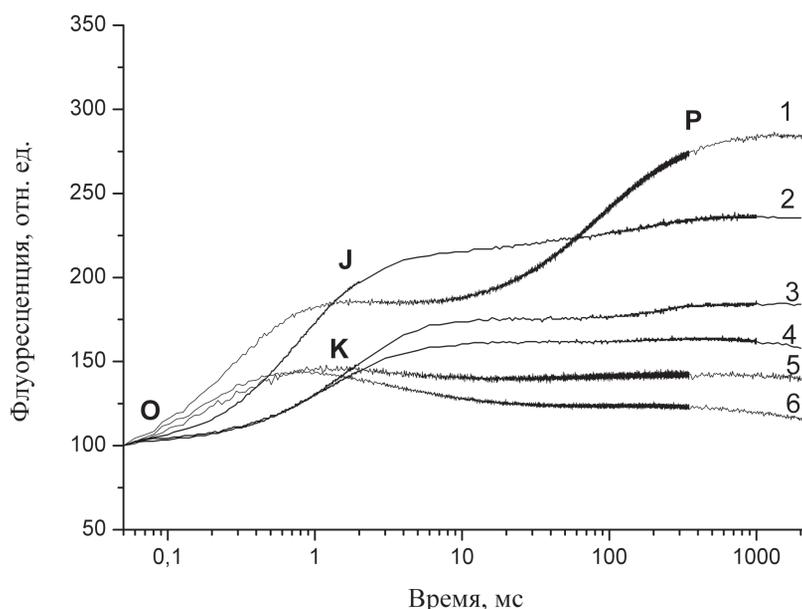
**Препараты ФС2, содержащие в КВК гетерогенный кластер 2Mn2Fe (ФС2(2Mn,2Fe))**, были получены по методу Семина и Сэйберта [7]. Мембраны ФС2(-Ca) (100 мкг Хл/мл) инкубировали с сульфатом железа (концентрация  $Fe^{2+}$  20 мкМ) в течение 120 мин в темноте при  $4^\circ C$  в буфере А (рН 6,5). После инкубации мембраны были осаждены центрифугированием, промыты и ресуспендированы в буфере А. Полученные мембранные фрагменты содержат на один реакционный центр 2 катиона Mn и 2 катиона  $Fe^{3+}$ . Один из катионов железа координируется остатком аспарагиновой аминокислоты D-170 высокоаффинного Mn-связывающего участка в КВК [7].

**Препараты ФС2, содержащие в КВК гетерогенный кластер 3Mn1Fe (ФС2(3Mn,1Fe))**, были получены по методу Семина и Сэйберта [8]. Метод получения таких препаратов практически идентичен методу получения препаратов ФС2(2Mn,2Fe) за исключением того, что инкубацию в присутствии катионов железа проводили в буфере А с рН 5,7.

**Получение препарата с заблокированным катионами железа высокоаффинным Mn-связывающим участком (ФС2(-Mn,+Fe))** было выполнено согласно методу, описанному в работе [14]. Мембраны ФС2(-Mn) (25 мкг Хл/мл) инкубировали в буфере А (рН 6,5), содержащем 15 мкМ  $Fe^{2+}$ , в течение 3 мин при слабом освещении (около 5 мкЕ/м<sup>2</sup>с) и постоянном перемешивании. После инкубации препараты были осаждены центрифугированием, промыты и ресуспендированы в буфере А. Препарат содержит катионы железа вместо катионов марганца в КВК.

### Результаты и обсуждение

КИФ исследованных препаратов ФС2 представлены на рисунке. В качестве контрольных препаратов были изучены мембранные фрагменты нативной ФС2 (рисунок, кривая 1), препараты ФС2(-Ca), не содержащие периферических белков PsbP и PsbQ и катион  $Ca^{2+}$  в КВК (рисунок, кривая 2) и препараты ФС2(-Mn), из которых экстрагирован марганцевый кластер совместно с периферическими белками и катионом кальция (рисунок, кривая 6).



**Рисунок.** Кривые индукции флуоресценции хлорофилла *a* в различных мембранных препаратах ФС2 (25 мкг Хл на 1 мл) в буфере А: 1 — интактные мембранные препараты ФС2; 2 — PSII(-Ca); 3 — PSII(3Mn,1Fe); 4 — PSII(2Mn,2Fe); 5 — PSII(-Mn,+Fe); 6 — PSII(-Mn)

**Препарат ФС2.** Кинетика флуоресценции нативных препаратов ФС2 (рисунок, кривая 1) возрастает от минимального уровня О до уровня Р (максимум) с промежуточным максимумом J. Штрассер и Говинджи [15] предположили, что J-фаза отражает накопление восстановленного первичного пластохинонного акцептора  $Q_A^-$ , что было подтверждено последующими экспериментальными работами, тогда как P-фаза обусловлена полным восстановлением первичного и вторичного пластохинонов.

**Препарат ФС2(-Ca).** Экстракция катиона  $Ca^{2+}$  из КВК совместно с периферическими белками PsbP и PsbQ приводит практически к полному ингибированию реакции выделения кислорода, тогда как ингибирование реакции восстановления экзогенного акцептора электронов ДХФИФ при этом значительно менее эффективно (таблица). Этот эффект получил название “разобщение” [16]. Исследование механизма эффекта “разобщения” показало, что наличие электронного транспорта в отсутствие выделения кислорода обусловлено неполным окислением воды — не до  $O_2$ , а до  $H_2O_2$ , т.е. в препаратах ФС2(-Ca) окисление воды до  $H_2O_2$  обеспечивает генерацию электронов, а  $O_2$  не выделяется [17]. Помимо эффекта “разобщения” экстракция  $Ca^{2+}$  и белков PsbP, PsbQ вызывает замедление скорости переноса электрона от  $Q_A^-$  к  $Q_B$ . Причиной ингибирования переноса электронов между пластохинонами является значительное повышение редокс-потенциала окисления  $Q_A^-$  [18] в результате экстракции белков PsbP и PsbQ [19, 20].

Вышеперечисленные эффекты, наблюдаемые при экстракции катиона кальция из КВК совместно с периферическими белками PsbP и PsbQ, отражаются в форме КИФ препаратов ФС2(-Ca) (рисунок, кривая 2). Уровень выхода флуоресценции уменьшается, но несущественно, что свидетель-

ствует о высокой скорости транспорта электронов в препарате, позволяющей эффективно восстанавливать пластохинон  $Q_A$ . В тоже время участок J-P кривой 2 гораздо более пологий, чем в кривой 1. Данный факт свидетельствует о том, что перенос электрона от  $Q_A^-$  к  $Q_B$  затруднен. Это подтверждает результаты предыдущих исследований [19, 20].

**Препарат ФС2(-Mn).** Известно, что экстракция катионов марганца из КВК сопровождается значительным изменением формы КИФ. В мембранах ФС2(-Mn), которые могут переносить только 1 электрон от донорной стороны к акцепторной, форма КИФ значительно отличается от формы КИФ в интактных препаратах ФС2 и препаратах ФС2(-Ca) (рисунок). В мембранных фрагментах ФС2(-Mn) кривая КИФ достигает максимума (пик К), а затем уменьшается вследствие того, что нет притока электронов от КВК к  $Q_A$ , чтобы продолжать восстанавливать  $Q_A$ , который достаточно быстро окисляется  $Q_B$  или  $Y_Z^+$  (реакция рекомбинации) [7]. Поэтому в препаратах ФС2(-Mn) фаза O-J трансформируется в пик К (рисунок, кривая 6).

Используя описанные выше КИФ, мы исследовали КИФ препаратов, в которых полностью или частично катионы Mn были замещены катионами железа. Ниже представлено описание КИФ этих препаратов.

**Препарат ФС2(-Mn,+Fe).** После инкубации частиц ФС(-Mn) с катионами  $Fe^{2+}$  один из окисленных катионов Fe связывается с высокоаффинным Mn-связывающим участком и блокирует его, т.е. препятствует связыванию катиона  $Mn^{2+}$  с этим участком. Активность препарата при этом не изменяется (см. таблицу), однако форма КИФ претерпевает некоторые изменения (рисунок, кривая 5) — пик К исчезает, появляется ровный участок насыщения флуоресценции. Подобный эффект не

связан с появлением дополнительных электронов в системе, так как электронный транспорт в этих препаратах отсутствует (таблица). Объяснением данного эффекта может быть замедление реакции рекомбинации между  $Q_A^-$  и  $Y_Z^+$ , которое мы наблюдали ранее [6].

Таблица

Скорость восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) в препаратах ФС2 с различным содержанием катионов марганца в КВК

Препарат	Скорость восстановления ДХФИФ мкмоль ДХФИФ · мг Хл <sup>-1</sup> · час <sup>-1</sup> (%)	
	-Ca <sup>2+</sup>	+Ca <sup>2+</sup>
ФС2	132±5 (100%±4)	143±5,5 (108%±4)
ФС2(-Ca)	91±5 (69%±3)	107±4 (81%±3)
ФС2(3Mn,1Fe)	29±2 (22%±2)	58±4 (43%±3)
ФС2(2Mn,2Fe)	22±3 (17%±2)	29±5 (22%±4)
ФС2(-Mn)	7±2 (5%±1)	6±2 (5%±1)
ФС2(-Mn,+Fe)	6±1 (5%±1)	7±2 (6%±2)

Скорость восстановления ДХФИФ была измерена после инкубации препаратов ФС2 (20 мкг Хл/мл) в буфере А (рН 6,5) в течение 10 мин в темноте при 4°C в присутствии 30 мМ CaCl<sub>2</sub> или без кальция. Величина 100% соответствует скорости восстановления ДХФИФ интактными мембранами ФС2. В таблице приведены средние значения 3–5 измерений и указаны стандартные отклонения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å // *Nature*. 2011. Vol. 473. N 7345. P. 55–65.
2. Armstrong F.A. Why did Nature choose manganese to make oxygen? // *Philos. T. Roy Soc. B*. 2008. Vol. 363. N 1494. P. 1263–1270.
3. Herbert D.E., Lionetti D., Rittle J., Agapie T. Heterometallic triiron-oxo/hydroxo clusters: effect of redox-inactive metals // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135. N 51. P. 19075–19078.
4. Singh A., Spiccia L. Water oxidation catalysts based on abundant 1st row transition metals // *Coordin. Chem. Rev.* 2013. Vol. 257. N 17–18. P. 2607–2622.
5. Semin B.K., Parak F. Coordination sphere and structure of the Mn cluster of the oxygen-evolving complex in photosynthetic organisms // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 400. N 3. P. 259–262.
6. Semin B.K., Ghirardi M.L., Seibert M. Blocking of electron donation by Mn(II) to YZ' following incubation of Mn-depleted photosystem II membranes with Fe(II) in the light // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41. N 18. P. 5854–5864.

*Препарат ФС2(2Mn,2Fe)*. Замещение двух катионов марганца катионами железа в препаратах ФС2(-Ca) приводит к полному ингибированию реакции выделения кислорода [7], однако система окисления воды частично продолжает работать, о чем свидетельствует реакция восстановления ДХФИФ (остаточная активность восстановления ДХФИФ около 17% – таблица). Эта реакция генерирует электроны, обеспечивающие отсутствие пика К в КИФ. Форма КИФ препарата ФС2(2Mn,2Fe) соответствует форме КИФ препарата ФС2(-Ca), но максимальный уровень флуоресценции  $F_{max}$  меньше, что объясняется меньшей электрон-транспортной активностью препаратов ФС2(2Mn,2Fe) в сравнении с активностью препаратов ФС2(-Ca) (таблица). Полученные результаты также свидетельствуют об отсутствии влияния катионов железа, связанных в КВК, на перенос электрона на акцепторной стороне ФС2.

*Препарат ФС2(3Mn,1Fe)*. Отличительной и очень важной особенностью данного препарата является его способность окислять воду до молекулярного кислорода. Кислород-выделяющая активность (в присутствии Ca<sup>2+</sup>) составляет 27% от активности нативной ФС2 [8]. Скорость восстановления ДХФИФ в присутствии Ca<sup>2+</sup> возрастает вдвое (таблица) и этот факт подтверждает протекание в препарате Ca-зависимой реакции окисления воды до O<sub>2</sub>, тогда как в препаратах ФС2(2Mn,2Fe), не выделяющих кислород, добавление кальция практически не влияет на скорость электронного транспорта. В отсутствие Ca<sup>2+</sup> скорость электронного транспорта лишь немного больше скорости переноса электрона в препарате ФС2(2Mn,2Fe) (таблица). Это обстоятельство определяет небольшую разницу в уровне  $F_{max}$  этих препаратов (рисунок).

7. Semin B.K., Seibert M. Substituting Fe for two of the four Mn ions in photosystem II-effects on water-oxidation // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2016. Vol. 48. N 3. P. 227–240.
8. Semin B.K., Davletshina L.N., Seibert M., Rubin A.B. Creation of a 3Mn/1Fe cluster in the oxygen-evolving complex of photosystem II and investigation of its functional activity // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. Vol. 178. P. 192–200.
9. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 153. N 1. P. 231–234.
10. Porra R.J., Tompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. Vol. 975. N 3. P. 384–394.
11. Armstrong J.M. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenolindophenol // *Biochim. Biophys. Acta*. 1964. Vol. 86. N 1. P. 194–197.
12. Preston C., Seibert M. The carboxyl modifier 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl]carbodiimide (EDC) inhibits half of the high-affinity manganese-binding site in photosys-

tem II membrane fragments // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. N 40. P. 9615–9624.

13. Ono T., Inoue Y. Abnormal redox reactions in photosynthetic O<sub>2</sub>-evolving centers in NaCl/EDTA-washed PS II. A dark-stable EPR multiline signal and an unknown positive charge accumulator // *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. Vol. 1020. N 3. P. 269–277.

14. Semin B.K., Lovyagina E.R., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Iron blocking the high-affinity Mn-binding site in photosystem II facilitates identification of the type of hydrogen bond participating in proton-coupled electron transport via YZ // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. N 28. P. 9746–9757.

15. Strasser R.J., Govindjee. On the O–J–I–P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Research in Photosynthesis* / Ed. M. Murata. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1992. Vol. 2. P. 29–32.

16. Semin B.K., Davletshina L.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Uncoupling of processes of molecular synthesis and electron transport in the Ca<sup>2+</sup>-depleted PSII membranes // *Photosynth. Res.* 2008. Vol. 98. N 1–3. P. 235–249.

17. Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca<sup>2+</sup>-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // *Photosynth. Res.* 2013. Vol. 117. N 1–3. P. 385–399.

18. Johnson G.N., Rutherford A.W., Krieger A. A change in the midpoint potential of the quinone Q<sub>A</sub> in Photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. Vol. 1229. N 2. P. 202–207.

19. Roose J.L., Frankel L.K., Bricker T.M. Documentation of significant electron transport defects on the reducing side of photosystem I upon removal of the PsbP and PsbQ extrinsic proteins // *Biochemistry*. 2010. Vol. 49. N 1. P. 36–41.

20. Semin B.K., Davletshina L.N., Mamedov M.D. Effect of different methods of Ca<sup>2+</sup> extraction from PSII oxygen evolving complex on the Q<sub>A</sub>-oxidation kinetics // *Photosynth. Res.* 2018. Vol. 136. N 1. P. 83–91.

Поступила в редакцию  
10.03.2018

Принята к печати  
30.05.2018

## BIOPHYSICS

### FLUORESCENCE INDUCTION KINETICS IN THE MEMBRANE PREPARATION OF PHOTOSYSTEM II WITH HETEROGENEOUS METAL CLUSTERS (Mn/Fe) IN THE OXYGEN-EVOLVING COMPLEX

L.N. Davletshina\*, B.K. Semin

*Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow 119234, Russia*  
\*email: davlet@biophys.msu.ru

Transport of electrons in the spinach photosystem II (PSII) with oxygen-evolving complex (OEC) containing heterogeneous metal clusters 2Mn2Fe and 3Mn1Fe was investigated using the method of fluorescence induction kinetic (FIK) measurement. Preparations of PSII(2Mn,2Fe) and PSII(3Mn,1Fe) were produced using Ca-depleted PSII membranes (PSII(-Ca)). We found that FIK in PSII(2Mn,2Fe) membranes are similar to FIK form in PSII(-Ca) samples but have lower fluorescence yield. Our results demonstrate the existence the electron transfer from metal cluster in the OEC to primary plastoquinone electron acceptor Q<sub>A</sub> as well as in PSII(-Ca) preparations and show that substitution of Mn with Fe doesn't effect on the electron transport on the PSII acceptor side. Thus these data demonstrate the possibility of water oxidation by heterogeneous metal cluster or water oxidation by only Mn dimer. We established that the form of FIK in PSII(3Mn,1Fe) preparations resembles the FIK in PSII(2Mn,2Fe) membranes. Yield of maximal fluorescence yield F<sub>max</sub> is larger but not significantly. The rate of electron transfer in the presence of Ca<sup>2+</sup> rises significantly (2 times) whereas Ca<sup>2+</sup> has no influence in PSII(2Mn,2Fe) membranes which don't evolve oxygen. In the Mn-depleted PSII membranes FIK reach maximum (so-called peak K) then decreases as consequence of Q<sub>A</sub><sup>-</sup> oxidation and absence of electron input. Insertion of Fe cations instead of Mn provides the fluorescence saturation and disappearance of peak K possibly due to the delay of recombination process between reduced primary electron acceptor Q<sub>A</sub><sup>-</sup> and oxidized tyrosine Y<sub>Z</sub><sup>+</sup> – electron carrier between OEC and primary electron donor P680.

**Keywords:** *photosystem II, oxygen-evolving complex, fluorescence induction kinetic, manganese, iron, calcium*

#### Сведения об авторах

*Давлетшина Лира Назиповна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: davlet@biophys.msu.ru

*Семин Борис Константинович* – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: semin@biophys.msu.ru

## БИОФИЗИКА

УДК 57.032

ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ФОСФОРНОГО ГОЛОДАНИЯ  
В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*  
IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE)А.Г. Кузнецов<sup>1</sup>, С.И. Погосян<sup>1</sup>, И.В. Конохов<sup>1</sup>, С.Г. Васильева<sup>2</sup>,  
А.А. Лукьянов<sup>2</sup>, В.С. Зотов<sup>3</sup>, Л. Недбал<sup>4</sup>, А.Е. Соловченко<sup>2,5,\*</sup><sup>1</sup>Кафедра биофизики и <sup>2</sup>кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2;<sup>4</sup>Институт биологии и геологии (IBG-2), Исследовательский центр Юлих (FZJ), Германия, 52428, г. Юлих, Вилем-Йонен штрассе, 2;<sup>5</sup>Евразийский центр по продовольственной безопасности, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Исследования влияния обеспеченности неорганическим фосфором ( $P_i$ ), важным биогенным элементом, на рост и физиологические параметры одноклеточных водорослей важны для определения динамики численности и продуктивности фитопланктона в природных экосистемах и промышленных системах с целью культивирования этих организмов. Затруднения при проведении таких исследований связаны со сложной кинетикой поглощения  $P_i$  клетками и способностью микроводорослей к внутриклеточному запасанию фосфора. В этой связи необходимы эффективные способы экспресс-мониторинга состояния культур микроводорослей. Данным критериям отвечают методы, основанные на регистрации оптических свойств клеток, таких как поглощение и рассеяние света культурами и флуоресценции содержащегося в клетках хлорофилла. В настоящей статье описаны результаты мониторинга культуры зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, культивируемой в среде, не содержащей фосфора. Установлено, что и оптические (поглощение света в полосах фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и каротиноидов), и люминесцентные (переменная флуоресценция хлорофилла) параметры отражают состояние культуры. При регистрации оптических свойств необходима коррекция вклада светорассеяния в общее ослабление света суспензиями клеток микроводорослей, при этом сам по себе уровень светорассеяния является точной мерой общего количества взвешенных частиц в суспензии. Однако мониторинг культур, содержащих значительное количество светорассеивающих частиц без фотосинтетических пигментов (таких как гетеротрофные бактерии) затруднен. Для подобных культур оптимальным является использование переменной флуоресценции – например, параметра Fv/Fm, отражающего максимальную фотохимическую эффективность фотосистемы II.

**Ключевые слова:** микроводоросли, светорассеяние, фосфорное голодание, флуоресценция хлорофилла, фотобиореактор, *Chlorella vulgaris*

Фосфор – ключевой биогенный элемент, критически важный для хранения и передачи энергии и информации в живой клетке, в том числе в клетке одноклеточных водорослей (микроводорослей) [1]. Для большинства водных экосистем характерны олиготрофные условия; именно обеспеченность фосфором во многих случаях определяет динамику численности и продуктивности фитопланктона. Неконтролируемый сброс обогащенных фосфором сточных вод вызывает вспышки численности («цветение») микроводорослей, в том числе токсичных, и эвтрофикацию в природных водоемах. С другой стороны, культивирование микроводорослей считается перспективным способом биологической очистки сточных вод, обеспечивающим устойчивое использование невозобновляемых ресурсов фосфора [2, 3].

В этой связи крайне важно понимание связи между обеспеченностью фосфором, кинетикой роста (деления) и функциональным состоянием клеток микроводорослей. Однако исследование этих зависимостей у микроводорослей затруднено сложной кинетикой поглощения фосфора из среды, а также обилием и многообразием внутриклеточных ресурсов фосфора у этих организмов [4]. Методы аналитического определения содержания фосфора в средах и биологических объектах сложны и требуют много времени, а зачастую и дорогостоящего оборудования. Необходимы экспресс-методы для наблюдения за состоянием культур и надежной регистрации стрессовых состояний, вызванных дефицитом фосфора, а также изменений, вызванных возобновлением фосфорного питания.

Вышеизложенным критериям отвечают методы, основанные на регистрации оптических свойств клеток, таких как поглощение и рассеяние света культурами, а также флуоресценции содержащегося в клетках хлорофилла. В настоящее время это методы широко применяются для оценки состояния микроводорослей и его изменений под влиянием дефицита либо избытка азота в природных водоемах [5, 6] и искусственных культивационных системах (фотобиореакторах) [7–10]. Однако публикаций, посвященных оптическому мониторингу изменений при фосфорном голодании и выходе из него, среди доступных нам источников не оказалось. Одна из ключевых трудностей при использовании оптических методов мониторинга культур связана с выбором подходящих спектральных индексов и (или) флуоресцентных параметров. В настоящей статье описаны результаты использования оптических методов для мониторинга фосфорного голодания зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1.

### Материалы и методы

Штамм *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 получен из коллекции IPPAS (Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН). Клетки культивировали на полной BG-11 [11] либо лишенной фосфора (BG-11/-P) среде в кольцевом фотобиореакторе собственной конструкции (толщина слоя суспензии – 2 см, объем – 2 л) при температуре 28°C, интенсивность света – 130 мкмоль квантов ФАР·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и продувании атмосферным воздухом. Культивирование вели при постоянном pH 7,0–7,5, который поддерживали прямым введением в культуру CO<sub>2</sub> через магнитный клапан, управляемый pH-контроллером собственной конструкции.

Предкультуру *C. vulgaris* выращивали в 300 мл полной среды BG-11 в колбах Эрленмейера (500 мл) в шейкере-инкубаторе INNOVA 44R (New Brunswick, США) при 28°C, 70 мкмоль квантов ФАР·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, 120 об./мин. Перед культивированием в фотобиореакторе клетки собирали центрифугированием (5 мин при 3000 g), отмывали средой BG-11/-P и ресуспендировали в 2 л той же среды (начальная оптическая плотность при 678 нм – 0,5). При культивировании поддерживали оптическую плотность (далее по тексту – OD, optical density) при 678 нм, OD<sub>678</sub>, ниже 0,5 единиц, ежедневно разбавляя культуру средой BG-11/-P. Моментом наступления фосфорного голодания считали момент прекращения деления клеток. Для возобновления роста культуры в течение суток с этого момента добавляли P<sub>i</sub> в виде KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (конечная концентрация – 180 мкмоль/л).

Число и размерное распределение клеток в образцах суспензии определяли с помощью анализатора частиц Multisizer 3 (Beckman-Coulter, США). Визуально состояние культуры контролировали под оптическим микроскопом DM2500 (Leica, Германия). Содержание неорганического фосфата (P<sub>i</sub>)

в среде и общего фосфора в клетках определяли с использованием хромогенной реакции с молибденовым синим [12]. Содержание нитратного азота в среде определяли методом ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа ICS 1600 (Thermo Scientific, США). Регистрацию кривых индукции флуоресценции хлорофилла и спектров оптического поглощения суспензии осуществляли с помощью проточных детекторов собственной конструкции согласно ранее описанному протоколу [13, 14].

Измеренные спектры поглощения корректировали на светорассеяние следующим образом [13, 15]: снимали спектры  $D(\lambda)$  при стандартном расположении кюветы вблизи входного окна интегрирующей сферы спектрофотометра и на расстоянии 1 см от нее, что соответствовало углам сбора света  $\gamma_0$  и  $\gamma_1$ . Спектры поглощения, компенсированные на рассеяние, рассчитывали как

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; \gamma_1) - [D_{\text{NIR}}^1 / (D_{\text{NIR}}^1 - D_{\text{NIR}}^0)] \times [D(\lambda; \gamma_1) - D(\lambda; \gamma_0)],$$

где  $\tilde{A}(\lambda)$  – спектр, компенсированный на светорассеяние;  $D(\lambda; \gamma_0)$  – спектр, записанный при стандартном расположении кюветы;  $D(\lambda; \gamma_1)$  – спектр, записанный при удаленном расположении кюветы;  $D_{\text{NIR}}^1$ ,  $D_{\text{NIR}}^0$  – оптическая плотность в ближней инфракрасной области (760–800 нм), в которой пигменты не обладают заметным поглощением.

Кривые индукции флуоресценции хлорофилла записывали на флуориметре Mega-25, разработанном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ [5]. Для возбуждения флуоресценции использован синий светодиод (450 нм, 7500 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). Флуоресценция детектируется в области 670–800 нм. Продолжительность записи кривой индукции 1 с. На основе зарегистрированных кривых индукции флуоресценции хлорофилла рассчитывали отражающий максимальную квантовую эффективность фотохимических реакций в фотосистеме II параметр Fv/Fm:

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm,$$

где Fm – максимальная, а Fo – минимальная интенсивность флуоресценции хлорофилла [6, 7].

Культивационные эксперименты проводили в трех последовательных независимых повторностях (циклах), результаты которых представлены на рисунках. Для расчета коэффициентов корреляции в программе Origin 8.0 (Microcal, США) результаты, полученные во всех циклах, объединяли ( $n = 37$ ; коэффициенты корреляции достоверны на уровне значимости 0,01).

### Результаты и обсуждение

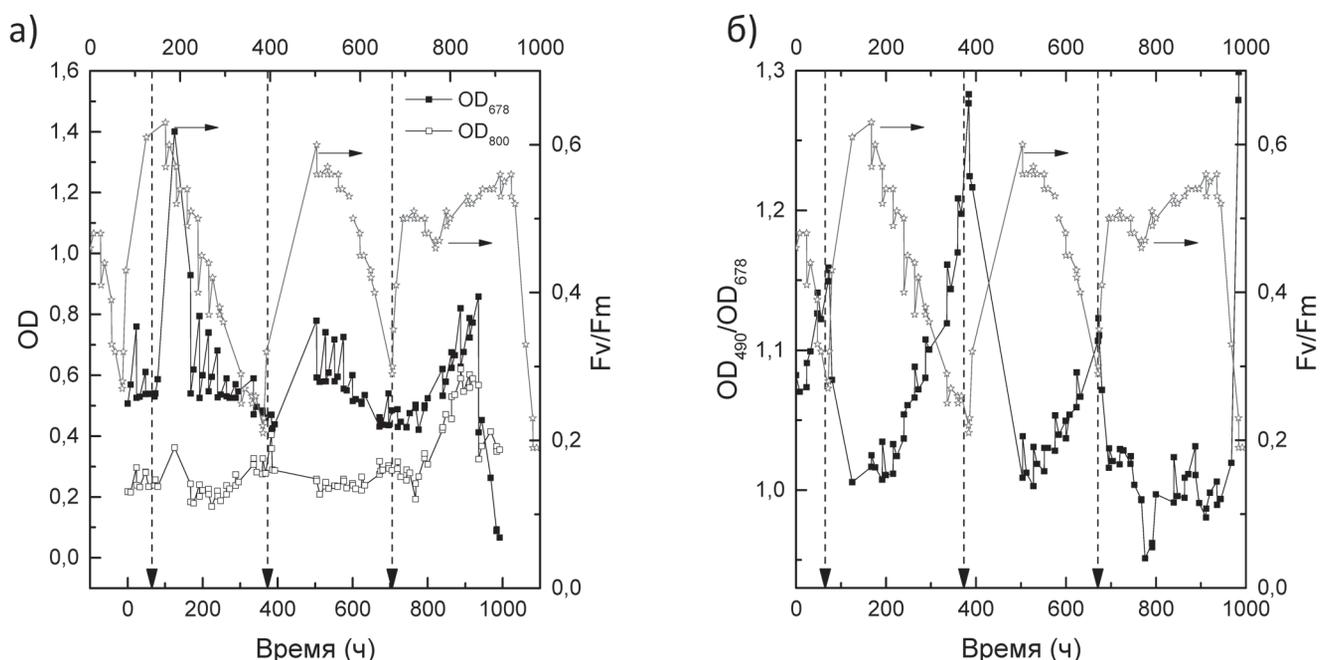
В настоящей работе регистрировали значительное количество данных о культуре, включая спектры поглощения в диапазоне 400–800 нм и кривые ин-

дукции флуоресценции хлорофилла с временным разрешением 1 мкс. В итоге для исследования были отобраны значения поглощения в области длинноволнового максимума поглощения хлорофилла (678 нм) и в полосе совместного поглощения хлорофиллов и каротиноидов в синей области (490 нм). Оптическую плотность в этих полосах анализировали как по отдельности, так и в виде отношения  $OD_{490}/OD_{678}$  (рис. 1). Данное отношение является чувствительным индикатором величины стресса у микроводорослей, в том числе стресса, вызванного дефицитом биогенных элементов [10, 14]. Кроме того, использовали значения оптической плотности в ближней ИК-области (800 нм), свободные от влияния поглощения света пигментами, но несущие информацию о числе, размерах и форме клеток и иных частиц в образцах суспензии [13]. На основании кривых индукции флуоресценции хлорофилла рассчитывали показатель  $Fv/Fm$ , широко применяемый для диагностики физиологического состояния микроводорослей [7–10].

Условия культивационных экспериментов были подобраны так, чтобы создать в культуре микроводорослей дефицит фосфора, но исключить дефицит других элементов минерального питания и дефицит световой энергии. Существенно, что в первые несколько суток после ресуспендирования клеток *C. vulgaris* в бесфосфорной среде рост культуры продолжался и культуру требовалось разбавлять во избежание лимитирования роста клеток недостатком световой энергии (рис. 1). По всей видимости, задержка фенотипического проявления дефицита фосфора совпадает с периодом расходования внут-

риклеточных резервов фосфора [16]. Лишь через 48–72 ч наблюдали замедление, а затем остановку деления клеток. Через 2–4 ч после добавления в среду  $P_i$  (конечная концентрация – 180 мкмоль/л) деление клеток возобновлялось. Следует отметить, что добавленный  $P_i$  уже через 2 ч был полностью поглощен клетками микроводорослей (данные не приводятся). Типичный эксперимент включал три последовательных цикла добавления–поглощения  $P_i$  (рис. 1).

Эти процессы сопровождалась направленными изменениями оптических свойств суспензии, отражающими как увеличение числа клеток, так и накопление фотосинтетических пигментов в культуре (рис. 1А). При этом кинетика изменений отношения  $OD_{490}/OD_{678}$  в каждом цикле эксперимента была двухфазной: при действии дефицита фосфора оно увеличивалось, достигая максимума в момент остановки деления клеток, а после добавления  $P_i$  – снижалось (рис. 1Б). Судя по параллельно регистрируемым изменениям  $OD_{678}$ , отражающим динамику содержания хлорофилла, и по ранее опубликованным данным [10, 14], такие изменения  $OD_{490}/OD_{678}$  свидетельствуют о редукации фотосинтетического аппарата (снижении содержания хлорофилла) при акклимации к дефициту фосфора на фоне действия света высокой интенсивности ( $130 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  ФАР). Тенденция изменений показателя  $Fv/Fm$ , основанного на флуоресценции хлорофилла, была противоположной (рис. 1А, Б, правая шкала): стресс, вызванный дефицитом фосфора, приводил к снижению эффективности фотохимических реакций и, как следствие, к падению переменной



**Рис. 1.** Динамика оптической плотности (OD) и переменной флуоресценции хлорофилла ( $Fv/Fm$ ) в культурах микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 при дефиците  $P_i$  (см. Материалы и методы). А – динамика оптической плотности в полосе длинноволнового максимума поглощения хлорофилла (678 нм) и в ближней ИК-области (800 нм), Б – динамика отношения  $OD_{490}/OD_{678}$ . На панелях А и Б по правой шкале отображается переменная флуоресценция хлорофилла. Пунктирные стрелки – моменты добавления  $P_i$  (конечная концентрация – 180 мкмоль/л) в среду культивирования

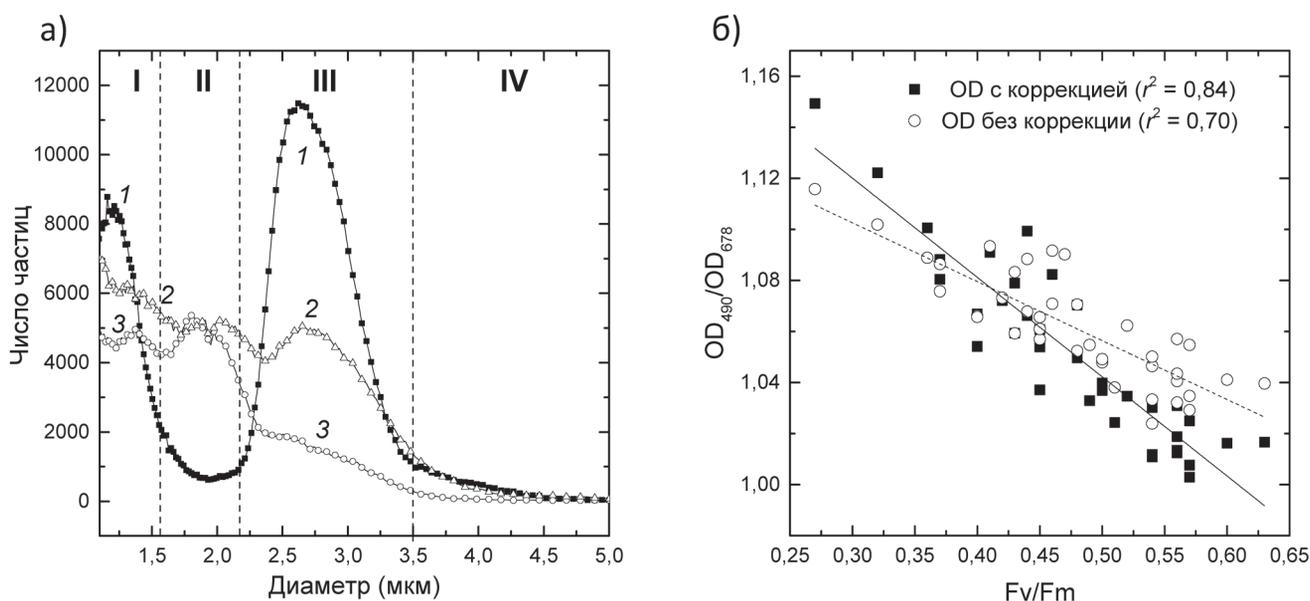
флуоресценции хлорофилла. Вероятной причиной этого процесса является индукция нефотохимического тушения – распространенного ответа микроводорослей на действие стрессоров различной природы [17, 18].

Следует отметить, что эффективность оптического показателя интенсивности стресса ( $OD_{490}/OD_{678}$ ) из-за дефицита фосфора зависела от наличия в суспензии частиц, рассеивающих свет, но не содержащих фотосинтетические пигменты, следовательно, и от коррекции вклада светорассеяния (рис. 2; см. также другие работы [13, 14]). Результаты анализа распределения частиц в образцах суспензий, взятых на разных этапах эксперимента, показали, что в наших экспериментальных условиях культуры в логарифмической фазе роста (кривая 1 на рис. 2А) содержат преимущественно клетки микроводоросли (диаметр около 4 мкм) и фракцию мелких частиц (<1 мкм), представленную, вероятно, обломками клеток, гетеротрофными бактериями и иными частицами. На ранней и, в особенности, на поздней стационарной стадии роста (кривые 2 и 3 на рис. 2А) доля мелких частиц возрастала, появлялись частицы размером около 2 мкм (клетки бактерий). При этом численность клеток микроводорослей в культурах, испытывающих сильный дефицит фосфора (кривая 3 на рис. 2А), значительно снижалась. Накопление светорассеивающих частиц значительно увеличивало мутность суспензии ( $OD_{800}$  на рис. 1А). Это снижало силу корреляции между оптическим ( $OD_{490}/OD_{678}$ ) и люминесцентным ( $Fv/Fm$ ) параметрами, отражающими состояние культуры (до  $r^2 = 0,70$ ; рис. 2Б). При расчете показателя  $OD_{490}/OD_{678}$  с использованием

значений оптической плотности, скорректированных на вклад светорассеяния [13], сила корреляции увеличивалась ( $r^2 = 0,84$ ; рис. 2Б).

Соответственно, для регистрации физиологического состояния культуры при стрессе, вызванном фосфорным голоданием, возможно использование обоих показателей. Однако для получения корректных результатов с применением  $OD_{490}/OD_{678}$  необходима компенсация вклада светорассеяния в общее ослабление света образцом суспензии. Важно отметить, что даже использование спектрофотометра с интегрирующей сферой не полностью решает эту проблему. Один из способов компенсации вклада светорассеяния требует измерения двух спектров поглощения с размещением кюветы с образцом на двух разных расстояниях от детектора [13]. Практическая реализация этого подхода в автоматизированной системе потребует использования двухканального проточного спектрометра, что дорого и не во всех случаях практично. Возможно, метод записи спектров с опаловым стеклом [19] окажется более подходящим для автоматизированных измерений спектров поглощения, скорректированных на помехи из-за потерь света, связанных со светорассеянием.

Наряду с оценкой степени фосфорного голодания, для комплексной регистрации состояния культуры необходима, как минимум, информация о динамике накопления биомассы (приросте числа клеток либо накоплении хлорофилла культурой). Подсчет клеток вручную отнимает много времени и не дает надежных результатов, проточные счетчики клеток сложны в обслуживании и дороги. Оптимальным для использования в автоматизиро-



**Рис. 2.** Влияние помех от светорассеяния на связь между оптическими и люминесцентными параметрами, отражающими физиологическое состояние клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*. А – распределение частиц по размеру в логарифмической фазе роста (1), а также в ранней (2) и поздней (3) стационарной фазе, вызванной дефицитом  $P_i$ . Размерные интервалы: I – обломки клеток, II – бактериальные клетки, III – клетки *C. vulgaris*, IV – клеточные агрегаты. Б – влияние коррекции помех от светорассеяния на связь между оптическими ( $OD_{490}/OD_{678}$ ) и люминесцентными ( $Fv/Fm$ ) параметрами, отражающими интенсивность стресса, вызванного дефицитом  $P_i$

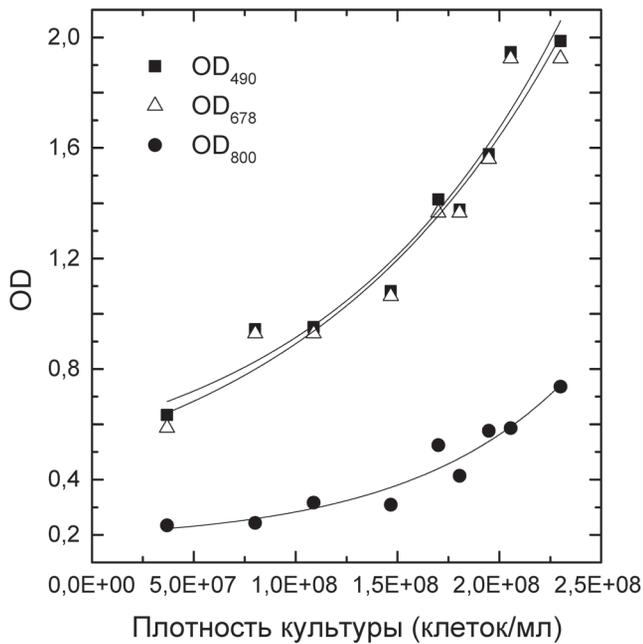


Рис. 3. Зависимость оптической плотности (OD) в полосах, использованных в данной работе, от плотности культуры. Во всех случаях вводилась поправка на вклад светорассеяния;  $r^2 > 0,93$ ,  $n = 9$

ванных системах культивирования микроводорослей представляется регистрация динамики числа клеток по косвенным показателям (изменения оптической плотности). При этом могут быть использованы спектральные полосы поглощения фотосинтетических пигментов как в видимой области,

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grossman A.R., Aksoy M. Algae in a phosphorus-limited landscape // Annual plant reviews. Vol. 48. Phosphorus metabolism in plants / Eds. W. Plaxton and H. Lambers. John Wiley & Sons, 2015. P. 337–374.
- Solovchenko A., Verschoor A.M., Jablonowski N.D., Nedbal L. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae // Biotechnol. Adv. 2016. Vol. 34. N 5. P. 550–564.
- Schreiber C., Schiedung H., Harrison L., Briese C., Ackermann B., Kant J., Schrey S.D., Hofmann D., Singh D., Ebenhöf O., Amelung W., Schurr U., Mettler-Altmann T., Huber G., Jablonowski N. D., Nedbal L. Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants // J. Appl. Phycol. 2018. DOI 10.1007/s10811-018-1390-9.
- Cembella A.D., Antia N.J., Harrison P.J. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part I // Crit. Rev. Microbiol. 1982. Vol. 10. N 4. P. 317–391.
- Antal T.K., Matorin D.N., Ilyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.I., Konyukhov I.V., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // Photosynth. Res. 2009. Vol. 102. N. 1. P. 67–76.
- Maxwell K., Johnson G. Chlorophyll fluorescence — a practical guide // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51. N 345. P. 659–668.
- Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D., Majchrowski R. Chlorophyll fluorimetry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // Oceanologia. 2004. Vol. 46. N 4. P. 519–531.
- Solovchenko A., Gorelova O., Selyakh I., Pogosyan S., Baulina O., Semenova L., Chivkunova O., Voronova E., Konyukhov I., Scherbakov P. A novel CO<sub>2</sub>-tolerant symbiotic *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Desmodesmaceae): Acclimation to and performance at a high carbon dioxide level // Algal Res. 2015. Vol. 11. P. 399–410.
- Solovchenko A., Pogosyan S., Chivkunova O., Selyakh I., Semenova L., Voronova E., Scherbakov P., Konyukhov I., Chekanov K., Kirpichnikov M., Lobakova E. Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel *Chlorella sorokiniana* strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence // Algal Res. 2014. Vol. 6. Part B. P. 234–241.
- Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in  $\Delta 5$  desaturase by nitrogen starvation and high light // J. Phycol. 2010. Vol. 46. N 4. P. 763–772.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. 1979. Vol. 111. N 1. P. 1–61.

так и за ее пределами (в ближней ИК-области) — для регистрации мутности суспензии, связанной с числом светорассеивающих частиц (клеток). В наших экспериментальных условиях оптическая плотность при 490 и 678 нм сильно коррелировала с числом клеток, равно как и экстинкция при 800 нм, при этом зависимость между указанными параметрами и числом клеток была близка к линейной (рис. 3). Существенно также, что эта корреляция сохранялась в весьма широком диапазоне плотности культуры, оптическая плотность при этом оставалась в пределах 0,2–2,0, что обеспечивало высокую фотометрическую точность метода.

Таким образом, регистрация оптических и люминесцентных параметров является удобным и надежным показателем физиологического состояния культуры микроводорослей при варьирующей обеспеченности фосфором. При этом мониторинг по поглощению света необходимо вести с поправкой на вклад светорассеяния в общее ослабление света образцом суспензии клеток микроводоросли. Силу стресса, вызванного дефицитом фосфора, адекватно отражают показатели  $O_{D490}/O_{D678}$  и  $Fv/Fm$ , связанные с функциональным состоянием фотосинтетического аппарата. Люминесцентный параметр  $Fv/Fm$  является более чувствительным и, в наших экспериментальных условиях, менее подвержен помехам от светорассеяния.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (соглашение № 14.616.21.0080).

12. Nagul E.A., McKelvie I.D., Worsfold P., Kolev S.D. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: opening the black box // *Analyt. Chim. Acta*. 2015. Vol. 890. P. 60–82.

13. Merzlyak M.N., Naqvi K.R. On recording the true absorption spectrum and the scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 2000. Vol. 58. N 2–3. P. 123–129.

14. Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Merzlyak M. Carotenoid-to-chlorophyll ratio as a proxy for assay of total fatty acids and arachidonic acid content in the green microalga *Parietochloris incisa* // *J. Appl. Phycol.* 2009. Vol. 21. N 3. P. 361–366.

15. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Maslova I.P., Naqvi K.R., Solovchenko A.E., Klyachko-Gurvich G.L. Light absorption and scattering by cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae // *Russ. J. Plant Physiol.* 2008. Vol. 55. N 3. P. 464–470.

16. Aitchison P., Butt V. The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris* // *J. Exp. Bot.* 1973. Vol. 24. N 3. P. 497–510.

17. Ruban A. V. Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protection against photodamage // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 170. N 4. P. 1903–1916.

18. Horton P. Developments in research on non-photochemical fluorescence quenching: Emergence of key ideas, theories and experimental approaches // *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria* / Eds. B. Demmig-Adams, G. Garab, W. Adams III, and Govindjee. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. P. 73–95.

19. Shibata K. Dual wavelength scanning of leaves and tissues with opal glass // *Biochim. Biophys. Acta*. 1973. Vol. 304. N 2. P. 249–259.

Поступила в редакцию  
20.04.2018

Принята к печати  
04.06.2018

## BIOPHYSICS

### POSSIBILITIES OF OPTICAL MONITORING OF PHOSPHORUS STARVATION IN SUSPENSIONS OF THE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE)

A.G. Kuznetsov<sup>1</sup>, S.I. Pogosyan<sup>1</sup>, I.V. Konyukhov<sup>1</sup>, S.G. Vasilieva<sup>2</sup>, A.A. Lukyanov<sup>2</sup>, V.S. Zotov<sup>3</sup>, L. Nedbal<sup>4</sup>, A.E. Solovchenko<sup>2,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biophysics and <sup>2</sup>Departments of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119234, Moscow, Leninskiye Gory 1–12;

<sup>3</sup>Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Russia, 119071 Moscow, Leninskii Prospekt 33–2;

<sup>4</sup>Institute of Bio- and Geosciences 2: Plant Sciences (IBG-2), Forschungszentrum Jülich (FZJ), Germany, 52428 Jülich, Leo-Brandt str;

<sup>5</sup>Eurasian Center for Food Security, Russia, 119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1–12

\*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Studies of the impact of inorganic phosphorus ( $P_i$ ), an important nutrient, on the growth and physiological parameters of single-celled algae are important for investigations of the dynamics of phytoplankton abundance and productivity in natural ecosystems as well as in industrial systems for the cultivation of microalgae. Difficulties in carrying out such studies are associated with the complex kinetics of  $P_i$  uptake by and the ability of microalgae to store phosphorus in their cells. This situation necessitates the efficient methods for express monitoring of microalgal cultures such as the methods based on the registration of optical properties of cells, such as absorption and scattering of light and fluorescence of chlorophyll contained in the cells. Here, we describe the results of monitoring the cultures of a chlorophyte *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, starving for phosphorus. It was found that both optical (light absorption in the bands of the key pigments—chlorophylls and carotenoids) and luminescent (variable fluorescence of chlorophyll) parameters reflect closely the culture condition. The correction for the contribution of light scattering to the overall extinction of light by microalgal cell suspensions turned to be necessary. At the same time, the light scattering signal is an accurate measure of the total number of suspended particles in the suspension. However, it is difficult to monitor via optical absorption the samples with abundant light-scattering particles lacking the photosynthetic pigments (such as heterotrophic bacteria). For such cultures, the using of variable fluorescence-based parameter  $F_v/F_m$  reflecting the maximum photochemical efficiency of the photosystem II is advisable.

**Keywords:** microalgae, light scattering, phosphorus starvation, chlorophyll fluorescence, photobioreactor, *Chlorella vulgaris*

#### Сведения об авторах

Кузнецов Андрей Григорьевич — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: 79257291630@yandex.ru

*Погосян Сергей Иосифович* – докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: pogosyan@biophys.msu.ru

*Конюхов Иван Владимирович* – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vanka\_kon@gmail.com

*Васильева Светлана Геннадьевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: vankat2009@mail.ru

*Лукьянов Александр Андреевич* – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: loockart@mail.ru

*Зотов Василий Сергеевич* – канд. биол. наук, руководитель группы ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: 8-495-952-33-09; e-mail: algo.consortium@gmail.com

*Недбал Ладислав* – доктор наук (Ph.D.), ст. исследователь, Институт биологии и геологии (IBG-2), Исследовательский центр Юлих (FZJ). Тел.: +49 2461 61-0; e-mail: l.nedbal@fz-juelich.de

*Соловченко Алексей Евгеньевич* – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, вед. науч. сотр. Евразийского центра по продовольственной безопасности МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

## ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 57.017.6+57.033+576.53+57.022

**УХУДШЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК  
КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА В НЕПЕРЕСЕВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ  
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО ОКИСЛЕННОГО ГУАНОЗИДА  
ПРОЯВЛЯЕТСЯ ТОЛЬКО В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА****Г.В. Моргунова<sup>\*</sup>, А.А. Клебанов***Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12**<sup>\*</sup>e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Несмотря на то, что продукты окисления нуклеотидов и нуклеозидов являются маркерами окислительного стресса, всё чаще стали появляться сообщения, свидетельствующие о парадоксальной способности этих соединений защищать клетки от повреждающего воздействия активных форм кислорода. Среди всех азотистых оснований наиболее восприимчив к влиянию окислительного стресса гуанин, поэтому чаще остальных окисляются гуанозины. В настоящей работе исследовано влияние экзогенного 8-оксо-2'-дезоксигуанозина на кинетику роста и "стационарного старения" (накопление "возрастных" изменений клеток при замедлении скорости размножения в пределах одного пассажа и дальнейшем их пребывании в стационарной фазе роста) непересеваемой культуры трансформированных клеток китайского хомячка. Показано, что нуклеозид быстро поглощается клетками из среды, однако он никак не влияет на кинетику роста культуры и ухудшает жизнеспособность клеток, находящихся в поздней стационарной фазе. Таким образом, не было обнаружено митогенного или геропротекторного эффекта 8-оксо-2'-дезоксигуанозина.

**Ключевые слова:** клеточное старение, кривые выживания, 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, окислительный стресс, повреждения ДНК, геропротекторы

ДНК клеток подвержена постоянному влиянию повреждающих её эндогенных и экзогенных факторов. Возникающие ошибки устраняет система репарации, но и её возможности не безграничны. Клетки с терминальными повреждениями в ДНК, как правило, погибают или теряют способность к делению. Для активно пролиферирующей культуры появление подобных клеток не так критично, потому что они могут быть "разбавлены" потомством других клеток [1, 2]. Если же повреждения возникают в клетках, которые по тем или иным причинам не могут поделиться, то остаётся надеяться только на систему репарации ДНК [3, 4]. Опасна и ситуация, когда возникшие в ДНК повреждения приводят к появлению мутаций, которые не мешают клетке размножаться и копировать ошибку. Подобные сбои могут привести к развитию опухоли [5–7].

Наиболее хорошо изучено влияние на ДНК окислительного стресса. Внутриклеточными повреждающими факторами являются активные формы кислорода (перекись водорода, супероксид-радикал, гидроксильный радикал), возникающие при поглощении электронов утечки молекулами кислорода [8–10], и так называемые активные формы азота (пероксинитрит, азотистый ангидрид) [6]. Среди пуринов и пиримидинов нуклеиновых кислот гуанин наиболее восприимчив к воздействию активных форм кислорода, так как он имеет самый низкий окислительно-восстановительный потенциал [7, 11, 12]. Именно по этой причине основными маркерами окислительного стресса являются

продукты окисления гуанина – 8-оксо-7,8-дигидро-дезоксигуанозинтрифосфат, 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин и др. Всего насчитывается более 100 продуктов окисления азотистых оснований [13]. По подсчётам Парк и соавт. в клетках крысы за день возникает и устраняется системой репарации в среднем около  $10^5$  окисленных гуанинов в ДНК [14]. Подвержены окислению и нуклеозиды РНК [15–17], а также свободные нуклеотиды [6, 18]. 8-Оксогуанозин является одной из самых опасных форм среди окисленных нуклеозидов, так как он может образовывать Хугстиновскую пару с аденозином [7, 11, 13]. Если подобную ошибку не устранить, может произойти замена пары Г:Ц на пару Т:А. Кроме того, если окисленный гуанозин при репликации встраивается в ДНК, может произойти двунитевой разрыв [5].

За устранение окисленных нуклеотидов, а также предотвращение их возникновения отвечает эксцизионная репарация оснований. В первую очередь её осуществляют ДНК-гликозилазы [19]. У бактерий – это mutM (formamidopyrimidine-DNA glycosylase, формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза), mutT (8-oxo-dGTP diphosphatase, 8-оксо-дГТФ-дифосфатаза) и mutY (adenine DNA glycosylase, адениновая ДНК-гликозилаза) [20, 21], а гомологи млекопитающих – MTH1 (mutT homolog 1, гомолог mutT 1), OGG1 (8-oxoguanine-DNA glycosylase 1, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1) и MUTYH (mutY homolog, гомолог mutY) соответственно [7]. У дрожжей нет mutY и mutT [3], зато есть несколько

вариантов 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы [11]. MutM/OGG1 удаляет окисленный гуанозин (ОГ) из пары ОГ:Ц в ДНК. MutY/MUTYH удаляет из неправильной пары ОГ:А неприемлемое адениновое основание. MutT/MTH1 гидролизует 8-оксо-7,8-дигидродезоксигуанозинтрифосфат, удаляя соединение из пула свободных нуклеотидов, и предотвращает его включение в ДНК. Показано, что мутации в генах, кодирующих эти ферменты, являются причиной развития многих опухолевых заболеваний [7, 10, 22]. Так как из каждых  $10^6$  гуанозинов в ДНК окислено всего лишь несколько [7], их поиск значительно усложнен. Ряд авторов считают, что наличие определённого количества окисленных нуклеозидов необходимо клетке, потому что окисленный гуанозин через активацию эксцизионной репарации оснований может стимулировать транскрипцию, выполняя таким образом эпигенетическую регуляцию [12]. Также существует точка зрения, согласно которой некоторое базовое количество окисленных гуанозинов не удаляется из ДНК в связи с феноменом гормезисного эффекта [16]. Временное сохранение базового количества оксигуанозинов может быть более выгодно, чем их восстановление. Значительный интерес представляет встраивание в ДНК окисленных нуклеозидов из свободного пула нуклеотидов [6, 8, 9, 18, 23]. К сожалению, некоторые ферменты могут способствовать накоплению ошибок, как, например, ДНК-полимераза бактерий, которая иногда встраивает окисленный нуклеозид из пула свободных нуклеотидов в новосинтезируемую ДНК [18].

При хронологическом старении дрожжей и “стационарном” старении культивируемых клеток млекопитающих происходит ограничение пролиферации вследствие контактного торможения, в результате чего клетки не обновляются и в них происходят разного рода изменения, сходные с изменениями, характерными для стареющих многоклеточных организмов. Наиболее важные среди них – повреждения ДНК, так как любые другие макромолекулы и органеллы можно заменить [24–26]. Ранее было показано, что в условиях этой модельной системы в клетках возникают сшивки ДНК-белок [27] и одностранные разрывы [28], происходит деметилирование ДНК [29] и ингибирование процесса поли(АДФ-рибозил)ирования белков хроматина [30], изменяется уровень спонтанных сестринских хроматидных обменов [31, 32]. В ДНК “стационарно стареющих” клеток в 4–5 раз увеличивается содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG) [33]. Интересно, что накопление 8-охо-dG происходит и в клетках, претерпевающих старение по Хейфлику [34].

В последнее время появляется информация о том, что экзогенные окисленные нуклеозиды могут положительно влиять на жизнеспособность клеток и тканей. 8-Охо-dG, например, может парадоксальным образом выступать в роли антиок-

сиданта и регулировать продукцию провоспалительных цитокинов [35]. Предполагается, что его можно будет использовать при лечении и профилактике заболеваний и нарушений, сопровождающихся окислительным стрессом и воспалением [36–38]. В настоящей работе было исследовано влияние экзогенного 8-охо-dG на жизнеспособность, рост и гибель непересеваемой культуры трансформированных клеток китайского хомячка.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на трансформированных клетках китайского хомячка перевиваемой линии V11-dii-FAF28 (клон 237), полученной из ФГБНУ “Медико-генетический научный центр” (Москва). Клетки культивировали при 37°C в стеклянных флаконах Карреля, используя среду Игла в модификации Дульбекко (ФГБУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского” Минздрава России, Москва) с добавлением 5–10% сыворотки крови крупного рогатого скота (“РАА”, Австрия), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересевали в соотношении 1:10–1:3 через каждые 3–4 сут. Снимали клетки с поверхности роста с помощью смеси (1:1) 0,02%-го версена и 0,25%-го трипсина (ФГБУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского” Минздрава России, Москва). 8-Охо-dG был синтезирован на кафедре биоорганической химии биологического факультета МГУ из 2'-дезоксигуанозина (Sigma, США), чистота синтезированного соединения подтверждена методами ядерного магнитного резонанса, а также жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических и митогенных свойств 8-охо-dG, клетки в “возрасте” 3–4 сут (т.е. выращиваемые без пересева в течение 3–4 сут) засеивали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы с плотностью около 40 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки добавляли во флаконы среду, содержащую 8-охо-dG, конечные концентрации – от  $10^{-6}$  М до  $10^{-3}$  М. В контрольные флаконы добавляли среду с соответствующим количеством дистиллированной воды качества Milli-Q. Флаконы помещали на 4 сут в термостат (37°C), после чего клетки снимали с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью счётных камер. Также определяли влияние 8-охо-dG в самой низкой и в самой высокой концентрации в длительном эксперименте, когда клетки не пересевали в течение 19-и сут (при этом окисленный нуклеозид также добавляли через 24 ч после посева).

Для оценки влияния 8-охо-dG на кинетику роста клеток и их последующую гибель в стационарной фазе 3-суточные клетки засеивали в пенициллиновые флаконы с плотностью 40 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. На следующие сутки подсчитывали количество

прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую 8-охо-dG (конечная концентрация –  $10^{-3}$  М), во флаконы контрольной группы – среду с соответствующим объёмом воды. Через определённые промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью счётных камер (3 флакона на точку, 4 камеры на флакон). Эксперимент был сделан в двух повторах.

Для определения динамики поглощения 8-охо-dG клетки выращивали в течение 5 сут до состояния сомкнутого монослоя, затем добавляли раствор окисленного нуклеозида до конечной концентрации  $10^{-3}$  М и через определённые интервалы времени производили отбор небольшого (20–30 мкл) объёма среды, последний был сделан на 20-е сут. Кроме того, определили стабильность 8-охо-dG в среде с 10% сыворотки без клеток при инкубации ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 21 сут. Оценку содержания 8-охо-dG в среде любезно провели сотрудники кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC-20AD (Shimadzu Scientific Instruments, Япония), оснащённом спектрофотометрическим детектором SPD-M20A (Shimadzu Corporation, Япония) и автосэмплером SII-20A (Shimadzu Corporation, Япония); использовали колонку Equivalent to Phenomenex® Luna® C18(2) (Phenomenex Inc., США). Хроматограммы регистрировали с помощью программы Shimadzu LCSolution (Shimadzu Corporation, Япония).

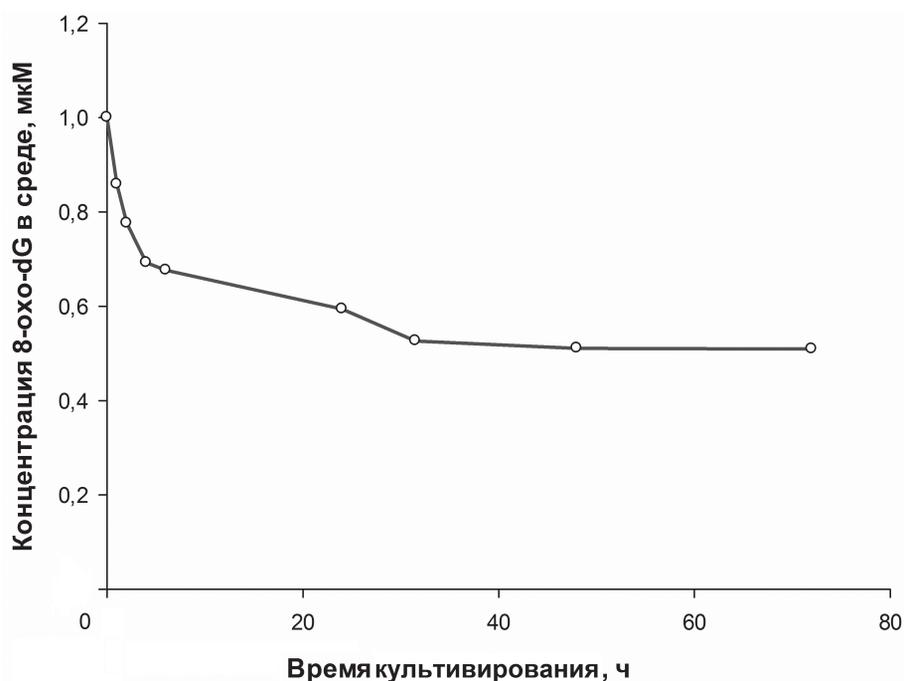
При сравнении данных использовали t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий

Манна-Уитни (в зависимости от результатов проверки нормальности распределения выборки). Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0 и в среде R с использованием дополнительного пакета “nortest”.

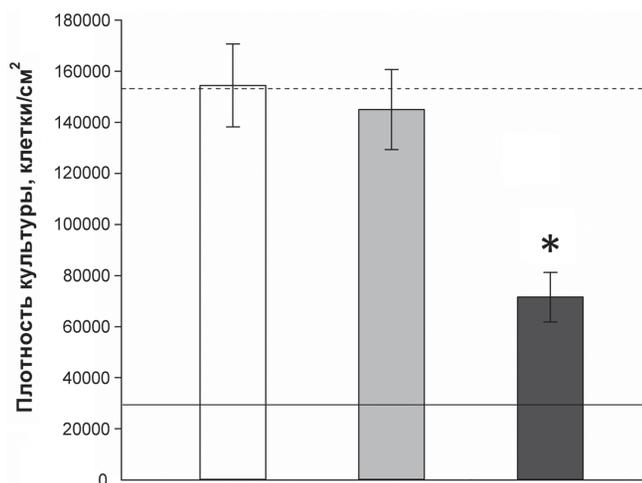
## Результаты

8-Охо-dG остаётся стабильным при инкубации в среде с сывороткой. Его концентрация, определённая методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, не изменяется в течение 21 сут. При оценке поглощения клетками 8-охо-dG из среды было обнаружено, что концентрация соединения быстро снижается в течение первых нескольких часов (рис. 1), ко вторым суткам она падает в два раза по сравнению с исходной и далее остаётся на этом уровне (последнее измерение было сделано на 20-е сут).

При оценке цитотоксических и митогенных свойств 8-охо-dG определяли его влияние в концентрациях от  $10^{-6}$  М до  $10^{-3}$  М. Даже в самой высокой из них –  $10^{-3}$  М – окисленный нуклеозид не оказывал воздействия на рост и жизнеспособность клеток, через 4 сут после добавления 8-охо-dG не было различий между группами. При длительном же содержании клеток с 8-охо-dG (в течение 18 сут) плотность культуры оказалась достоверно ниже в группе с самым высоким содержанием нуклеозида в среде (рис. 2), но сопоставима с контрольным показателем в группе с низким его содержанием. В связи с этим концентрацию  $10^{-3}$  М выбрали для проведения следующего эксперимента.



**Рис. 1.** Динамика изменения концентрации 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в культуральной среде в течение первых 70 ч от момента его добавления в среду с 5-суточными (5 сут без пересевов) трансформированными клетками китайского хомячка, находящимися в стационарной фазе роста. Приведено содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в среде, измеренное методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии



**Рис. 2.** Плотность культуры находящихся под влиянием 8-оксо-2'-дезоксигуанозина трансформированных клеток китайского хомячка через 19 сут после посева. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозина был добавлен в ростовую среду через 24 ч после посева до конечной концентрации  $10^{-6}$  М (серый столбец) и  $10^{-3}$  М (чёрный столбец). Сплошная горизонтальная линия — плотность клеток через 24 ч после посева, пунктирная горизонтальная линия — плотность клеток в контрольной группе через 10 сут после посева. Приведены средние  $\pm$  стандартные ошибки среднего

\* — достоверное отличие от контрольной группы (белый столбец)

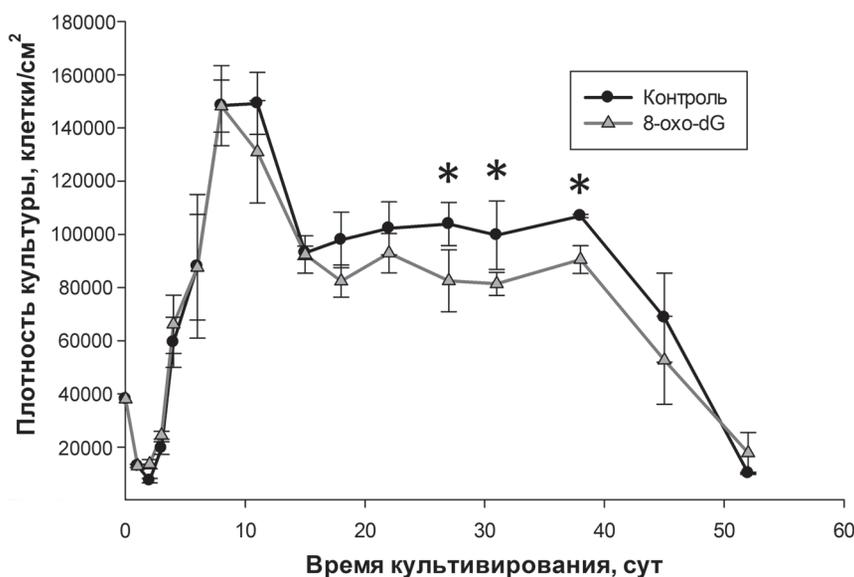
Контрольные и экспериментальные данные, полученные при оценке влияния 8-охо-dG на динамику роста и “стационарного старения” культуры клеток, сравнивали в каждой отдельной точке подсчёта количества живых клеток. Всего было проведено два эксперимента. В первом эксперименте опыт (данные не приведены) был завершён на 22-е сут (когда клетки только вступили в фазу вымирания), достоверных различий между группами не было обнаружено. Второй эксперимент

был завершён к 52-м сут (рис. 3), практически все клетки в обеих группах погибли к этому времени. На рис. 3 видно, что кривая, описывающая кинетику роста и гибели клеток экспериментальной группы, начиная с фазы плато, пролегает несколько ниже контрольной, достоверные отличия удалось обнаружить на 27-е и 31-е сут. Таким образом, под влиянием 8-охо-dG в концентрации  $10^{-3}$  М кинетика роста не изменяется и несколько ухудшается жизнеспособность “стационарно старой” культуры клеток.

### Обсуждение

8-Охо-dG даже в высокой концентрации не оказывает никакого влияния на рост и жизнеспособность молодых активно делящихся или только вступивших в стационарную фазу роста клеток. При этом нуклеозид активно поглощается из среды в течение первых суток (особенно в течение первых нескольких часов). Можно предположить, что так как раковые клетки лучше адаптированы к влиянию окислительного стресса и уровень активности МТН1 у них высокий [10], то, вероятно, это позволяет им преобразовывать поглощённые окисленные продукты, потенциально способные навредить клеткам, в безопасные. С другой стороны, хотя 8-охо-dG и поглощается клетками в первые часы, влияние его обнаруживается лишь на позднем этапе стационарной фазы.

Существующие литературные данные свидетельствуют о том, что положительный эффект 8-охо-dG проявляется преимущественно в модельных системах, где объекты подвергаются влиянию неблагоприятных или повреждающих факторов, вызывающих развитие окислительного стресса [36–38]. И в нашем случае некоторое влияние на



**Рис. 3.** Влияние добавления 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в концентрации  $10^{-3}$  М на кинетику роста и “стационарного старения” культуры трансформированных клеток китайского хомячка (методические подробности — в тексте). Приведены средние  $\pm$  стандартные ошибки среднего. Чёрная кривая — контроль, серая кривая — 8-оксо-2'-дезоксигуанозин. \* — достоверное отличие от контрольной группы

жизнеспособность было обнаружено только в случае, когда клетки длительное время находились в стационарной фазе роста. Однако этот эффект не только не был положительным, но, напротив, выражался в ухудшении жизнеспособности клеток (рис. 2–3). Остаётся открытым вопрос, как вещество, поглощённое клетками практически сразу, вызывает эффект только спустя 18–40 сут. Происходит ли встраивание 8-охо-dG в собственные структуры, либо он влияет на ход определённых метаболических реакций.

Можно заметить некоторое расхождение контрольных и экспериментальных кривых, описывающих рост и гибель клеток в поздней стационарной фазе (рис. 3), хотя достоверные различия были обнаружены не во всех точках. Впрочем, сложность постановки опытов с оценкой кинетики роста и гибели клеток не позволяет задействовать достаточно большое количество флаконов в каждой группе. В экспериментах по цитотоксичности, где на 19-е сут после посева различия обнаруживались, выборка была больше (7 флаконов на точку), поэтому не исключено, что увеличение количества флаконов в каждой группе от 3 до 5–7 позволило бы обнаружить достоверные различия и в других точках снятия клеток, пребывающих в стационарной фазе роста.

Отрицательный эффект был более ожидаемым, так как накопление окисленных нуклеозидов, свидетельствующее об окислительном стрессе, значительно нагружает клетку, заставляя тратить ресурсы на работу гликозилаз эксцизионной репарации оснований. Возможно, некоторая активация этой репарационной системы и способствует улучшению транскрипции, но значительное увеличение количества продуктов окисления нуклеиновых кислот не может положительно влиять на жизнеспособность клеток и только усложняет их существование, особенно в поздней стационарной фазе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khokhlov A.N.* Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
2. *Khokhlov A.N.* On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
3. *Barnes D.E., Lindahl T.* Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells // *Annu. Rev. Genet.* 2004. Vol. 38. P. 445–476.
4. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.
5. *Cheng K.C., Cahill D.S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L.A.* 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. N 1. P. 166–172.
6. *Kamiya H.* Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. N 2. P. 517–531.
7. *David S.S., O'shea V.L., Kundu S.* Base-excision repair of oxidative DNA damage // *Nature.* 2007. Vol. 447. N 7147. P. 941–950.
8. *Russo M.T., Blasi M.F., Chiera F., Fortini P., Degan P., Macpherson P., Furuichi M., Nakabeppu Y., Karran P., Aquilina G., Bignami M.* The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. N 1. P. 465–474.
9. *Satou K., Kawai K., Kasai H., Harashima H., Kamiya H.* Mutagenic effects of 8-hydroxy-dGTP in live mammalian cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 42. N 10. P. 1552–1560.

Окисленные нуклеотиды из свободного пула вносят значительный вклад в нарушение стабильности ДНК. В работах Руссо и соавт. [8] была доказана роль системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов в защите ДНК от вставки окисленных нуклеозидов. При нарушении работы этой системы происходит значительная компенсаторная активация МТН1. При добавлении к суспензии бактерий обычных пуриновых нуклеотидов — дГТФ и дАТФ — частота мутаций не увеличивается, однако если добавлять окисленные варианты тех же нуклеотидов, то частота мутаций возрастает в 12 и в 9 раз соответственно [23].

Таким образом, есть основания предполагать, что 8-охо-dG, попадая в клетку, накапливается в её структурах. Жизнедеятельность молодых активно делящихся клеток никак не нарушается, но при переходе культуры в стационарную фазу роста, когда репликативного синтеза ДНК не происходит, накопленные окисленные нуклеотиды становятся балластом. Вследствие этого возникает ещё больше ошибок, частота которых в любом случае увеличивается со временем пребывания клеток в стационарных условиях, так как ферментам, поддерживающим правильную структуру ДНК, тяжелее отследить все возникающие повреждения. Реакция клеток на экзогенные и эндогенные повреждения в значительной мере определяется работой ферментов эксцизионной репарации оснований, поэтому наиболее перспективны исследования, направленные на изучение их работы при “стационарном” старении клеток.

Авторы выражают признательность Д.С. Есипову и Н.В. Мармий за предоставление 8-охо-dG и помощь в определении концентрации вещества в среде. Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00813 мол\_a).

10. Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. N 7. P. 12543–12557.
11. Faucher F., Duclos S., Bandaru V., Wallace S.S., Doublé S. Crystal structures of two archaeal 8-oxoguanine DNA glycosylases provide structural insight into guanine/8-oxoguanine distinction // *Structure.* 2009. Vol. 17. N 5. P. 703–712.
12. Fleming A.M., Burrows C.J. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine, friend and foe: Epigenetic-like regulator versus initiator of mutagenesis // *DNA repair.* 2017. Vol. 56. P. 75–83.
13. Aguiar P.H., Furtado C., Repolês B.M., Ribeiro G.A., Mendes I.C., Peloso E.F., Gadelha F.R., Macedo A.M., Franco G.R., Pena S.D., Teixeira S.M. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013. Vol. 7. N 6. e2279.
14. Park E.M., Shigenaga M.K., Degan P., Korn T.S., Kitzler J.W., Wehr C.M., Kolachana P., Ames B.N. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. Vol. 89. N 8. P. 3375–3379.
15. Yoshimura D., Sakumi K., Ohno M., Sakai Y., Furuchi M., Iwai S., Nakabeppu Y. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, suppresses cell death caused by oxidative stress // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 39. P. 37965–37973.
16. Radak Z., Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49. N 4. P. 587–596.
17. Poulsen H.E., Specht E., Broedbaek K., Henriksen T., Ellervik C., Mandrup-Poulsen T., Tonnesen M., Nielsen P.E., Andersen H.U., Weimann A. RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52. N 8. P. 1353–1361.
18. Shimizu M., Gruz P., Kamiya H., Kim S.R., Pisani F.M., Masutani C., Kanke Y., Harashima H., Hanaoka F., Nohmi T. Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases // *EMBO Rep.* 2003. Vol. 4. N 3. P. 269–273.
19. Baute J., Depicker A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2008. Vol. 43. N 4. P. 239–276.
20. Michaels M.L., Miller J.H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174. N 20. P. 6321–6325.
21. Bjørås M., Luna L., Johnsen B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 20. P. 6314–6322.
22. Tsuzuki T., Egashira A., Igarashi H., Iwakuma T., Nakatsuru Y., Tominaga Y., Kawate H., Nakao K., Nakamura K., Ide F., Kura S. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 20. P. 11456–11461.
23. Inoue M., Kamiya H., Fujikawa K., Ootsuyama Y., Murata-Kamiya N., Osaki T., Yasumoto K., Kasai H. Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. New evaluation method for mutagenesis by damaged DNA precursors *in vivo* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. N 18. P. 11069–11074.
24. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.
25. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 207–211.
26. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.
27. Khokhlov A.N., Chirkova E.Yu., Gorin A.I. Strengthening of the DNA-protein complex during stationary phase aging of cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* 1986. Vol. 101. N 4. P. 437–440.
28. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Наджарян Т.Л. Дегградация ДНК в покоящихся культивируемых клетках китайского хомячка // *Цитология.* 1984. Т. 26. № 8. С. 965–968.
29. Хохлов А.Н., Кирнос М.Д., Ванюшин Б.Ф. Уровень метилирования ДНК и “стационарное старение” культивируемых клеток // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1988. № 3. С. 476–478.
30. Shram S.I., Shilovskii G.A., Khokhlov A.N. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006. Vol. 141. N 5. P. 628–632.
31. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Чеботарёв А.Н. Изменения уровня сестринских хроматидных обменов в культивируемых клетках китайского хомячка при ограничении их пролиферации // *Цитол. генет.* 1985. Т. 19. № 2. С. 90–92.
32. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Чеботарёв А.Н. Изменения уровня сестринских хроматидных обменов в культивируемых клетках китайского хомячка при ограничении их пролиферации. Дополнительные исследования // *Цитол. генет.* 1987. Т. 21. № 3. С. 186–190.
33. Есипов Д.С., Горбачёва Т.А., Хайруллина Г.А., Клебанов А.А., Неуен Тхи Нгок Ту, Хохлов А.Н. Изучение накопления 8-оксо-2-дезоксигуанозина в ДНК при “стационарном старении” культивируемых клеток // *Усп. геронтол.* 2008. Т. 21. № 3. С. 485–487.
34. Chen Q., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92. N 10. P. 4337–4341.
35. Ock C.Y., Kim E.H., Choi D.J., Lee H.J., Hahn K.B., Chung M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases // *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18. N 4. P. 302–308.
36. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression // *Exp. Mol. Med.* 2006. Vol. 38. N 4. P. 417–427.
37. Huh J.Y., Son D.J., Lee Y., Lee J., Kim B., Lee H.M., Jo H., Choi S., Ha H., Chung M.H. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine prevents plaque formation and inhibits vascular

smooth muscle cell activation through Rac1 inactivation // Free Radic. Biol. Med. 2012. Vol. 53. N 1. P. 109–121.

38. Lee J.K., Ko S.H., Ye S.K., Chung M.H. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine ameliorates UVB-induced skin damage in

hairless mice by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MMP expression // J. Dermatol. Sci. 2013. Vol. 70.

N 1. P. 49–57.

Поступила в редакцию  
29.01.2018

Принята в печать  
15.05.2018

## GERONTOLOGY

### IMPAIRMENT OF THE VIABILITY OF TRANSFORMED CHINESE HAMSTER CELLS IN A NONSUBCULTURED CULTURE UNDER THE INFLUENCE OF EXOGENOUS OXIDIZED GUANOSIDE IS MANIFESTED ONLY IN THE STATIONARY PHASE OF GROWTH

G.V. Morgunova\*, A.A. Klebanov

*Evolutionary Cyto gerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

\*e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Despite the fact that oxidation products of nucleotides and nucleosides are markers of oxidative stress, reports of the paradoxical ability of these compounds to protect cells from the harmful effects of reactive oxygen species began to appear more often. Among all nitrogenous bases, guanine is most susceptible to the influence of oxidative stress, therefore, guanosine is oxidized more often than other bases. In the present work, the effect of exogenous 8-oxo-2'-deoxyguanosine on the growth and "stationary phase aging" (accumulation of "age" changes in cultured cells during cell proliferation slowing down within a single passage and subsequent "aging" in the stationary phase of growth) of a nonsubcultured culture of transformed Chinese hamster cells was studied. We showed that the nucleoside is rapidly absorbed by the cells from the medium, but it does not affect the growth of the culture, and in the late stationary phase of growth impairs the viability of the cells. Thus, no mitogenic or geroprotective effect of 8-oxo-2'-deoxyguanosine was found.

**Keywords:** *cell aging, survival curve, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, oxidative stress, DNA damage, geroprotectors*

#### Сведения об авторах

*Моргунова Галина Васильевна* – науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

*Клебанов Александр Александрович* – науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru

## ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 551.465

## ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПИКОФИТОПЛАНКТОНА В БЕЛОМ МОРЕ В НАЧАЛЕ ЛЕТА

Л.В. Ильяш<sup>1</sup>, Т.А. Белевич<sup>1,\*</sup>, А.В. Дриц<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Институт океанологии имени П.П. Шириова РАН, Россия, 117997, г. Москва, Нахимовский проспект, д. 36

\*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Биомасса фотосинтезирующего пикопланктона ( $V_{\text{пик}}$ ), его вклад в суммарную биомассу фитопланктона ( $V_{\text{пик}\%}$ ), концентрация хлорофилла “a” (ХЛ), а также сопутствующие гидрофизические условия были оценены в Белом море в июне 2015 г. на 47 станциях, охватывающих залив Онежский, залив Кандалакшский с его губами и западную часть Бассейна. Пространственная изменчивость средних для фотического слоя значений  $V_{\text{пик}}$  ( $0,1-1,91 \text{ мг С/м}^3$ ) определялась суб- и мезомасштабной неоднородностью гидрологических условий. Выявлено увеличение  $V_{\text{пик}}$  во фронтальных зонах и низкие значения  $V_{\text{пик}}$  в водах с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик. На половине станций  $V_{\text{пик}\%}$  не превышал 1%, на остальной акватории варьировал от 1 до 8%. На одной из станций Бассейна этот показатель достигал 40,5%. При цветении фитопланктона в губе Княжая (ХЛ > 3 мг/м<sup>3</sup>) с доминированием *Skeletonema costatum sensu lato*  $V_{\text{пик}\%}$  не превышал 2%.

**Ключевые слова:** пикофитопланктон, фитопланктон, цветение, биомасса пикофитопланктона, Белое море, *Skeletonema costatum sensu lato*

К пикофитопланктону относят эукариотические водоросли и цианобактерии с размерами клеток менее 3 мкм [1]. В арктических экосистемах мельчайшие фотоавтотрофы в отдельные периоды сезонного развития дают основной вклад в суммарную биомассу фитопланктона и первичную продукцию [2–5]. Для оценки численности и биомассы пикофитопланктона требуется применение специальных методов, таких как эпифлуоресцентная микроскопия [4], проточная цитометрия [6], флуоресцентная гибридизация *in situ* [7]. Этим обуславливается немногочисленность данных об обилии мельчайшей фракции фитопланктона в российских арктических морях и в субарктическом Белом море. При наблюдаемой климатической тенденции в Арктике [8] прогнозируется возрастание роли пикоформ в создании первичной продукции и увеличение доли мельчайших водорослей в суммарной биомассе фитопланктона [9]. В связи с этим исследования пикофитопланктона Белого моря, по абиотическим условиям сочетающего черты как арктических, так и умеренных морей [10], приобретают особую актуальность.

Отдельные районы Белого моря (в частности, Онежский и Кандалакшский заливы, Бассейн) различаются по термохалинной структуре вод, температуре и солености поверхностного слоя, а также другим гидрофизическим и гидрохимическим параметрам. В начале лета биомасса фитопланктона снижается вследствие истощения биогенных элементов во время весеннего цветения фитопланк-

тона, при этом относительная биомасса пиководорослей возрастает [11]. Как показали предыдущие исследования, проведенные в июне в Онежском заливе и губах Кандалакшского залива [12], биомасса пикофракции и ее вклад в суммарную биомассу фитопланктона варьируют в значительных пределах в зависимости от локальных гидрофизических условий. Динамичность гидрофизических процессов в исследованных районах и их изменчивость в зависимости от метеорологических условий дают основание полагать, что описанная ранее картина пространственного распределения пикофитопланктона не является постоянной. Отсутствие сведений о пикофитопланктоне Бассейна и центральной части Кандалакшского залива, а также представлений о межгодовой изменчивости биомассы пикофракции и определило цель настоящего исследования. Она состояла в оценке биомассы пикофитопланктона и его вклада в суммарную биомассу фитопланктона в западной части Бассейна, а также в Онежском и Кандалакшском заливах в июне 2015 г.

### Материалы и методы

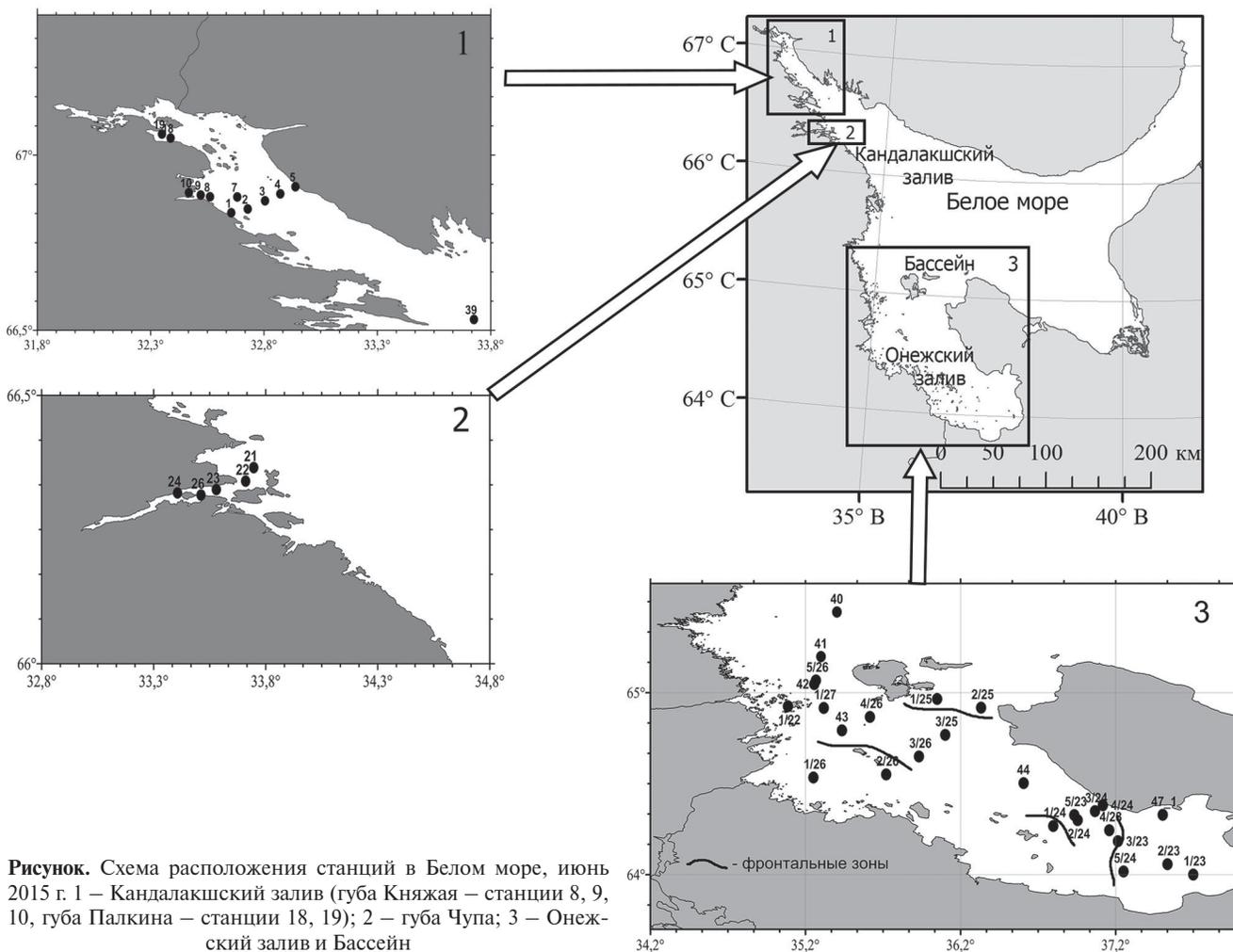
Материалом для работы послужили пробы, отобранные в акватории Белого моря на 47 станциях (рисунок) с 12 по 27 июня 2015 г. в ходе экспедиций на научно-исследовательском судне “Эколог”. На комплексных судовых станциях проводили вертикальное зондирование температуры и солености с помощью гидрологических зондов CastAway (YSI

Incorporated, США) и SBE-25 (Sea-Bird Scientific, США). Степень стратификации водного столба оценивали по среднему градиенту плотности между глубинами 20 м и 1 м. Коэффициент поглощения фотосинтетически активной радиации (ФАР) рассчитывали по глубине исчезновения белого диска, границей фотической зоны принимали глубину с 1% фотосинтетически активной радиации.

Пробы воды для оценки концентрации ХЛ и количественных параметров пико- и более крупного фитопланктона отбирали 5-литровым батометром Нискина с 3–4 горизонтами (поверхностный, над и под пикноклином). Концентрацию ХЛ определяли флуориметрическим методом [13] с помощью флуориметра Trilogy 1.1 (Turner Designs, США). Для количественного учета пикопланктона подпробы воды объемом 10 мл наливали в фильтрационную воронку, добавляли насыщенный раствор примулина, выдерживали 5–7 мин, затем фиксировали 2%-ным раствором глутаральдегида и осаждали на ядерные фильтры с диаметром пор 0,12 мкм, предварительно окрашенные суданом черным. Фильтры помещали в жидкий азот и хранили до последующей обработки. Подсчет клеток на фильтре проводили с помощью люминесцентного микроскопа

Leica DM5000 (Leica Microsystems, Германия) при увеличении  $\times 1000$ , просматривая 30–50 полей зрения в зависимости от концентрации клеток. При подсчете учитывали “тип” свечения клеток (оранжевый – цианобактерии, красный – эукариотические водоросли), а также измеряли размеры клеток. При расчете объема клеток их форму соотносили с подходящей стереометрической фигурой и рассчитывали объем по соответствующим формулам. Клеточное содержание углерода ( $C_{кл}$ ) определяли по объемам клеток ( $W_{кл}$ ) с использованием зависимости  $C_{кл} = 0,433 W_{кл}^{0,863}$  [14].

Количественную оценку нано- и микрофитопланктона проводили по общепринятому методу, подробно описанному ранее [15]. Учитывали только фотосинтезирующие формы. По величинам биомассы пикофитопланктона и суммарной биомассы фитопланктона на нескольких горизонтах каждой станции рассчитывали средние значения в фотическом слое. Достоверность различий средних значений биомассы оценивали по критерию Манна-Уитни. Для оценки зависимости между параметрами рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена ( $R_s$ ). Расчеты проводили с использованием программы PAST.



**Рисунок.** Схема расположения станций в Белом море, июнь 2015 г. 1 – Кандалакшский залив (губа Княжая – станции 8, 9, 10, губа Палкина – станции 18, 19); 2 – губа Чупа; 3 – Онежский залив и Бассейн

## Результаты

**Гидрофизические условия.** В июне 2015 г. на большей части исследованной акватории воды были стратифицированы (таблица). Воды с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик и слабо стратифицированные воды с низкой температурой и повышенной соленостью поверхностного слоя отмечались у Соловецких островов и в центральной части Онежского залива. Такая структура вод обусловлена интенсивным приливным перемешиванием. Между водами с разной структурой располагались приливные фронтальные зоны. Стоковая фронтальная зона ограничивала наиболее стратифицированные вследствие речного стока воды в вершине Онежского залива. Глубина фотического слоя превышала протяженность перемешиваемого слоя на всех станциях за исключением станций с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик. Температура поверхностного слоя в Онежском заливе была достоверно выше, чем в Бассейне и Кандалакшском заливе ( $p = 0,001$ ).

**Концентрация хлорофилла “а” и суммарная биомасса фитопланктона.** На исследованной акватории концентрация ХЛ и суммарная биомасса фитопланктона ( $V_{\text{сум}}$ ) значительно варьировали (таблица). В большинстве случаев ХЛ и  $V_{\text{сум}}$  убывали с глубиной. Наибольшие средние для фотического слоя значения ХЛ ( $>3$  мг/м<sup>3</sup>) отмечены в губе Княжая, на разрезе от западного берега к восточному в Кандалакшском заливе и в Бассейне на станции 41. К тем же районам (за исключением Бассейна) были при-

урочены наибольшие величины  $V_{\text{сум}}$  ( $>50$  мг С/м<sup>3</sup>). Такого же порядка  $V_{\text{сум}}$  достигала и в центральной части Кандалакшского залива на станции 39. Средние значения ХЛ и  $V_{\text{сум}}$  в Кандалакшском заливе были достоверно выше таковых в Онежском заливе ( $p = 0,01$ ). Повышенные по сравнению с фоновыми значения величины ХЛ и  $V_{\text{сум}}$  в Онежском заливе были приурочены к фронтальным зонам – стоковой (станции 3/23, 4/24, 5/24) и приливной (станции 1/26, 2/26).

На большинстве станций основной вклад в суммарную биомассу фитопланктона давала диатомовая водоросль *Skeletonema costatum sensu lato* (15–88% в Кандалакшском заливе, 13–63% в Онежском заливе). В Бассейне доминировали диатомовая водоросль *Coscinodiscus concinnus* (54% от  $V_{\text{сум}}$ , станция 41) и динофлагелляты *Gymnodinium* spp. (41% от  $V_{\text{сум}}$ , станция 40).

**Биомасса пикофитопланктона.** Биомасса пикофитопланктона ( $V_{\text{пик}}$ ) варьировала в пределах двух порядков – от 0,01 (станция 2/25 в Онежском заливе) до 1,91 мг С/м<sup>3</sup> (станции 40 и 41 в Бассейне). Повышенные значения  $V_{\text{пик}}$  отмечены не только в Бассейне, но и в водах с наиболее выраженной стратификацией – в центральной части Кандалакшского залива (станция 39) и у стокового фронта в Онежском заливе (станции 4/24, 5/24). В водах с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик, где глубина фотического слоя была меньше протяженности перемешиваемого слоя,  $V_{\text{пик}}$  не превышала 0,19 мг С/м<sup>3</sup>. На большинстве станций наибольшие значения  $V_{\text{пик}}$  были приурочены к верхнему пятиметровому слою. Достовер-

Таблица

Протяженность фотического слоя (ФС, м), температура ( $T_0$ , °C) и соленость ( $S_0$ , ‰) поверхностного горизонта, а также среднее в фотическом слое значение суммарной биомассы фотосинтезирующего планктона ( $V_{\text{сум}}$ , мг С/м<sup>3</sup>), хлорофилла “а” (ХЛ, мг/м<sup>3</sup>), биомассы пикофитопланктона ( $V_{\text{пик}}$ , мг С/м<sup>3</sup>) и его вклада ( $V_{\text{пик}}$ , %) в суммарную биомассу фитопланктона

Район	ФС	$T_0$	$S_0$	$V_{\text{сум}}$	ХЛ	$V_{\text{пик}}$	$V_{\text{пик}}$ , %
<b>Онежский залив</b>							
Стратифицированные воды	7–12	6,2–15,2	21–26,8	1,38–19,13	0,33–1,07	0,01–0,83	0,05–8,05
Воды с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик	8–22	6,5–8,6	22,5–26,7	2,46–31,36	0,26–0,57	0,02–0,19	0,25–2,85
В среднем по заливу ( $\pm$ стандартное отклонение)				12,48 $\pm$ 7,20	0,58 $\pm$ 0,23	0,16 $\pm$ 0,18	1,76
<b>Кандалакшский залив</b>							
Губа Княжая	2,5–7,5	5,1–6,3	9,1–22,3	16,59–102,51	1,61–3,45	0,06–0,35	0,06–2,11
Губа Палкина	1,5–2,5	7,6–8,3	18,5–18,8	2,42–10,02	0,24	0,02–0,09	0,21–0,89
Губа Чупа	4–10	8,2–9,3	22,5–24,2	7,78–14,06	0,51–0,74	0,20–0,46	2,02–5,15
Разрез от западного до восточного берега	3,5–5	2,7–5,5	15,9–25,9	7,74–97,28	1,39–2,58	0,05–0,41	0,17–0,65
В среднем по заливу ( $\pm$ стандартное отклонение)				47,09 $\pm$ 39,82	1,54 $\pm$ 1,07	0,24 $\pm$ 0,22	1,44
<b>Бассейн</b>							
Западная часть	20,3	7,5–7,9	26,00	2,74–33,23	0,61–2,33	1,86–1,91	5,4–40,5

ного отличия средних значений  $V_{\text{пик}}$  между заливами не выявлено. Между  $V_{\text{пик}}$  и ХЛ отмечена достоверная связь ( $R_s = 0,39$ ,  $p = 0,01$ ). Вклад пикофракции в суммарную биомассу фитопланктона на большинстве станций был невысоким за исключением станции 40 в Бассейне. Достоверного отличия в средних значениях вклада пикофитопланктона между заливами не выявлено.

На большинстве станций в пикофитопланктоне по биомассе доминировали цианобактерии. Известно, что в субполярных морских водах среди пикоцианобактерий преобладают *Synechococcus* spp., представленные разными генотипами с выраженной дифференциацией экологических ниш [16]. Биомасса фотосинтезирующих пикоэукариот превышала таковую пикоцианобактерий на пяти станциях Онежского залива (станции 1/22, 3/24, 3/25, 1/26, 43).

### Обсуждение результатов

Проведенные в июне 2015 г. исследования по оценке биомассы пикофракции фотосинтезирующих водорослей, суммарной биомассы фотосинтезирующего фитопланктона и концентрации ХЛ охватывали обширную акваторию Белого моря от южной части Онежского залива до северной части Кандалакшского залива, включая его губы, а также западную часть Бассейна. Суб- и мезомасштабная неоднородность гидрологических условий на исследованной акватории определила существенную изменчивость средних для фотического слоя значений параметров фитопланктона. По полученному массиву данных выявлена достоверная положительная связь между  $V_{\text{пик}}$  и концентрацией ХЛ, что свидетельствует об общности основных факторов, определяющих пространственное распределение биомассы фотосинтезирующих форм разных размерных групп. Однако выявленная положительная связь оказалась слабой, что, по-видимому, обусловлено наличием ситуаций, когда локальные гидрологические условия ведут к разнонаправленным трендам в распределении пиководорослей и более крупных форм. Пример такой ситуации – губа Княжая, где отмечены высокие значения  $V_{\text{сум}}$  и ХЛ, соответствующие уровню цветения. В подповерхностном слое величина ХЛ достигала почти  $6 \text{ мг/м}^3$ . Такие высокие значения редко отмечаются в беломорских водах [17]. Мы предполагаем, что локальное цветение фитопланктона с доминированием *S. costatum* s.l. обусловлено поступлением в губу богатых биогенными элементами вод, сбрасываемых в период экспедиционных работ Князегубской гидроэлектростанцией [<http://www.dpbvu.ru>]. По мере продвижения от кута к вершине губы на фоне увеличения солености поверхностных вод  $V_{\text{сум}}$  и ХЛ возрастали, тогда как  $V_{\text{пик}}$  снижалась. Снижение  $V_{\text{пик}}$  может быть обусловлено эффектом “разведения” и/или смертностью вносимых со сбрасываемыми водами пресноводных

пикоформ, биомасса пиководорослей выше в пресных, чем в морских водах [18]. Напротив, для морских водорослей, и в первую очередь *S. costatum* s.l., наиболее благоприятные для роста условия складывались при увеличении солености в центральной и верхней частях губы, что вело к значительному росту  $V_{\text{сум}}$  и ХЛ.

На разрезе через Кандалакшский залив (станции 1–5) при относительно высоких значениях  $V_{\text{сум}}$  и ХЛ при выраженных градиентах солености и температуры поверхностных вод связи между  $V_{\text{пик}}$  и ХЛ не отмечалось. Аналогичная картина складывалась и в губе Чупа в отсутствие пространственного градиента солености и температуры. Можно предположить, что в этих районах в качестве основного фактора, определявшего биомассу пикоформ, было выедание микрозоопланктоном, а биомассу более крупных водорослей – выедание мезозоопланктоном.

В Онежском заливе при отсутствии в период настоящего исследования лимитирования фитопланктона недостатком биогенных элементов [19] пространственное распределение  $V_{\text{пик}}$ , а также  $V_{\text{сум}}$  и ХЛ определяли гидрофизические факторы. Так, в водах с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик, где глубина фотического слоя была меньше протяженности перемешиваемого слоя, значения  $V_{\text{пик}}$ , ХЛ и  $V_{\text{сум}}$  были меньше таковых в стратифицированных водах юго-восточной части залива перед стоковым фронтом, который играет роль барьера, препятствующего дисперсии фитопланктона. Помимо гидрофизических факторов в варьирование  $V_{\text{пик}}$  по акватории залива могут вносить различия экологических ниш отдельных генотипов пикоцианобактерий. Например, в Чесапикском заливе показано наличие более семи генотипов *Synechococcus*, два из которых преобладают в пикофракции в верхней и средней частях эстуария и способны выдерживать колебания солености от 0 до 30‰, тогда как в мористой части преобладают морские генотипы [20].

При наблюдаемой изменчивости  $V_{\text{сум}}$  и  $V_{\text{пик}}$  вклад пиководорослей в биомассу фитопланктона на половине исследованных станций не превышал 1%, на остальных станциях варьировал от 1% до 8%. На одной из станций Бассейна при относительно низкой  $V_{\text{сум}}$  вклад пикоформ достигал 40,5%.

Сравнение результатов настоящего исследования с картиной пространственного распределения пикофракции фотосинтезирующего фитопланктона в июне 2012 г. [12] показывает, что средние значения  $V_{\text{пик}}$  как в Онежском заливе, так и в губах Кандалакшского залива были меньше в 2015 г. Более низкая биомасса пикофракции в губах может быть обусловлена меньшей на  $4\text{--}5^\circ\text{C}$  температурой поверхностных вод в 2015 г. В пикофракции преобладали цианобактерии, а, как было показано, например, в работе Полсен и соавт. [21], биомасса

этой группы положительно коррелирует с температурой воды. Вклад пиководорослей в суммарную биомассу фитопланктона губ также был существенно ниже в 2015 г. Если в губе Чупа в июне 2012 г. вклад составлял 19–26% [12], то в 2015 г. колебался от 2% до 5%. В Онежском заливе температура воды в эти годы не различалась. Однако обращает на себя внимание тот факт, что если в 2015 г. на большей части акватории в нано- и микрофитопланктоне доминировали диатомовые водоросли, то в 2012 г. преобладали динофлагелляты. Такое различие в доминирующих группах свидетельствует о том, что фитопланктон в июне этих двух лет находился на разных стадиях сезонного развития. Это, возможно, и определило различия в  $V_{\text{пик}}$ . Однако величины вклада пиководорослей в суммарную биомассу фитопланктона в 2015 г. были близки к таковым в 2012 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Massana R.* Eukaryotic picoplankton in surface oceans // *Annu. Rev. Microbiol.* 2011. Vol. 65. P. 91–110.
2. *Gosselin M., Levasseur M., Wheeler P.A., Horner R.A., Booth B.C.* New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean // *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* 1997. Vol. 44. N 8. P. 1623–1625, 1627–1644.
3. *Booth B.C., Horner R.A.* Microalgae on the Arctic Ocean Section, 1994: species abundance and biomass // *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* 1997. Vol. 44. N 8. P. 1607–1622.
4. *Sherr E.B., Sherr B.F., Wheeler P.A., Thompson K.* Temporal and spatial variation in stocks of autotrophic and heterotrophic microbes in the upper water column of the central Arctic Ocean // *Deep-Sea Res. Part I-Oceanogr. Res. Pap.* 2003. Vol. 50. N 5. P. 557–571.
5. *Kilias E.S., Nöthig E.-M., Wolf C., Metfies K.* Picoeukaryote plankton composition off West Spitsbergen at the entrance to the Arctic Ocean // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2014. Vol. 61. N 6. P. 569–579.
6. *Zubkov M.V., Burkill P.H.* Syringe pumped high speed flow cytometry of oceanic phytoplankton // *Cytometry A.* 2006. Vol. 69. N 9. P. 1010–1019.
7. *Not F., Massana R., Latasa M., Marie D., Colson C., Eikrem W., Pedros-Alio C., Vaulot D., Simon N.* Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas // *Limnol. Oceanogr.* 2005. Vol. 50. N 5. P. 1677–1686.
8. IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. Working Group I 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* N.Y.: Cambridge Univ. Press, 996 pp.
9. *Li W.K.W., McLaughlin F.A., Lovejoy C., Carmack E.C.* Smallest algae thrive as the Arctic Ocean freshens // *Science.* 2009. Vol. 326. N 5952. P. 539.
10. *Berger V., Dahle S., Galaktionov K., Kosobokova X., Naumov A., Ratkova T., Savinov V.* White Sea: ecology and environment. St Petersburg; Tromsø: Derzavents, 2001. 157 pp.
11. *Ильяш Л.В.* Пикофитопланктон Кандалакшского залива Белого моря. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 1998. N 2. P. 49–52.
12. *Ilyash L.V., Belevich T.A., Stupnikova A.N., Drits A.V., Flint M.V.* Effects of local hydrophysical conditions on the spatial variability of phytoplankton in the White Sea // *Oceanology.* 2015. Vol. 55. N 2. P. 216–225.
13. *Arar E.J., Collins G.B.* Method 445.0. *in vitro* determination of chlorophyll “a” and pheophytin “a” in marine and freshwater algae by fluorescence. Revision 1.2. Cincinnati: U.S. EPA, 1997. 22 pp.
14. *Verity P.G., Robertson C.Y., Tronzo C.R., Andrews M.G., Nelson J.R., Sieracki M.E.* Relationship between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 1992. Vol. 37. N 7. P. 1434–1446.
15. *Belevich T.A., Ilyash L.V.* Picophytoplankton abundance in the Velikaya Salma Strait, White Sea // *Microbiology.* 2012. Vol. 81. N 3. P. 360–366.
16. *Huang S., Wilhelm S.W., Harvey R., Taylor K., Jiao N., Chen F.* Novel lineages of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in the global oceans // *ISME J.* 2012. Vol. 6. N 2. P. 285–297.
17. *Kravchishina M.D., Burenkov V.I., Kopelevich O.V., Sheberstov S.V., Vazyulya S.V., Lisitzin A.P.* New data on the spatial and temporal variability of the chlorophyll a concentration in the White Sea // *Dokl. Earth Sci.* 2013. Vol. 448. N 1. P. 120–125.
18. *Bell T., Kalf J.* The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth // *Limnol. Oceanogr.* 2001. Vol. 46. N 5. P. 1243–1248.
19. *Belevich T.A., Ilyash L.V., Zimin A.V., Kravchishina M.D., Novikhin A.E., Dobrotina E.D.* Peculiarities of summer phytoplankton spatial distribution in Onega Bay of the White Sea under local hydrophysical conditions // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 3. P. 135–140.
20. *Chen F., Wang K., Kan J., Suzuki M.T., Wommack K.E.* Diverse and unique picocyanobacteria in Chesapeake Bay, revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72. N 3. P. 2239–2243.
21. *Paulsen M.L., Doré H., Garczarek K.L., Seuthe L., Müller O., Sandaa R.-A., Bratbak G., Larsen A.* *Synechococcus* in the Atlantic gateway to the Arctic Ocean // *Front. Mar. Sci.* 2016. N 3. P. 191–205.

Поступила в редакцию  
28.03.2018  
Принята к печати  
04.06.2018

## HYDROBIOLOGY

## SPATIAL DISTRIBUTION OF THE WHITE SEA PICOPHYTOPLANKTON IN THE BEGINNING OF THE SUMMER

L.V. Ilyash<sup>1</sup>, T.A. Belevich<sup>1,\*</sup>, A.V. Drits<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>P.P. Shirshov Institute of Oceanology RAS, 36 Nahimovskiy pr., Moscow, 117997, Russia

\*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Biomass of photosynthetic picoplankton ( $B_{pic}$ ), its contribution to the total phytoplankton biomass ( $B_{pic\%}$ ), chlorophyll *a* concentration (Chl), and associated hydrophysical characteristics of water masses were estimated in the White Sea in June of 2015 on 47 stations in Onega and Kandalaksha Bays, including inlets, and in the western part of Basin. Spatial variability of  $B_{pic}$  mean values in photic layer (0.01–1.91 mg C/m<sup>3</sup>) was determined by sub- and mesoscale heterogeneity of hydrological conditions. The values of  $B_{pic}$  were higher near frontal zones than in the water masses with quasi-homogenous distribution of thermohaline characteristics. The relative contribution of  $B_{pic}$  did not exceed 1% at half of the stations and varied from 1 to 8% on the rest of the water area. The value of  $B_{pic\%}$  riched 40.5% in the Basin and did not exceed 2% during the phytoplankton bloom in Knyazhaya Inlet (Chl > 3 mg/m<sup>3</sup>) with the dominance of *Skeletonema costatum* sensu lato.

**Keywords:** picophytoplankton, phytoplankton, picophytoplankton biomass, bloom, the White Sea, *Skeletonema costatum* sensu lato

**Сведения об авторах**

Ильяш Людмила Васильевна — докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-2791; e-mail: ilyash@mail.bio.msu.ru

Белевич Татьяна Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Дриц Александр Викторович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. института Океанологии имени П.П. Ширишова РАН. Тел: 8-916-655 9191; e-mail: adrits@mail.ru

## ЗООЛОГИЯ

УДК 592:59.002

ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ ПЛЕКТОЛОФНОГО ЛОФОФОРА БРАХИОПОДЫ  
*COPTOTHYRIS GRAYI* (TEREBRATULIDA, RHYNCHONELLIFORMEA)

Т.В. Кузьмина\*, Е.Н. Темерева

*Кафедра зоологии беспозвоночных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы д. 1, стр. 12**\*e-mail: kuzmina-t@yandex.ru*

Брахиоподы — реликтовая группа беспозвоночных-фильтраторов, использующих щупальцевый аппарат — лофофор — для улавливания пищи из толщи воды. Брахиоподы претерпели массовое вымирание, связанное, по-видимому, с низкой эффективностью работы их ловчего аппарата по сравнению с более эволюционно продвинутыми животными-фильтраторами. Изучение механизма работы лофофора современных брахиопод важно для понимания их эволюционной судьбы. В данной работе изучен механизм очищения лофофора от крупных несъедобных частиц у брахиоподы *Coptothyris grayi* с наиболее сложным типом щупальцевого аппарата — плектолофным лофофором. Методом прижизненных наблюдений и в ходе экспериментов с искусственными частицами показано, что крупные несъедобные частицы скапливаются внутри рук лофофора на внешней стороне брахиальной складки. Накопленные частицы формируют ряды вдоль фронтальных желобков наружных щупалец, последовательно переносятся к их краю и двигаются вдоль края щупалец, обволакиваясь слизью. Одна часть частиц отрывается от лофофора, в то время как другая переносится на абфронтальную сторону щупалец. Путем многократного реверсирования направления биения абфронтальных ресничек частицы совершают волнообразные движения вдоль абфронтальной поверхности щупалец. Такой характер движения частиц способствует склеиванию частиц в комки благодаря слизи, выделяемой железистыми клетками щупалец. Сформированные комки отрываются от лофофора и падают на мантийную складку. За счет биения ресничек мантии частицы транспортируются к переднему участку края мантии, где также наблюдается реверсирующий характер биения ресничек. В области края мантии происходит склеивание комков и формирование псевдофекалий, которые выводятся из мантийной полости. Таким образом, впервые показано, что удаление крупных несъедобных частиц из лофофора обеспечивается работой исключительно наружных щупалец. Впервые для брахиопод было обнаружено реверсирование биения абфронтальных ресничек щупалец и мантии, что способствует дополнительной выработке слизи, формированию комков псевдофекалий и облегчает их выход из мантийной полости. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание работы щупальцевого аппарата современных брахиопод. Использование этих результатов в сравнительном анализе позволит пролить свет на функционирование и эволюцию щупальцевых аппаратов у Bilateria.

**Ключевые слова:** брахиоподы, лофофор, щупальце, мантия, фильтраторы, фильтрационный аппарат

Брахиоподы (или плеченогие) — морские беспозвоночные животные, тело которых заключено в двустворчатую раковину. Большой объем раковины занят мантийной полостью — обширным пространством, которое выстлано складками покровного эпителия (мантией) и соощаается с окружающей средой. В мантийной полости у брахиопод располагается фильтрационный аппарат — лофофор. Лофофор — особый отдел тела, который несет щупальца, окружающие рот и никогда не окружающие анус [1]. Лофофор выполняет множество разнообразных функций: от питания и дыхания до вынашивания потомства и встречается у трех типов беспозвоночных животных — форонид, брахиопод и мшанок. У брахиопод строение лофофора достигло максимального морфологического разнообразия и

сложности. Основой лофофора является брахиальная ось, вдоль которой проходит ряд щупалец [2, 3]. Параллельно основаниям щупалец тянется брахиальная складка. Между складкой и щупальцами проходит пищевой желобок. В разных типах лофофора брахиальная ось имеет разную морфологию и может быть полукруглой, подковообразной, петлевидной и спиральной [3].

У подавляющего большинства брахиопод вдоль брахиальной оси щупальца организованы в два ряда, наружный и внутренний, которые расположены относительно друг друга в шахматном порядке. У каждого щупальца обоих рядов можно выделить фронтальную и абфронтальную стороны. Фронтальная сторона обращена к брахиальной складке и пищевому желобку, абфронтальная поверхность нахо-

дится на противоположной стороне щупальца. Вдоль фронтальной стороны внутренних щупалец проходит выпячивание — фронтальный гребень, вдоль фронтальной стороны наружного ряда щупалец проходит впячивание — фронтальный желобок.

Согласно литературным данным [4, 5], процесс фильтрации брахиопод может быть подразделен на несколько последовательных событий: создание токов воды в мантийной полости, сортировка частиц, захват и передача пищевых частиц ко рту, удаление ненужных частиц и очистка лофофора.

Циркуляцию воды в мантийной полости создает биение латеральных ресничек, расположенных вдоль боковых сторон щупалец, и ресничек, покрывающих мантию [2, 6]. Щупальца разграничивают внутреннее пространство мантийной полости на вводную и выводную камеры. Вода поступает в вводную камеру, проходит между рядами щупалец, попадает в выводную камеру и оттуда выходит во внешнюю среду. Характер циркуляции водных потоков мантийной полости различается в разных типах лофофора [2, 7]. Однако во всех случаях входящие потоки с пищевыми частицами встречаются с фронтальной поверхностью щупалец, а захват частиц происходит с верхней фронтальной стороны латеральных ресничек, что характерно для так называемой «upstream collecting system (системы, собирающей частицы с верхнего потока)» [8].

Предполагается, что сортировка частиц может происходить по размеру [3, 6, 9], массе [10], а также одновременно по массе, форме и импульсу [11].

Механизм захвата пищевых частиц до настоящего времени является предметом морфологических и экспериментальных исследований [10, 12–15]. Известно, что они попадают на фронтальные желобки наружных щупалец, перемещаются по ним вниз и поступают в пищевую желобок, где обволакиваются слизью и транспортируются ко рту. Существует несколько гипотез о том, каким образом происходят захват пищевых частиц из входящего потока и передача их на фронтальный желобок наружных щупалец. Наиболее правдоподобной считается гипотеза локального реверсирования латеральных ресничек [12, 13] в сочетании с гипотезами аэрозольного захвата [14, 16]: пищевые частицы, которые попадают к латеральным ресничкам на расстоянии, равное диаметру самой частицы, вызывают локальное изменение направления биения латеральных ресничек, так что они начинают бить в сторону фронтального желобка, тем самым частица отбрасывается на фронтальную поверхность щупальца.

Несъедобные частицы скапливаются внутри лофофора, откуда они транспортируются к концам щупалец и выводятся с выходящим потоком. Однако в литературных источниках нет общего мнения по вопросу, каким образом происходит удаление ненужных частиц. В большинстве работ предполагается разная роль внутренних и наружных щупалец для очистки лофофора: наружные щупальца переносят съедобные частицы к пищевому желобку,

а внутренние щупальца переносят несъедобные частицы к своим концам, откуда они отрываются от щупалец и выносятся с выходящим потоком [10, 15, 17, 18]. При этом одни авторы [10, 15] полагают, что фронтальные реснички внутренних щупалец постоянно бьют в сторону кончиков, и поэтому очистка лофофора происходит постоянно. Другие исследователи [2, 17, 18] считают, что происходит процесс реверсирования биения фронтальных ресничек внутренних щупалец при очищении лофофора. Однако Стратман [12] описывает участие лишь наружных щупалец в очистке и питании (путем реверсирования биения фронтальных ресничек).

Целью данной работы является изучение механизма удаления крупных несъедобных частиц из мантийной полости на примере плектолофного лофофора замковой брахиоподы *Coptothyris grayi* (Davidson, 1852).

### Материалы и методы

Материал для исследования (половозрелые особи *C. grayi*) собран в июле 2015 г. на глубине 8–10 м в заливе Восток Японского моря в окрестностях морской биологической станции “Восток” Национального научного центра морской биологии. Исследование проводили на живых особях, у которых была удалена вентральная створка раковины, в аквариуме с морской водой при температуре 18°C. В водную среду были добавлены сферические частицы диаметром 110 мкм. Наблюдения проводили под биноклем Leica MZ12.5 (“Leica Microsystems”, Германия), съемка была проведена при помощи цифровой камеры DMC6200 (“Leica Microsystems”, Германия).

Изучение строения брахиальной оси лофофора *C. grayi* было проведено при помощи сканирующей электронной микроскопии. Для этого отпрепарированные участки лофофора были зафиксированы в 2,5%-ном глутаральдегиде на какодилатном буфере. Дальнейшую обработку материала проводили по стандартной методике для сканирующей электронной микроскопии. Подготовленные образцы были изучены и сфотографированы на сканирующих электронных микроскопах Hitachi S-405A (“Hitachi”, Япония) и Cam Scan S2 (“Cambridge Instruments Inc.”, Великобритания).

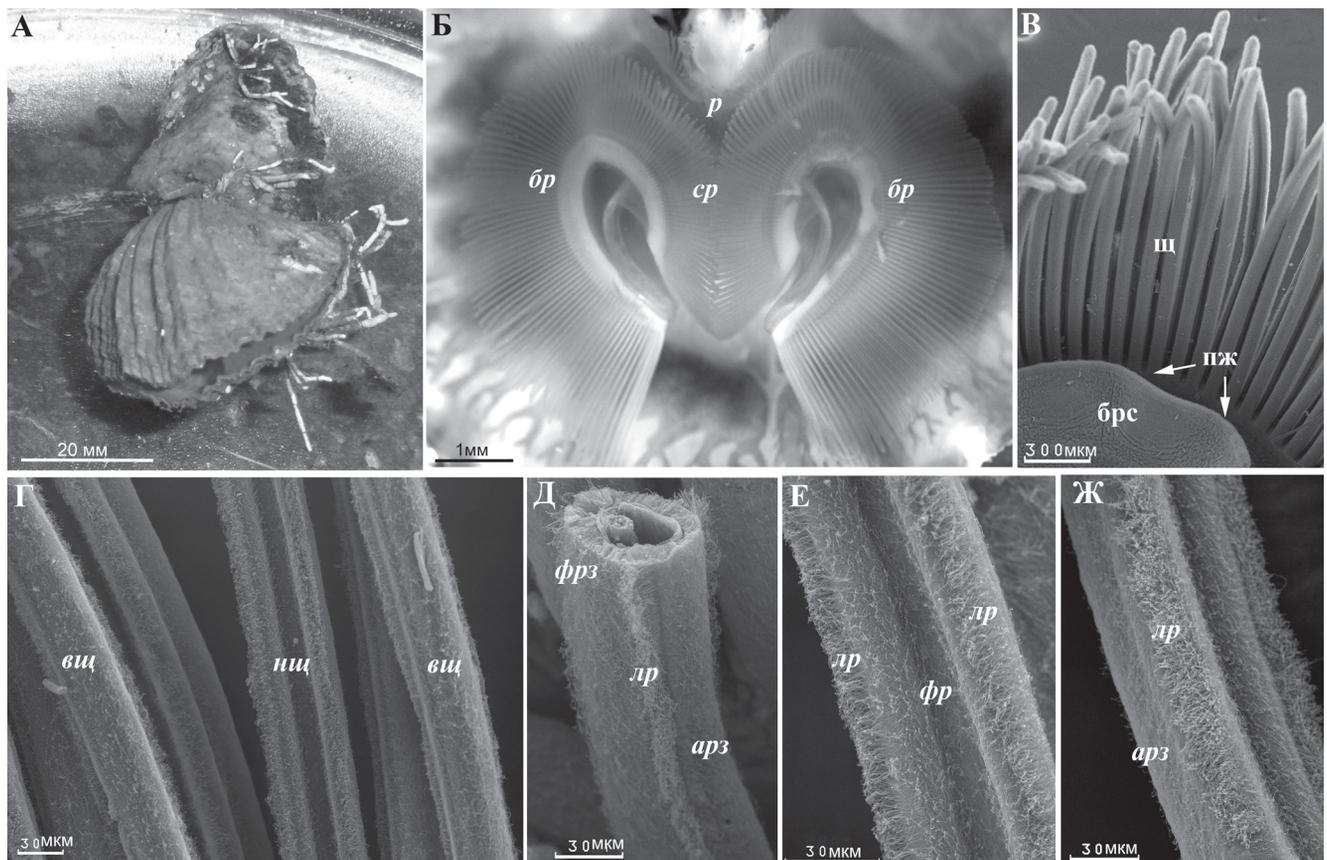
### Результаты и обсуждение

Для изучаемого вида характерен плектолофный лофофор, который представляет собой наиболее сложный тип организации лофофора брахиопод. Во время фильтрации створки раковины лишь немного приоткрыты (рис. 1А). Плектолофный лофофор крепится к передней стенке тела и поддерживается известковым скелетом. Он выдается в мантийную полость и состоит из двух боковых рук и одной средней спиральнозавитой руки (рис. 1Б). Вдоль руки лофофора проходит двойной ряд щупалец, который состоит из чередующихся в шах-

матном порядке внутренних и наружных щупалец, параллельно основаниям щупалец проходит брахиальная складка (рис. 1Б). Щупальца покрыты ресничками. Вдоль щупальца проходят три продольные ресничные зоны, характерные для других брахиопод [10, 19] – фронтальная и две латеральных. Фронтальные ресничные зоны обращены в сторону брахиальной складки. Латеральные ресничные зоны располагаются симметрично по обе стороны щупальца. Поскольку у внутренних щупалец латеральные реснички расположены ближе к абфронтальной стороне, их также называют латеро-абфронтальными ресничками, а у наружных щупалец латеральные реснички расположены ближе к фронтальной стороне, поэтому их называют латеро-фронтальными ресничками [5, 19]. Абфронтальная сторона щупалец покрыта менее густо расположенными ресничками. Нами не были обнаружены особые чувствительные латеро-фронтальные реснички по краям фронтальной ресничной зоны, описанные для некоторых замковых и беззамковых брахиопод [10, 13].

Циркуляция воды в мантийной полости у брахиопод с плектолофным лофофором подробно исследована [2, 20]. Изучение работы не потревоженного плектолофного лофофора внутри раковины при использовании эндоскопа [15] дало наиболее достоверный результат. Во время фильтрации вода поступает в мантийную полость с боков и попадает в переднюю часть боковых рук, где разделяется на два потока. Первый поток проходит между щупальцами боковых рук и выносится из мантийной полости с выходящим потоком спереди по центру раковины. Второй поток идет назад вдоль боковых рук и затягивается средней спиральной рукой, проходит между ее щупальцами и также выводится по центру между створками раковины.

На основании морфо-функционального анализа было выдвинуто предположение, что верхний предел съедобных частиц у брахиопод составляет около 100 мкм [3]. При добавлении частиц диаметром 110 мкм нами было обнаружено, что частицы проникают в боковые руки лофофора, при этом частицы не попадают в пищевой желобок, а кон-



**Рис. 1.** Строение лофофора *Coptothyris grayi*. А–Б – фотографии живых животных со светового стереомикроскопа, В–Ж – фотографии на сканирующем электронном микроскопе. А – фотография взрослой особи: створки раковины приоткрыты во время фильтрации, Б – общий вид плектолофного лофофора, который состоит из средней (ср) и двух боковых рук (бр), рот (р) расположен между рядом щупалец и брахиальной складкой в основании лофофора, В – участок брахиальной оси лофофора, которая состоит из двойного ряда щупалец (ш) и брахиальной складки (брс), между ними расположен пищевой желобок (пж), Г – наружные щупальца (нц) и внутренние щупальца (вц), расположенные вдоль брахиальной оси в шахматном порядке, Д – участок внутреннего щупальца: видны фронтальная ресничная зона (фрз) в виде гребня и латеральные реснички (лр), смещенные к абфронтальной ресничной зоне (арз), Е – участок наружного щупальца: виден глубокий фронтальный желобок, покрытый фронтальными ресничками (фр), по бокам видны латеральные реснички (лр), Ж – участок наружного щупальца, вид сбоку: видны латеральные реснички (лр) и абфронтальная ресничная зона (арз), покрытая редко расположенными ресничками

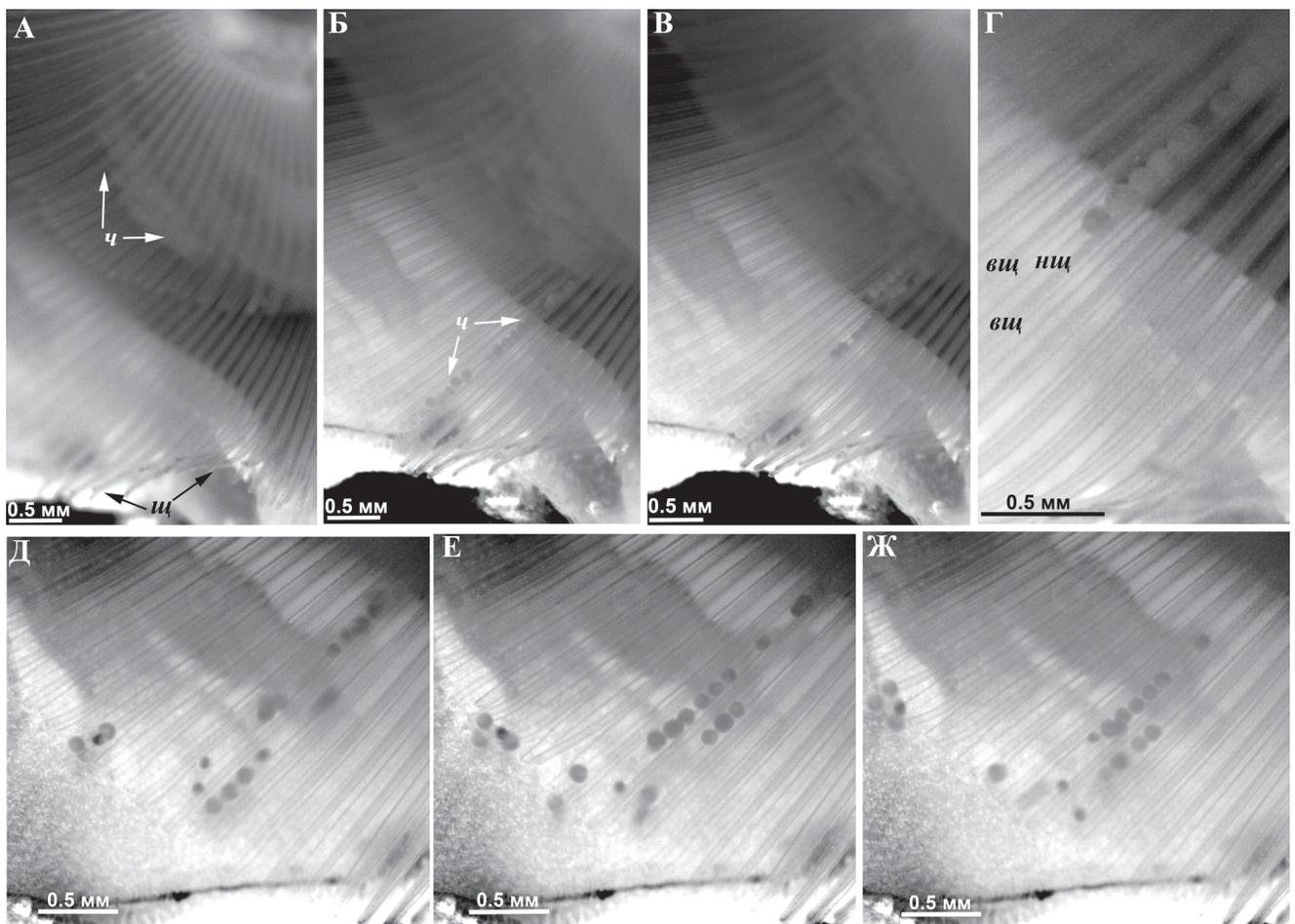


Рис. 2. Фотографии последовательных этапов передвижения частиц по фронтальной поверхности лофофора; световая микроскопия. А – скопление частиц внутри лофофора, Б–Г – последовательные фотографии с интервалом в 60 с передвижения частиц вдоль наружного щупальца, Д–Ж – последовательные фотографии с интервалом в 30 с передвижения частиц вдоль кончиков щупалец. Обозначения: *вщ* – внутреннее щупальце, *нщ* – наружное щупальце, *ч* – частицы диаметром 110 мкм

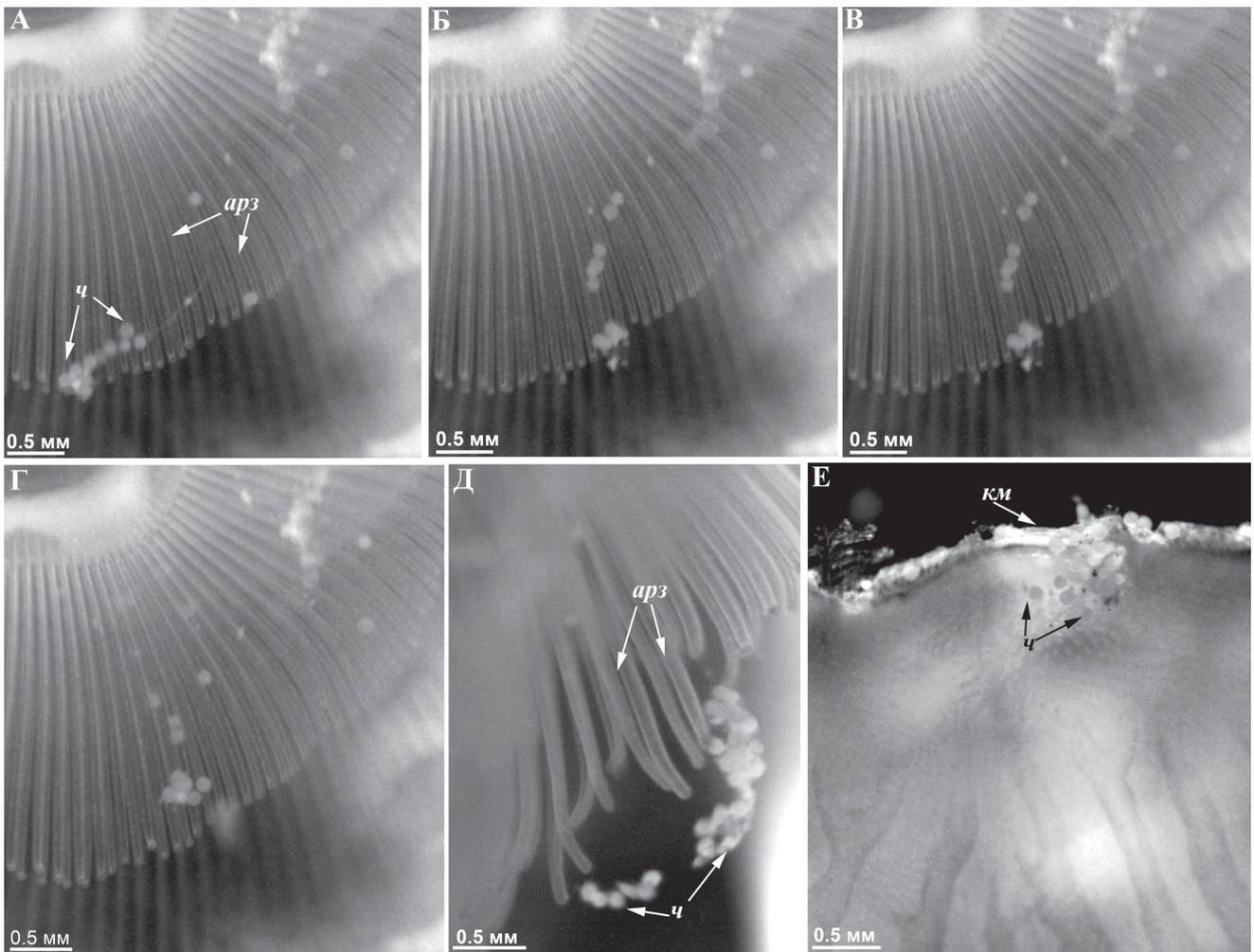
центрируются на внешней стороне брахиальной складки (рис. 2А).

Механизм очищения лофофора от крупных несъедобных частиц можно разделить на три этапа:

1. **Перенос частиц с фронтальной на абфронтальную поверхность щупалец.** В ходе наблюдения за процессом очищения лофофора мы обнаружили, что крупные частицы, которые скапливаются у основания щупалец, выстраиваются друг за другом в ряд и перемещаются в сторону кончиков щупалец (рис. 2Б–В). Движение частиц от основания к концу щупалец происходит только вдоль желобков наружных щупалец, внутренние щупальца при этом не участвуют в очищении лофофора (рис. 2Г). Когда частицы достигают кончиков щупалец, они обволакиваются слизью и либо передвигаются вдоль кончиков щупалец (рис. 2Е–Ж), пока не падают на мантийную складку, либо попадают на абфронтальную сторону щупалец. Поскольку доказано, что именно наружные щупальца также участвуют в переносе пищевых частиц вниз к пищевому желобку [4, 5], то можно предположить, что наружные щупальца могут участвовать как в питании, так и в удалении ненужных частиц путем реверси-

рования своего биения, что согласуется с данными Стратмана [12]. Наши данные не подтверждают результаты предыдущих работ, в которых показано, что основная роль в очищении лофофора принадлежит внутренним щупальцам [10, 15, 17, 18].

2. **Перенос частиц с абфронтальной стороны щупалец на мантийную складку.** После того, как склеенные слизию частицы оказываются на абфронтальной стороне лофофора, они начинают двигаться то вверх, то вниз, пока не отрываются от лофофора и затем не падают на мантийную складку (рис. 3А–Г). Можно предположить, что абфронтальные реснички щупалец меняют направление биения на противоположное несколько раз, что, вероятно, способствует отделению слизистых комков с частицами от лофофора. Участие слизи в склеивании ненужных частиц для очистки лофофора широко известно [4, 5]. Однако нами впервые показан процесс многократного реверсирования направления биения абфронтальных ресничек лофофора, благодаря чему ненужный комок начинает двигаться то вверх, то вниз по щупальцам, что способствует дополнительному выделению слизи и отделению комка от лофофора. Кроме того, отде-



**Рис. 3.** Фотографии последовательных этапов удаления частиц с абфронтальной поверхности щупалец; световая микроскопия. А–Г – перемещение частиц (*ч*) вдоль абфронтальной ресничной зоны щупалец (*арз*), последовательные фотографии с интервалом в 30 с, Д – сгибание щупалец, Е – перемещение частиц к краю мантии (*км*)

лению частиц от лофофора способствует сгибание отдельных щупалец (рис. 3Д). В некоторых случаях при сгибании щупалец между ними увеличивается расстояние, достаточное для прохождения крупных частиц, которые затем попадают на мантийную складку. Движение щупалец для очистки лофофора описано для многих брахиопод [9].

**3. Перенос частиц вдоль мантии и удаление во внешнюю среду.** Частицы, упавшие на мантийную складку, обволакиваются слизью и за счет биения ресничек мантии передвигаются к строго определенному месту, а именно к переднему участку края мантии (рис. 3Е). Здесь происходит концентрация частиц, формирование псевдофекалий и их удаление. В некоторых случаях, прежде чем попасть во внешнюю среду, частицы совершают колебательные движения то вперед, то назад подобно тому, что мы наблюдали на абфронтальной стороне щупалец. Вероятно, реснички мантии также способны реверсировать свое биение и этот процесс способствует отделению частиц от края мантии и их выделению во внешнюю среду. Выход частиц строго на переднем участке мантийного края соответствует направлению выходящего потока, что способствует

выделению частиц. Участие мантии в процессе выделения ненужных частиц также отмечено многими авторами [6, 9].

Важно отметить, что данное наблюдение было проведено на вскрытых особях без вентральной створки. Следовательно, мы не могли наблюдать процесс схлопывания створок раковины, который описан у большинства брахиопод и играет важную роль в очищении мантийной полости от псевдофекалий [2]. Кроме того, при удалении вентральной створки мы не могли наблюдать строгое разделение входящих и выходящих потоков воды через мантийную полость. В этом случае частицы не могли быть унесены выходящим потоком, а падали на мантию, что случается и при неповрежденной системе потоков.

Таким образом, нами было впервые доказано, что в процессе очищения лофофора участвуют исключительно наружные щупальца. Реверсирование направления биения абфронтальных ресничек щупалец и мантии способствует дополнительной выработке слизи, формированию комков псевдофекалий и облегчает их выход из мантийной полости.

Брахиоподы — реликтовая группа беспозвоночных-фильтраторов, расцвет которой приходится на палеозой, в мезозое произошло вымирание этой группы, так что до наших дней сохранилось всего лишь около 5% былого разнообразия [21]. Другие фильтраторы — двустворчатые моллюски — наоборот, стали доминировать в морях с мезозоя и многочисленны в наше время. Из этих двух фактов был сделан вывод, что брахиоподы были вытеснены двустворчатыми моллюсками в результате конкуренции за пищу и местообитание [22]. Однако двустворчатые моллюски уже в палеозое были более эволюционно успешными, что в первую очередь связано с тем, что фильтрационный аппарат двустворчатых моллюсков уже в палеозое обладал более высокой эффективностью, чем у брахиопод [21, 23]. Настоящее исследование показало, что механизм сортировки частиц и очищения фильтрующего аппарата у брахиопод сходен с таковым у двустворчатых моллюсков [24] и связан с обильным выделением слизи, склеиванием тех частиц, которые в силу своих крупных размеров не попали в пищевой желобок, и выносом их из мантийной полости за счет выходящих потоков. Однако име-

ется существенная разница в объеме фильтрационного аппарата: он очень крупный у двустворчатых моллюсков и имеет гораздо меньший объем у брахиопод. Эффективность работы фильтрационного аппарата напрямую связана с его размерами. У брахиопод все попытки построить очень большой лофофор и соответственно иметь большие размеры тела оказались неудачными: например, гигантские брахиоподы (*Gigantoproductinae*) с диаметром раковины 20 см вымерли, а размеры современных брахиопод никогда не превышают 6 см. Наличие эффективного фильтрующего аппарата позволило двустворчатым моллюскам лучше приспособляться к изменениям окружающей среды и занимать новые экологические ниши, в то время как брахиоподы оказались менее пластичными и пертерпели катастрофическое вымирание [21, 23, 25].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (электронно-микроскопические работы — проект № 18-14-00082, сбор материала и проведение экспериментов — проект № 14-50-00029) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00586).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hyman L.H. The invertebrates. Vol. 5. Smaller coelomate groups. N.Y.: McCraw—Hill, 1959. 783 pp.
2. Rudwick M.J.S. Living and fossil brachiopods. London: Hutchinson and Co. Ltd., 1970. 199 pp.
3. Kuzmina T.V., Malakhov V.V. Structure of the brachiopod lophophore // *Paleontol. J.* 2007. Vol. 41. N 5. P. 520–536.
4. James M.A., Ansell A.D., Collins M.J., Curry G.B., Peck L.S., Rhodes M.C. Biology of living brachiopods // *Adv. Mar. Biol.* 1992. Vol. 28. P. 175–387.
5. Williams A., Brunton C.H.C., Carlson S.J. Treatise on invertebrate paleontology. Part H. Brachiopoda. Vol. 1. Introduction. Colorado; Lawrence: The Geological Society of America; Univ. Kansas Press, 1997. 539 pp.
6. Westbroek P., Yanagida J., Isa Y. Functional morphology of brachiopod and coral skeletal structures supporting ciliated epithelia // *Paleobiology.* 1980. Vol. 6. N 3. P. 313–330.
7. Emig C.C. Functional disposition of the lophophore in living brachiopoda // *Lethaia.* 1992. Vol. 25. N 3. P. 291–302.
8. Nielsen C. The structure and function of metazoan ciliary bands and their phylogenetic significance // *Acta Zool.* 1987. Vol. 68. N 4. P. 205–262.
9. Thayer C.W. Are brachiopods better than bivalves? Mechanisms of turbidity tolerance in articulate and their interaction with feeding in articulate // 1986. *Paleobiology.* Vol. 12. N 2. P. 161–174.
10. Gilmour T.H.J. Ciliation and function of the food-collecting and waste-rejecting organs of the lophophorates // *Can. J. Zool.* 1978. Vol. 56. N 10. P. 2142–2155.
11. Rhodes M.C., Thayer C.W. Effects of turbidity on suspension feeding: Are brachiopods better than bivalves? // *Brachiopods through time. Proceedings of the 2nd International Brachiopod Congress / Eds. D.I. MacKinnon, D.E. Lee, and J.D. Campbell. Dunedin: Univ. Otago, 1991. P. 191–196.*
12. Strathmann R.R. Function of lateral cilia in suspension feeding of lophophorates (Brachiopoda, Phoronida, Ectoprocta) // *Mar. Biol.* 1973. Vol. 23. N 2. P. 129–136.
13. Strathmann R.R. Ciliary sieving and active ciliary response in capture of particles by suspension-feeding brachiopod larvae // *Acta Zool.* 2005. Vol. 86. N 1. P. 41–54.
14. LaBarbera M. Feeding currents and particle capture mechanisms in suspension feeding animals // *Am. Zool.* 1984. Vol. 24. N 1. P. 71–84.
15. Dhar S.R., Logan A., MacDonald B.A., Ward J.A. Endoscopic investigations of feeding structures and mechanisms in two plectolophous brachiopods // *Invertebr. Biol.* 1997. Vol. 116. N 2. P. 142–150.
16. Rubenstein D.I., Koehl M.A.R. The mechanisms of filter feeding: some theoretical considerations // *Am. Nat.* 1977. Vol. 111. N 981. P. 981–994.
17. Atkins D. The ciliary feeding mechanism of the Megathyridae (Brachiopoda), and the growth stages of the lophophore // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 1960. Vol. 39. N 3. P. 459–479.
18. Atkins D. Notes on the lophophore and gut of the brachiopod *Tegulorhynchia nigricans* (G. B. Sowerby) // *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1963. Vol. 140. N 1. P. 15–24.
19. Reed C.G., Cloney R.A. Brachiopod tentacles: ultrastructure and functional significance of the connective tissue and myoepithelial cells in *Terebratalia* // *Cell Tiss. Res.* 1977. Vol. 185. N 1. P. 17–42.
20. LaBarbera M. Water flow patterns in and around three species of articulate brachiopods // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1981. Vol. 55. N 2. P. 185–206.
21. Carlson S.J. The evolution of Brachiopoda // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2016. Vol. 44. P. 409–438.
22. Liow L.H., Reitan T., Harnik P.G. Ecological interactions on macroevolutionary time scales: clams and brachiopods are more than ships that pass in the night // *Ecol. Lett.* 2015. Vol. 18. N 10. P. 1030–1039.
23. Payne J.L., Heim N.A., Knope M.L., McClain C.R. Metabolic dominance of bivalves predates brachiopod diver-

sity decline by more than 150 million years // Proc. R. Soc. B. 2014. Vol. 281. N 1783:20133122.

24. *Jørgensen C.B.* Bivalve filter feeding revisited // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1996. Vol. 142. N 1/3. P. 287–302.

25. *Смирнова Т.Н.* Брахиоподы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 64 с.

Поступила в редакцию  
19.04.2018

Принята к печати  
06.06.2018

## ZOOLOGY

### REJECTION MECHANISM OF PLECTOLOPHOUS LOPHOPHORE OF BRACHIOPOD *COPTOTHYRIS GRAYI* (TEREBRATULIDA, RHYNCHONELLIFORMEA)

T.V. Kuzmina\*, E.N. Temereva

*Department of Invertebrate Zoology, School of Biology, Moscow State University, Leninskiye Gory, Moscow 119234, Russia*

\*e-mail: kuzmina-t@yandex.ru

Brachiopoda is a relict group of invertebrate filter feeders that used tentacle organ – lophophore – for caption of food particles from the water flow. Brachiopod extinction apparently occurred due to low productivity of their filtering organ in comparison with more advanced filter-feeders. Investigation of filtering mechanism of recent brachiopods is essential to understanding their evolutionary fate. This study is devoted to the rejection mechanism of waste large particles from plectolophous lophophore of brachiopod *Coptothyris grayi*. The waste particles gather inside of the lophophore on outer side of brachial fold. The particles form rows along frontal grooves of outer tentacles, are carried successively to the tentacle tips and move along them, sliming by mucus. One part of the particles takes off the lophophore and falls down mantle, while another part was carried to abfrontal surface of the tentacles. Due to repeated reversals of abfrontal cilia, the particles wavyly move along the abfrontal surface of tentacles. Such movement contributes to secretion of mucus and forming of particle clots. The clots take off the lophophore and fall down the mantle. The particles are transported along mantle by cilia to anterior part of the mantle margin. Here the ciliary reversals also take place that facilitate to secretion of mucus and forming pseudofeaces. The last takes away from the mantle cavity. Thus, only outer tentacles participate in rejection of waste large particle from lophophore. Ciliary reversals of abfrontal surface of tentacles and mantle are first discovered in brachiopods. This facilitates the secretion of mucus, forming of pseudofeaces and emission them from mantle cavity. The results contribute to knowledges of lophophore function and evolution of tentacle organs in Bilateria.

**Keywords:** *brachiopods, lophophore, tentacle, mantle, filter feeders, filtration apparatus*

#### Сведения об авторах

*Кузьмина Татьяна Валерьевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-95; e-mail: kuzmina-t@yandex.ru

*Темерева Елена Николаевна* – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-95; e-mail: temereva@mail.ru

## МЕТОДЫ

УДК 577.214.32

ОЧИСТКА ЭЛОНГАЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

О.В. Чертков, М.Г. Карлова, Н.С. Герасимова, О.С. Соколова\*

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Разработана методика подготовки образца остановленного элонгационного комплекса РНК-полимеразы *Escherichia coli* с нуклеосомой для исследования с помощью криоэлектронной микроскопии. Разработана методика очистки комплекса от избытка свободной РНК-полимеразы и непродуктивных комплексов на гепариновой смоле. Для концентрирования элонгационного комплекса был применен аффинный монослой, сформированный липидами, связанными с ионами Ni. Применение подготовленных аффинных сеток с иммобилизованным монослоем липидов позволило предотвратить агрегацию частиц комплекса на поверхности сетки. Разработанная методика может применяться для получения трехмерной реконструкции элонгационного комплекса ЕС+39.

**Ключевые слова:** РНК-полимераза, нуклеосома, элонгационный комплекс, аффинная сетка, очистка белка, электронная микроскопия

В хроматине нуклеиновые кислоты и белки компактно упакованы, и, в то же время, его структура позволяет ДНК- и РНК-полимеразам эффективно продвигаться вдоль цепи ДНК. Поддержание нуклеосомной организации при прохождении РНК-полимеразы необходимо для правильной регуляции генов и выживаемости клеток. Восстановление структуры хроматина происходит двумя разными способами. Во время интенсивной транскрипции наблюдается обмен всех основных гистонов, тогда как при умеренной транскрипции происходит обмен димеров H2A-H2B, но не тетрамеров H3-H4 [1, 2].

Прохождение РНК-полимеразы через хроматин характеризуется высоким нуклеосомным барьером транскрипции. После начального отворачивания нуклеосомной ДНК от октамера гистонов [3] и формирования ряда внутринуклеосомных петель ДНК [4] при транскрипции в области +45 РНК-полимераза может индуцировать формирование внутринуклеосомной петли малого размера [5]. Этот комплекс был назван петлей “нулевого размера” (или Ø-петлей), поскольку в нем ДНК-гистоновые взаимодействия сохраняются как в ДНК, находящейся перед РНК-полимеразой, так и в ее области, уже пройденной транскрибирующим ферментом. Результатом образования Ø-петли может быть частичное отворачивание ДНК от поверхности октамера и потеря димера H2A-H2B [5]. Формирование Ø-петли необходимо для прохождения транскрипции без диссоциации коровых гистонов H3-H4 от ДНК и, возможно, играет роль в сохранении гистонового кода в процессе транскрипции. Для того, чтобы оценить возможность образования Ø-петли, было проведено моделиро-

вание комплекса методами докинга. Этот анализ показал, что Ø-петля может быть сформирована только при нахождении РНК-полимеразы в позициях +39 или +49 в нуклеосоме [5].

Общая схема строения ДНК-зависимых РНК-полимераз идентична для прокариот и эукариот. Холофермент РНК-полимеразы *Escherichia coli* состоит из “корового” фермента и сигма-фактора. “Коровый” фермент включает 5 субъединиц ( $\beta$ -,  $\beta'$ -, 2  $\alpha$ -,  $\omega$ -). Он обладает каталитической активностью, но не способен распознавать точку начала транскрипции; для этого требуется сигма-фактор [6]. Архитектура всех известных к настоящему моменту структур ДНК-зависимых РНК-полимераз оказалась консервативной: область активного центра внешне напоминает клешню и характеризуется присутствием иона магния и консервативными мотивами.

Нуклеосома представляет собой октамер гистонов (центральный гетеротетрамер (H3-H4)<sub>2</sub> и два гетеродимера H2A-H2B), связывающий двухцепочечную ДНК размером 147 п.о. Структура нуклеосомы была определена при помощи рентгеноструктурного анализа [7].

В данной работе нами был разработан метод двухстадийной очистки и концентрирования элонгационного комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с мононуклеосомой, остановленного в положении +39 от входа в нуклеосому (ЕС+39). Данная очистка позволяет получить чистый препарат элонгационного комплекса, подходящий для изучения как методом электронной микроскопии с негативным окрашиванием, так и методом криоэлектронной микроскопии.

## Материалы и методы

**Сборка ДНК матрицы.** Используемая в работе ДНК-матрица состоит из двух частей: нуклеосом-позиционирующая последовательность s603 и прокариотический промотор T7A1. Последовательность нуклеотидов ДНК была модифицирована таким образом, чтобы образовался участок, не содержащий основания Т от старта транскрипции до положения +39. Такая последовательность нуклеотидов позволяла получить элонгационный комплекс с РНК-полимеразой, остановленной в положении +39 пар нуклеотидов от входа в нуклеосомную ДНК в ходе транскрипции в присутствии ограниченного набора рибонуклеотидов.

Фрагменты ДНК для работы получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для фрагмента T7A1 использовались праймеры: 282Forwhst 5'-CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA 134rev40mod 5'-TGCGCGCGCTTCTGGGCCCTGTGCCGGTGTCTCGCTTG

Для фрагмента s603 использовались праймеры: For40T CGCGCGCCCAACCGAGAGAAGAC GACACATGGGCTTCTAAG

282Revwhst 5'-CGTCGGATCCGTACCCAGGGACTT

Для очистки полученной ДНК использовали набор QIAquick PCR Purification Kit фирмы Qiagen (США).

В ходе перекрестного отжига с последующим удлинением цепей был получен полноразмерный фрагмент, включающий промотор и нуклеосом-позиционирующую последовательность, который был клонирован в плазмиде pDS1 в клетках *E. coli*. Фрагменты ДНК для работы получали методом ПЦР с использованием описанной плазмиды в качестве матрицы и олигонуклеотидов 282Forwhst и 282Revwhst.

**Сборка нуклеосом.** В качестве источника коровых гистонов для сборки нуклеосом на ДНК-матрице, использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят. Нуклеосомы собирали на ДНК-матрице в ходе диализа против NaCl в уменьшающихся концентрациях по протоколу, описанному нами ранее [8].

**Сборка элонгационного комплекса EC+39.** Для получения элонгационного комплекса в положении +39 от начала нуклеосомы использовали РНК-полимеразу *E. coli*, экспрессированную и очищенную, как было описано нами ранее [9]. Реакцию транскрипции проводили по методике, опубликованной в работе Гайкаловой с соавт. [10], с некоторыми изменениями и дополнительной стадией очистки. Для получения открытого комплекса брали 100 нг ДНК матрицы, ассоциированной с нуклеосомой, и добавляли холофермент РНК-полимеразу *E. coli* в пятикратном молярном избытке, затем инкубировали полученную смесь при 37°C в течение 10 мин. Реакция проводилась в буфере ТБ40 (10 мМ Tris-HCl pH 7,9, 1 мМ β-меркаптоэтанол, KCl – 40 мМ) в объеме 10 мкл.

Элонгационный комплекс EC-39 (комплекс, остановленный в положении –39 относительно начала нуклеосомы со стороны промотора) получали путем добавления РНК-праймера ApUpC (20 мкМ), а также АТФ (20 мкМ) и ГТФ (20 мкМ) с последующим инкубированием при 37°C в течение 10 мин. Для получения комплекса EC+39 к раствору, содержащему EC–39, добавляли KCl до концентрации 150 мМ и ЦТФ (5 мМ), а затем инкубировали полученную смесь 10 мин при комнатной температуре.

**Очистка открытого комплекса на гепариновой колонке.** Для очистки использовали смолу Heparin-HyperD (Pall, США) для аффинной хроматографии. К полученному открытому комплексу добавляли 1 мкл смолы, инкубировали 15 с при комнатной температуре и осаждали центрифугированием в течение 10 с при 8000 об./мин. 100 мкл смолы предварительно были проинкубированы с БСА (бычий сывороточный альбумин; 10 мг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для отмывки от остатков БСА к 100 мкл смолы добавляли 1 мл буфера ТБ40, осаждали центрифугированием, супернатант декантировали, процедуру повторяли 5 раз.

**Приготовление аффинных сеток.** При получении аффинных сеток [11] 1 мкл смеси липидов 80% POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилхолин; Avanti, США), 20% DGS-NTA(Ni) (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-[(N-(5-амино-1-карбоксипентил) иминодиацетат) сукцинил], соль никеля; Avanti, США) наслаивали на каплю буфера (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH = 7,9). Тефлоновый контейнер, содержащий капли (25 мкл) буфера с липидами, инкубировали 15 мин во влажной камере при +4°C для формирования липидного монослоя. Далее монослой переносили на поверхность медных сеток для микроскопии, покрытых слоем аморфного углерода, усиленного слоем формвара (SPI, США), удаляли избыток жидкости и подсушивали. Сетки хранили в пластиковом контейнере при комнатной температуре до использования.

**Электронная микроскопия.** Для приготовления препарата аффинную сетку помещали на каплю раствора, содержащего комплекс EC+39, инкубировали 60 мин при +4°C во влажной камере. Затем сетку аккуратно снимали пинцетом с капли, излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. Препарат сразу же окрашивали 1%-ным раствором ацетата уранила два раза по 30 с.

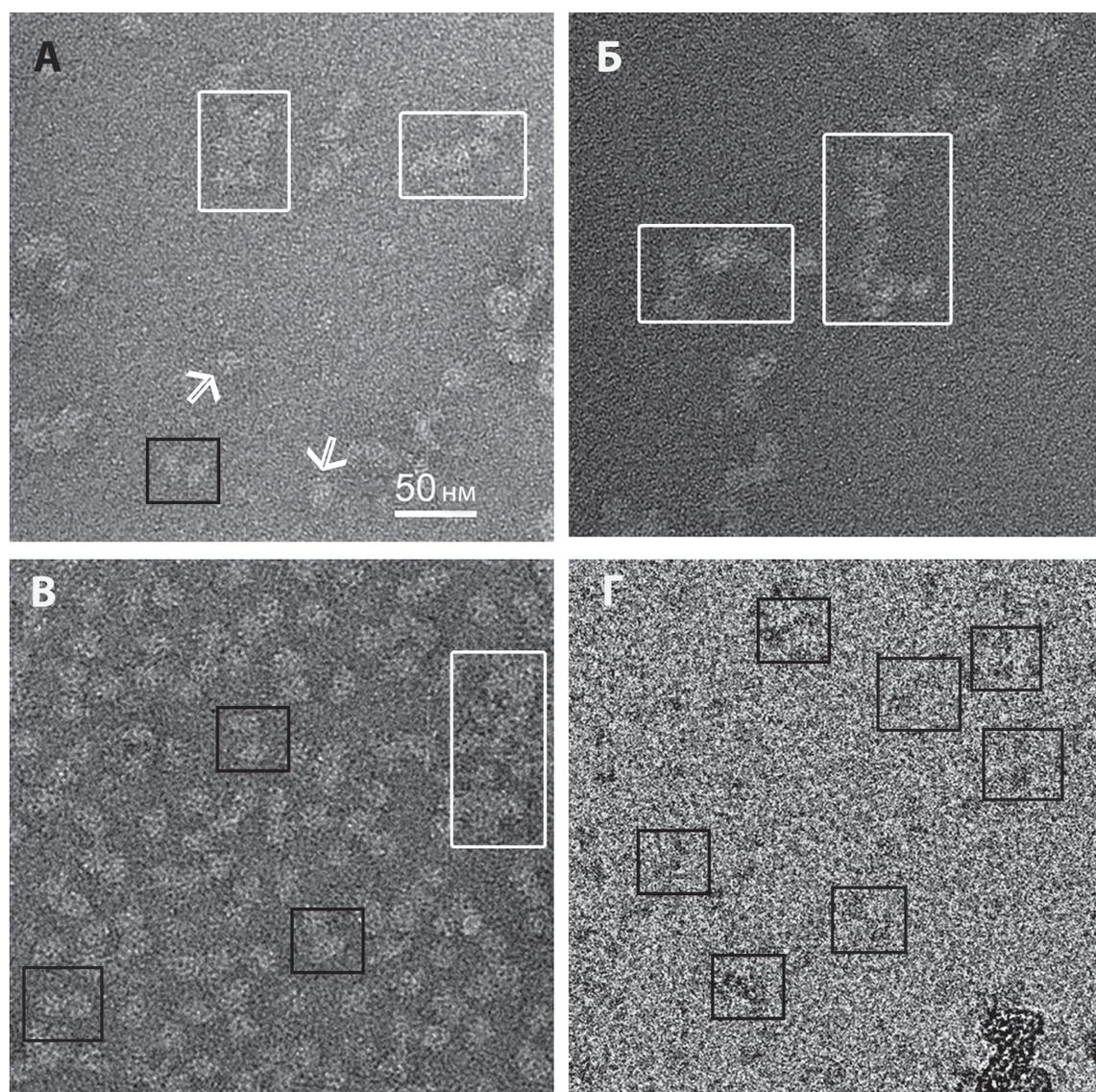
Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония). Использовали ускоряющее напряжение 200 кВ в условиях низкой дозы (<10–20 электронов на Å<sup>2</sup> в секунду) для уменьшения повреждения образца под воздействием электронного пучка. Изображения получали с увеличением ×40000 с помощью ПЗС-камеры с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США). Размер пикселя на микрофотографиях составил 3,3 Å.

**Криоэлектронная микроскопия.** Сетки, приготовленные, как указано выше, снимали с капли раствора, помещали в прибор для замораживания образцов Vitrobot MarkIII (FEI, США) и замораживали в жидком этане при следующих параметрах: время промокания 4 с, температура климатической камеры +12°C, влажность 95%. Сетки хранили в жидком азоте до использования. Для изучения сетки переносили при температуре жидкого азота в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Теспа F20 (FEI, США), оснащенный источником полевой эмиссии электронов и работающий при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением  $\times 50000$  с помощью ПЗС-камеры с размером матрицы  $4000 \times 4000$  пикселей (Gatan, США). Размер пикселя на микрофотографиях составил 2,22 Å.

## Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что РНК-полимераза *E. coli* воспроизводит основные особенности транскрипции хроматина РНК-полимеразой II [12]. В данной работе мы использовали конструкцию, состоящую из РНК-полимеразы *E. coli* и мононуклеосомы с промотором, расположенном на выступающем (не связанном с гистонами) участке ДНК. В качестве матрицы использовали нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 длиной 147 п.о., содержащую участок без основания А в области 1–39 со стороны промотора, с присоединенным к ней промотором T7A1 длиной 135 п.н.

После предварительного анализа образцов оказалось, что в процессе транскрипции *in vitro* в растворе вместе с целевыми элонгационными



**Рисунок.** Электронно-микроскопическое исследование препаратов комплекса ЕС+39. А – Препарат, приготовленный на аффинном монослое липидов; Б – препарат после очистки на гепариновой смоле, на аффинном монослое липидов; В – препарат после очистки на гепариновой смоле, приготовленный на аффинной сетке для электронной микроскопии. Окраска – 1% ацетат уранила. Г – Криоэлектронное изображение препарата, приготовленного на аффинной сетке. Белые стрелки показывают расположение отдельных частиц РНК-полимеразы. Черными квадратами отмечены комплексы ЕС+39, белыми прямоугольниками – агрегаты белка. Масштабный отрезок – 50 нм

комплексами образуются также и непродуктивные комплексы; кроме того, остается большое количество свободной РНК-полимеразы. Для получения гомогенного препарата остановленных комплексов ЕС+39 мы использовали дополнительную стадию очистки (см. методы). Для этого использовали смолу HeparinHyperD. Гепариновая смола связывает свободную РНК-полимеразу и непродуктивные комплексы, тогда как остановленные целевые комплексы остаются в растворе.

Далее препарат комплексов РНК-полимеразы был сконцентрирован на аффинном монослое липидов (рис. 1А). Этот метод был применен нами ранее для очистки РНК-полимеразы от глицерина [9]. Метод заключается в наслаивании смеси липидов (фосфатидилхолина и DGS-NTA(Ni) в различных соотношениях) на раствор, содержащий комплексы РНК-полимеразы. Липиды формируют монослой, обращенный группами с ионами Ni к поверхности раствора, в котором находится РНК-полимераза, несущая на N-конце аффинный таг. Специфическое связывание осуществляется за счет наличия на поверхности белка свободных электронодонорных групп.

Было обнаружено, что при концентрировании очищенного на гепарине комплекса ЕС+39 на аффинном монослое в условиях, аналогичных описанным нами ранее [9], происходит агрегация комплексов с образованием длинных цепочек (рис. 1Б). В этих агрегатах отдельные комплексы расположены настолько близко, что невозможно определить их границы и отобрать изображения индивидуальных частиц для последующего анализа изображений. Мы предположили, что агрегация комплекса может происходить из-за локального повышения концентрации частиц, фиксированных на монослое, но способных перемещаться в его плоскости из-за свободной диффузии липидов на поверхности воды.

Для проверки этой гипотезы мы приготовили аффинные сетки, покрытые углеродной подлож-

кой с адгезированным монослоем липидов, содержащих DGS-NTA(Ni). Зафиксированные на углеродной подложке липиды существенно менее склонны к латеральной диффузии [11]. Действительно, при использовании для концентрирования комплекса ЕС+39 аффинных сеток вместо аффинного монослоя в препаратах наблюдается меньшее количество агрегатов. При этом концентрация комплексов на сетке значительно увеличивается (рис. 1В).

Высокая концентрация образцов позволила нам изучить очищенные комплексы в криоэлектронном микроскопе. Для этого мы приготовили аналогичным образом сетки Quantifoil (1.2/1.3) (Quantifoil Micro Tools, Германия) и исследовали их в криоэлектронном микроскопе Tecnai F20 (FEI, США) при ускоряющем напряжении 200 кВ. В результате были получены изображения комплексов ЕС+39, замороженных в витрифицированном льду (рис. 1Г).

Таким образом, мы показали, что применение гепариновой смолы HeparinHyperD позволяет очистить препарат элонгационных комплексов от избытка свободной РНК-полимеразы и непродуктивных комплексов. Применение аффинных монослоев, сформированных липидами, связанными с ионами Ni, позволяет сконцентрировать образцы комплекса РНК-полимеразы с нуклеосомой, а также предотвратить их агрегацию. Использование подобных аффинных сеток в дальнейшем планируется для получения трехмерной реконструкции элонгационного комплекса ЕС+39.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Электронная микроскопия проводилась с использованием аналитического электронного микроскопа JEOL2100 (JEOL, Япония) в составе уникальной научной установки “Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия” биологического факультета МГУ и криоэлектронного микроскопа Tecnai F20 (FEI), расположенного в центре коллективного пользования университета Брандаиз (США).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dion M.F., Kaplan T., Kim M., Buratowski S., Friedman N., Rando O.J. Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast // *Science*. 2007. Vol. 315. N 5817. P. 1405–1408.
2. Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9. N. 3. P. 541–552.
3. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112. N. 43. P. 5787–5795.
4. Pestov N.A., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // *Sci. Adv*. 2015. Vol. 1. N. 6. e1500021.
5. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of

chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.

6. Murakami K.S., Darst S.A. Bacterial RNA polymerases: the whole story // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003. Vol. 13. P. 31–39.

7. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.

8. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.

9. Karlova M.G., Volokh O.I., Chertkov O.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Purification and concentration of RNA polymerase on Ni-lipid monolayers // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. Vol. 43. N 6. P. 637–643.

10. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods in Molecular Biology*. Vol. 523. Chromatin Protocols / S.P. Chellappan. Humana Press, 2009. P. 109–123.

11. Kelly D.F., Abeyrathne P.D., Dukovski D., Walz T. The Affinity Grid: a pre-fabricated EM grid for monolayer purification // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 382. N 2. P. 423–433.

12. Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N. 38. P. 36148–36156.

Поступила в редакцию  
16.05.2018 г.

Принята к печати  
18.06.2018 г.

## METHODS

### PURIFICATION OF RNA-POLYMERASE ELONGATION COMPLEXES FOR CRYO-ELECTRON MICROSCOPY INVESTIGATION

O.V. Chertkov, M.G. Karlova, N.S. Gerasimova, O.S. Sokolova\*

*Department of Bioengineering, School of Biology,  
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;  
\*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

A procedure was developed for purification and preparation of a transcriptional stalled complex of *Escherichia coli* RNA polymerase for investigation by cryo-electron microscopy. The elongation complex has been concentrated on an affine monolayer formed by lipids bound to Ni ions. Additionally, the excess free RNA polymerase and unproductive complexes were removed on a heparin resin. The use of affinity grids with an immobilized monolayer of lipids helps to prevent aggregation of the particles on the grid surface. This technique can be used in the future to obtain a three-dimensional reconstruction of the EC+39 elongation complex.

**Keywords:** *RNA polymerase, nucleosome, elongation complex, affinity grid, protein purification, electron microscopy*

#### Сведения об авторах

*Чертков Олег Валериевич* – канд. биол. наук, вед. инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: o\_chertkov@mail.ru

*Карлова Мария Георгиевна* – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mkarlova@yandex.ru

*Герасимова Надежда Сергеевна* – канд. биол. наук, асс. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shordome@gmail.com

*Сokolova Ольга Сергеевна* – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

## МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.22

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ АРХЕЙ  
СЕМЕЙСТВА FERROPLASMACEAEА.Г. Булаев<sup>1,2,\*</sup>, Т.В. Ерофеева<sup>1</sup>, К.С. Воробьева<sup>3</sup>, Г.Г. Челидзе<sup>3</sup>, А.А. Рамонова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр., д. 33, стр. 2;

<sup>3</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

\*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Исследовано влияние органических веществ (глюкозы, фруктозы, рибозы, глицина, аланина, пирувата, ацетата, цитрата и дрожжевого экстракта), а также отходов пищевых производств (мелассы, барды, молочной сыворотки) на рост железоокисляющих ацидофильных микроорганизмов и на биоокисление двухвалентного железа. Объектами исследования были представители групп микроорганизмов, доминирующих в биогидрометаллургических процессах: археи семейства Ferropasmaceae (*Acidiplasma aeolicum* V1<sup>T</sup>, *A. cupricumulans* ВН2<sup>T</sup>, *Acidiplasma* sp. МВА-1, *Ferropasma acidiphilum* В-1) и бактерии рода *Sulfobacillus* (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Kг1<sup>T</sup>). Все исследованные штаммы наиболее активно росли и окисляли железо в средах с дрожжевым экстрактом, что, вероятно, объясняется наличием в его составе большого количества различных факторов роста, однако другие субстраты также обеспечивали как рост микроорганизмов, так и окисление железа.

**Ключевые слова:** ацидофильные микроорганизмы, биогидрометаллургия, *Sulfobacillus*, *Ferropasmaceae*, миксотрофия, железоокисляющие микроорганизмы

Биогидрометаллургические технологии широко применяются для извлечения цветных и благородных металлов из сульфидных руд. Принципом, на котором основаны данные технологии, является деструкция кристаллической решетки сульфидных минералов ацидофильными железо- и сероокисляющими микроорганизмами [1]. Микроорганизмы, окисляющие сульфидные минералы, представляют собой филогенетически неоднородную группу, включающую несколько представителей *Bacteria* (*Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*) и *Archaea* (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*) [2].

В процессе окисления сульфидных минералов выделяется тепло, поэтому и в промышленных реакторах биоокисления, и при кучном выщелачивании происходит разогрев до температур 40–50°C, при которых доминируют умеренно термофильные и термотолерантные микроорганизмы. В разных условиях состав микробных сообществ может быть различным [2], однако было показано, что в технологических процессах биоокисления сульфидных руд и концентратов часто доминируют бактерии рода *Sulfobacillus* и археи семейства Ferropasmaceae родов *Acidiplasma* и *Ferropasma*) [3–7], являющиеся экстремально ацидофильными умеренно-термофильными аэробными окислителями железа. Несмотря на то, что и бактерии рода *Sulfobacillus*, и археи семейства Ferropasmaceae окисляют

двухвалентное железо, все известные представители данных групп нуждаются в органическом источнике углерода для стабильного роста, т.е. являются миксотрофами [2, 8].

Углеродный метаболизм бактерий рода *Sulfobacillus* детально изучен в нескольких работах [9–12]. Миксотрофия по углеродному питанию дает сульфобациллам преимущества перед облигатными автотрофами, так как скорость их роста намного выше, чем у облигатных автотрофов, окисляющих сульфидные минералы [12]. При этом интенсивность фиксации CO<sub>2</sub> у них соответствует интенсивности у ряда автотрофных микроорганизмов. Поэтому неспособность сульфобацилл к автотрофному росту, возможно, обусловлена недостаточным обеспечением клеток энергией при окислении неорганических субстратов [9–12]. Величины скорости окисления неорганических субстратов (пирита и тиосульфата) сульфобациллами были выше в миксотрофных условиях, чем в автотрофных, что связывают с повышением количества синтезируемого белка [13].

Углеродный метаболизм архей семейства Ferropasmaceae изучен в меньшей степени. При описании типового вида *F. acidiphilum* сделан вывод о том, что он является автотрофом, но нуждается в органическом субстрате (дрожжевом экстракте – ДЭ) в качестве источника факторов роста [14]. В ряде

работ было отмечено, что представители Ferroplassmaceae нуждаются в ДЭ при росте в средах, содержащих двухвалентное железо, и обычно не способны расти в средах, содержащих только простые органические субстраты или двухвалентное железо [3, 4, 14, 15]. Например, штамм *A. cupricumulans* ВН2<sup>Т</sup> не был способен расти в средах без ДЭ и железа [3]. Для штамма *F. thermophilum* L1<sup>Т</sup> была показана способность к росту в средах с железом, содержащих пептон или глюкозу [4]. Урожайность в этом случае была значительно ниже, чем в среде с ДЭ и железом, но подробные данные в работе не приводятся. Обобщение опубликованных данных об археях семейства Ferroplassmaceae позволяет заключить, что они нуждаются и в органических источниках углерода, и в двухвалентном железе, но не позволяет оценить влияние источников углерода на рост данных архей.

Изучение углеродного метаболизма бактерии рода *Sulfobacillus* и архей семейства Ferroplassmaceae весьма важно и с прикладной точки зрения. Было показано, что добавление в среду органического субстрата повышает эффективность процессов биовыщелачивания [5, 7]. С точки зрения технологии наиболее важно подобрать дешевый органический субстрат, который мог бы повысить эффективность процессов биоокисления сульфидных минералов.

Целью данной работы являлось исследование влияния различных органических соединений и отходов пищевых производств на рост архей семейства Ferroplassmaceae и бактерий рода *Sulfobacillus* и окисление ими двухвалентного железа.

### Материалы и методы

Объектами исследования были штаммы бактерий рода *Sulfobacillus* и архей семейства Ferroplassmaceae: *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1; *S. thermotolerans* Krl<sup>Т</sup>; *Acidiplasma* sp. MBA-1; *A. aeolicum* V1<sup>Т</sup>; *A. cupricumulans* ВН2<sup>Т</sup>; *F. acidiphilum* В-1. Для экспериментов была использована среда, содержащая минеральные соли (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,4;  $(NH_4)_2SO_4$  – 0,2; KCl – 0,1;  $K_2HPO_4$  – 0,1;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 28; pH среды был около 1,0 – для штаммов *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. cupricumulans* ВН2<sup>Т</sup>, *F. acidiphilum* В-1 и 1,5–1,6 – для штаммов *A. aeolicum* V1<sup>Т</sup>, *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Krl<sup>Т</sup>. Эксперименты проводили при температурах, близких к оптимальным для роста микроорганизмов: 50°C – для штаммов *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. cupricumulans* ВН2<sup>Т</sup>, *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1; 40°C – для штаммов *A. aeolicum* V1<sup>Т</sup>, *S. thermotolerans* Krl<sup>Т</sup>, *F. acidiphilum* В-1. Продолжительность экспериментов составляла 20 ч, штаммы культивировали на ротационном шейкере (200 об./мин.) в пенициллиновых флаконах с 3 мл среды. Начальная численность клеток составляла примерно  $1 \cdot 10^7$  кл./мл.

Исследовали влияние следующих органических субстратов: ДЭ, глюкозы, фруктозы, рибозы, гли-

цина, аланина, пирувата (натриевая соль), ацетата (натриевая соль), цитрата, а также органических отходов: мелассы, барды и молочной сыворотки (МС). Согласно информации производителя (“Хеликон”, Россия) содержание углерода в ДЭ составляло примерно 50% от сухого веса. В экспериментах использовали среды, содержащие 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,10% ДЭ. Все органические вещества использовали в концентрациях, которые соответствовали по содержанию углерода вышеуказанным концентрациям ДЭ. Органические отходы вносили в среду в концентрациях 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,1%. Все органические субстраты готовили отдельно от основной среды в виде 10%-ных растворов, которые стерилизовали фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Поскольку спиртовая барда содержит нерастворимые в воде компоненты, готовили суспензию, содержащую 10% спиртовой барды (в пересчете на сухую массу), и стерилизовали ее автоклавированием при 0,5 ати. Был проведен эксперимент с одновременным внесением в среду глюкозы и раствора витаминов группы В [16]. В качестве контроля использовали среду без органических субстратов.

При проведении экспериментов определяли концентрации ионов трех- и двухвалентного железа методом трилонометрического титрования [17], а также численность микроорганизмов путем прямого счета с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Все приводимые в работе цифровые значения получены в двух независимых опытах. В таблицах представлены среднеарифметические значения и 95%-ные доверительные интервалы ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2013.

### Результаты и обсуждение

*S. thermosulfidooxidans* SH 10-1 окислил за 20 ч около 80%  $Fe^{2+}$  в среде с 0,02%, 0,05% и 0,1% ДЭ (в автотрофных условиях – только 28%). В средах с другими органическими веществами железо тоже окислялось достаточно активно (от 30% до 50%). Исключение составлял пируват, в присутствии которого окисления  $Fe^{2+}$  практически не наблюдалось (было окислено от 5% до 8%  $Fe^{2+}$ ). Несмотря на достаточно активное окисление железа, прирост клеток на средах с органическими соединениями оставался низким по сравнению с приростом в присутствии ДЭ: в среде с ДЭ штамм достиг численности порядка  $1-2 \cdot 10^8$  кл./мл, в других вариантах эксперимента прирост численности был незначительным (максимальная численность в среде с глюкозой и аланином составила около  $5 \cdot 10^7$  кл./мл). Внесение витаминов в среду с глюкозой не привело к увеличению скорости окисления железа и урожайности. Достаточно высокими степени окисления железа были в средах, содержащих органические отходы (в среде с бардой было окислено до 80% железа), но численность клеток была значительно более низкой, чем в среде с ДЭ.

Таблица 1

Степень окисления двухвалентного железа (%) исследуемыми штаммами после 20 ч инкубации;  
1, 2, 3, 4 – концентрации органических веществ, соответствующие 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,1% ДЭ

Субстрат	Концентрация	<i>S. thermosulfido-oxidans</i> SH 10-1	<i>S. thermotolerans</i> Kr1 <sup>T</sup>	<i>A. aeolicum</i> V1 <sup>T</sup>	<i>A. cupricumulans</i> BH2 <sup>T</sup>	<i>Acidiplasma</i> SP. MBA-1	<i>F. acidiphilum</i> B-1
Автотрофные условия	–	26±8	30±5	15±11	21±2	15±13	15±2
ДЭ	0,01%	48±12	98±2	19±9	97±4	41±16	59±1
	0,02%	79±27	99±1	39±8	100±0	74±18	56±4
	0,05%	87±9	88±6	38±15	100±0	78±12	58±7
	0,10%	86±15	93±2	40±15	100±0	79±17	53±3
Глюкоза	1	42±17	73±31	27±16	40±24	25±5	21±7
	2	44±20	75±24	24±13	50±21	21±8	26±7
	3	51±15	74±26	23±15	42±26	25±10	24±8
	4	56±17	72±32	17±9	50±21	25±10	19±9
Глюкоза + Витамины	1	26±3	45±6	16±2	21±2	20±6	27±1
	2	35±12	44±8	14±1	30±7	18±9	28±2
	3	43±18	49±3	14±1	36±2	38±5	31±1
	4	15±12	43±2	13±4	36±3	18±3	27±6
Фруктоза	1	44±1	100±0	19±6	51±3	25±1	22±3
	2	42±9	100±0	23±2	59±1	25±3	18±1
	3	50±10	100±0	16±7	61±2	23±2	20±3
	4	48±5	100±0	21±1	43±27	26±3	15±1
Рибоза	1	42±3	100±0	22±3	59±1	31±1	10±1
	2	47±5	100±0	19±2	67±2	27±3	10±1
	3	54±6	100±0	20±4	86±20	25±3	13±1
	4	58±1	100±0	21±7	76±9	26±1	14±1
Глицин	1	48±2	100±0	18±3	56±9	26±1	17±1
	2	48±1	100±0	20±6	51±7	27±2	16±2
	3	44±4	100±0	19±2	31±8	19±12	21±1
	4	46±2	100±0	16±2	48±6	18±8	13±1
Аланин	1	58±3	100±0	19±2	55±1	27±1	11±1
	2	57±6	100±0	20±4	58±3	27±3	15±1
	3	53±4	100±0	18±1	53±4	27±1	18±1
	4	54±2	100±0	21±2	56±2	29±1	17±3
Пируват	1	7±2	78±1	7±2	45±2	25±1	3±1
	2	8±1	79±4	8±2	40±4	27±6	7±1
	3	5±1	49±3	2±1	4±1	33±2	1±1
	4	6±1	30±3	2±1	2±1	8±2	1±0
Ацетат	1	50±1	100±0	18±3	56±2	33±2	16±3
	2	47±1	100±0	21±1	50±2	32±2	13±3
	3	39±1	96±6	16±1	71±20	29±2	20±3
	4	29±2	72±2	22±1	50±1	32±3	12±2
Цитрат	1	43±15	100±0	11±5	53±2	27±3	13±1
	2	55±2	100±0	19±1	64±8	27±6	11±1
	3	57±1	100±0	21±4	60±9	25±7	14±3
	4	33±7	100±0	12±6	73±4	33±1	13±3
Меласса	0,01%	23±4	55±4	9±4	45±3	32±3	30±1
	0,02%	37±5	54±1	13±2	38±3	12±3	31±4
	0,05%	53±12	35±10	12±8	43±5	22±2	31±1
	0,10%	33±10	6±3	7±1	43±5	30±2	23±2
Барда	0,01%	67±1	53±2	11±2	30±5	20±6	32±4
	0,02%	63±1	52±1	15±3	32±2	24±3	23±11
	0,05%	75±9	56±4	23±4	38±3	29±2	33±4
	0,10%	79±4	51±2	19±2	51±3	32±2	35±2
МС	0,01%	5±1	41±19	25±7	27±2	46±3	38±1
	0,02%	57±4	65±6	20±2	32±7	47±7	36±2
	0,05%	52±4	73±2	26±1	55±2	59±2	41±1
	0,10%	18±5	80±2	13±1	66±3	73±3	46±1

Штамм *S. thermotolerans* K1<sup>T</sup> окислял железо быстрее, чем *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1 (в большинстве экспериментов он окислил железо почти полностью). При этом степень окисления в контрольном эксперименте составила около 30%, а прирост численности был достаточно низким по сравнению со средами, содержащими ДЭ. Добавление раствора витаминов также не привело к увеличению скорости окисления железа и численности клеток штамма. При росте в среде с органическими отходами железо окислялось медленнее, чем в среде с ДЭ, и численность клеток штамма была значительно ниже, чем в среде с ДЭ (в 4–10 раз).

Штамм *A. aeolicum* V1<sup>T</sup> за 20 ч достиг относительно невысокой степени окисления железа (она была максимальной в средах с ДЭ – около 40%). Степень окисления железа в экспериментах со всеми органическими веществами была примерно в два раза ниже, чем в экспериментах с ДЭ (18–20%), за исключением вариантов с пируватом, где степень окисления была крайне низкой (от 2% до 8%, т.е. значительно ниже, чем в автотрофных условиях). Прирост численности клеток был максимальным в средах с ДЭ (до  $9 \cdot 10^7$  кл./мл), а при росте в средах с органическими субстратами численность достигала  $2\text{--}3 \cdot 10^7$  кл./мл. Исключение составляла глюкоза, в средах с которой численность была относительно высокой (до  $6\text{--}7 \cdot 10^7$  кл./мл). Добавление витаминов к среде с глюкозой не привело к увеличению скорости окисления железа, но численность клеток в среде с глюкозой и витаминами была несколько выше – например, в варианте с самой высокой концентрацией глюкозы добавление витаминов позволило достичь численности около  $1 \cdot 10^8$  кл./мл. В экспериментах с органическими отходами степень окисления и прирост численности клеток штамма были значительно ниже, чем в средах с ДЭ (в 2–3 раза).

В экспериментах с *A. cupricumulans* ВН2<sup>T</sup> скорость окисления  $\text{Fe}^{2+}$  была значительно выше, чем в аналогичных экспериментах со штаммом *A. aeolicum* V1<sup>T</sup>. В присутствии ДЭ железо было окислено практически полностью. Достаточно высокими были степени окисления в присутствии почти всех органических веществ (30% и выше), но высокие концентрации пирувата ингибировали окисление. Различия между средами по численности клеток были более значительными, чем по степени окисления железа. В среде с 0,02% ДЭ численность клеток достигала приблизительно  $24 \cdot 10^7$  кл./мл, а в присутствии ДЭ в других концентрациях численность была в 2–3 раза ниже. В средах с другими субстратами численность была ниже (не более  $6 \cdot 10^7$  кл./мл). Добавление витаминов достаточно сильно влияло на рост штамма *A. cupricumulans* ВН2<sup>T</sup>. Степень окисления железа в среде с витаминами была несколько ниже, чем в среде с глюкозой, тогда как численность клеток была в 3–4 раза выше ( $16\text{--}18 \cdot 10^7$  и  $4\text{--}5 \cdot 10^7$  кл./мл соответственно). Ве-

роятно, штамм *A. cupricumulans* ВН2<sup>T</sup> в большей степени зависел от присутствия в среде таких факторов роста, как витамины группы В. Этим можно объяснить и различия в урожайности между средами, содержащими ДЭ или раствор витаминов и другие органические вещества. В экспериментах с органическими отходами степень окисления железа была в 2–3 раза ниже, чем в присутствии ДЭ, но на средах с мелассой и МС численность клеток была высокой (до  $20 \cdot 10^7$  кл./мл).

У штамма *Acidiplasma* sp. МВА-1 степень окисления железа и урожайность были наиболее высокими в средах с ДЭ (от  $4 \cdot 10^7$  до  $12 \cdot 10^8$  кл./мл, с максимумом в среде с 0,05% ДЭ). Окисление  $\text{Fe}^{2+}$  в большой степени зависело от присутствия ДЭ, и в экспериментах с органическими веществами степень окисления была в 3–4 раза ниже, чем в экспериментах с ДЭ. В большинстве экспериментов скорость окисления не менялась значительно или увеличивалась при увеличении концентрации органических веществ, но пируват в наиболее высокой концентрации ингибировал и окисление железа, и рост штамма. Степень окисления железа в среде с пируватом была ниже, чем в контроле (8% и 15% соответственно). Добавление раствора витаминов к среде с глюкозой не привело к значительному увеличению скорости окисления и численности клеток. В экспериментах с органическими отходами было показано, что степень окисления железа и численность клеток штамма были наиболее высокими в экспериментах с бардой. Степени окисления  $\text{Fe}^{2+}$  в средах с ДЭ и бардой различались 2–2,5 раза, а численность клеток – в 2–6 раз. Степень окисления железа и численность клеток штамма в экспериментах с мелассой и молочной сывороткой были ниже, чем в соответствующих вариантах с бардой.

Штамм *F. acidiphilum* В-1 окислял железо относительно медленно, наиболее быстро оно происходило в присутствии ДЭ (было окислено около 50% двухвалентного железа). Степень окисления железа на средах с органическими соединениями не превышала достоверно степень окисления в контрольном варианте (15%). Пируват ингибировал окисление (было окислено не более 7% железа). Аналогичная зависимость наблюдалась и для урожайности. Численность клеток была максимальной в среде с 0,05% ДЭ (около  $13 \cdot 10^7$  кл./мл), а в контрольном варианте она составила приблизительно  $2,5 \cdot 10^7$  кл./мл. В средах с другими органическими веществами численность клеток была не намного выше, чем в контрольном эксперименте. В присутствии пирувата и ацетата роста практически не наблюдалось. Внесение витаминов не оказало значительного влияния на окисление железа и на рост штамма. В экспериментах с органическими отходами степень окисления железа и урожайность были ниже, чем в присутствии ДЭ, но выше, чем на средах с органическими веществами. Было окислено от 30% до 40% железа, а численность достигала значений от  $5\text{--}6 \cdot 10^7$  кл./мл

Таблица 2

Численность клеток исследуемых штаммов ( $\cdot 10^7$  кл./мл) после 20 ч инкубации; 1, 2, 3, 4 – концентрации органических веществ, соответствующие 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,1% ДЭ

Субстрат	Концентрация	<i>S. thermosulfido-oxidans</i> SH 10-1	<i>S. thermotolerans</i> Kr1 <sup>T</sup>	<i>A. aeolicum</i> V1 <sup>T</sup>	<i>A. cupricumulans</i> BH2 <sup>T</sup>	<i>Acidiplasma</i> sp. MBA-1	<i>F. acidiphilum</i> B-1
Автотрофные условия	–	2,9±0,6	2,9±1,6	2,8±0,6	2,7±1,3	5,6±2,8	2,5±0,7
ДЭ	0,01%	6,0±3,4	7,1±1,0	8,6±3,11	7,6±4,4	47,4±15,8	10,1±0,5
	0,02%	11,1±6,8	9,2±1,4	9,1±4,11	23,6±6,5	43,8±13,5	10,7±1,2
	0,05%	19,5±7,0	21,0±5,7	8,5±1,4	11,6±5,4	122,9±38,3	13,5±2,4
	0,10%	15,2±4,6	20,1±4,8	6,1±2,3	12,6±5,4	70,1±22,2	12,4±3,4
Глюкоза	1	3,4±0,9	2,7±1,2	4,3±1,6	5,8±1,8	8,2±3,4	3,7±2,3
	2	3,1±0,9	3,4±0,1	7,3±0,6	4,4±1,4	9,8±3,8	5,5±2,9
	3	4,8±3,2	7,0±4,3	6,7±1,4	4,1±1,3	10,9±4,5	4,1±0,9
	4	4,2±1,6	3,4±1,0	5,2±3,5	3,8±1,9	9,1±3,9	3,1±1,9
Глюкоза + Витамины	1	3,3±0,4	3,2±0,4	7,8±0,8	16,5±2,1	6,3±0,5	4,1±0,2
	2	3,6±0,1	3,2±0,2	8,7±2,8	18,9±0,8	4,4±0,3	3,5±0,5
	3	2,8±0,1	3,6±0,5	9,7±0,8	16,8±0,4	9,5±4,1	6,2±2,2
	4	3,5±0,1	4,0±1,1	10,8±2,5	18,3±1,1	8,7±0,8	2,4±0,4
Фруктоза	1	1,9±0,7	6,2±0,9	2,8±0,5	5,8±0,9	7,2±2,4	3,0±0,3
	2	2,5±0,3	5,4±0,8	1,3±0,7	3,2±0,4	14,7±2,2	2,0±0,3
	3	2,9±1,2	4,3±1,2	4,3±0,8	1,2±0,4	13,6±0,1	3,5±0,8
	4	1,3±0,7	5,4±0,5	2,4±0,3	0,8±0,1	14,4±1,6	3,8±0,1
Рибоза	1	1,1±0,5	4,3±0,3	1,6±0,28	0,6±0,4	12,6±2,8	3,1±0,1
	2	3,1±1,4	1,9±0,7	2,2±0,5	1,0±0,7	11,9±0,4	1,4±0,4
	3	2,2±0,9	4,9±0,1	3,2±0,1	4,1±0,3	14,6±1,8	1,6±0,1
	4	2,2±0,8	4,7±0,7	2,0±0,3	3,0±0,8	11,5±4,9	1,9±0,1
Глицин	1	1,2±0,4	4,3±0,1	3,6±0,1	6,5±3,1	4,7±0,4	3,5±0,3
	2	1,4±0,3	8,5±0,3	3,8±0,9	5,6±1,4	6,9±0,4	1,8±0,1
	3	1,9±0,5	7,9±0,7	3,6±0,4	5,4±0,5	7,4±3,7	3,1±0,4
	4	2,2±0,8	3,3±0,5	1,1±0,3	5,9±3,6	7,5±0,4	2,9±0,1
Аланин	1	2,5±1,4	3,5±0,3	2,5±0,1	5,1±4,8	7,3±2,5	0,9±0,3
	2	4,7±0,9	3,8±0,9	4,1±0,5	3,7±2,6	12,8±1,7	0,7±0,1
	3	5,1±0,1	6,5±0,8	1,6±0,3	6,0±1,7	12,6±4,4	1,8±0,1
	4	4,5±0,7	4,4±0,5	4,4±0,3	1,1±0,3	12,7±0,1	3,3±0,3
Пируват	1	1,6±0,1	9,9±0,4	2,0±0,3	2,3±1,2	1,5±0,3	2,2±0,5
	2	1,4±0,1	4,1±1,0	0,9±0,1	2,2±0,5	3,4±0,4	0,8±0,1
	3	1,5±0,3	3,3±0,5	0,9±0,3	0,9±0,8	5,2±1,4	1,0±0,1
	4	1,8±0,3	5,4±0,5	0,7±0,4	0,6±0,4	2,9±1,2	1,1±0,5
Ацетат	1	2,0±0,5	3,4±0,9	0,9±0,5	4,3±0,9	8,5±0,8	1,6±0,7
	2	0,9±0,2	2,7±0,7	0,9±0,14	2,8±0,3	6,0±0,4	1,7±0,3
	3	1,0±0,1	3,5±0,3	0,7±0,1	1,3±0,3	9,3±1,9	0,6±0,3
	4	1,8±0,1	4,2±0,7	0,6±0,3	0,8±0,4	4,9±1,3	0,7±0,3
Цитрат	1	1,9±1,0	3,8±0,1	1,9±0,4	3,3±0,3	3,8±1,4	0,9±0,3
	2	2,0±0,5	3,5±0,5	0,8±0,1	2,7±1,3	6,7±0,3	1,9±0,4
	3	1,9±0,5	2,8±0,8	2,9±0,8	2,2±0,3	12,1±1,2	1,9±0,1
	4	1,3±0,3	2,1±0,6	3,3±0,8	0,8±0,4	11,5±0,8	1,4±0,1
Меласса	0,01%	3,5±0,3	3,1±0,3	3,4±0,1	14,4±0,2	9,4±4,2	6,4±0,6
	0,02%	3,8±0,5	2,2±0,1	3,4±0,1	17,3±2,6	16,4±0,2	5,1±3,0
	0,05%	4,2±1,0	3,3±1,0	3,8±0,84	15,8±1,6	12,5±4,2	4,5±1,4
	0,10%	3,7±0,7	1,3±0,3	3,9±0,3	17,4±0,4	10,5±0,2	4,6±2,2
Барда	0,01%	4,6±0,8	3,4±0,3	2,4±0,4	5,5±3,0	6,1±1,5	8,0±0,7
	0,02%	4,2±1,0	3,2±0,1	4,1±0,5	5,8±2,9	9,1±0,3	6,7±2,5
	0,05%	4,4±1,6	3,3±1,0	4,9±1,1	8,7±2,6	10,4±3,4	6,9±3,3
	0,10%	7,9±0,4	3,7±0,6	5,0±0,7	7,2±0,6	11,3±1,2	6,6±0,7
МС	0,01%	4,0±0,2	3,4±1,0	2,3±0,3	6,9±0,2	11,1±0,2	6,5±1,3
	0,02%	5,7±1,3	3,3±0,5	2,3±0,4	7,9±1,0	15,9±10,2	6,2±1,8
	0,05%	6,0±1,3	4,9±1,0	3,6±0,9	12,9±1,0	19,3±4,5	8,0±0,2
	0,10%	5,0±0,1	6,5±1,4	4,6±0,6	18,1±0,4	19,9±4,4	9,5±3,0

в средах с мелассой до  $6,5-9,5 \cdot 10^7$  кл./мл в средах с МС и бардой.

Все исследованные штаммы наиболее активно росли и окисляли железо при росте в средах с ДЭ, другие субстраты также обеспечивали рост и окисление железа микроорганизмами, но численность клеток и скорость окисления были более низкими. Это, очевидно, объясняется наличием в составе ДЭ большого количества различных факторов роста. Такие субстраты, как меласса, барда и МС, содержащие достаточно большое количество различных органических соединений, включая витамины и аминокислоты [18–20], также обеспечивали относительно быстрый рост штаммов. Добавление раствора витаминов группы В к среде с глюкозой не приводило к значительному увеличению урожайности штаммов. Единственным исключением был штамм *A. cupricumulans* ВН2<sup>Т</sup>. Пируват и ацетат в некоторых экспериментах ингибировали рост микроорганизмов. Это объясняется тем, что слабые органические кислоты не диссоциируют при низких рН, а их молекулы легко проникают через клеточ-

ную мембрану и снижают внутрицитоплазматический рН [21].

Таким образом, ДЭ является оптимальным органическим субстратом для всех исследованных штаммов, однако и другие субстраты, включая отходы пищевого производства, также могут быть использованы в качестве источника углерода для культивирования микроорганизмов. Полученные результаты могут служить основой для планирования дальнейших фундаментально-научных и прикладных исследований. В частности, для архей семейства *Ferroplasmaceae* роль органических и неорганических субстратов в энергетическом метаболизме детально еще не изучена. Кроме того, необходимо проведение прикладных исследований для определения возможности использования органических отходов для интенсификации промышленных процессов биовыщелачивания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 16–34–60053 мол\_а\_дк.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson D.B. Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. Vol. 30. P. 24–31.
2. Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification // *Microbial Processing of Metal Sulfides* / Eds. E.R. Donati and W. Sand. N.Y.: Springer, 2007. P. 3–33.
3. Hawkes R.B., Franzmann P.D., O'Hara G., Plumb J.J. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaea isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap // *Extremophiles*. 2006. Vol. 10. N 6. P. 525–530.
4. Zhou H., Zhang R., Hu P., Zeng W., Xie Y., Wu C., Qiu G. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite // *J. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 105. N 2. P. 591–601.
5. Li Q., Tian Y., Fu X., Yin H., Zhou Z., Liang Y., Qiu G., Liu J., Liu H., Liang Y., Shen L., Cong J., Liu X. The community dynamics of major bioleaching microorganisms during chalcopyrite leaching under the effect of organics // *Curr. Microbiol.* 2011. Vol. 63. N 2. P. 164–172.
6. van Hille R.P., van Wyk N., Froneman T., Harrison S.T.L. Dynamic evolution of the microbial community in BIOX leaching tanks // *Adv. Mater. Res.* 2013. Vol. 825. P. 331–334.
7. Muravyov M.I., Bulaev A.G. Two-step oxidation of a refractory gold-bearing sulfidic concentrate and the effect of organic nutrients on its biooxidation // *Miner. Eng.* 2013. Vol. 45. P. 108–114.
8. Golyshina O.V., Timmis K.N. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments // *Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 7. N 9. P. 1277–1288.
9. Zakharchuk L.M., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I., Melamud V.S., Karavaiko G.I. Activity of the enzymes of carbon metabolism in *Sulfobacillus sibiricus* under various conditions of cultivation // *Microbiol. Eng.* 2003. Vol. 72. N 5. P. 553–557.
10. Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Каравайко Г.И. Метаболизм углерода у *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* // *Микробиол.* 1994. Т. 63. № 4. С. 573–580.
11. Karavaiko G.I., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk L.M. Growth and carbohydrate metabolism of sulfobacilli // *Microbiology*. 2001. Vol. 70. N 3. P. 245–250.
12. Egorova M.A., Zakharchuk L.M., Krasil'nikova E.N., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I. Effect of cultivation conditions on the growth and activities of sulfur metabolism enzymes and carboxylases of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *asporogenes* strain 41 // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2004. Vol. 40. N 4. P. 381–387.
13. Вартамян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А. Влияние органических веществ на рост и окисление неорганических субстратов *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *asporogenes* // *Микробиол.* 1990. Т. 59. N 3. С. 411–417.
14. Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrat'eva T.F., Moore E.R.B., Abraham W., Lünsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. Vol. 50. N 3. P. 997–1006.
15. Golyshina O.V., Yakimov M.M., Lünsdorf H., Ferrer M., Nimtz M., Timmis K.N., Wray V., Tindall B.J., Golyshin P.N. *Acidiplasma aeolicum* gen. nov., sp. nov., a euryarchaeon of the family *Ferroplasmaceae* isolated from a hydrothermal pool, and transfer of *Ferroplasma cupricumulans* to *Acidiplasma cupricumulans* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. Vol. 59. N 11. P. 2815–2824.
16. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238. N 6. P. 2882–2886.

17. Schwarzenbach G., Flaschka H. Complexometric titrations. London: Methuen, 1969. 490 pp.

18. Delaney R.A.M. Composition, properties and uses of whey protein concentrates // J. Soc. Dairy Technol. 1976. Vol. 29. N 2. P. 91–101.

19. Kristiansen B., Linden J., Matthey M. Citric acid biotechnology. London: Taylor & Francis, 2002. 189 pp.

20. Krzywonos M., Cibis E., Mi kiewicz T., Ryznar-Luty A. Utilization and biodegradation of starch stillage (distillery

wastewater) // Electron. J. Biotechnol. 2009. Vol. 12. N 1. DOI: 10.2225/vol12-issue1-fulltext-5.

21. Borischewski R.M. Keto acids as growth-limiting factors in autotrophic growth of *Thiobacillus thiooxidans* // J. Bacteriol. 1967. Vol. 93. N 2. P. 597–599.

Поступила в редакцию  
26.02.2018 г.

Принята к печати  
30.05.2018 г.

## MICROBIOLOGY

### EFFECT OF ORGANIC NUTRIENTS ON THE ACTIVITY OF ARCHAEA OF THE FERROPLASMACEAE FAMILY

A.G. Bulaev<sup>1,2,\*</sup>, T.V. Erofeeva<sup>1</sup>, K.S. Vorobeva<sup>3</sup>, G.G. Chelidze<sup>3</sup>, A.A. Ramonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky Ave. 33–2, Moscow, 119071, Russia;

<sup>3</sup>Russian State Agrarian University-Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st. 49, Moscow, 127550, Russia

\*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

The effect of different organic compounds (glucose, fructose, ribose, glycine, alanine, pyruvate, acetate, citrate and yeast extract) as well as of the wastes of food production (molasses, stillage, sweet whey) on the growth of iron-oxidizing acidophilic microorganisms and biooxidation of ferrous iron was studied. Representatives of the microorganisms predominating in biohydrometallurgical processes: archaea of the family Ferroplasmaceae (*Acidiplasma aeolicum* V1<sup>T</sup>, *A. cupricumulans* BH2<sup>T</sup>, *Acidiplasma* sp. MBA-1, *Ferroplasma acidiphilum* B-1) and bacteria of the genus *Sulfobacillus* (*S. thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Kr1<sup>T</sup>) were the subjects of the study. All studied strains most actively grew and oxidized ferrous iron in the presence of yeast extract, which is probably due to the presence of the large number of different growth factors in its composition, while others substrates provided growth of microorganisms and ferrous iron oxidation.

**Keywords:** acidophilic microorganisms, biohydrometallurgy, *Sulfobacillus*, *Ferroplasmaceae*, mixotrophy, iron-oxidizing microorganisms

#### Сведения об авторах

Булаев Александр Генрихович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-65; e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Ерофеева Таисия Владимировна – студент кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: taisiyar@yandex.ru

Воробьева Ксения Сергеевна – студент кафедры защиты растений факультета агрономии и биотехнологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-976-04-80; e-mail: yev.evsevia@yandex.ru

Челидзе Георгий Гарриевич – студент кафедры защиты растений факультета агрономии и биотехнологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-976-04-80; e-mail: winnyduff@gmail.com

Рамонова Алла Аликовна – науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-56; e-mail: a.ramonova@yandex.ru

## МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.2:579.695

ПРИМЕНЕНИЕ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ФЕНОЛА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

В.В. Коробов\*, Е.Ю. Журенко, Н.В. Жарикова, Т.Р. Ясаков, Т.В. Маркушева

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН,  
Россия, 450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69  
\*e-mail: vacikk@mail.ru

Описаны свойства штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG, выделенного из почвы расположенного в г. Уфе (Республика Башкортостан) предприятия, являющегося крупнейшим производителем синтетических дубителей в России. Идентификация штамма проведена с учетом культурально-морфологических, физиолого-биохимических и морфометрических признаков, а также результатов сравнительного анализа за последовательности гена 16S рРНК. В условиях периодической культуры исследован рост *P. aeruginosa* 21SG и установлено, что содержание фенола в культуральной жидкости снижается через 4 сут на 84% от контроля. Выявлена возможность применения *P. aeruginosa* 21SG для утилизации фенола в промышленных стоках нефтехимического производства и производства дубильных экстрактов.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, штамм-деструктор, экотоксиканты, фенол, утилизация, сточные воды

Фенол является одним из токсичных ароматических соединений, загрязняющих сточные воды при термической и химической переработке нефти, каменного угля, торфа, сланцев, древесины, а также при производстве красителей, лекарственных средств, синтетических волокон и пластмасс на основе формальдегидов, синтетических дубителей. Концентрация фенолов в производственных сточных водах может быть значительной: в сточных водах ряда нефтехимических предприятий она может составлять до 15–17 г/л. Большинство предприятий на начальном этапе осуществляют очистку фенолсодержащих сточных вод механическими методами, избавляясь от грубодисперсных взвешенных частиц, далее физико-химическими и химическими методами разрушаются комплексы и удаляются мелкодисперсные фенолсодержащие загрязнения. Конечным этапом является биологическая очистка, после которой стоки часто оказываются не избавленными от остаточных количеств фенола, длительная эмиссия которых является нежелательной для окружающей среды. В этом контексте острую необходимость осуществления эффективных коррективных мер по очистке стоков обуславливает “эффект курьеров”, заключающийся в том, что присутствие фенолов, растворителей, углеводородов способствует вертикальной миграции диоксинов из верхних слоев почвы, находящихся на глубине 5–10 см, до грунтовых вод на глубину 8–10 м. Подобные условия имеют место на территории многих промышленных предприятий, они характерны для мест утилизации и хранения промышленных отходов, свалок, нефтебаз, заправочных станций и др. [1].

Следует отметить, что известны факты, указывающие на то, что бактерии способны использовать в качестве источников питания и энергии большое число соединений, опасных по отношению к живым системам. Вместе с тем вопросы применения бактерий в практике борьбы с трудноудаляемыми остаточными количествами фенола оказались малоизученными.

Целью настоящей работы было получение характеристик нового штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG и возможность его применения для доочистки промышленных стоков.

#### Материалы и методы

Штамм *P. aeruginosa* 21SG был выделен из пробы почвы расположенного в г. Уфе (Республика Башкортостан) предприятия, являющегося крупнейшим производителем синтетических дубителей для кожевенной промышленности России.

**Выделение и идентификация штамма по признакам морфологической, морфометрической, физиологической и биохимической дифференциации.** Выделение чистой культуры *P. aeruginosa* 21SG было проведено на селективной среде следующего состава (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 5,6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0. В среду вносили смесь микроэлементов – 0,1 мл/л. Вода дистиллированная с добавлением 100 мг/л фенола в качестве единственного источника углерода и энергии. Культуральные и физиолого-биохимические свойства штамма определяли общепринятыми методами [2]. Морфометрические и морфологические характеристики были определены с помощью

атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Россия) [3].

**Секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК, сравнение последовательностей и филогенетический анализ.** Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили согласно методу, описанному ранее [4]. Концентрация полученного препарата ДНК при использовании этого метода составляла 30–50 мкг/мл. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов частичной последовательности гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [5]. Амплификационная смесь (50 мкл) имела следующий состав: буфер для ДНК-полимеразы BioTaq (БиоМастер, Россия) (17 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ ); по 12,5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл – 9 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; последующие 30 циклов – 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; завершающий цикл – 7 мин при 72°C. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили, как описано ранее [6]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, США) согласно инструкциям производителя. Первичный анализ гомологии нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изучаемого штамма проводили с помощью баз данных RDP [7] и NCBI [8]. Множественное выравнивание и построение филогенетического древа было проведено, как описано ранее [9]. Последовательность длиной 1400 пар нуклеотидов депонирована в международную базу данных GenBank под номером MH457188.

**Рост культуры в жидкой питательной среде и его учет.** Посевной материал получали выращиванием бактерий в разведенном в 8 раз мясоептонном бульоне при температуре 30°C. Далее культуру в концентрации  $5,37 \cdot 10^8$  КОЕ засеивали в количестве 1 мл в жидкую среду объемом 100 мл следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{ZnSO}_4$  – 0,008; фенол – 0,1 и инкубировали в термостатируемом орбитальном встряхивателе УВМТ-12-250 (Элион, СССР) при 115–120 об./мин [10]. Контроль роста вели с использованием фотоколориметра КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

**Определение концентрации фенола.** Определение количества фенола осуществляли стандартным фотометрическим методом [11]. Для анализов от-

бирали по 5 мл культуральной жидкости, которую освобождали от клеток центрифугированием (3630g, 30 мин). Далее к пробе последовательно приливали 30 мкл 2%-ного раствора 4-аминоантипирин, 100 мкл 2%-ного раствора аммиака и 100 мкл 2%-ного раствора железосинеродистого калия. Смесь перемешивали после добавления каждого компонента реакции и через 10 мин измеряли коэффициент пропускания на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Количество фенола определяли по градуировочному графику, построенному в стандартных условиях определения.

Определение количества фенола в сточных водах проводили по описанному ранее протоколу [9].

Проведение экспериментов осуществляли в 3-кратной повторности, данные обрабатывали с помощью программы ORIGIN SRO 7.0. В качестве достоверных рассматривали различия между выборочными средними при 5%-ном уровне значимости.

## Результаты и обсуждение

### Идентификация штамма *P. aeruginosa* 21SG.

Клетки штамма представляли собой подвижные палочки, при росте на мясоептонном агаре образовывали гладкие непигментированные колонии. Окраска клеток по Граму отрицательная. Исследование физиолого-биохимических признаков изучаемого штамма показало, что для культуры характерен аэробный рост с оптимумом в диапазоне температур от +22°C до +30°C и значениях рН среды в пределах 6–8. Штамм использовал в качестве единственного источника азота соли аммония и аминокислот, а в качестве источника углерода – маннит. Изолят обладал оксидазной активностью, осуществлял восстановление нитратов, не использовал в качестве источников углерода целлюлозу, не осуществлял гидролиз крахмала, казеина, проявлял невысокую активность в отношении желатины.

При изучении морфологии и морфометрических параметров культуры 21SG было установлено, что микробная популяция на момент анализа была гетерогенна по возрасту клеток. Значительная часть бактерий в популяции (67% от всего числа клеток) была представлена молодыми клетками, сходными по морфологии. Большинство клеток популяции (95%) имело форму коротких палочек или палочек с размерами 0,37/0,73–1,4 мкм с ровной поверхностью.

Идентификация бактериального штамма 21SG проводилась на основании результатов сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК (1400 п.н.) и близких ему последовательностей других типовых видов. На основании анализа представленного филогенетического древа можно сделать вывод о принадлежности исследуемого штамма к роду *Pseudomonas*. Уровень идентичности между ним и другими типовыми видами бактерий рода *Pseudomonas* находился в пределах

95,5–99,6%. Исследуемый штамм находится в одном кластере с представителем типового вида – штаммом *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, который филогенетически наиболее близок к нему. Уровень идентичности между ними составил 99,6%, что соответствует внутривидовому для вида *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 1).

Таким образом, на основании полученных результатов и в соответствии с существующими молекулярными критериями [12] исследуемый штамм был идентифицирован как *Pseudomonas aeruginosa* 21SG.

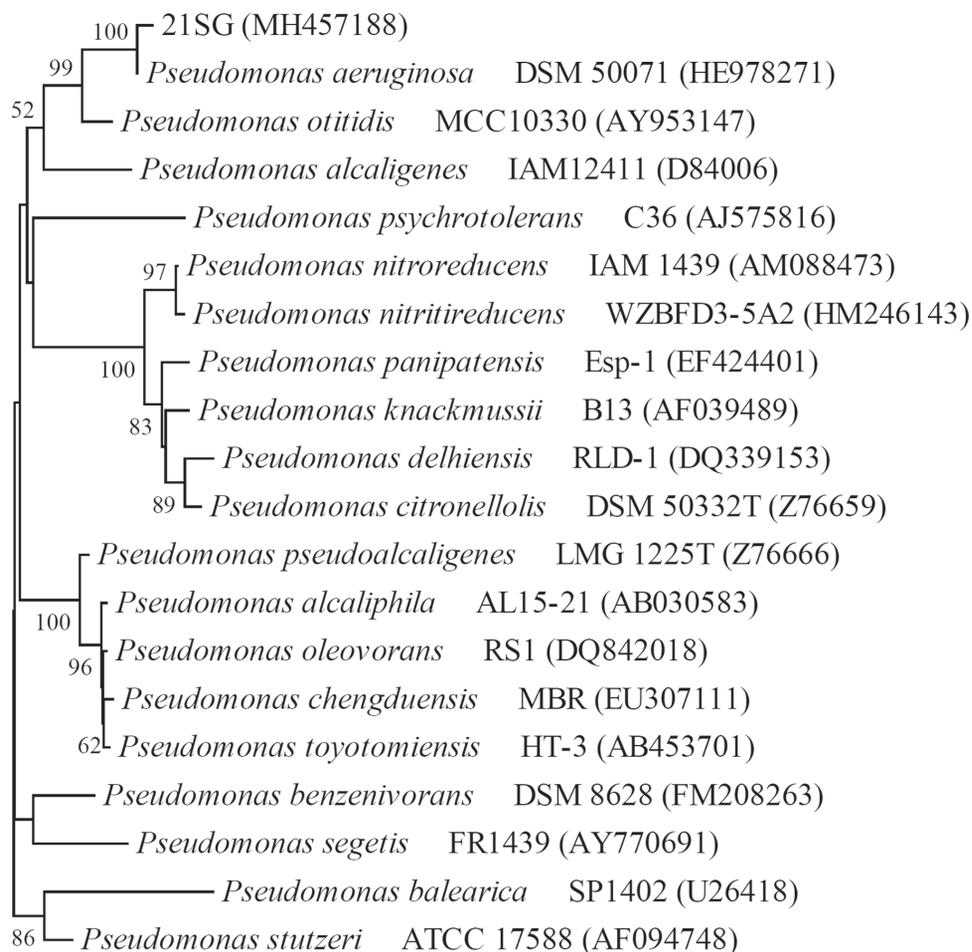
**Субстратная специфичность штамма *P. aeruginosa* 21SG.** В ходе дальнейшей работы был исследован рост периодической культуры *P. aeruginosa* 21SG на феноле. Накопление массы клеток при использовании фенола в качестве источника углерода и энергии начиналось с первых суток культивирования (рис. 2). Экспоненциальная фаза роста длилась 4 сут, и оптическая плотность (ОП<sub>590</sub>) достигала 0,46 оптических единиц (о.е.), а затем, после невыраженной стационарной фазы, культура заканчивала свой рост. Содержание фенола в культуральной жидкости снижалось в течение первых суток

на 68%, а к четвертым суткам – на 84% от начального уровня.

Приведенные выше результаты показывают, что штамм *P. aeruginosa* 21SG способен активно утилизировать фенол в качестве единственного источника углерода и энергии.

**Использование штамма *P. aeruginosa* 21SG для доочистки сточных вод предприятий нефтехимического профиля и производства дубильных экстрактов от фенола.** Культура *P. aeruginosa* 21SG была применена для обработки загрязненных фенолом сточных вод двух промышленных предприятий, занимающихся нефтехимическим производством (НХП) и производством дубильных экстрактов (ПДЭ).

Содержание фенола в пробах сточных вод предприятия НХП составляло 0,096 мг/л, а в стоках компании ПДЭ – 0,75 мг/л. После 3 сут воздействия бактерий концентрация фенола снижалась соответственно до 0,014 и 0,06 мг/л, а в контрольной пробе сохранялась постоянной (рис. 3). Полученные данные показывают, что культура *P. aeruginosa* 21SG проявила активность в реальных условиях загрязненных сточных вод обоих производств. Существенное изменение содержания фенола в стоках



**Рис. 1.** Филогенетическое древо, построенное на основе сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК штамма 21SG и гомологичных ему последовательностей типовых видов бактерий рода *Pseudomonas*. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью «bootstar»-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Номера в GenBank указаны в скобках

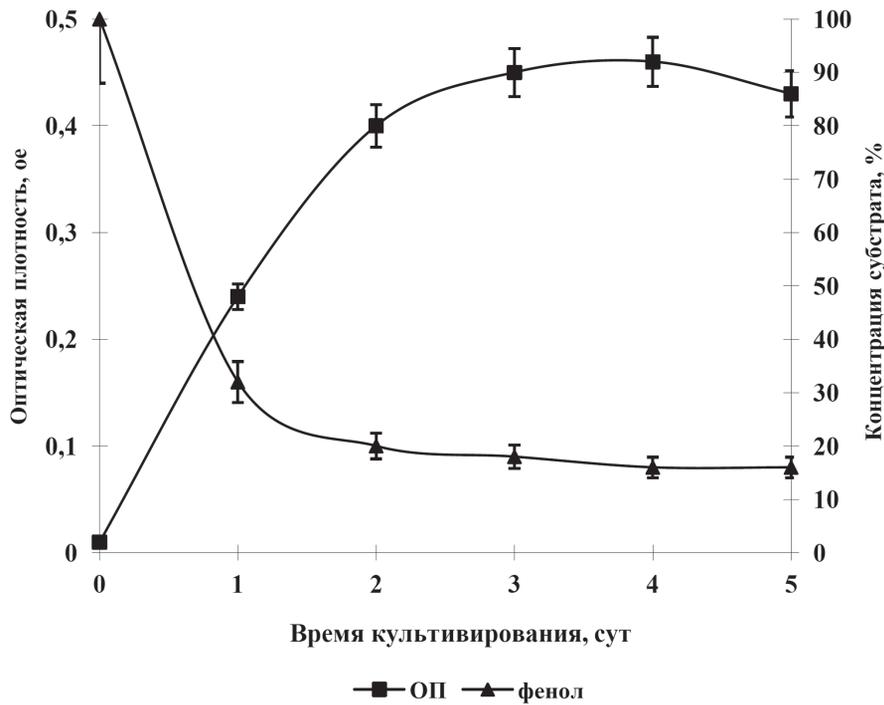


Рис. 2. Графики зависимости значений оптической плотности клеточной суспензии ( $OP_{590}$ ) и концентрации фенола, используемого в качестве единственного источника углерода и энергии, от времени инкубации штамма *P. aeruginosa* 21SG в периодической культуре

при использовании *P. aeruginosa* 21SG наблюдалось уже после первых суток воздействия. Степень очистки сточных вод, достигаемая при использовании штамма *P. aeruginosa* 21SG, составляла для стоков НХП 85,4%, а для стоков ПДЭ – 92%.

Обсуждая полученные данные, следует подчеркнуть, что большинство описанных в литературе культур *Pseudomonas aeruginosa* утилизировали фенол, присутствующий в сточных водах в высоких концентрациях. Так, бактериальный штамм *P. aeruginosa* KDQ4 утилизировал в сточных водах фенол в концентрации 800 мг/л [13], культура *P. aeruginosa*

NIBGE MB осуществляла деградацию фенола в концентрации 2600 мг/л [14], культура *P. aeruginosa* 101/1 эффективно удаляла фенол в концентрации 1600 мг/л [15].

Таким образом, в результате работы выявлена возможность применения штамма-деструктора *P. aeruginosa* 21SG для доочистки стоков НХП и ПДЭ от фенола

В работе было использовано оборудование регионального центра коллективного пользования “Агидель” Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

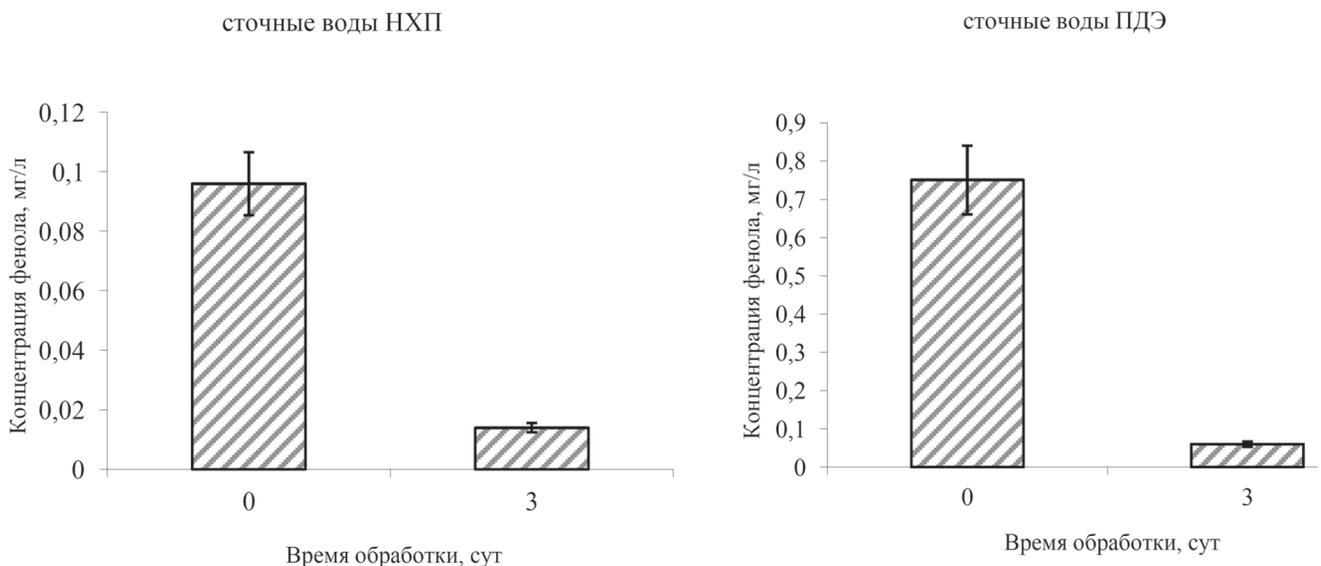


Рис. 3. Диаграммы снижения концентрации фенола в сточных водах НХП и ПДЭ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Майстренко В.Н. Эколого-аналитический мониторинг диоксинов: состояние проблемы и пути решения // Вестник АН РБ. 1997. Т. 2. № 1. С. 30–39.
2. Manual of methods for general bacteriology / Ed. P. Gerhardt. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 536 pp.
3. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy // Biotechnol. Prog. 2004. Vol. 20. N 6. P. 1615–1622.
4. Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Tourova T.P., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Galchenko V.F. A Study of nucleotide sequences of *nifH* genes of some methanotrophic bacteria // Microbiology. 2002. Vol. 71. N 4. С. 425–432.
5. Lane D.J. 16S/23S sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 1991. P. 115–175.
6. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Markusheva T.V., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Kuznetsov B.B. Isolation and sequence analysis of pCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA // Saudi J. Biol. Sci. 2018. Vol. 25. N 4. P. 660–671.
7. C7le 1. J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D.M., Sun Y., Brown C.T., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Tiedje J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N D1. P. D633–D642.
8. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. N D1. P. D36–D42.
9. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythro-*  
*polis* 17S, for treatment of industrial wastewater // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 201–205.
10. Коробов В.В., Жарикова Н.В., Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Маркушева Т.В. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // *Изв. Самар. науч. центра РАН.* 2013. Т. 15. № 3–4. С. 1320–1322.
11. Коробов В.В., Маркушева Т.В., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Штамм бактерий *Serratia marcescens* В-6493 – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // *Биотехнология.* 2006. № 2. С. 63–65.
12. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // *Microbiology Today.* 2006. Vol. 8. N 4. P. 6–9.
13. Zhang P., Jia R., Zhang Y., Shi P., Chai T. Quinoline-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* KDQ4 isolated from coking activated sludge is capable of the simultaneous removal of phenol in a dual substrate system // *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2016. Vol. 51. N 13. P. 1139–1148.
14. Afzal M., Iqbal S., Rauf S., Khalid Z.M. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei* // *J. Hazard. Mater.* 2007. Vol. 149. N 1. P. 60–66.
15. Son T.T., Blaszczyk M., Przytocka-Jusiak M. Growth and phenol activity of *Pseudomonas aeruginosa* strain 101/1 in batch cultures // *Acta Microbiol. Pol.* 1999. Vol. 48. N 3. P. 297–306.

Поступила в редакцию  
21.03.2018

Принята к печати  
07.06.2018

MICROBIOLOGY

APPLICATION OF PHENOL-DEGRADING STRAIN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG FOR TREATMENT OF INDUSTRIAL WASTEWATER

V.V. Korobov\*, E.Yu. Zhurenko, N.V. Zharikova, T.R. Iasakov, T.V. Markusheva

Ufa Institute of Biology Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
prospect Oktyabrya, 69, Ufa, 450054, Russia

\*e-mail: vacikk@mail.ru

The features of the phenol-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* 21SG, isolated from the soil of the Ufa (Republic of Bashkortostan) largest producer of synthetic tanning agents in Russia, are described. Identification of the strain was performed according to the cultural, morphological, physiological, biochemical, morphometric features, as well as the results of the comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence. The growth of *P. aeruginosa* 21SG in the batch culture was studied. It was established that the phenol content was reduced to the 4th day by 84% from the control in the culture liquid. The possibility of using *P. aeruginosa* 21SG for phenol utilization in industrial wastewater of petrochemical production and production of tanning extracts has been revealed.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, degrader strain, ecotoxicants, phenol, utilization, wastewater

Сведения об авторах

Коробов Владислав Викторович – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: vacikk@mail.ru

*Журенко Евгения Юрьевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: zhurenkoe@gmail.ru

*Жарикова Наталья Владимировна* – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: puzzle111@yandex.ru

*Ясаков Тимур Рамилевич* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: iasakov@anrb.ru

*Маркушева Татьяна Вячеславовна* – докт. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: tvmark@anrb.ru

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

ОБРАТИМОСТЬ ИНДУЦИРОВАННЫХ ИОННОЙ СИЛОЙ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕ-  
СТРОЕК В МОНОНУКЛЕОСОМАХА.В. Феофанов<sup>1,2,\*</sup>, Т.В. Андреева<sup>1</sup>, В.М. Студитский<sup>1,3</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;<sup>3</sup>Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA

\*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Методом флуоресцентной микроскопии одиночных частиц с регистрацией фёрстеровского резонансного переноса энергии исследованы структурные перестройки, происходящие под действием высокой ионной силы в нуклеосомах на основе ДНК-матрицы 603. Установлено, что в диапазоне концентраций KCl 0,7–1,3 М в нуклеосомах происходят масштабные изменения структуры, сопровождающиеся образованием по меньшей мере двух состояний, отличающихся степенью отворачивания ДНК от октамера гистонов, и затрагивающие от 13 до 35 и более пар нуклеотидов. Доля нуклеосом с измененной структурой варьирует от 60% при 0,7 М KCl до 100% при 1,3 М KCl. Сохранение ассоциации между коровыми гистонами и ДНК в новых конформационных состояниях обеспечивает обратимость структурных изменений при снижении концентрации KCl до физиологического уровня. Обратимость достигает ~100% при переходе от 0,7 М к 0,15 М KCl и снижается до ~50% при переходе от 1,3 М к 0,15 М KCl.

**Ключевые слова:** хроматин, нуклеосома, ионная сила, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула

Нуклеосомы являются важным структурным элементом хранения генетической информации в составе хроматина. ДНК в нуклеосомах намотана на октамер коровых гистонов, а считывание с нее информации требует перестройки нуклеосом (как правило, обратимой), облегчающей доступ к ДНК различным ферментам, таким как, например, РНК- и ДНК-полимеразы. Изучение факторов, вызывающих контролируемые изменения в структуре нуклеосом, и условий обратимости этих изменений, является важным для прояснения механизмов функционирования генома и развития биоинженерных систем, воспроизводящих и использующих элементы машинерии клеточного ядра.

Ионная сила раствора является одним из таких факторов, который, например, используется при сборке в растворе моонуклеосом заданной структуры из коровых гистонов и ДНК-матриц (таких как матрицы 601 и 603 [1, 2]) с короткими (147 п.н.) нуклеосом-позиционирующими последовательностями [3–6]. Ионы в растворе участвуют как в стабилизации комплексов поликатионных гистонов в коровой области нуклеосомы и снижении электростатического отталкивания соседних витков полианионной ДНК, так и в регуляции ДНК-гистоновых взаимодействий в нуклеосоме [4, 5]. Если в состав нуклеосомы ввести две флуоресцентные метки, образующие донор-акцепторную пару, то для изучения деталей ДНК-гистоновых взаимодействий можно использовать метод флуоресцентной микро-

скопии одиночных частиц на основе фёрстеровского резонансного переноса энергии (single particle Förster Resonance Energy Transfer microscopy, далее spFRET-микроскопия), который позволяет обнаруживать и характеризовать отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом, одновременно присутствующие в растворе [4–9].

При исследовании методом spFRET-микроскопии влияния концентрации NaCl на структуру моонуклеосом, собранных с использованием ДНК-матрицы 601 (нуклеосомы-601), обнаружена дестабилизация их структуры при физиологических концентрациях соли (0,15–0,3 М) [5, 7]. Дестабилизация нуклеосом-601 не наблюдается при меньших (0–0,1 М) и больших (0,4–0,65 М) концентрациях NaCl. Предполагается, что эта дестабилизация связана с частичным отворачиванием ДНК от октамера гистонов или со сдвигом ДНК относительно октамера гистонов. Увеличение концентрации NaCl от 0,7 до 1,2 М, как показано, вызывает масштабные структурные изменения в нуклеосоме-601 с образованием нескольких конформационных состояний [4, 5, 7]. Структурные изменения могут сопровождаться частичной потерей контактов между димерами H2A-H2B и тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub> при сохранении ассоциации гистонов с раскрученной ДНК [4]. Однако после 0,5 М [10] или 0,6 М [4] NaCl начинается диссоциация димера H2A-H2B, которая завершается при 1 М NaCl [4]. При 1,1 М NaCl наблюдается диссоциация гистона H4 [4]. Для ну-

клеосом-601 установлено, что структурные изменения, вызываемые 1 М NaCl, являются лишь частично обратимыми при снижении ионной силы [11].

ДНК-матрица 603 является альтернативой матрице 601 и широко используется в биоинженерных моноклеосомных системах для изучения процессов транскрипции и взаимодействия с различными ядерными белковыми факторами в солевых буферах на основе KCl [2, 6, 8, 9, 12, 13]. Структурные перестройки, происходящие в нуклеосомах на основе матрицы 603 (нуклеосомах-603) под действием повышенной ионной силы, и их обратимость не исследовались и требуют изучения. Кроме того, ранее было показано, что ионы калия отличаются от ионов натрия по взаимодействию с нуклеосомами – в том числе, по влиянию на конформацию линкерных участков ДНК в нуклеосомах-603 [14].

В настоящей работе описаны особенности структурных изменений в нуклеосомах-603, обнаруженные методом spFRET-микроскопии в диапазоне концентраций KCl 0,7–1,3 М, а также результаты анализа обратимости этих изменений.

### Материалы и методы

Для получения нуклеосом использовали два типа флуоресцентно-меченых ДНК-матриц, включавших в себя нуклеосом-позиционируемую последовательность 603 длиной 147 п.н. и свободный от гистонов участок ДНК длиной 20 п.н., а также отличающихся положением флуоресцентных меток. В матрице для сборки нуклеосом N(13,91) метки Cy3 и Cy5 были введены соответственно в положения 13 и 91 п.н. от начала позиционирующей последовательности 603; в матрице для сборки нуклеосом N(35,112) они находились в положениях 35 и 112 п.н. от начала последовательности 603.

Матрицы получали при помощи полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченых праймеров, описанных в предыдущей работе [15]. Выделение и очистку ДНК-матриц проводили, как описано ранее [6, 9]. Концентрацию ДНК определяли методом спектрофотометрии. Источником коровых гистонов служил хроматин без гистона H1, выделенный из эритроцитов цыплят [3]. Сборку нуклеосом-603 на ДНК-матрице выполняли по ранее описанному протоколу [3] в процессе диализа против уменьшающейся концентрации NaCl.

Для измерений методом spFRET-микроскопии нуклеосомы разбавляли в 50–100 раз до концентрации ~1 нМ в буфере 10 мМ Tris-HCl (pH = 8,0), 0,5 мМ ЭДТА, 2 мМ β-меркаптоэтанола с концентрацией KCl 0,15, 0,7, 1,0 или 1,3 М. При изучении обратимости структурных изменений нуклеосомы N(13,91) сначала инкубировали в буфере с 0,7, 1,0 или 1,3 М KCl в течение 10 мин при концентрации 10 нМ, а затем разбавляли до 1 нМ в буфере с той же концентрацией KCl или с конечной концентрацией KCl 0,15 М.

Образец нуклеосом помещали для анализа в лунку 12-луночной силиконовой камеры flexiPERM

(Greiner Bio-One, Германия), закрепленной на покровном стекле. Для измерений использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM710-Confocor3 (Carl Zeiss, Германия) с водонепроницаемым объективом C-Apochromat (40×, числовая апертура 1,2). Детали методики измерений описаны ранее [6]. Флуоресценцию возбуждали излучением Ag<sup>+</sup>-лазера (мощность 0,2 мкВт) с длиной волны 514,5 нм и регистрировали в областях 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5) лавинными фотодиодами. Диаметр конфокальной диафрагмы соответствовал 1 диску Эйри.

Для каждого образца интенсивность флуоресценции от одиночных нуклеосом, свободно диффундирующих через фокус лазерного луча, измеряли в течение 10 мин с константой интегрирования 3 мс. Измеренные показатели интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5 в составе одиночных нуклеосом пересчитывали после коррекции на величину фона в коэффициент близости (K) согласно уравнению [6, 9]:

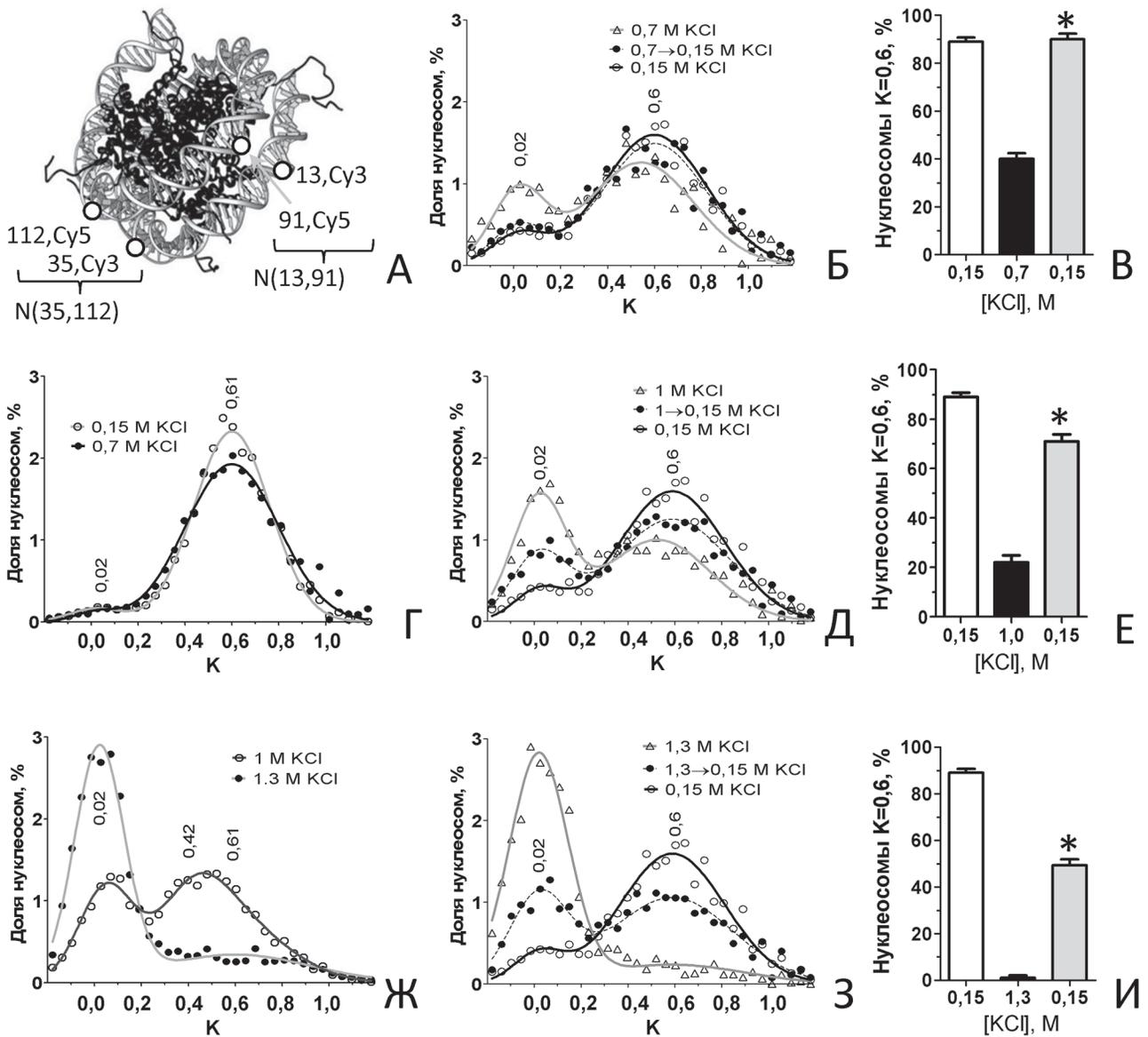
$$K = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3),$$

где  $I_3$  и  $I_5$  – это интенсивности сигналов Cy3 и Cy5, а коэффициенты 0,19 и 0,81 обеспечивают учет частичного перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм. Коэффициент близости K является аналогом эффективности FRET, но не равен ей, так как расчет K не учитывает поправки на квантовые выходы флуорофоров и отличия в чувствительности прибора в двух измеряемых спектральных диапазонах.

Расчитанную для измеренных одиночных нуклеосом выборку значений K представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения величины K и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы, соответствующих различным конформационным состояниям нуклеосом. Для нуклеосом N(13,91) гистограммы представляли в виде суперпозиции двух полос (состояний) с максимумами 0,02 и 0,6 (при 0,15 М KCl). При 0,7, 1 и 1,3 М KCl в разложение вводили третью полосу с максимумом 0,5. Аналогично для нуклеосом N(35,112) гистограммы представляли в виде суперпозиции двух полос с максимумами 0,02 и 0,61 (при 0,15 и 0,7 М KCl), а при 1 и 1,3 М KCl в разложение вводили третью полосу с максимумом 0,42. Доли нуклеосом в различных конформационных состояниях рассчитывали как отношение площадей под соответствующими гауссовыми полосами к общей площади под K-гистограммой (в процентах). Результаты получены в трех независимых экспериментах с размером выборки не менее 8000 нуклеосом.

### Результаты и обсуждение

Исследование влияния ионной силы на структуру моноклеосом проводили методом spFRET-микроскопии с использованием нуклеосом N(13,91)



**Рисунок.** Анализ изменений структуры мононуклеосом при различных концентрациях KCl по данным spFRET-микроскопии. (А) Структура коровой части нуклеосомы (pdb 1EQZ) и схема расположения меток Су3 и Су5 в мононуклеосомах N(13,91), у которых метки находятся в положениях 13 и 91 п.н. от начала нуклеосом-позиционирующей ДНК-матрицы 603 и в мононуклеосомах N(35,112) с метками в положениях 35 и 112 п.н. от начала нуклеосом-позиционирующей ДНК-матрицы 603. Октамер гистонов показан черным цветом. Б, Г, Д, Ж, З – Гистограммы относительной частоты распределения величины К для нуклеосом N(35,112) (Г, Ж) и нуклеосом N(13,91) (Б, Д, З) при различной концентрации KCl в буфере или после снижения концентрации KCl (0,7→0,15 М KCl, 1→0,15 М KCl, 1,3→0,15 М KCl) в экспериментах по обратимости структурных изменений (Б, Д, З). Символами обозначены рассчитанные по экспериментальным данным значения К. Линии – результат представления распределений величины К в виде суммы гауссовых полос, положения максимумов которых указаны над графиками. В, Е, И – доли нуклеосом N(13,91) с интактной структурой (субпопуляции с К=0,6) при 0,15 М KCl, при повышенной концентрации KCl и после ее снижения до 0,15 М в экспериментах по обратимости структурных изменений (\*)

и N(35,112), отличающихся по положению донор-акцепторной пары флуоресцентных меток в кор-нуклеосоме (рисунок, А). В нуклеосомах N(13,91) расположение меток позволяет по изменению величины К обнаруживать структурные перестройки вблизи входа ДНК в нуклеосому. В нуклеосомах N(35,112) расположение меток обеспечивает регистрацию изменений в укладке ДНК в центральной части нуклеосомы.

Согласно данным spFRET-микроскопии нуклеосомы N(13,91) при физиологической концентрации KCl (0,15 М) представлены в растворе двумя

субпопуляциями: минорной (14±3%) с максимумом нормального распределения К=0,02 и основной (86±2%) с максимумом распределения К=0,6 (рисунок, Б). У нуклеосом N(35,112) при 0,15 М KCl также обнаружено две субпопуляции: минорная (5±1%) с К=0,02 и основная (95±2%) с К=0,61 (рисунок, Г). В обоих случаях субпопуляция с К≈0,6 – это интактные нуклеосомы с плотной укладкой нуклеосомной ДНК на октамере гистонов [8]. Субпопуляция с К=0,02 – это нуклеосомы с нарушенной укладкой ДНК, возникающей, по-видимому, из-за потери гистонов в разбавленных

растворах, а в случае N(13,91) – еще и вследствие так называемого “дыхания нуклеосом”, то есть временного спонтанного отворачивания небольшого участка ДНК от октамера гистонов в области входа ДНК в нуклеосому [8].

Проведенные методом *sp*FRET-микроскопии исследования показали, что значительные изменения в структуре нуклеосом происходят при концентрации KCl больше 0,7 М. При 0,7 М KCl эти изменения регистрируются для нуклеосом N(13,91) как снижение субпопуляции частиц с  $K=0,6$  до  $40\pm 3\%$ , возрастание субпопуляции с  $K=0,02$  до  $27\pm 2\%$  и появление новой субпопуляции нуклеосом с  $K=0,5$ , доля которой составляет  $33\pm 3\%$  (рисунок, Б). При 0,7 М KCl структурные перестройки практически не распространяются на центральную область нуклеосом, где расположены метки в нуклеосомах N(35, 112) (рисунок, Г). Таким образом, изменения в укладке ДНК происходят вблизи входа ДНК в нуклеосому и затрагивают не менее 13, но меньше 35 п.н. в коровой области. При образовании субпопуляции нуклеосом с  $K=0,5$  происходит изменение укладки нуклеосомной ДНК, при котором расстояние между метками в положениях 13 и 91 п.н. возрастает согласно теории Фёрстера менее чем на 1 нм. Возрастание заселенности состояния с  $K=0,02$  у N(13,91) свидетельствует об увеличении доли частиц, в которых ДНК значительно отвернута от октамера гистонов вблизи входа в нуклеосому. Структурные перестройки, обнаруженные в N(13,91) при 0,7 М KCl, практически полностью обратимы, если вновь снизить концентрацию соли до 0,15 М (рисунок, В). Можно заключить, что изменения структуры нуклеосом при 0,7 М KCl не сопровождаются диссоциацией коровых гистонов даже в состоянии с  $K=0,02$ , что обеспечивает обратимость наблюдаемых конформационных переходов.

При увеличении концентрации KCl до 1 и 1,3 М перестройки в структуре нуклеосом значительно усиливаются и распространяются на участок нуклеосомной ДНК длиной не менее 35 п.н., на что указывают изменения в  $K$ -распределениях нуклеосом N(13,91) и N(35, 112) (рисунок, Ж, Д, З).

При 1 М KCl появляются значительные субпопуляции нуклеосом N(35, 112) в состояниях с  $K=0,42$  и  $K=0,05$  ( $36\pm 3\%$  и  $31\pm 4\%$  соответственно), и лишь  $33\pm 3\%$  нуклеосом сохраняют исходную структуру в области положения меток (состояние с  $K=0,61$ ). Еще меньшая доля частиц N(13,91) сохраняет исходную структуру в области входа ДНК в нуклеосому (состояние с  $K=0,6$ ,  $22\pm 4\%$ ), а доли частиц со значительно ( $K=0,02$ ) и

умеренно ( $K=0,5$ ) измененной укладкой ДНК достигают соответственно  $43\pm 4$  и  $35\pm 3\%$ . Структурные перестройки, наблюдаемые в N(13,91) при 1 М KCl, в значительной степени обратимы. При снижении концентрации соли до 0,15 М  $71\pm 5\%$  нуклеосом восстанавливают исходную структуру с максимумом распределения  $K=0,6$  (рисунок, Е).

При 1,3 М KCl в большинстве нуклеосом укладка ДНК значительно нарушена, и это нарушение затрагивает не менее 35 п.н. в коровой области. Доли нуклеосом N(35, 112) в состояниях  $K=0,61$ ,  $K=0,42$  и  $K=0,02$  составляют соответственно  $15\pm 5\%$ ,  $14\pm 4\%$  и  $71\pm 4\%$ , а дисперсия распределений в состояниях  $K=0,42$  и  $K=0,6$  значительно возрастает. Нуклеосом N(13,91) с интактной структурой не остается, и в растворе доминирует ( $81\pm 4\%$ ) субпопуляция с  $K=0,02$ . Несмотря на столь масштабное изменение в укладке ДНК,  $49\pm 4\%$  нуклеосом все еще способны восстановить исходную структуру с максимумом распределения  $K=0,6$  после снижения концентрации соли до 0,15 М (рисунок, И). Обратимость структурных изменений указывает на то, что в состоянии с  $K=0,02$  отворачивание ДНК от октамера гистонов у половины нуклеосом происходит с сохранением ассоциации между коровыми гистонами и ДНК. Как показано для нуклеосом-601 [4], такое возможно, если ДНК разворачивается вместе с гистонами H2A-H2V, у которых при этом нарушается часть взаимодействий с тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub>. Потеря способности к восстановлению интактной структуры у части нуклеосом может быть связана с диссоциацией гистонов H2A-H2V и H4 [4, 10]. Эта диссоциация практически необратима при низких концентрациях нуклеосом. Для нуклеосом-601 диссоциация димера H2A-H2V начинается при 0,5–0,6 М и завершается при 1 М NaCl [4, 10]. По результатам анализа обратимости структурных изменений (рисунок, В, Е, И) можно заключить, что нуклеосомы-603 обладают повышенной способностью сохранять ассоциацию между ДНК и гистонами в аналогичном диапазоне концентраций KCl.

Таким образом, высокая ионная сила является еще одним фактором в дополнение к белковому комплексу FACT (от английского *FA*cilitates *Ch*romatin *T*ranscription), обеспечивающим АТФ-независимую обратимую перестройку структуры нуклеосом-603, сопровождающуюся масштабным отворачиванием нуклеосомной ДНК от октамера гистонов [8].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031, соглашение № 14-24-00031-П).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thastrom A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom J.* Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. N 2. P. 213–229.
2. *Bondarenko V.A., Steele L.M., Ujvari A., Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Polikanov Y.S., Luse D.S., Studitsky V.M.* Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 24. N 3. P. 469–479.

3. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin Protocols. Methods Mol. Biol.* Vol. 523 / Ed. S.P. Chellappan. Humana Press, 2009. P. 109–123.
4. Böhm V., Hieb A.R., Andrews A.J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 1. P. 3093–3102.
5. Hazan N.P., Tomov T.E., Tsukanov R., Liber M., Berger Y., Masoud R., Toth K., Langowski J., Nir E. Nucleosome core particle disassembly and assembly kinetics studied using single-molecule fluorescence // *Biophys. J.* 2015. Vol. 109. N 8. P. 1676–1685.
6. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1288. *Chromatin Protocols* / Ed. S.P. Chellappan. Humana Press, 2015. P. 395–412.
7. Gansen A., Hieb A.R., Böhm V., Tóth K., Langowski J. Closing the gap between single molecule and bulk FRET analysis of nucleosomes // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N 4. e57018.
8. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
9. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.
10. Chen Y., Tokuda J.M., Topping T., Meisburger S.P., Pabit S.A., Gloss L.M., Pollack L. Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017. Vol. 114. N 2. P. 334–339.
11. Ngo T.T.M., Ha T. Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 8. P. 3964–3971.
12. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 3. P. 1619–1627.
13. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Pestov N.A., Hsieh F.K., Studitsky V.M. Experimental analysis of the mechanism of chromatin remodeling by RNA polymerase II // *Methods Enzymol.* 2012. Vol. 512. P. 293–314.
14. Lyubitelev A.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Effect of sodium and potassium ions on conformation of linker parts of nucleosomes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 3. P. 146–150.
15. Chertkov O.V., Valieva M.E., Malyuchenko N.V., Feofanov A.V. Analysis of nucleosome structure in polyacrylamide gel by the Förster resonance energy transfer method // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 196–200.

Поступила в редакцию

15.05.2018 г.

Принята к печати

18.06.2018 г.

## MOLECULAR BIOLOGY

### REVERSIBILITY OF STRUCTURAL REARRANGEMENTS IN MONONUCLEOSOMES INDUCED BY IONIC STRENGTH

A.V. Feofanov<sup>1,3,\*</sup>, T.V. Andreeva<sup>1</sup>, V.M. Studitsky<sup>1,3</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA

\*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Using fluorescence microscopy of single particles with Förster resonance energy transfer recording, the structural rearrangements were studied that occurred in nucleosomes formed on the 603 DNA template at a high ionic strength. It is found that within the range of 0.7–1.3 M KCl, large-scale changes occur in the nucleosome structure that are accompanied by the formation of at least two states differing in the degree of DNA unwrapping from the histone octamer and affecting from 13 to 35 and more pairs of nucleotides. A fraction of nucleosomes with modified structure varies from 60% at 0.7 M KCl to 100% at 1.3 M KCl. Preservation of the association between core histones and DNA in the new conformational states ensures reversibility of structural changes when KCl concentration is reduced to a physiological level. Reversibility is ~100% after the transition from 0.7 M to 0.15 M KCl and decreases to ~50% after the transition from 1.3 M to 0.15 M KCl.

**Keywords:** chromatin, nucleosome, ionic strength, fluorescence, microscopy, single molecule

**Сведения об авторах**

*Феофанов Алексей Валерьевич* – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

*Андреева Татьяна Викторовна* – студентка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: tanyafromtver@yandex.ru

*Студитский Василий Михайлович* – докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fcc.edu

*Кирпичников Михаил Петрович* – акад. РАН, проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.12:581.13:581.5

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА  
*HIBISCUS SYRIACUS* L. В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ, ИНСОЛЯЦИИ  
И ЗАГРЯЗНЕНИЯ****Н.Г. Акиншина<sup>1,\*</sup>, А.А. Азизов<sup>1</sup>, Н.И. Штонда<sup>2</sup>, А.И. Халмурзаева<sup>2</sup>, Н.Ш. Рахматуллина<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,  
Узбекистан, 100174, г. Ташкент, ул. Университетская, 4;<sup>2</sup>Ташкентский ботанический сад АН РУз имени академика Ф.Н. Русанова,  
Узбекистан, 100125, г. Ташкент, ул. Богишамол, 232

\*e-mail: n.akinshina@yahoo.com

В статье представлены результаты изучения пигментного состава, скоростей видимого фотосинтеза (чистой продукции кислорода) и темнового дыхания листьев гибискуса сирийского (*Hibiscus syriacus* L.) в условиях комплексного воздействия высоких летних температур, интенсивной инсоляции, загазованности и запылённости воздушной среды. Исследования проводились в период активной вегетации в 2017 г. на трёх территориях — Ташкентский ботанический сад АН РУз, сквер в центре города Ташкента и горная турбаза. Результаты экспериментов показали, что гибискус обладает высоким адаптивным потенциалом и в условиях достаточного полива хорошо приспособлен к экстремальным факторам среды обитания семиаридной зоны. Экологическая пластичность фотосинтетического аппарата гибискуса играет существенную роль в приспособлении вида к условиям среды обитания. Выявлено, что в условиях затенения у растений Ташкентского ботанического сада формируются крупные, широкие и тонкие “теневые” листовые пластинки, т.е. проявляются сциоморфные черты. Гелиоморфные признаки отмечены у листьев растений в горной местности, где в условиях сильной инсоляции формируются “световые” листья, которые имеют утолщённую и уплотнённую листовую пластинку гораздо меньшего размера. Адаптивный смысл подобных структурных перестроек листа — усиление мощности ассимиляционного аппарата, компенсирующее недостаток света (в случае сциоморфоза), и, напротив, — взаимное затенение фотосинтетических элементов, как защитная мера против повреждающего влияния избыточного света (в случае гелиоморфоза). Таким образом, обеспечивается необходимый растению постоянный уровень ассимиляции углекислого газа и продукции органических веществ, для поддержания энергетического баланса в разных условиях среды обитания. Изучение температурной зависимости скоростей темнового дыхания и видимого фотосинтеза показало, что эти процессы более устойчивы к температурным повреждениям в условиях обитания при более экстремальных значениях факторов среды. При этом устойчивость увеличивается и с возрастом листа, т.е. растение адаптируется в процессе онтогенеза к возможным перепадам температуры. В разных условиях произрастания скорость видимого фотосинтеза листьев гибискуса в период активной вегетации при оптимальных параметрах измерения примерно одинакова —  $0,20 \pm 0,05$  мкмоль  $O_2 / (дм^2 \cdot с)$ , это — норма реакции данного показателя и является видоспецифичной характеристикой фотосинтетического аппарата *H. syriacus* L.

**Ключевые слова:** *Hibiscus syriacus* L., пигменты, видимый фотосинтез, темновое дыхание, экологическая пластичность, высокая температура, инсоляция

Гибискус сирийский (вид *Hibiscus syriacus* L., род *Hibiscus*, сем. Malvaceae) — листопадный кустарник или небольшое дерево до 5–6 м высоты с продолжительным периодом цветения крупными цветками разного цвета. Родина — Китай, Индия и Малая Азия. Используется для озеленения как солитер или в групповых посадках для создания живых изгородей и аллей. Размножается семенами, черенками, прививками, отводками. Растёт быстро, выдерживает стрижку, способен к самосеву, что указывает на высокую степень адаптивности данного вида. Предпочитает рыхлую, плодородную влаж-

ную почву. Переносит заморозки до  $-22^\circ C$ . В диком виде гибискус сирийский практически не встречается. Имеется множество гибридных форм.

Исследования химического состава листьев, цветков и корней *Hibiscus syriacus* L. свидетельствуют о наличии в них веществ, применяемых в медицинской практике. Например, экстракты коры корней растения содержат тритерпеноиды, включая бетулин и его производные, которые ингибируют рост и вызывают апоптоз клеток рака легких человека [1–4]. Выделенные из коры корней и стеблей *H. syriacus* L. кумарины и флавоноиды

проявляют ярко выраженные антиоксидантные свойства и ингибируют перекисное окисление липидов [5–8]. Описан антидиабетический эффект спиртового экстракта цветков гибискуса [9].

Очевидно, что гибискус сирийский представляет интерес не только для специалистов декоративного садоводства, а также, для медиков и фармакологов, как лекарственное растение. Для научно обоснованного культивирования вида в разных почвенно-климатических условиях необходимо обладать информацией об экологической пластичности и его адаптивном потенциале. Однако, несмотря на большое число работ, посвященных изучению химического состава тканей гибискуса, имеются лишь единичные исследования эколого-физиологических особенностей данного вида.

Так, в литературе отмечается устойчивость гибискуса сирийского к загрязнению почвы и воздушной среды, рекомендуется выращивать его для восстановления земель в местах захоронения отходов [10]. Показано, что гибискус чувствителен к холодному стрессу, что проявляется в редуции фотосинтеза [11]. Описано ингибирующее действие дефицита воды на показатели водного обмена и фотосинтеза гибискуса, чувствительность растения к содержанию калия в почве [12]. Вместе с тем, имеются данные о повышенной адаптивности отдельных сортов вида к засухе, о том, что гибискус занимает промежуточное положение между мезофитами и ксерофитами [13], в засушливых условиях у него проявляются характерные признаки ксероформных структур [14].

Гибискус традиционно применяется в озеленении населённых пунктов Узбекистана. Экстремально высокие температуры и практическое отсутствие атмосферных осадков являются наиболее неблагоприятными абиотическими факторами в период активной вегетации, несмотря на это, гибискус сирийский хорошо растёт здесь в условиях полива. В связи с этим, изучение влияния высоких температур, интенсивной инсоляции и загрязнения воздушной среды на состояние данного вида, исключая воздействие водного дефицита, представляет несомненный научный и практический интерес.

Фотосинтез и дыхание — ключевые физиологические процессы в жизни растения, их характеристики специфичны для каждого вида, и, вместе с тем, обладают высокой экологической лабильностью и зависят от многих факторов среды обитания. Любое стрессовое воздействие отражается на их интенсивности. Именно адаптация этих взаимосвязанных процессов позволяет растениям выживать в меняющихся условиях [15, 16]. Поскольку известно, что гибискус характеризуется высокой экологической пластичностью, есть основания предполагать наличие у него различных механизмов адаптации на уровне структурных и функциональных особенностей фотосинтетического аппарата (ФА). Фотосинтетические пигменты хлоропластов являются материальной основой фотосинтеза. Их

состав и количественные соотношения обуславливают интенсивность фотосинтеза и устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды обитания [17].

Данная работа посвящена исследованию пигментного состава листьев, скоростей видимого фотосинтеза (чистой продукции кислорода) и темнового дыхания гибискуса сирийского (*H. syriacus* L.) в условиях комплексного воздействия высоких температур, инсоляции, техногенного загрязнения на фоне достаточного орошения.

### Материалы и методы

Листья гибискуса сирийского, *H. syriacus* L., сорта Red heart являлись объектом данного исследования. Наблюдения проводились на трёх участках: (1) Ташкентский ботанический сад АН РУз (условно фоновая точка города, 480 м над уровнем моря, хорошее проветривание, уход, полив, притенение); (2) сквер Амира Тимура (центр города Ташкента, “остров тепла” в городе, высокая сухость воздуха, загазованность и запыленность, хороший полив, высокая инсоляция) и (3) турбаза “Янгиабад” (120 км от Ташкента, 1500–2000 м над уровнем моря, горная местность, более резкая континентальность по сравнению с городом, более высокая влажность воздуха, более мягкие летние температуры, разреженность воздуха, высокая инсоляция, повышенная доля ультрафиолетового излучения в спектре солнечного света, хороший полив, каменистые почвы). Выбранные для исследования территории достаточно отличаются друг от друга температурным режимом, инсоляцией и составом воздушной среды. Так, по данным Гидрометцентра РУз, средние суточные температуры воздуха в июле 2017 г. в точках 1, 2 и 3 соответственно были равны +29,9°C, +34°C и +21,5°C, центр города является наиболее тёплой зоной. По степени чистоты воздушной среды участки наблюдения располагаются в следующем порядке: самая загрязнённая — точка 2 (сквер А.Тимура), затем — 1 (Ботанический сад) и, наконец, 3 (турбаза “Янгиабад” в горах).

Отбор образцов проводили в период интенсивной вегетации 2017 г., с мая по октябрь; отбирали листья в утреннее время (8:00–8:30 утра), с 3–4-го междоузлия веток на высоте примерно полтора-два метра.

Стандартным весовым методом измеряли общее содержание воды в листьях (сушка при 105°C до постоянного веса), содержание минеральных компонентов (сжигание при 600°C) [18] и рассчитывали удельный вес листовой пластинки [19].

Концентрацию хлорофиллов и каротиноидов определяли спектрофотометрически при 662, 644 и 440 нм на приборе Jasco V-450 (Jasco, Япония) после быстрой гомогенизации в фарфоровой ступке высушенной при комнатной температуре высечки листа диаметром 1 см и экстракции из гомогената 80% водным раствором ацетона. Число повторов

составляло 5–7. Работы проводились на холоду (при +5...+9°C). Для определения концентрации пигментов в суммарной вытяжке использовали формулу Веттштейна (Wettstein, 1957) в пересчёте на 1 см<sup>2</sup> листовой пластинки.

Показатели скоростей видимого фотосинтеза и темнового дыхания измеряли в лабораторных условиях на высеках свежесорванных листьев при помощи прибора PlantVital 5030 (INNO-Concept GmbH, Германия) с электрохимическим сенсором MF 41-INN (Sortertechnik Meinsberg, Германия); температуры измерения +17°C, +27°C, +37°C и +42°C. Измерение длилось 20–25 мин. Освещение измеряемой пробы осуществляли люминесцентным диодом в области красного спектра (635–650 нм) [20].

Статистическую обработку полученных данных выполнили в программе OriginPro 7.5, графики построили в Microsoft Office Excel 2010. На рисунках и в таблицах представлены среднеарифметические значения измерений и их среднеквадратические отклонения. Вычисляли достоверность различий между средними с помощью 1-факторного дисперсионного анализа ANOVA при уровне статистической значимости 0,05. В работе обсуждаются только статистически значимые различия.

### Результаты и обсуждение

Лист – это очень чувствительный орган, отражающий влияние любых экологических факторов на растение в целом. Несмотря на то, что структура листа обусловлена генетически и сформирована в процессе филогенеза вида, под действием условий обитания возможны анатомические и морфологические изменения, имеющие адаптационное значение в жизни растений [16, 21, 22].

Измерения биометрических показателей листьев гибискуса, проведённые в конце вегетации, выявили достоверные различия между размерами листьев у городских и горных растений. Листовые пластинки гибискуса, произрастающего в условиях гор, в сентябре были примерно в 2 раза меньшего размера по сравнению с городскими растениями (длина листа горного гибискуса меньше показателей растений из ботанического сада на 53%, ширина – на 56%) (табл. 1). У растений в условиях города, на участках 1 и 2, изменения в размерах листа были статистически не достоверны.

Результаты проведенных наблюдений показали постепенное увеличение удельной плотности листовой пластинки (УПЛП) у всех исследуемых растений в процессе вегетации (рис. 1). В сентябре УПЛП в точках 2 (центральная часть города) и 3 (горная местность) были выше показателей гибискусов ботанического сада примерно на 23–24%.

Также было обнаружено, что в начале вегетации, в мае, содержание минеральных компонентов в тканях листа гибискуса составляет около 9% от сухого вещества, в сентябре в сухом веществе

листьев содержится порядка 22% минеральных веществ. Интересно, что этот показатель был примерно равным в листьях всех групп исследуемых растений, несмотря на существенные различия в загрязнённости воздушной среды мест обитания. Можно предположить, что *H. syriacus* L. не аккумулирует загрязняющие минеральные вещества из воздуха и почвы в биомассе листьев.

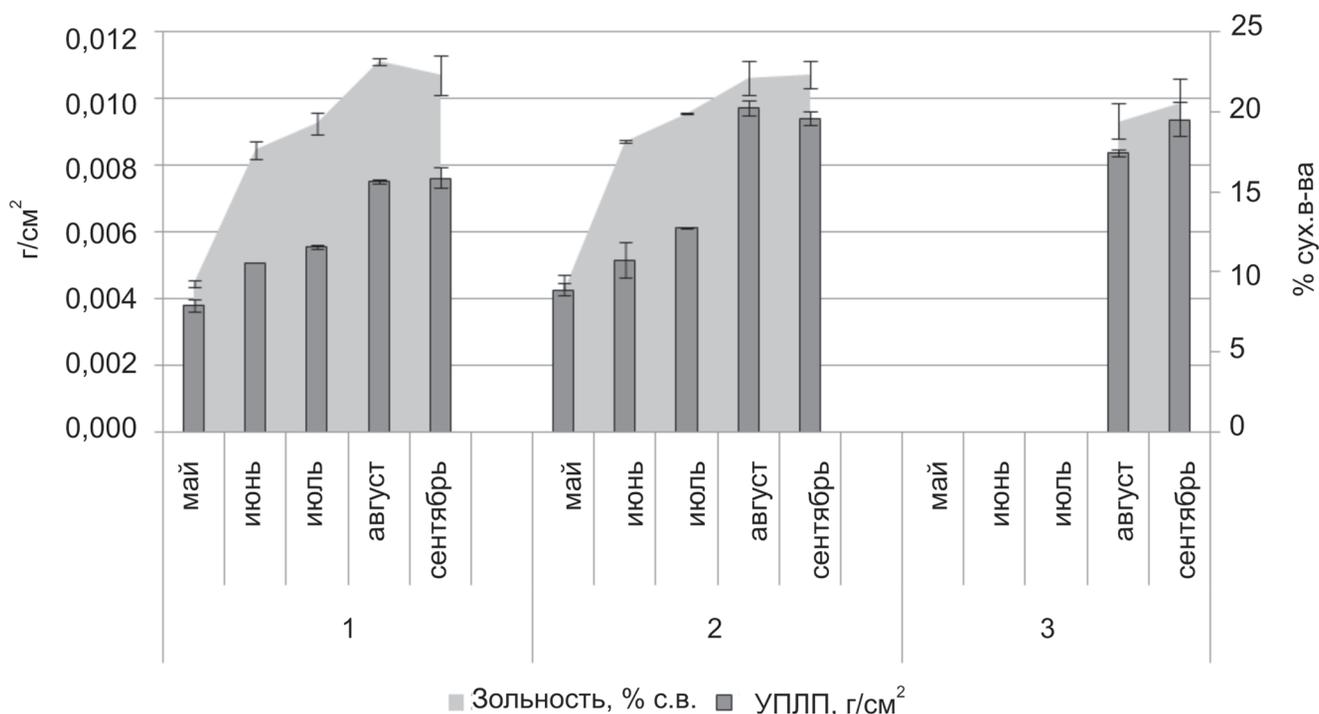
Таблица 1

Длина и ширина листовой пластинки *Hibiscus syriacus* L. (Ташкент и Ташкентская область, 3–6 сентября, 2017 г.)

Место отбора проб	Длина листовой пластинки, см	Ширина листовой пластинки, см
1	10,16±0,95	6,81±0,80
2	8,81±1,22	6,09±0,97
3	4,79±0,59	3,01±0,45

Примечание: 1 – Ботанический сад АН РУз, 2 – Сквер А. Тимура (центр г. Ташкента), 3 – горная турбаза “Янгиабат”. В таблице представлены среднеарифметические значения измерений и их среднеквадратические отклонения.

Итак, в условиях гор (точка 3) листья гибискуса были наименьшего размера с наибольшей плотностью листовой пластинки, более высоким содержанием органического вещества на единицу поверхности. Скорее всего, это связано с адаптационными изменениями листа, вызванными в первую очередь уровнем освещённости места обитания. Следует отметить, что листья гибискусов ботанического сада имеют выраженные сциоморфные признаки “теневого” листьев, а листья гибискусов с горной турбазы имеют “световые” черты (гелиоморфные), листья центральной части города занимают промежуточное положение. Известно, что сциоморфные черты возникают при формировании листовой пластинки в затенении. Так, в условиях ботанического сада, под пологом крупных деревьев при сниженной интенсивности света тормозится рост клеток листа в высоту (перпендикулярно поверхности листа), но продолжается рост в ширину, в результате чего формируются крупные, широкие и тонкие листовые пластинки [22]. Гелиоморфные черты формируются у растений в условиях сильной инсоляции. Многими исследованиями доказано, что сильное освещение оказывает стимулирующее действие на рост клеток мезофилла в высоту, это приводит к образованию у световых листьев утолщённой и плотно сложенной палисадной ткани и к общему утолщению листовой пластинки. Вместе с тем, поверхностный рост отстаёт, в итоге образуются более мелкие листья. Именно поэтому у горных растений листья мелкого размера и увеличена УПЛП. Следует отметить, что часто наблюдается сочетанное воздействие инсоляции, сильного нагревания и загрязнения воздушной среды (как в условиях обитания



**Рис. 1.** Динамика изменения показателей удельной плотности листовой пластинки (УПЛП) и зольности листьев *Hibiscus syriacus* L. в период активной вегетации 2017 г. (Территории исследования: 1 – Ташкентский ботанический сад АН РУз, 2 – центральная часть Ташкента, сквер А. Тимура, 3 – горная турбаза “Янгиабат”)

в центре города) или воздействие инсоляции, повышенной доли ультрафиолетовых лучей и разреженности воздуха (как в горах). Комплексное влияние сразу нескольких экологических факторов вызывает комплексные адаптации, которые труднее идентифицировать.

Изучение содержания пигментов фотосинтеза в единице площади листа показало, что в процессе активного роста и развития растений (с мая по сентябрь) происходит увеличение общего количества пигментов в листьях гибискуса (табл. 2). В октябре-ноябре этот показатель снижается, что связано с завершением вегетации и деструктивными процессами в тканях листа, в конце ноября листья с первыми заморозками желтеют и опадают.

Результаты измерений показали, что в мае общее количество пигментов в единице поверхности листа у гибискусов, выращиваемых в центре города и в ботаническом саду было примерно одинаковым (соответственно 34,65 мкг/см<sup>2</sup> и 31,33 мкг/см<sup>2</sup>). Причём, содержание хлорофилла *b* (Хл *b*) в группе растений из сквера в центре Ташкента было на 26,5% достоверно выше, чем у растений ботсада.

Сравнение этих же показателей в конце вегетации (среднее за август и сентябрь) не выявило достоверных отличий в общем количестве пигментов, у гибискусов в центре города сумма всех пигментов была 44,66 мкг/см<sup>2</sup>, в ботаническом саду – 44,43 мкг/см<sup>2</sup>. При этом, количество каротиноидов в листьях растений центральной части города на 17% было ниже, чем у гибискусов ботсада.

К концу вегетации у гибискусов ботанического сада, обитающих в условиях притенения, отмечен наибольший прирост содержания пигментов в единице поверхности листа. Так, по сравнению с показателями мая, содержание хлорофилла *a* (Хл *a*) в сентябре у растений этой группы увеличилось на 78,6%, Хл *b* – на 50,7%, каротиноидов – на 86,2%. В листьях гибискусов из центральной части города (в условиях высокой инсоляции и загазованности/запыления) к сентябрю содержание Хл *a* выросло на 54%, каротиноидов – на 51%, (повышение содержания Хл *b* было статистически не достоверно).

Статистический анализ данных не выявил достоверных отличий в содержании Хл *a* в сентябре в листьях растений Ташкентского ботанического сада и центральной части города, 28,52±2,27 мкг/см<sup>2</sup> и 26,99±2,63 мкг/см<sup>2</sup> соответственно. Вместе с тем, у растений с горной турбазы этот показатель был достоверно выше на 30 и 36% относительно показателей городских гибискусов (36,81±6,52 мкг/см<sup>2</sup>).

Содержание Хл *b* в тканях листьев гибискуса из ботанического сада и со сквера достигло в сентябре 11,49±2,17 мкг/см<sup>2</sup> и 10,40±1,47 мкг/см<sup>2</sup> соответственно, в листьях растений с горной турбазы – 15,96±0,88 мкг/см<sup>2</sup>, что на 39 и 54% превышает показатели городских растений.

Соотношение Хл *a*/Хл *b* у городских растений в сентябре было 2,6; у листьев гибискусов с горной турбазы – 2,3. Считается, чем больше это соотношение, тем выше интенсивность фотосинтеза у растений, в норме оно должно соответствовать 2,2–3,0. Значит, этот показатель гибискуса сирийского на-

Таблица 2

Содержание пигментов фотосинтеза в листьях *Hibiscus syriacus* L. в период интенсивной вегетации (Ташкент и Ташкентская область, 2017 г.)

Место отбора проб	Время отбора проб	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Кар	Хл <i>a/b</i>	Хл/Кар
		мкг/см <sup>2</sup>				
1	май	15,97±0,89	7,63±0,70	7,73±0,37	2,09	3,05
	июнь	20,54±0,26	7,01±0,52	8,77±0,12	2,93	3,14
	июль	22,00±1,46	7,00±0,94	8,00±2,02	3,14	3,63
	август	24,94±0,46	9,77±0,74	12,51±0,27	2,55	2,78
	сентябрь	28,52±2,27	11,49±2,17	14,40±0,69	2,61	2,88
	октябрь	22,31±0,23	8,00±0,55	10,15±0,10	2,79	2,99
2	май	17,51±0,12	9,65±0,22	7,49±0,00	1,81	3,63
	июнь	24,08±0,95	9,16±0,19	8,44±0,53	2,63	3,94
	июль	25,00±1,29	8,22±0,98	7,05±0,84	3,04	4,71
	август	27,63±1,28	8,80±0,22	11,05±0,91	3,14	3,30
	сентябрь	26,99±2,63	10,40±1,47	11,31±0,56	2,60	3,30
	октябрь	18,01±3,19	7,33±3,74	8,98±2,99	2,46	2,82
3	август	26,49±1,71	12,42±1,48	11,84±3,06	2,13	3,29
	сентябрь	36,81±6,52	15,96±0,88	16,21±2,06	2,31	3,26

*Примечание:* Места отбора проб: 1 – Ботанический сад АН РУз, 2 – Сквер А. Тимура (центр г. Ташкента), 3 – горная турбаза “Янгибад”. Сокращения: Хл *a* – содержание хлорофилла *a*, Хл *b* – содержание хлорофилла *b*, Кар – содержание каротиноидов, Хл *a/b* – отношение содержания хлорофилла *a* к содержанию хлорофилла *b*, Хл/ Кар – отношение общего содержания хлорофиллов к содержанию каротиноидов.

ходится в пределах нормы, ФА растений достаточно хорошо адаптирован к условиям среды обитания в городе Ташкенте и на территории горной базы.

При этом соотношение общего количества хлорофилла к количеству каротиноидов в августе-сентябре у гибискусов ботанического сада (в условиях притенения) составляло примерно 2,8, а у гибискусов центральной части города и горной турбазы (в условиях высокой инсоляции) этот показатель был равен 3,3. Как правило, хлорофилла в листьях приблизительно в 3 раза больше, чем каротиноидов. Уменьшение данного показателя свидетельствует о снижении светособирающей функции пигментного комплекса листа под воздействием неблагоприятных факторов среды обитания. В данном случае, высокие летние температуры и недостаточная освещённость явились “неблагоприятным” фактором для гибискуса сирийского, что может свидетельствовать о светолюбовности данного вида. Пигментные комплексы листа гибискуса сирийского при хорошем поливе лучше адаптированы к высокой инсоляции и загрязнению воздушной среды, чем к недостатку света в сочетании с высокой температурой.

Концентрация каротиноидов в листьях гибискусов, выращиваемых в горных условиях, в сентябре была больше, чем в центральной части Ташкента на 43%, и составляла 16,21±2,06 мкг/см<sup>2</sup>,

разница в содержании каротиноидов в листьях растений с гор и ботанического сада была статистически не достоверна.

Увеличение количества каротиноидов связано с адаптивными перестройками ФА клеток листа для защиты от избыточной солнечной радиации. Известно, что в условиях высокой инсоляции и жёсткого ультрафиолетового излучения (характерных для горного участка 3) происходит накопление каротиноидов, которые защищают реакционные центры ФА от фотоингибирования и индуцированных температурой повреждений, таких как фотоокислительное разрушение элементов пигментного аппарата и электронно-транспортной цепи, улавливая активизированный (синглетный) кислород [23, 24]. Как описано в ряде работ [23, 25], в ответ на действие высокой температуры, возможна такая же реакция, что объясняет накопление каротиноидов в листьях растений ботанического сада.

Наименьшее количество каротиноидов отмечено в листьях растений в центре города (точка 2), что можно объяснить высокой степенью запылённости воздушной среды на данной территории и оседанием пыли на листовой пластинке. Возможно, пыль в данном случае защищала от избыточных солнечных лучей.

Таким образом, результаты исследования показали, что листья растений 3-й исследуемой группы (на территории горной турбазы в условиях среднегорья) в конце вегетации содержат больше пигментов (Хл *a*, Хл *b*, Кар) в единице поверхности, чем городские растения (группы 1 и 2). Скорее всего, это связано с гелиоморфными и, отчасти, ореофильными особенностями листьев горных гибискусов, а именно, с многорядностью палисадной ткани и высокой плотностью хлоропластов в клетке листа. Многочисленность хлоропластов в данном случае может быть обусловлена стимулирующим действием сильного света на их репликацию [22]. Выявленные у растений ботанического сада сциоморфные признаки обуславливают меньшую насыщенность единицы площади листа хлоропластами при одновременном увеличении содержания в них пигментов. Адаптивный смысл подобных структурных перестроек ФА листа – усиление мощности ассимиляционного аппарата, компенсирующее недостаток света (в случае сциоморфоза), и, напротив, – взаимное затенение фотосинтетических элементов, как защитная мера против повреждающего влияния избыточного света (в случае гелиоморфоза). К тому же, по литературным данным [22], в листьях с высокой концентрацией хлоропластов значительно снижается сопротивление диффузии  $\text{CO}_2$  в мезофилл, что имеет важное значение для горных растений, где ощущается низкое парциальное давление углекислого газа.

Известно, что функциональная активность фотосинтеза, оцениваемая по скорости продукции кислорода, значительно зависит от температурного фактора. На разных стадиях зрелости листа гибискуса были проведены измерения скорости видимого фотосинтеза, а также, скорости темнового дыхания, причём измерения проводили при разных температурных режимах в измерительной ячейке. Результаты измерений представлены на рис. 2.

Обнаружено, что у молодых листьев (июнь), как правило, наблюдается прямая корреляционная зависимость между уровнем газообмена и температурой, то есть, с повышением температуры увеличиваются скорости дыхания и фотосинтеза в них.

Чувствительность ФА листа гибискуса к температуре, оцениваемая по степени изменения скорости чистой продукции кислорода, менялась в онтогенезе. Так, амплитуда реакции у молодых (незрелых) листьев в ответ на температурное воздействие была гораздо больше, чем у взрослых. В конце вегетации чувствительность скорости видимого фотосинтеза к температурным воздействиям снижалась до минимума, достоверных изменений относительно контроля ( $+27^\circ\text{C}$ ) часто не наблюдалось. Значения скорости чистой продукции в ответ на повышение температуры до  $+37^\circ\text{C}$  и  $+42^\circ\text{C}$  у молодых листьев растений из ботанического сада были почти в 2 раза выше, чем у растений из точки 2 (центр города) с более сложными условиями среды, более высокими показателями инсоляции, темпе-

ратуры и загрязнённости. При этом у молодых листьев гибискуса в центре города скорость дыхания в темноте была несколько выше, чем у растений из ботсада.

Более резко снижались показатели газообмена гибискуса из ботанического сада и при воздействии низкой температуры. Если считать  $+27^\circ\text{C}$  контрольной температурой, то в ответ на понижение температуры до  $+17^\circ\text{C}$  скорость видимого фотосинтеза у молодого листа гибискуса из ботанического сада уменьшалась почти на 60% относительно контроля. Под влиянием высоких температур,  $+37^\circ\text{C}$  и  $+42^\circ\text{C}$ , этот показатель возрастал на 88% и 109% соответственно.

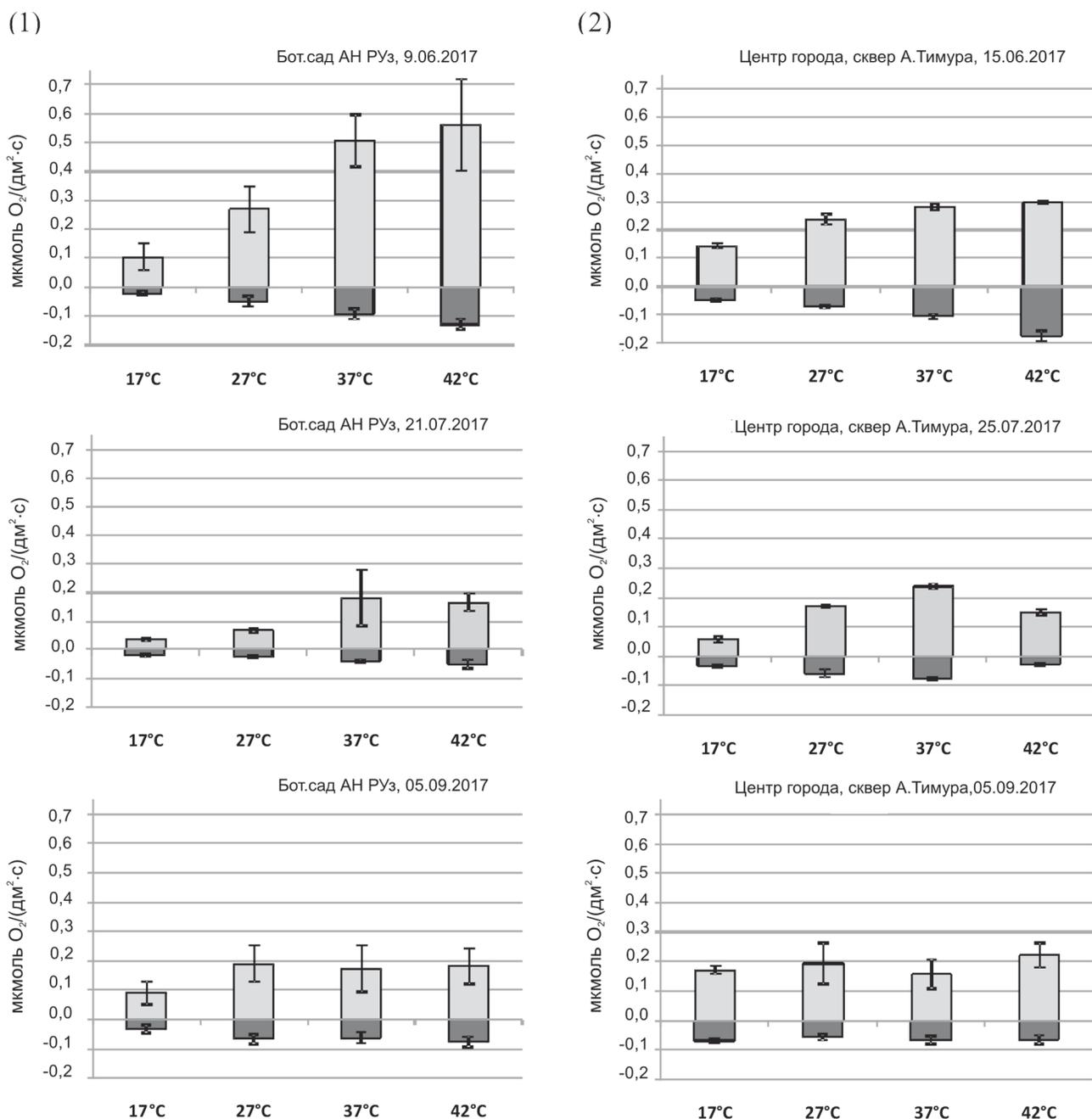
У зрелого листа (в сентябре) с этого же места обитания под влиянием температуры  $+17^\circ\text{C}$  скорость видимого фотосинтеза снижалась на 53%, а достоверных изменений в ответ на повышение температуры до  $+37^\circ\text{C}$  и  $+42^\circ\text{C}$  не наблюдалось.

Гибискус сирийский, выращиваемый в условиях интенсивной инсоляции, высокой температуры воздуха и почвы, загрязнения воздушной среды в центре Ташкента на сквере А. Тимура, проявлял похожую реакцию, но с меньшей амплитудой. Так, у молодых листьев в ответ на воздействие  $+17^\circ\text{C}$  скорость видимого фотосинтеза снижалась на 39%. Под влиянием температур  $+37^\circ\text{C}$  и  $+42^\circ\text{C}$ , показатели увеличивались соответственно на 18 и 25% относительно контрольных параметров. В сентябре у листьев гибискуса на сквере статистически достоверных изменений скорости видимого фотосинтеза в ответ на изменения температуры не выявлено.

У растений третьей группы, произрастающих в горных условиях, измерения проводились в августе и сентябре на зрелых листьях (рис. 3). Результаты показали, что скорость видимого фотосинтеза в сентябре достоверно не менялась под воздействием низких или высоких температур и оставалась на постоянном уровне. В августе отмечено, что под влиянием температур  $+37^\circ\text{C}$  и  $+42^\circ\text{C}$  скорость чистой продукции кислорода увеличивалась на 53,3% и 63% соответственно.

В рамках исследования было изучено влияние температуры на темновое дыхание листьев гибискуса сирийского на разных стадиях онтогенеза. Обнаружено, что скорости дыхания молодых листьев в темноте более резко менялись в ответ на изменения температуры, по сравнению с более зрелыми листьями.

Так, в ответ на понижение температуры до  $+17^\circ\text{C}$  у листьев гибискуса из ботанического сада в начале активной вегетации (июнь) скорость дыхания достоверно снижалась на 57% относительно контрольного показателя при  $+27^\circ\text{C}$ . Повышение температуры до  $+37^\circ\text{C}$  и  $+42^\circ\text{C}$  приводило к активации дыхания на 89 и 160% соответственно. В августе достоверных изменений в скоростях дыхания у листьев этой группы в ответ на низкую температуру не наблюдалось. Высокие температуры уве-



**Рис. 2.** Скорости видимого фотосинтеза (нетто продукции кислорода,  $\mu\text{моль O}_2 / (\text{дм}^2 \cdot \text{с})$ ) и дыхания в темноте (потребления кислорода,  $-\mu\text{моль O}_2 / (\text{дм}^2 \cdot \text{с})$ ) у листьев *Hibiscus syriacus* L. в Ташкенте (Территории исследования: (1) Ташкентский ботанический сад АН РУз, (2) центральная часть Ташкента, сквер А. Тимура; измерения проводились на высечках свежих листьев в диапазоне длин волн 635–650 нм, при температурах в измерительной ячейке 17, 27, 37 и 42°C; 9–15 повторов; время измерения – 20–25 мин)

личивали скорости дыхания на 70% (+37°C) и 104% (+42°C). В сентябре изменений в скорости дыхания листьев гибискуса из ботанического сада под влиянием высоких температур не выявлено.

Дыхание листьев растений обитающих в центре города (точка 2) в июне в ответ на температуру +27°C и +37°C не отличалось от показателей растений ботанического сада, хотя под действием +17°C скорости дыхания были выше на 120%, а при +42°C – выше на 18%. При этом сама реакция темнового дыхания на изменение температуры была менее выраженной. Так, скорость темнового дыхания при +17°C снизилась на 35%, относительно

показателя при контрольной температуре +27°C. Повышение температуры до +37°C и +42°C приводило к активации дыхания на 48 и 108% соответственно. В конце вегетации достоверных изменений в скорости дыхания этой группы под влиянием высоких температур не выявлено.

Интересно отметить, что у горных гибискусов, обитающих в условиях постоянного резкого перепада дневных и ночных температур, наблюдалась прямая корреляция между скоростью дыхания и температурой в августе и сентябре. Так, в сентябре, в ответ на понижение температуры до +17°C скорость дыхания в темноте снижается на 47%, а при

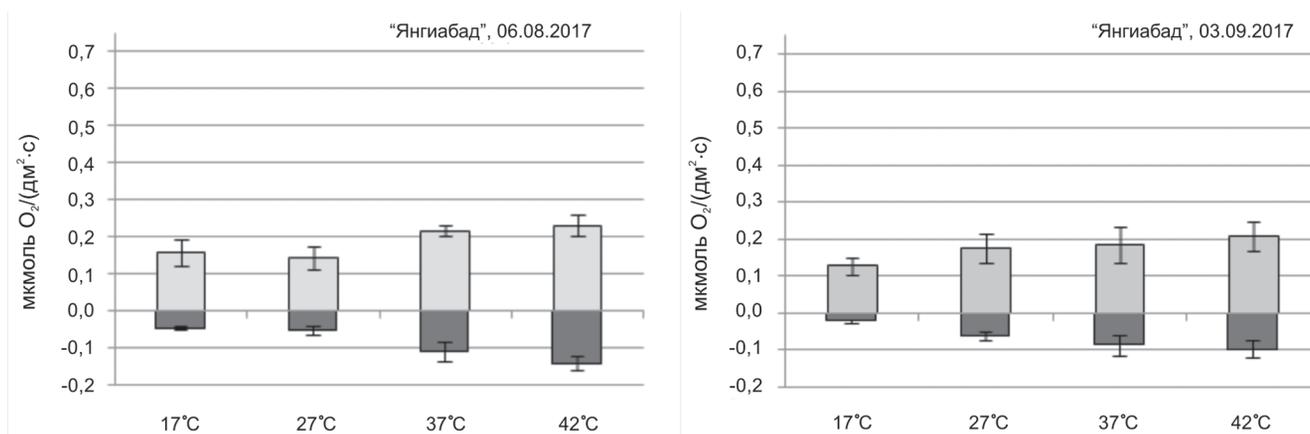


Рис. 3. Скорости видимого фотосинтеза и дыхания в темноте у листьев *Hibiscus syriacus* L. в горных условиях, август и сентябрь, 2017 г.

(Территория исследования: горная турбаза “Янгиабд” в Ташкентской области; измерения проводились на высечках свежих листьев в диапазоне длин волн 635–650 нм и при температурах в измерительной ячейке 17, 27, 37 и 42°C; 9–15 повторов; время измерения – 20–25 мин)

увеличении температуры до +42°C, возрастает на 62%. При этом статистически достоверных отличий от показателей городских растений измеренных в это же время не наблюдается.

В июле у городских растений отмечено уменьшение скорости чистой продукции кислорода, у растений ботанического сада показатель снижается на 75% относительно июня, а у гибискуса со сквера – на 28% (при температуре измерения +27°C). Возможно, это объясняется определёнными физиологическими перестройками, вызванными подготовкой растения к цветению и сдвигом энергетического баланса в сторону катаболических процессов. К тому же, в июле 2017 г. в городе Ташкенте держались экстремально высокие дневные температуры, от +42°C до +44°C, которые, как известно, ингибируют фотосинтез, как световую фазу, так и фиксацию углекислоты [25]. При этом скорость темнового дыхания у листьев растений ботанического сада снижается на 49% по сравнению с показателями июня. У гибискуса, выращиваемого на сквере в условиях самых высоких температур в городе, скорости дыхания в июне и июле не отличаются. Возможно, гибискус сирийский лучше переносит высокие температуры среды обитания в условиях хорошего освещения, чем в условиях притенения.

Итак, чем экстремальнее условия мест обитания гибискуса, тем более устойчив процесс продукции кислорода к температурным воздействиям, причем, устойчивость увеличивается к концу вегетации, т.е. в процессе онтогенеза растение адаптируется к возможным перепадам температуры. Чувствительность темнового дыхания листьев к температурным изменениям несколько ниже, чем чувствительность фотосинтеза.

Максимальные скорости видимого фотосинтеза у гибискуса сирийского в разных условиях обитания (при температуре измерения +27°C) наблюдались в июне и составляли в среднем 0,24–0,27 мкмоль O<sub>2</sub>/(дм<sup>2</sup>·с), в июле-августе скорости

нетто-продукции несколько снижались до 0,14–0,24 мкмоль O<sub>2</sub>/(дм<sup>2</sup>·с), в сентябре варьировали от 0,18 до 0,19 мкмоль O<sub>2</sub>/(дм<sup>2</sup>·с).

Таким образом, несмотря на отличия в условиях выращивания *H. syriacus* (а именно, в уровне инсоляции, температуре воздуха и почвы, загрязнённости газами и пылевыми частицами) скорость видимого фотосинтеза при оптимальных условиях измерения (+27°C, 635–650 нм) оставалась на одинаковом уровне, 0,20±0,05 мкмоль O<sub>2</sub>/(дм<sup>2</sup>·с). Интересно отметить, что в более ранней работе американских учёных [12] указано, что скорость чистой продукции гибискуса в условиях достаточного полива варьировала в зависимости от содержания калия в почве от 17,95 до 22,69 мкмоль O<sub>2</sub>/(м<sup>2</sup>·с). Таким образом, можно полагать, что полученная нами в эксперименте величина скорости видимого фотосинтеза (чистой продукции кислорода) 0,20±0,05 мкмоль O<sub>2</sub>/(дм<sup>2</sup>·с) – норма реакции данного показателя и является видоспецифичной характеристикой фотосинтетического аппарата гибискуса.

Можно заключить, что гибискус сирийский (*Hibiscus syriacus* L.) обладает высоким адаптивным потенциалом и в условиях достаточного полива хорошо приспособлен к экстремальным факторам семиаридной зоны. Показано, что экологическая пластичность фотосинтетического аппарата гибискуса играет существенную роль в приспособлении вида к условиям среды обитания. Следует отметить, что в естественных условиях обитания, как правило, наблюдается совместное воздействие разных экологических факторов на растения. Для участка наблюдения в ботаническом саду характерно сочетание таких факторов, как притенение и высокая летняя температура. Интенсивная инсоляция, высокая температура и загрязнение воздушной среды оказывают основное влияние на жизнь растений в центре города. Резкие перепады дневных и ночных температур, высокая инсоляция, повышенная доля ультрафиолетовых лучей в спектре

солнечного света и разреженность воздуха являются важными факторами среды обитания растений на территории горной турбазы. Комплексное влияние сразу нескольких экологических факторов вызывает комплексные адаптации, которые бывает трудно идентифицировать. Тем не менее, у листьев гибискуса сирийского, обнаружены выраженные признаки сциоморфоза и гелиоморфоза, являющиеся результатом адаптации к разным условиям освещенности. Сциоморфные черты проявляются у растений Ташкентского ботанического сада, в условиях затенения у них формируются крупные, широкие и тонкие “теньевые” листовые пластинки. Гелиоморфные признаки выявлены у листьев растений в горной местности, под воздействием сильной инсоляции так называемые “световые” листья имеют утолщенную и уплотненную листовую пластинку гораздо меньшего размера.

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в единице поверхности листьев всех исследуемых растений постепенно возрастало с мая по сентябрь. Достоверных различий в общем количестве пигментов в листьях растений, произраставших в городских условиях, не обнаружено.

Листья гибискуса сирийского на территории горной турбазы в конце вегетации содержат больше пигментов (Хл *a*, Хл *b*, Кар) в единице поверхности, чем городские растения. Это связано с их гелиоморфными и, отчасти, ореофильными особенностями, а именно, с высокой плотностью хлоропластов в клетке листа. Сциоморфные признаки, выявленные у растений ботанического сада, обуслав-

ливают меньшую насыщенность единицы площади листа хлоропластами при одновременном увеличении содержания в них пигментов. Адаптивный смысл подобных структурных перестроек ФА листа — усиление мощности ассимиляционного аппарата, компенсирующее недостаток света (в случае сциоморфоза), и, напротив, — взаимное затенение фотосинтетических элементов, как защитная мера против повреждающего влияния избыточного света (в случае гелиоморфоза). Таким образом, обеспечивается необходимый растению постоянный уровень ассимиляции углекислого газа и продукции органических веществ, для поддержания энергетического баланса в разных условиях среды обитания.

Изучение температурной зависимости скоростей темнового дыхания и видимого фотосинтеза показало, что, чем более экстремальными условиями характеризуется место обитания, тем более устойчивы эти процессы к температурным воздействиям. Выявлено, что устойчивость увеличивается с возрастом растения, т.е. растение в онтогенезе адаптируется к возможным перепадам температуры и температурным повреждениям.

Скорость видимого фотосинтеза листьев гибискуса при оптимальных условиях измерения остаётся в разных экологических условиях примерно на одинаковом уровне —  $0,20 \pm 0,05$  мкмоль  $O_2$ /(дм<sup>2</sup>·с). Это — норма реакции данного показателя и является видоспецифичной характеристикой фотосинтетического аппарата *H. syriacus* L.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства инновационного развития РУз (проект БВ-М-Ф-5-001).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hsu R., Hsu Y., Chen S., Fu C., Yu J., Chang F., Chen Y., Liu J., Ho J., Yu C. The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells // BMC Complem. Altern. M. 2015. 15:65.
- Shi L.S., Wu C.H., Yang T.C., Yao C.W., Lin H.C., Chang W.L. Cytotoxic effect of triterpenoids from the root bark of *Hibiscus syriacus* // Fitoterapia. 2014. Vol. 97. P. 184–191.
- Yoo I.D., Yun B.S., Lee I.K., Ryoo I.J., Choung D.H., Han K.H. Three naphthalenes from root bark of *Hibiscus syriacus* // Phytochemistry. 1998. Vol. 47. N 5. P. 799–802.
- Yun B.S., Ryoo I.J., Lee I.K., Park K.H., Choung D.H., Han K.H., Yoo I.D. Two bioactive pentacyclic triterpene esters from the root bark of *Hibiscus syriacus* // J. Nat. Prod. 1999. Vol. 62. N 5. P. 764–766.
- Lee S.J., Yun Y.S., Lee I.K., Ryoo I.J., Yun B.S., Yoo I.D. An antioxidant lignan and other constituents from the root bark of *Hibiscus syriacus* // Planta Med. 1999. Vol. 65. N 7. P. 658–660.
- Yun B.S., Lee I.K., Ryoo I.J., Yoo I.D. Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus* // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64. N 9. P. 1238–1240.
- Kwon S.W., Hong S.S., Kim J.I., Ahn I.H. Antioxidant properties of heat-treated *Hibiscus syriacus* // Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 2003. Vol. 30. N 1. P. 15–16.
- Kwon S., Kwon H.J., Kim K.S. Calcium extends flower life in *Hibiscus syriacus* L. // Hort. Environ. Biotechnol. 2010. Vol. 51. N 4. P. 275–283.
- Venkatesh S., Thilagavathi J., Shyam Sundar D. Anti-diabetic activity of flowers of *Hibiscus rosa sinensis* // Fitoterapia. 2008. Vol. 79. P. 79–81.
- Kim K.D., Lee E.J. Potential tree species for use in the restoration of unsanitary landfills // Environ. Management. 2005. Vol. 36. N 1. P. 1–14.
- Paredes M., Quiles M.J. The effects of cold stress on photosynthesis in *Hibiscus* plants // PLoS ONE. 2015. Vol. 10. N 9. e0137472.
- Egilla J.N., Davies F.T., Boutton T.W. Drought stress influences leaf water content, photosynthesis, and water-use efficiency of *Hibiscus rosa-sinensis* at three potassium concentrations // Photosynthetica. 2005. Vol. 43. N 1. P. 135–140.
- Киселева Г.К., Ненько Н.И., Тыщенко Е.Л. Оценка засухоустойчивости интродуцированных сортов гибискуса сирийского в Краснодарском крае // Плод. виногр. юга России. 2012. № 15(3). С. 124–130.
- Тыщенко Е.Л., Киселева Г.К., Тимкина Ю.В. Анатомо-морфологические особенности строения листовой пластинки *Hibiscus syriacus* L., в связи с приспособительной реакцией сортов к природно-климатическим

условиям юга России // Вест. ВГУ. Сер.: Геогр. Геоэкол. 2011. № 2. С. 67–69.

15. Семихатова О.А., Чиркова Т.В. Физиология дыхания растений. Учеб. пособие. СПб.: СПбГУ, 2001. 220 с.

16. Markesteijn L., Lourens P., Frans B. Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species // Am. J. Bot. 2007. Vol. 94. N 4. P. 515–525.

17. Rohacek K., Bartak M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications // Photosynthetica. 1999. Vol. 37. N 3. P. 339–363.

18. Грязнов В.П., Сиротина Л.В. Практикум по физиологии растений. Белгород: Бел.ГУ, 2000. 68 с.

19. Васфилов С.П. Анализ причин изменчивости отношения сухой массы листа к его площади у растений // Ж. общ. биол. 2011. Т. 72. № 6. С. 436–454.

20. Azizov A., Tauschke M., Lentzsch P. et al. Verfahren zur Bewertung der Vitalität chlorophylltragender biologischer Proben. Deutsches Patentamt. DE 112006000480. IPC: G01N 33/483. INNO-Concept GmbH, Strausberg, DE. Anmeldung 06.03.2006. Veröffentlichung 30.04.2015.

21. Valladares F., Wright J.S., Lasso E., Kitajima K., Pearcy R. W. Plastic phenotypic responses to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest // Ecology. 2000. Vol. 81. N 7. P. 1925–1936.

22. Горышина Т.К. Фотосинтетический аппарат растений и условия среды. Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1989. 204 с.

23. Sun X., Wen T. Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses // J. Biosci. 2011. Vol. 36. N 5. P. 951–956.

24. Lichtenthaler H.K. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance // Photosynth. Res. 2007. Vol. 92. N 2. P. 163–179.

25. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis // Photosynth. Res. 2008. Vol. 98. N 1–3. P. 541–550.

Поступила в редакцию  
06.03.2018

Принята к печати  
29.05.2018

## PLANT PHYSIOLOGY

### ECOLOGICAL PLASTICITY OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF *HIBISCUS SYRIACUS* L. UNDER PRESSURE OF HIGH TEMPERATURE, INSOLATION AND AIR POLLUTION

N.G. Akinshina<sup>1,\*</sup>, A.A. Azizov<sup>1</sup>, N.I. Shtonda<sup>2</sup>, A.I. Khalmurzayeva<sup>2</sup>, N.Sh. Rakhmatullina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mirzo Ulugbek National University of Uzbekistan, Uzbekistan, 100174, Tashkent, University street 4;

<sup>2</sup>Academician F.N. Rusanov Tashkent Botanical Garden of AS of RUz, Uzbekistan, 100125, Tashkent, Bogishamol street 232

\*e-mail: n.akinshina@yahoo.com

Integrated effect of high temperature, insolation and anthropogenic pollution on pigment content, net oxygen production and dark respiration rates of *Hibiscus syriacus* L. is described in the paper. There were three observation sites under the study: Tashkent Botanical Garden, public garden in central part of Tashkent city and mountain holiday camp. High adaptive potential of *H. syriacus* L. was revealed; it is recognized as well adapted to environmental stress factors of arid and semiarid zone under good irrigation. Ecological plasticity of photosynthetic apparatus of hibiscus plays key role in the adaptation. It was revealed, that plants under the shade (in Tashkent Botanical Garden) had long, wide and thin leaves, recognized as manifestation of sciomorphosis. Helimorphosis features of hibiscus' leaves were identified in mountains under the high solar irradiation; there were thickened and compacted leaves of small sizes. Such leaf structure modifications have adaptive significance – it is for strengthening of photosynthetic capacity to compensate deficiency in sun light (in case of sciomorphosis); and on the contrary, – it is for shading of sensitive to redundant solar radiation photosynthetic elements to protect from oxidative damages (in case of helimorphosis). Thus, the plant needs in carbon dioxide assimilation and organic matter production for maintenance of constant energy balance under different stress environment are provided. It was revealed that unfavorable (extreme) environment improved the resistance of dark respiration and net production of oxygen to temperature injuries (the worse environment, the higher plant resistance to temperature injuries). Besides, the higher resistance was detected for mature age leaves of *H. syriacus* in comparison with young ones. Thus, plants adapt to probable temperature drops gradually during their ontogenesis. Net oxygen production rate of *H. syriacus* (measured at optimal conditions – +27°C and 635–650 nm) was of the same level in different sites under the study during all the time of active vegetation; it was about  $0,20 \pm 0,05 \mu\text{mol O}_2/(\text{dm}^2 \cdot \text{s})$ . It is considered as norm of reaction of net production (visible photosynthesis) rate of *H. syriacus* and as specific feature of its photosynthetic apparatus.

**Keywords:** *Hibiscus syriacus* L., pigments, net oxygen production, dark respiration, ecological plasticity, high temperature, insolation

**Сведения об авторах**

*Акиншина Наталья Геннадиевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела прикладной экологии и устойчивого развития Национального университета Узбекистана. Тел: +998-909325298; e-mail: n.akinshina@yahoo.com

*Азизов Азамат Атакузиевич* – канд. хим. наук, руководитель отдела прикладной экологии и устойчивого развития Национального университета Узбекистана. Тел: +998-935702752; e-mail: azazizov@rambler.ru

*Штонда Нина Ивановна* – канд. биол. наук, научный консультант Ташкентского ботанического сада имени академика Ф.Н. Русанова Академии наук Республики Узбекистан. Тел: +998-909708536; e-mail: botanikabogi@exat.uz

*Халмурзаева Атыргуль Исаковна* – науч. сотр. Ташкентского ботанического сада имени академика Ф.Н. Русанова Академии наук Республики Узбекистан. Тел: +998-905380655; e-mail: botanikabogi@exat.uz

*Рахматуллина Нигина Шамильевна* – мл. науч. сотр. отдела прикладной экологии и устойчивого развития Национального университета Узбекистана. Тел: +998-909618837; e-mail: rakhmatullina.nigina@mail.ru

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 57.053

ВЛИЯНИЕ УДАЛЕНИЯ КОРНЕЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНИНОВ  
В КЛЕТКАХ АПЕКСА ПОБЕГА АРАБИДОПСИСАГ.Р. Ахиярова<sup>1,\*</sup>, А.В. Коробова<sup>1</sup>, С.Ю. Веселов<sup>2</sup>, Г.Р. Кудоярова<sup>1</sup>, Д.С. Веселов<sup>1</sup><sup>1</sup>Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 69;<sup>2</sup>кафедра биохимии и биотехнологии, биологический факультет, Башкирский государственный университет, Россия, 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32

\*e-mail: akhiyarova@rambler.ru

Изучено влияние удаления корней на содержание цитокининов в апексах побегов растений арабидопсиса. Для оценки уровня гормонов в клетках применяли метод иммуногистохимической локализации с использованием антител против рибозидов зеатина. Для предотвращения вымывания цитокининов из клеток в процессе дегидратации применяли дифференциальный метод конъюгирования свободных пуриновых оснований и их рибозидов. Показано, что удаление корней снижает иммунное окрашивание на зеатин клеток апикальной меристемы побега. Выявлено снижение уровня зеатина в клетках апекса побега под влиянием протонофора, что указывает на роль процесса вторично-активного трансмембранного переноса цитокининов в поддержании их уровня в клетках апекса побега.

**Ключевые слова:** арабидопсис, зеатин, зеатин-рибозид, изопентениладенин, апекс побега, транспорт *It* из корней, иммуногистохимическая локализация

Обнаружение фитогормонов в ксилемном соке растений послужило стимулом для формулировки важной концепции, предполагающей их роль в передаче сигналов из корней в побеги (см. ссылки обзора Кудояровой и соавт. [1]). Проф. О.Н. Кулаева первая показала присутствие в ксилемном соке цитокининподобных соединений, способных задерживать старение листьев [2], что привлекло внимание исследователей к изучению роли цитокининов как корневых сигналов. Было показано изменение концентрации цитокининов в ксилемном соке под влиянием засухи [3] или повышении концентрации нитратов [4], а также при многих других воздействиях [1, 5], что сопровождалось изменением как скорости роста побега и старения листьев, так и транспирации и экспрессии генов цитокининового ответа в листьях. Эти результаты подтверждали значение корневых цитокининов как сигналов, регулирующих функциональную активность побега. Вместе с тем роль цитокининов, синтезируемых в корнях растений, стала предметом дискуссий после того, как экспрессия *IPT*-генов, контролирующей синтез цитокининов, была выявлена не только в корнях, но и в побегах растений [6]. Было высказано предположение о так называемом “паракринном”, т.е. локальном действии цитокининов только в месте их синтеза [7]. Однако этому предположению противоречили данные о пониженном содержании цитокининов в семядольных листьях и соцветиях и их накоплении в корнях растений мутанта по переносчику цитокининов [8]. Поскольку растения мутанта отличались нарушениями функций побега, эти результаты подтверждали функциональную

роль притока цитокининов из корней. Необходимо отметить, что в работах, посвященных роли корневых цитокининов в регуляции функций побега, недостаточно внимания уделялось его апексу. Между тем, важная роль цитокининов в поддержании деления апикальной меристемы побега хорошо известна [9]. Пробелы в сведениях на этот счет, скорее всего, связаны с техническими сложностями определения гормонов в таких мелких структурах, как апикальная меристема побега. В данной работе мы использовали метод иммуногистохимической локализации цитокининов с использованием антител к рибозидам зеатина и изопентениладенозина (ИПА), который хорошо зарекомендовал себя при изучении апикальной меристемы побега [10, 11]. Этот подход обладает преимуществом по сравнению с методом выявления цитокининов с помощью биосенсоров цитокининов, основанном на использовании трансгенных растений, у которых репортерный ген находится под контролем чувствительного к цитокинину промотора. Это преимущество заключается в том, что иммуногистохимическая локализация позволяет оценить относительный уровень гормонов в тканях независимо от чувствительности клеток к цитокинину, от которой зависит их выявление с помощью биосенсоров [12]. В цитируемой работе приведен пример повышения уровня цитокининов при охлаждении растений, выявленного с помощью биосенсора, в то время как содержание цитокининов по результатам их количественной оценки не менялось. Кроме того, разработанная нами модификация опыта позволяла отдельно выявлять на срезах свободные и рибозилированные

формы цитокининов за счет их специфичной фиксации, в то время как при использовании метода биосенсоров репортерные конструкции выявляют преимущественно активные формы цитокининов.

Для оценки вклада переносчиков цитокининов в их накопление в клетках апексов побега был использован протонифор карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразона [13], подавляющий функции переносчиков за счет разрушения градиента водорода, являющегося источником энергии для вторично-активного трансмембранного переноса.

### Материалы и методы

Выращивание растений. Семена растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) экотипа Columbia (Col) проращивали на влажной бумаге в чашках Петри после стратификации в течение 3 сут при 4°C. Затем семена переносили на поверхность песка, находящегося в контейнерах объемом 100 мл и насыщенного питательным раствором Хогланда-Арнона, после чего выращивали в климатической камере (MLR-350H, Sanyo, Япония) при 23°C/19°C (день/ночь), 80%-ной влажности воздуха, освещенности 120 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> фотосинтетически активной радиации и 16-часовом фотопериоде, как описано ранее [14]. Растения получали дистиллированную воду для компенсации транспирационных потерь, которые измеряли, взвешивая контейнеры; влажность песка поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости. В экспериментах с удалением корней растения выращивали в контейнерах с песком в течение 10 сут. Затем их аккуратно переносили в лунки полистироловых планшетов, в дне которых были просверлены отверстия, и микропланшеты помещали в пятилитровые контейнеры, в которых планшеты плавали на поверхности разведенного в десять раз раствора Хогланда-Арнона. Через 2 сут у части растений корни аккуратно отрезали лезвием бритвы, после чего побеги снова опускали в лунки планшета, плавающего на поверхности питательного раствора. Фиксацию побегов для иммунолокализации цитокининов в апексах производили через 2 ч после удаления корней.

В другой серии экспериментов для подавления вторично-активного транспорта побеги 12-суточных растений, выращенных в контейнерах с песком, опрыскивали раствором протонифора карбонилцианида *m*-хлорофенилгидразона в концентрации 10 мкМ. Последующую фиксацию побегов растений арабидопсиса для иммунолокализации цитокининов в апексах производили через 30 мин после опрыскивания растений.

Иммунолокализация цитокининов. Процедура, модифицированная по сравнению с описанной ранее [13], проводилась с помощью антител кролика против цитокининов —рибозида зеатина и ИПА. Сыворотки отличались высокой реактивностью по отношению к производным того азоти-

стого основания цитокинина, к рибозиду которого были получены антитела (соответствующему пуриновому основанию и его рибозиду), и низкой кроссреактивностью по отношению к производным азотистого основания другого цитокинина: сыворотка против рибозида зеатина имела высокую реактивность по отношению к транс-зеатину и низкую — к цис-зеатину и изопентениладенину (ИП) и ИПА, а сыворотка к ИПА — высокую реактивность к ИП и низкую — к зеатину и его рибозиду. Апексы побегов отделяли для отдельной иммунолокализации свободных оснований и их рибозилированных форм с помощью метода их дифференциальной конъюгации с белками тканей перед дегидратацией. Рибозилированные формы конъюгировали с помощью 20мМ периодата натрия, который активирует гидроксильные радикалы рибозы, обеспечивая связывание с белками. Поскольку после связывания рибозилированных цитокининов с помощью периодата натрия проводят постфиксацию тканей смесью альдегидов [15], в результате может происходить связывание не только рибозилированных, но и свободных азотистых оснований с белками. Для того чтобы избежать этого, была использована модифицированная методика [16], которая предотвращает конъюгирование свободных оснований с белками путем повышения pH раствора (до 9,6) во время фиксации тканей листа смесью альдегидов. Детали процедуры заключались в следующем. Для связывания рибозилированных цитокининов с белками растений апексы побегов обрабатывали периодатом натрия и затем фиксировали смесью 4%-ного параформальдегида и 0,1%-ного глутарового альдегида в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,6). Пуриновые остатки свободных цитокининов конъюгировали с белками смесью 4%-ного параформальдегида и 0,1%-ного глутарового альдегида в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,2). Рибозилированные цитокинины при таком способе фиксации (без предварительной обработки периодатом натрия) не связываются с белками [15].

Вслед за фиксацией смесью альдегидов апексы побега дегидратировали в серии разведений этанола (до 96 %). Ткани затем заключали в смолу (JB-4, Electron Microscopy Sciences, США), как рекомендуется производителем. Гистологические срезы (1,5 мкм толщиной) готовили с помощью ротационного микротомы (HM 325, MICROM Laborgeräte, Германия) и помещали на предметные стекла, как описано ранее [13]. Вкратце, срезы инкубировали в течение 30 мин в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем желатин и Твин 20 (ФЖТ), и затем в течение 2 ч во влажной камере при комнатной температуре с сывороткой против рибозида зеатина или ИПА (по 20 мкл на каждый срез в разведении сыворотки 1:80). Проверку специфичности иммунного окрашивания срезов проводили с помощью неиммунной сыворотки в тех же разведениях. Для выявления антител, связанных со свободными основаниями или рибозидами (в зависимости от

способа фиксации), срезы обрабатывали вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, меченных коллоидным золотом (1:40 в ФЖТ, Aurion, США). Затем проводили постфиксацию срезов 2%-ным раствором глутарового альдегида и инкубирование с препаратом серебра в соответствии с рекомендациями производителя (R-Gent SE-EM Silver Enhancement Reagent, Aurion, США) в течение 30 мин. Избыток ионов серебра удаляли, промывая стекла дистиллированной водой, и изучали срезы с помощью светового микроскопа Axio Imager.A1 (Carl Zeiss Jena, Германия), снабженного цифровой камерой (AxioCam MRc5, Carl Zeiss Jena, Германия).

### Результаты и обсуждение

Иммуноокрашивание срезов апексов побега растений арабидопсиса на цитокинины с помощью специфических сывороток, имеющих сродство к производным зеатина и ИПА (свободным основаниям и их конъюгатам), выявило присутствие производ-

ных обеих форм цитокининов в клетках апикальной меристемы побега и листовых примордиев (рис. 1). Окрашивание было несколько более интенсивным в случае срезов, фиксированных смесью альдегидов. Этот вариант фиксации обеспечивал конъюгацию и последующее выявление свободных оснований, но не рибозилированных форм цитокининов. Используемые в данной работе антитела были получены к конъюгату белка с рибозидами цитокининов. Однако благодаря специфичности фиксации свободных оснований цитокининов смесью альдегидов (без предобработки периодатом натрия) [15], не происходила конъюгация рибозилированных форм, и они вымывались из тканей в процессе дегидратации. Поэтому при этом варианте фиксации иммуногистохимическая локализация выявляла именно свободные формы цитокининов.

Наши данные соответствуют сведениям, полученным с помощью биосенсоров цитокининов. В этих опытах в апикальной меристеме, листовых примордиях и сосудах побегов также была зареги-

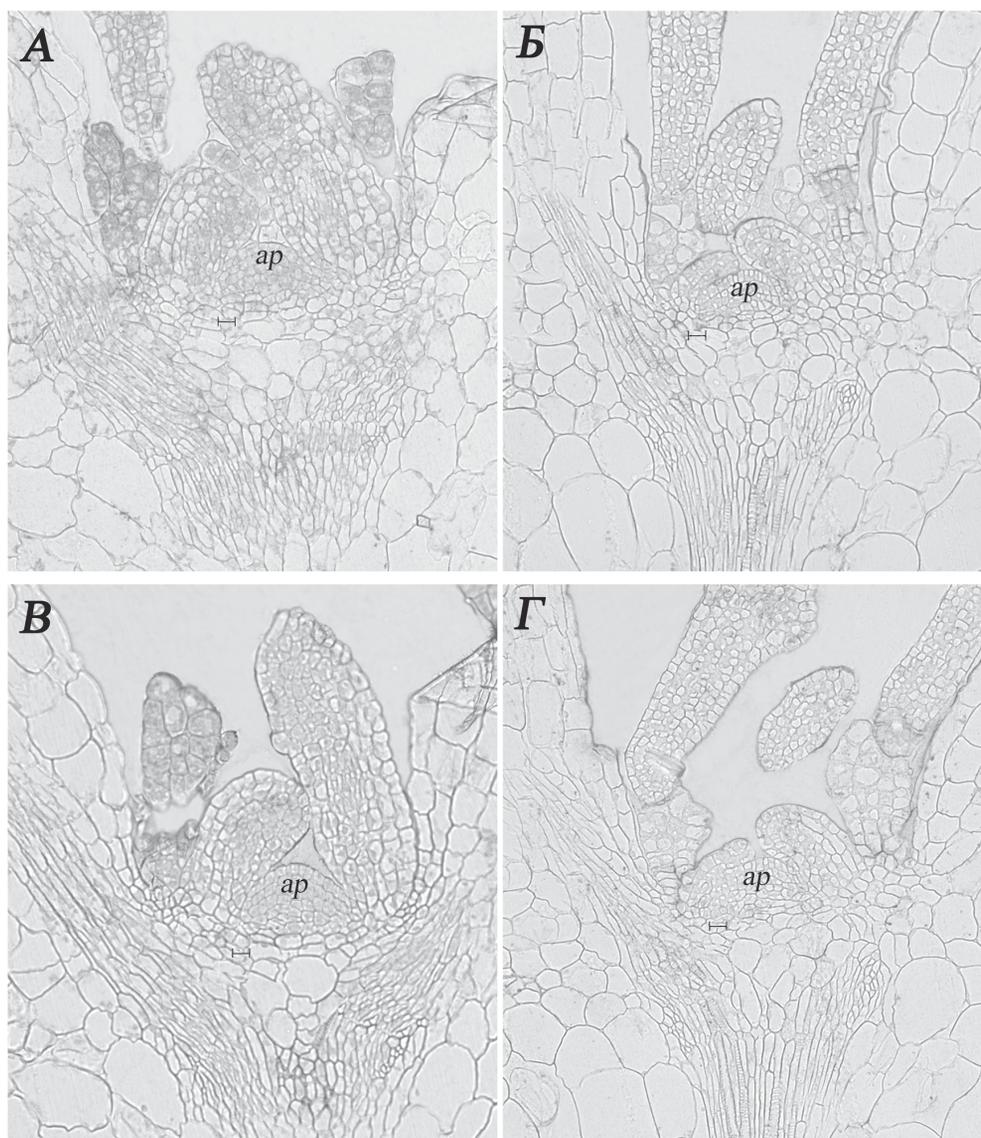
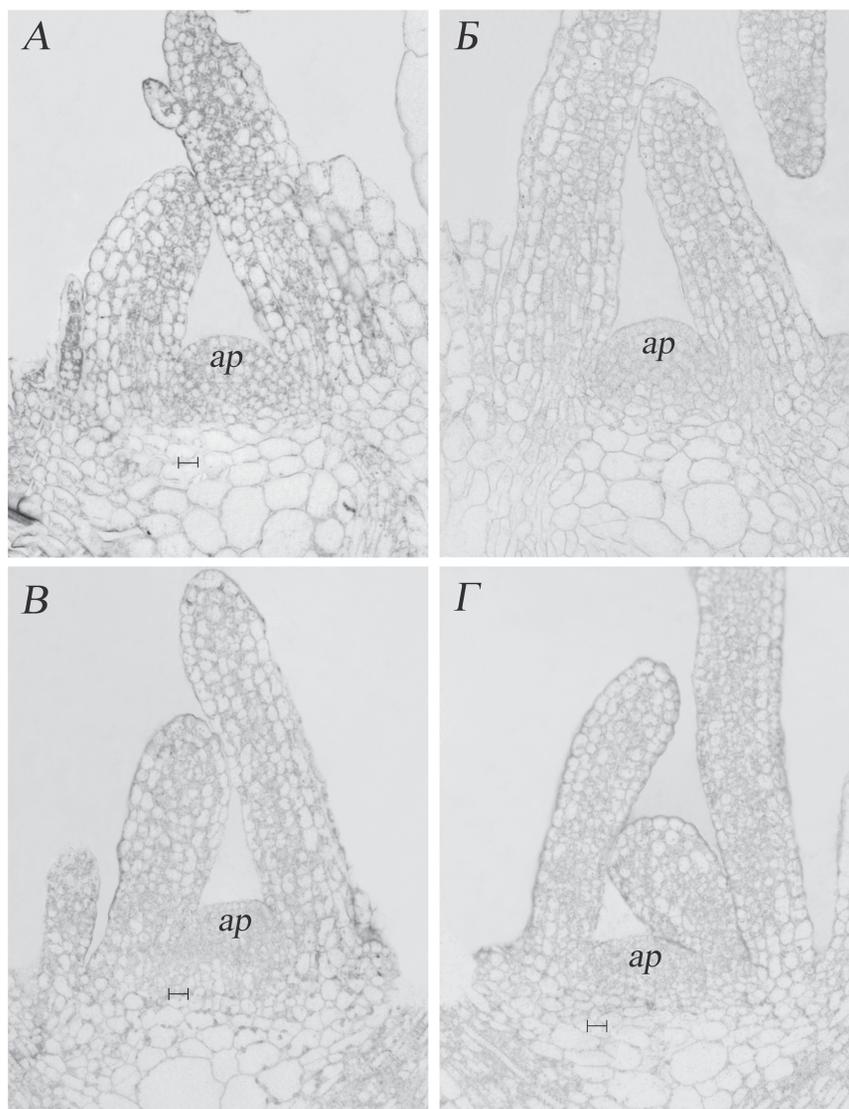
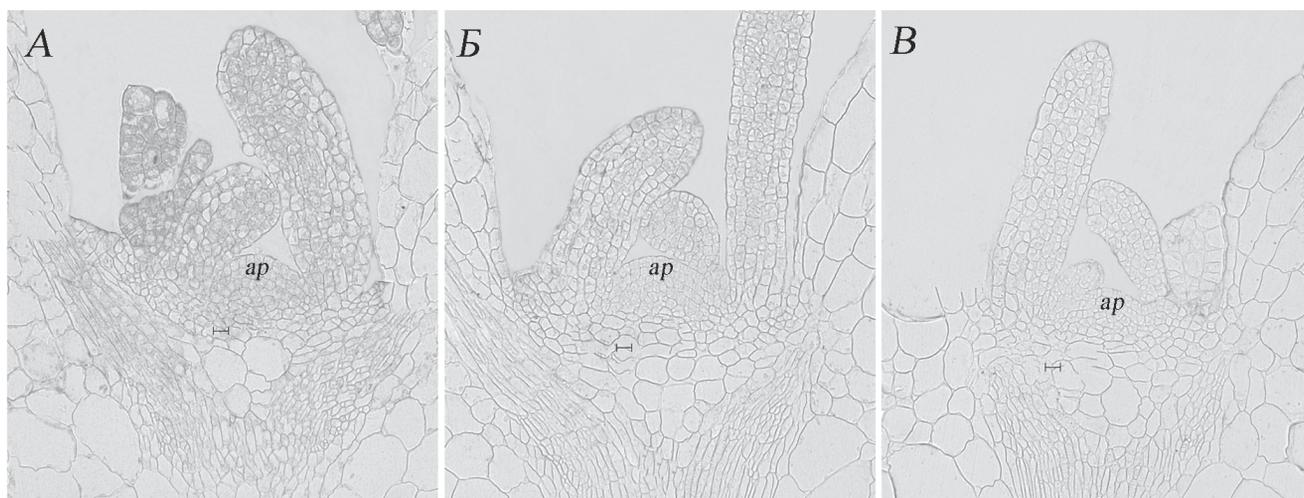


Рис. 1. Иммуногистохимическая локализация зеатина (А), рибозида зеатина (Б), изопентениладенина (В) и изопентениладенозина (Г) в клетках апексов побега растений арабидопсиса. *ap* – апекс. Линейка 10 мкм



**Рис. 2.** Иммуногистохимическая локализация цитокининов (А, Б – зеатина, В, Г – рибозида зеатина) в клетках апексов побегов растений арабидопсиса в контроле и через 2 ч после удаления корней: А, В – контрольные (интактные) растения, Б, Г – растения с удаленными корнями. **ap** – апекс. Линейка 10 мкм



**Рис. 3.** Влияние обработки протонифором (карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразона) на иммуногистохимическую локализацию цитокининов (зеатина) в клетках апексов растений арабидопсиса с помощью сыворотки к рибозиду зеатина: А – контрольное (интактное) растение, Б – через 30 мин после обработки протонифором, В – срез, обработанный неиммунной сывороткой, не содержащей антитела к исследуемым гормонам. **ap** – апекс. Линейка 10 мкм

стрирована повышенная экспрессия GUS-гена, находящегося под контролем чувствительного к цитокинам промотора гена *ARR5* [17]. Вместе с тем преимущество иммуногистохимической локализации заключается в возможности раздельного выявления как свободных, так и рибозилированных форм цитокининов (за счет специфичной для этих форм цитокининов фиксации), а также дифференциального окрашивания на зеатин и изопентениладенин (за счет специфичности антител).

Поскольку наша задача состояла в проверке возможной зависимости накопления цитокининов в апексах побегов от их притока из корней, дальнейшие исследования проводились с помощью антител к рибозиду зеатина (известно, что цитокинины поступают из корней в форме производных зеатина [18]). Из рис. 2А и 2Б видно, что через 2 ч после удаления корней снижалась интенсивность окрашивания срезов, фиксированных с помощью альдегидов. Эти результаты можно интерпретировать как свидетельство зависимости уровня цитокининов в апексе побега растений арабидопсиса от притока цитокининов из корней. Вместе с тем ослабления окрашивания не было зарегистрировано на срезах тканей, фиксированных с помощью периодата натрия (рис. 2В и 2Г). Отсутствие изменений уровня рибозилированных форм цитокининов в клетках апекса побега при удалении корней противоречит предположению о роли транспорта цитокининов из корней в регуляции их уровня в апексе, поскольку именно рибозидам цитокининов приписывается транспортная функция [18]. Альтернативное объяснение могло заключаться в том, что отсутствие корней сказалось на способности самих побегов синтезировать цитокинины (например, за счет уменьшения притока из корней азотсодержащих соединений). Необходимы дальнейшие эксперименты для однозначной интерпретации результатов (например, оценка влияния удаления корней на содержание в апексах ИП и ИПА).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // *J. Exp. Bot.* 2015. Vol. 66. N 8. P. 2133–2144.
2. Кулаева О.Н. Влияние корней на обмен веществ листьев в связи с проблемой действия на лист кинетина // *Физиол. раст.* 1962. Т. 9. № 2. С. 229–239.
3. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Cherkozyanova A., Dodd I.C. Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves // *J. Exp. Bot.* 2007. Vol. 58. N 2. P. 161–168.
4. Sakakibara H., Takei K., Hirose N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development // *Trends Plant Sci.* 2006. Vol. 11. N 9. P. 440–448.
5. Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V. Role of cytokinins in stress resistance of plants // *Russ. J. Plant Physl.* 2017. Vol. 64. N 1. P. 15–27.
6. Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate // *Plant J.* 2004. Vol. 37. N 1. P. 128–138.
7. Faiss M., Zalubilová J., Strnad M., Schmillling T. Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants // *Plant J.* 1997. Vol. 12. N 2. P.401–415.
8. Zhang K., Novak O., Wei Z., Gou M., Zhang X., Yu Y., Yang H., Cai Y., Strnad M., Liu C.J. Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5:3274.
9. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmillling T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // *Plant Cell.* 2003. Vol. 15. N 11. P. 2532–2550.
10. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D. Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of

Ранее нами было показано, что поглощение экзогенных цитокининов клетками корней зависит от вторично-активного транспорта [13]. Для того чтобы проверить, зависит ли накопление цитокининов в апексе побега от их активного поглощения клетками, мы обработали побеги интактных растений протонифором карбонилцианидом *m*-хлорофенилгидразона. Эта обработка приводила к нарушению формирования на клеточной мембране градиента протонов, который является источником энергии для вторично-активного переноса через мембраны соединений (в том числе свободных оснований [13]). Как видно из рис. 3А и 3Б, обработка протонифором резко снижала иммунное окрашивание на зеатин клеток апикальной меристемы, фиксированных с помощью смеси альдегидов. Отсутствие окрашивания на рис. 3В в случае использования неиммунной сыворотки подтверждает специфичность метода. Эти результаты свидетельствуют о зависимости накопления цитокининов от активного поглощения гормона клетками и соответствуют данным, полученным при удалении корней.

Недавние исследования показали роль переносчиков пуриновых оснований из семейства PUP, способных переносить свободные основания цитокининов, тем самым участвуя в регуляции их накопления в клетках апексов побега [19]. Поскольку было показано, что активность этих транспортеров ингибирует протонифор карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразона [20], эти данные литературы соответствуют полученным нами результатам.

Таким образом, проведенные нами эксперименты с использованием метода иммуногистохимической локализации выявили высокий уровень цитокининов в апексах побегов и зависимость накопления свободного зеатина от присутствия корней и процесса вторично-активного трансмембранного переноса цитокининов.

cytokinins and auxins in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 2016. Vol. 52. N 3. 251–264.

11. Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition // *J. Exp. Bot.* Vol. 54. N 392. P. 2511–2517.

12. Jeon J., Kim N.Y., Kim S., Kang N.Y., Novak O., Ku S.J., Cho C., Lee D.J., Lee E.J., Strnad M., Kim J. A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. N 30. P. 23371–23386.

13. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65. N 9. P. 2287–2294.

14. Korobova A.V., Vysotskaya L.B., Vasinskaya A.N., Kuluev B.R., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Dependence of root biomass accumulation on the content and metabolism of cytokinins in ethylene-insensitive plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. Vol. 63. N 5. P. 536–543.

15. Dewitte W., Chiappetta A., Azmi A., Witters E., Strnad M., Rembur J., Noin M., Chriqui D., Van Onckelen H. Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-

neutral tobacco during floral transition and flower formation // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. N 1. P. 111–122.

16. Веселов С.Ю., Вальке П. Раздельное гистохимическое определение гликозилированных форм цитокининов и их свободных оснований у растений табака // Иммуноанализ регуляторов роста в решение проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии / Под ред. В.А. Вахитова. Уфа: Изд-во АН РБ, 2000. С. 6–11.

17. Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E., Ullrich C.I. Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream // *J. Exp. Bot.* 2005. Vol. 56. N 416. P.1535–1544.

18. Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59. N 1. P. 75–83.

19. Zürcher E., Liu J., di Donato M., Geisler M., Müller B. Plant development regulated by cytokinin sinks // *Science*. 2016. Vol. 353. N 6303. P. 1027–1030.

20. Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W.B. Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures // *Plant Physiol.* Vol. 148. N 4. P. 1857–1867.

Поступила в редакцию  
07.03.2018

Принята к печати  
05.06.2018

## PLANT PHYSIOLOGY

### EFFECTS OF ROOT CUTTING ON CYTOKININ CONTENT IN THE CELLS OF SHOOT APIX OF ARABIDOPSIS PLANTS

G.R. Akhiyarova<sup>1,\*</sup>, A.V. Korobova<sup>1</sup>, S.Yu. Veselov<sup>2</sup>, G.R. Kudoyarova<sup>1</sup>, D.S. Veselov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ufa Institute of Biology, RAS, pr. Octyabrya 69, Ufa, 450054, Russia;*

<sup>2</sup>*Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Biology, Bashkir State University, Russia, Zaki Valedi str. 32, Ufa, 450076, Russia*

\*e-mail: akhiyarova@rambler.ru

We studied the dependence of cytokinins accumulation in the shoot apices of *Arabidopsis* plants on the delivery of these hormones from the roots. For the estimation of cytokinins content in the cells the method of immunohistochemical localization was used using antibodies against zeatin riboside. To prevent washing of cytokinins during the process of dehydration we used the method of differential conjugation of free cytokinins bases and their ribosides. Root cutting has been shown to weaken the immunostaining of zeatin in the cells of the shoot apical meristem thereby supporting the hypothesis about dependence of cytokinins accumulation in these cells on the hormone delivery from the roots. We detected a decline in the level of cytokinins in the cells of the shoot apex as affected by protonophor indicating important role of the process of secondary active transport through the cell membrane for the maintenance of cytokinins level in the cells of the shoot apex.

**Keywords:** *Arabidopsis, zeatin, zeatin riboside, isopenteniladenin, shoots apex, transport from the roots, immunohistochemical localization*

#### Сведения об авторах

Ахиярова Гузель Рифовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: akhiyarova@rambler.ru

*Коробова Алла Владимировна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: muksin@mail.ru

*Веселов Станислав Юрьевич* – докт. биол. наук, проф. кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета Башкирского государственного университета. Тел.: 8-347-272-46-33; e-mail: respectableman@yandex.ru

*Кудоярова Гюзель Радмесовна* – докт. биол. наук, зав. лабораторией физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: guzel@anrb.ru

*Веселов Дмитрий Станиславович* – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: veselov@anrb.ru

## ЭКОЛОГИЯ

УДК 574.91

**О РАСПРОСТРАНЕНИИ *PLEUROZIUM SCHREBERI* (BRYOPHYTA, HYLOCOMIACEAE) НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ РАВНИНЫ И ВОСТОЧНОЙ ФЕННОСКАНДИИ****С.Ю. Попов**

*Кафедра общей экологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
e-mail: sergei.popov.2015@yandex.ru*

*Pleurozium schreberi* является одним из наиболее распространенных видов мхов на территории лесной зоны. Он доминирует в моховом ярусе в лесах черничного и кисличного типов. В небольших количествах может встречаться практически во всех типах леса, даже на болотах. Также он является типичным компонентом мохового яруса и в тундрах. В статье рассматривается распространение *Pleurozium schreberi* на территории Восточно-Европейской равнины и Восточной Фенноскандии. На основе литературных источников о встречаемости вида в различных регионах, по точечным данным, была создана модельная карта распространения вида с использованием метода кригинга. Наложение модельной карты на карты пространственного распространения на этой территории климатических показателей и растительных зон, были выяснены биогеографические предпочтения вида. *P. schreberi* характеризуется наибольшим распространением в лесной зоне. Здесь его встречаемость высока, он является фитоценотически активным видом. При переходе от лесной зоны к зоне степей, встречаемость *Pleurozium schreberi* резко падает. Здесь он уже является достаточно редким видом, произрастая исключительно в сосновых и березовых колках. В открытой степи этот вид пропадает. Начиная со степной зоны и далее к югу, встречаемость *Pleurozium schreberi* уменьшается постепенно, по мере увеличения летних температур и уменьшения осадков, а также исчезновения лесов. На севере же, где вид высоко активен, его ареал резко обрывается на побережье Северного Ледовитого океана. Такое распространение *Pleurozium schreberi* связано как с ценотическими предпочтениями, так и обусловлено климатически — он изреживается в регионах с летними температурами выше +23°C и количеством осадков менее 400 мм в год.

**Ключевые слова:** *Pleurozium schreberi*, Восточно-Европейская равнина, BIOCLIM, кригинг, биогеография, встречаемость вида, модельные карты

Современный этап развития бриологии характеризуется хорошей изученностью бриофлор различных регионов. Проведившиеся примерно с конца XX в. разными авторами исследования флористические исследования позволили осуществить практически полную инвентаризацию флоры мохообразных такой обширной территории как Восточно-Европейская равнина и Восточная Фенноскандия. Поэтому на современном этапе развития науки крайне актуальной является задача обобщения материалов, полученных в ходе инвентаризации, ее визуализация на картах и установление биогеографических закономерностей распространения видов и видового разнообразия. В качестве объекта исследований в настоящей работе выбран *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt.

*P. schreberi* широко распространен в умеренной зоне Северной Евразии [1]. Особенности его биологии и жизненного цикла хорошо известны. Это двудомный вид с плеврокарпными многолетними стеблями. Вегетативный рост его продолжается весь вегетационный период. Для успешного произрас-

тания *P. schreberi* нуждается в периодическом увлажнении и не требует высоких температур [2, 3]. Экология этого вида также хорошо известна. Он является доминантом мохового яруса в сосновых и еловых лесах зеленомошной группы типов леса в таежной зоне [4]. Типичными местообитаниями *P. schreberi* являются ельники и сосняки черничные, кисличные и брусничные [4, 5], но он также широко распространен и в заболоченных лесах — ельниках и сосняках сфагновых, а также в березняках черничных [5, 6]. В березняках неморально-травных и широколиственных лесах *P. schreberi* отсутствует или очень редок [7, 8]. Однако на песчаных почвах в сосняках в зоне широколиственных лесов (Полесье) данный вид произрастает довольно часто [9]. В степной зоне этот вид встречается только в сосновых посадках, на почве. На севере в тундровой зоне является активным компонентом мохово-кустарничковых тундр.

Несмотря на наличие многочисленных работ по биологии и экологии *P. schreberi*, для этого вида еще ни разу не проводился ареалогический анализ.

Поэтому целью настоящей работы является моделирование ареала данного вида и изучение закономерностей его распространения в связи с пространственным изменением климатических факторов на территории Восточно-Европейской равнины и Восточной Фенноскандии (ВЕРВФ). Другими словами, настоящая работа призвана восполнить пробел в биогеографии *P. schreberi*.

### Материалы и методы

Теоретические основы методов составления ареалов широко известны и применяются в биогеографии уже давно. Они базируются на составлении контурных ареалов на основе точечных данных изучения локальных флор, зафиксированных в литературных источниках [10]. В настоящее время в связи с развитием компьютерных технологий и методов пространственного анализа, в разных областях науки внедряются методы геостатистики (например, в картографии цифровые модели рельефа строятся с применением именно этих методов). Наиболее мощным из методов геостатистики является метод кригинга [11, 12]. Этот метод позволяет не только моделировать контурные ареалы по точечным данным, но и воспроизводить на карте активность вида внутри границ ареала. Существенным преимуществом данного метода является также то, что он позволяет установить общее направление изменения значений в пространстве, учесть автокорреляцию и отсесть возможные шумы. На этой основе составляются статистически значимые непрерывные покрытия. Благодаря этому обеспечивается также и работа над ошибками в случае, если в какой-то точке вид был неправильно определен или неправильно оценено его обилие. Таким образом, методом кригинга возможно получить не только модельные ареалы в целом, но и посмотреть распределение количественных характеристик вида внутри границ ареала, таких как обилие или встречаемость. Наложение непрерывных покрытий со значениями обилия вида на покрытия со значениями климатических факторов позволяет проводить анализ распространения вида методами многомерной статистики.

Ранее нами уже было проанализировано распространение некоторых видов рода *Sphagnum*, с использованием метода кригинга [13]. Методика составления модельных карт ареалов видов мхов была адаптирована к целям биогеографии [14]. Для изучения распространения *P. schreberi* на территории ВЕРВФ нами были проанализированы литературные данные с аннотированными списками конкретных бриофлор разных регионов (Европейская часть РФ, Прибалтика, Украина, Белоруссия, Молдавия) (рис. 1). В аннотированных списках обычно указываются географические координаты района работ, его площадь, частота встречаемости видов. Все эти данные собирались нами в реляционную базу данных, созданную на основе MS ACCESS-2003. По географическим координатам

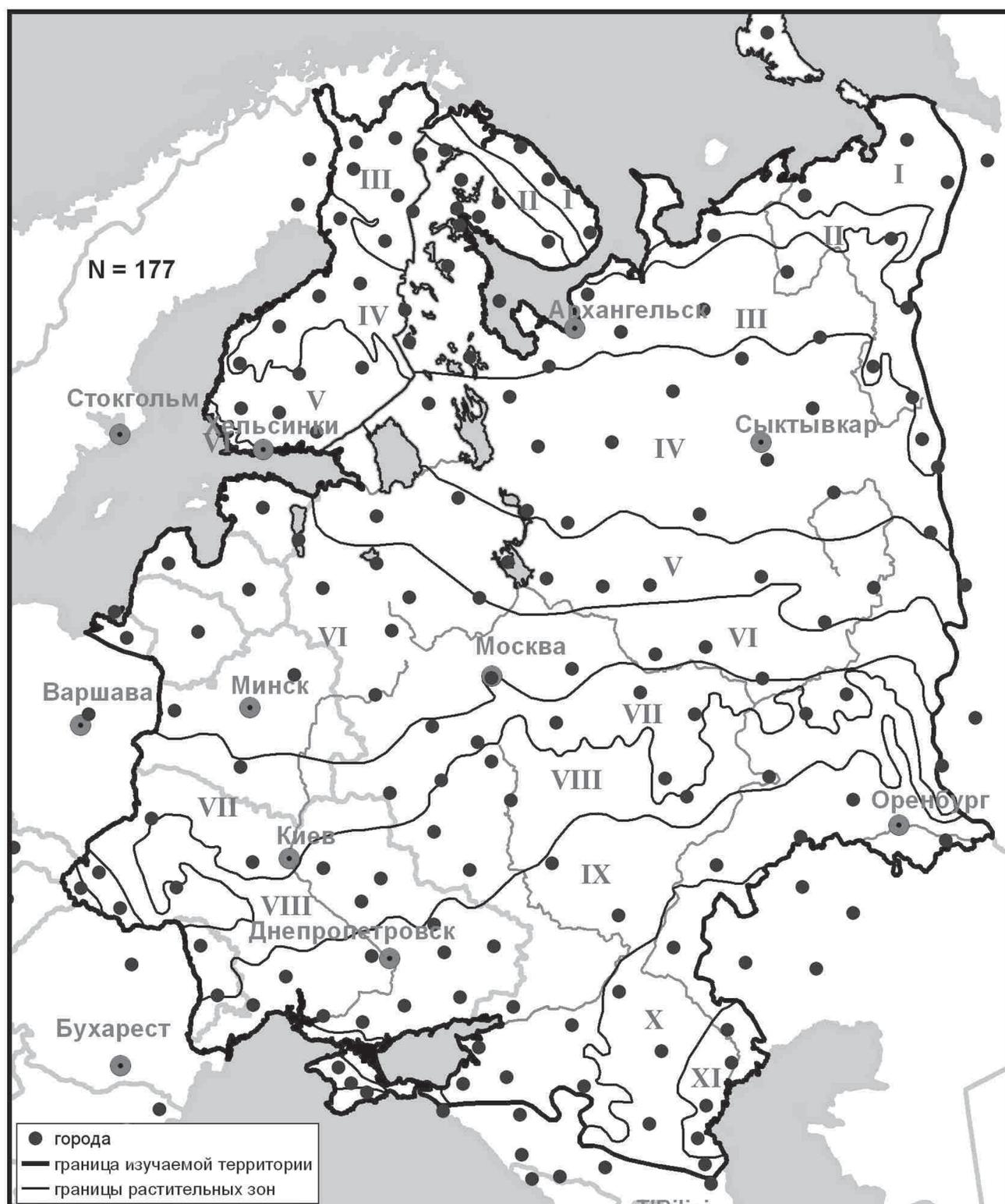
точки сбора мхов накладывались на карту. Встречаемость в списках разных авторов оценивается либо по числу гербарных образцов каждого вида, либо по числу находок, отмеченных автором сбора, либо по его общим впечатлениям. С учетом всего этого, встречаемость *P. schreberi* оценивалась нами по 6-балльной шкале: 0 – отсутствие вида; 1 – единично (1–2 находки), 2 – редко (3–7 находки), 3 – спорадически (более 7 находок, но не повсеместно), 4 – часто (обычный вид, но иногда отсутствующий в подходящих фитоценозах), 5 – очень часто (обычный и фитоценологически активный вид в районе работ). Баллы встречаемости представляют собой, таким образом, порядковую шкалу, которую можно анализировать с количественной точки зрения.

Для проведения анализа зависимости распространения видов от климатических факторов были выбраны переменные, рекомендуемые для решения задач распространения биологических объектов в рамках программ WORLDCLIM и BIOCLIM [15]. Всего в анализ включено 28 климатических переменных [14]. Для встречаемости *P. schreberi* и климатических переменных были построены непрерывные покрытия с использованием метода кригинга. Точность непрерывных покрытий, созданных методом кригинга оценивается методом кросс-валидации, а главным критерием такой оценки служит коэффициент детерминации ( $R^2$ ) [11, 12]. Для покрытия встречаемости *P. schreberi*, построенного на основе нерегулярной сети точек (рис. 1)  $R^2=0,978$ . Для покрытий климатический переменных его определять не требуется, поскольку они созданы на основе регулярной сети точек авторами программы BIOCLIM [14].

Все непрерывные покрытия были объединены в общую пространственную базу данных, из которой была получена реляционная таблица для проведения корреляционного анализа. Кроме того, проанализировано распространение вида по природным зонам, границы которых даются в настоящей статье по другим работам [16, 17] (рис. 1). Все операции с пространственными объектами выполнены в программах ARCGIS-10, SAGA GIS и ERDAS 2013, корреляционный и регрессионный анализы – в программе STATISTICA-10.

### Результаты и обсуждение

Результаты геостатистического моделирования представлены на рис. 2. Из рисунка видно, что *P. schreberi* является широко распространенным видом в тундре и лесной зоне. Начиная с зоны широколиственных лесов, его обилие начинает уменьшаться к югу (табл. 1). В южных степях Причерноморья и на границе с Казахстаном вид отсутствует. Также он практически отсутствует в полупустынной и пустынной зонах в Прикаспии. В Предкавказье и в Крыму он снова появляется, но с небольшим обилием, в горных лесах (рис. 2).



**Рис. 1.** Границы территории исследования, растительные зоны и точки изученных локальных бриофлор. Растительные зоны: I – тундра; II – лесотундра; III – северная тайга; IV – средняя тайга; V – южная тайга; VI – смешанные леса; VII – широколиственные леса; VIII – лесостепь; IX – степь; X – полупустыня; XI – пустыня (ссылки на опубликованные источники с аннотированными списками видов по каждой точке приводятся в работах Роров, 2016, Попов, 2017)

Площадь зоны наиболее широкого распространения *P. schreberi* составляет более половины (64,8%) общей площади ВЕРВФ (табл. 1). Сразу за пределами зоны широкого распространения, площади зон с меньшей встречаемостью резко сокращаются,

составляя от 4,3 до 8,5% от территории ВЕРВФ (табл. 2). В целом, площадь, на которой встречается *P. schreberi*, составляет 91,4% от общей площади ВЕРВФ (табл. 1), что позволяет считать этот вид широко распространенным на данной территории.

Таблица 1

Площади зон встречаемости по природным зонам для *P. schreberi*, км<sup>2</sup>

Растительные зоны	Зоны встречаемости						Всего по природным зонам, км <sup>2</sup>
	отсутствует	редко	очень редко	спорадически	часто	очень часто	
Тундра						191758,2	191758,2
Лесотундра						102091,9	102091,9
Северная тайга						550727,7	550727,7
Средняя тайга						748019,6	748019,6
Южная тайга				28,3	3461,1	536484,4	539973,8
Хвойно-широколиственные леса					13162,7	801161,6	814324,3
Широколиственные леса	180,1	2079,7	28658,4	36165,2	190211,4	259855,8	517150,5
Лесостепь		4479,2	143058,8	222548,2	129847,4	22769,4	522702,9
Степь	215723,9	164195,5	243342,0	82416,4	2905,0		708582,7
Полупустыня	157140,8	41701,0	5918,2				204760
Пустыня	54417,9	445,9					54863,8
<i>Всего по зонам встречаемости, км<sup>2</sup></i>	<i>427462,7</i>	<i>212901,3</i>	<i>420977,3</i>	<i>341158,1</i>	<i>339587,5</i>	<i>3212868,5</i>	<i>4954955,4</i>
<i>Всего по зонам встречаемости, %</i>	<i>8,6</i>	<i>4,3</i>	<i>8,5</i>	<i>6,9</i>	<i>6,9</i>	<i>64,8</i>	<i>100,0</i>

Таблица 2

Окончание табл. 2

Коэффициент корреляции Спирмена между значениями климатических факторов, двух характеристик рельефа и встречаемостью видов; полужирным выделены значения  $r$  больше 0,5 по модулю, все значения на уровне значимости  $p < 0,05$

Климатический фактор	Коэффициент корреляции
amt	<b>-0,69</b>
pr01	-0,06
pr02	-0,24
pr03	0,05
pr04	0,06
pr05	0,16
pr06	0,23
pr07	0,48
pr08	<b>0,68</b>
pr09	<b>0,79</b>
pr10	<b>0,74</b>
pr11	0,45
pr12	0,02
pr_a	0,47
reh04	0,34

Климатический фактор	Коэффициент корреляции
reh05	0,46
reh06	0,49
reh07	<b>0,64</b>
reh08	<b>0,74</b>
reh09	<b>0,75</b>
reh10	<b>0,76</b>
tm04	<b>-0,75</b>
tm05	<b>-0,77</b>
tm06	<b>-0,77</b>
tm07	<b>-0,74</b>
tm08	<b>-0,77</b>
tm09	<b>-0,77</b>
tm10	<b>-0,66</b>

Примечание: **amt** – средняя годовая температура; **pr01–pr12** – месячное количество осадков за январь–декабрь; **pr\_a** – среднегодовое количество осадков; **reh04–reh10** – относительная влажность воздуха за апрель–октябрь; **tm04–tm10** – среднемесячная температура за апрель–октябрь.

Корреляционный анализ показывает, что наиболее существенными климатическими факторами, с изменением в пространстве которых связано изменение встречаемости *P. schreberi* являются: среднегодовая температура (amt), осадки августа–октября (pr08–pr10), относительная влажность воздуха в июле–октябре (reh07–reh10) и среднемесячные температуры вегетационного периода (tm04–tm10) (табл. 2). С факторами увлажнения наблюдается положительная коррелятивная связь, а с температурными факторами – отрицательная, что находится в полном соответствии с закономерностями распределения осадков и температуры на территории ВЕРВФ [18].

Как видно из табл. 3, *P. schreberi* является частым или широко распространенным видом при среднегодовых температурах от +1,8 до +5,6°C. При значениях этого показателя выше +6°C он становится более редким, а при значениях свыше +7,8°C – исчезает из покрова. Если говорить о месячных температурах вегетационного периода, то этот вид плохо растет или пропадает из покрова при температурах примерно свыше +20°C. В регионах, где *P. schreberii* имеет высокую частоту встречаемости, летние температуры не должны превышать +18,9°C (табл. 3).

Среднегодовое количество осадков в районах широкого и частого распространения изучаемого

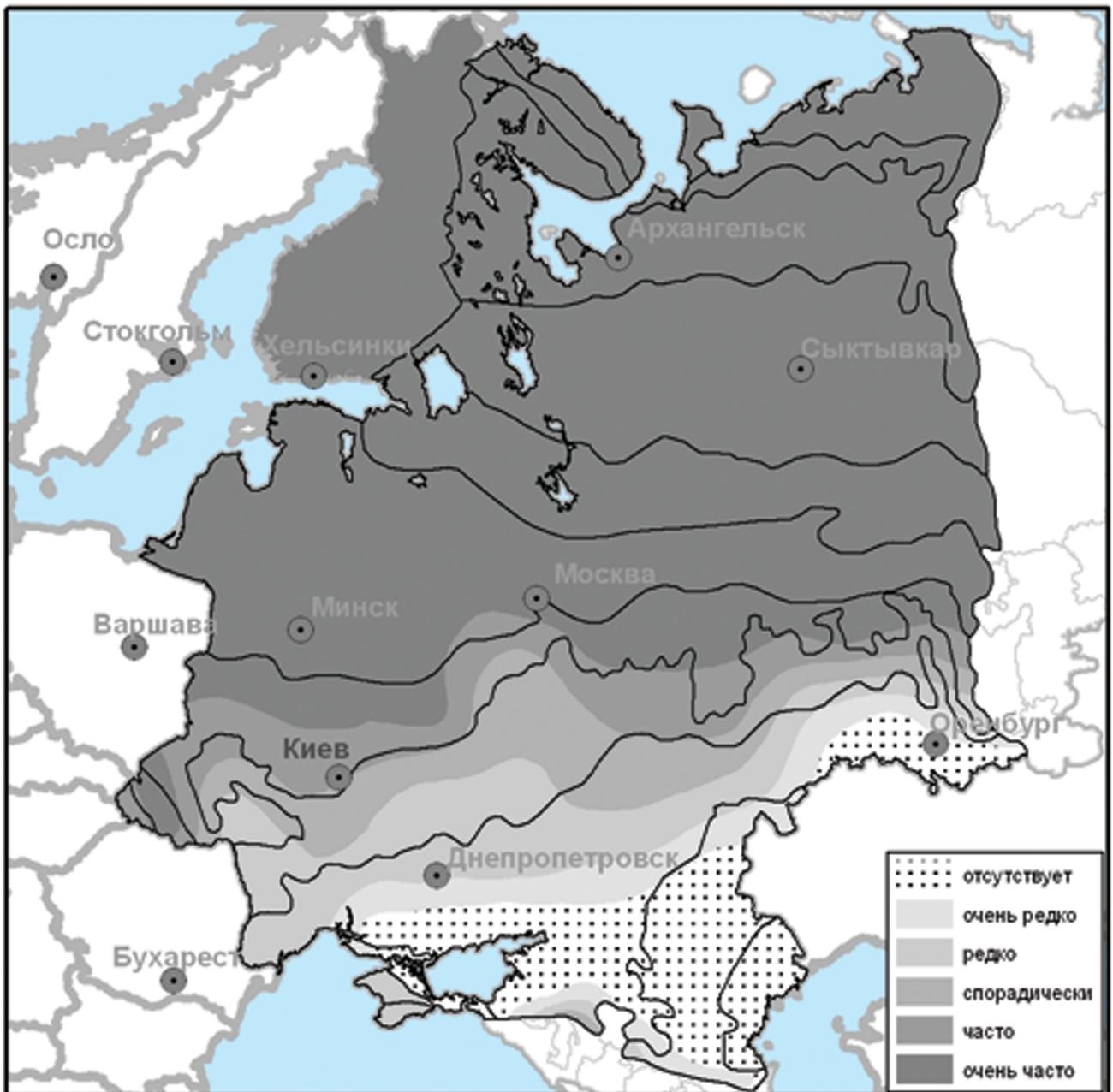


Рис. 2. Модельная карта распространения *Pleurozium schreberi* на территории Восточно-Европейской равнины и Восточной Фенноскандии (черными линиями показаны границы растительных зон; зоны встречаемости *P. schreberi* показаны градиентом серого цвета)

вида приближается к 600 мм, а при годовом количестве осадков менее 400 мм он вообще отсутствует. Аналогичным образом произрастание *P. schreberi* зависит от среднемесячных осадков и влажности воздуха.

На основании проведенного анализа, согласно правилу В. Шелфорда [10], можно выявить лимитирующие факторы, ограничивающие распространение *P. schreberi* и их верхние и нижние пределы. Очевидно, что таковыми окажутся факторы из табл. 2, имеющие наибольший коэффициент корреляции со встречаемостью изучаемого вида. Их

нижние значения, т.е. значения, за пределами которых вид перестает расти, показаны в табл. 3 (столбец “очень редко”). Верхние значения лимитирующих факторов, видимо, находятся за пределами изучаемой территории, поскольку встречаемость *P. schreberi* не убывает к северу, а его ареал обрывается на побережье Северного Ледовитого океана.

Также, можно определить и значения факторов, при которых можно говорить о климатическом оптимуме для *P. schreberi*. Поскольку климатический оптимум для вида в биогеографии принято определять по значениям соответствующих факторов,

Таблица 3

Средние значения климатических факторов по зонам встречаемости *P. schreberi* (расшифровку обозначений см. табл. 2)

Климатический фактор	Зоны встречаемости						Среднее
	отсутствует	очень редко	редко	спорадически	часто	очень часто	
amt	8,9	7,8	7,6	6,0	5,6	1,8	3,7
pr01	31,5	35,8	40,3	39,5	38,2	35,8	36,3
pr02	25,3	29,0	33,5	31,8	31,1	27,5	28,4
pr03	24,9	27,8	30,2	31,1	31,5	29,5	29,3
pr04	29,0	32,2	36,1	38,4	39,8	35,1	35,1
pr05	36,6	40,7	45,3	48,6	51,2	45,9	45,3
pr06	44,4	52,5	59,6	64,8	70,7	62,3	60,9
pr07	40,1	48,1	58,9	71,6	79,2	74,4	69,1
pr08	33,6	38,8	45,8	57,0	62,9	70,8	62,6
pr09	30,4	35,7	40,5	46,3	51,1	61,6	54,3
pr10	27,0	32,0	34,0	41,5	44,5	55,8	48,7
pr11	34,4	39,6	43,1	46,3	46,3	49,1	46,6
pr12	38,6	42,0	45,2	45,5	44,8	43,0	43,1
pr_a	390,0	450,9	520,5	566,5	590,9	591,9	560,5
reh04	63,7	65,1	66,5	67,2	68,8	73,9	71,2
reh05	55,9	56,3	59,3	58,5	61,2	66,3	63,5
reh06	56,5	58,4	62,3	63,4	66,1	68,2	65,8
reh07	54,9	57,8	62,9	65,7	68,8	72,3	68,7
reh08	55,4	57,6	61,7	65,1	69,1	76,9	71,6
reh09	61,0	62,4	66,0	69,1	72,9	81,4	76,1
reh10	72,8	73,9	75,5	78,3	80,1	87,2	83,3
tm04	10,1	9,1	8,9	7,5	6,8	1,4	3,9
tm05	17,0	16,2	15,6	14,7	14,0	8,6	11,0
tm06	21,2	20,1	19,2	18,1	17,4	13,7	15,6
tm07	23,7	22,3	20,9	19,7	18,9	16,4	18,0
tm08	22,3	21,0	20,0	18,5	17,7	14,2	16,2
tm09	16,8	15,6	14,9	13,3	12,6	9,0	11,0
tm10	8,9	7,9	7,9	6,3	6,0	2,3	4,1

которые они принимают в регионах максимального распространения вида [19], для *P. schreberii* оптимальные значения климатических факторов находятся по табл. 3 в столбцах “часто” и “очень часто”.

Однако, как показывает анализ ареала изучаемого вида, на его распространение оказывают влияние не только климатические факторы.

В целом у *P. schreberii*, зона наивысшей встречаемости совпадает с южной границей лесной зоны (рис. 2). К югу от этого рубежа, можно отметить некоторые нюансы в его распространении. Зона спорадической и редкой встречаемости заходит из степной зоны к северу небольшим “языком” на юг лесной зоны (рис. 2). Это объясняется тем, что в этом регионе таким же “языком” к северу заходит Среднерусская возвышенность, сложенная преимущественно суглинистыми моренными отложениями [20]. Территория здесь сильно распахана и имеет пониженную лесистость по сравнению с более западными и более восточными регионами юга лесной зоны, где преобладают полесские ландшафты на флювиогляциальных отложениях. Видимо, пониженная встречаемость *P. schreberii* здесь объясняется отсутствием подходящих местообитаний на богатых суглинках, хотя по климатическим характеристикам регион к югу от Москвы в зоне

широколиственных лесов слабо отличается от соответствующих регионов, например в Полесье [9].

Присутствие же *P. schreberii* на небольшой части полупустынной зоны (восток Волгоградской и юг Саратовской областей) объясняется наличием здесь сосновых посадок [21], в которых он, хотя и встречается очень редко, но находит сносные условия для своего существования. В расположенной рядом Оренбургской же области, сходной по климатическим условиям, где отдельные небольшие леса являются единичными, *P. schreberii*, как и следовало ожидать, отсутствует [22].

На протяжении такой обширной территории, как ВЕРВФ, через которую проходят 11 растительных зон (рис. 1), произрастание *P. schreberii* тесно связано с распространением лесной растительности. С другой стороны, распространение его на территории ВЕРВФ можно объяснить и совместным воздействием таких климатических факторов, как режим увлажненности и температуры вегетационного периода. Таким образом, среди биогеографических факторов, оказывающих воздействие на распространение *P. schreberii* наиболее важными являются ценоценозическая приуроченность и климатические показатели.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ignatov M.S., Afonina O.M., Ignatova E.A. et al. Checklist of mosses of East Europe and North Asia // *Arctoa*. 2006. Vol. 15. P. 1–130.
2. Longton R.E., Greene S.W. Experimental studies of growth and reproduction in the moss *Pleurozium schreberii* (Brid.) Mitt. // *J. Bryol.* 1979. Vol. 10. N 3. P. 321–338.
3. Longton R.E., Greene S.W. The growth and reproductive cycle of *Pleurozium schreberii* (Brid.) Mitt // *Ann. Bot.* 1969. Vol. 33. N 1. P. 83–105.
4. Bonan G.B., Shugart, H.H. Environmental factors and ecological processes in boreal forests // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1989. Vol. 20. P. 1–28.
5. Esseen P.A., Ehnström B., Ericson L., Sjöberg K. Boreal forests // *Ecol. Bull.* 1997. Vol. 46. P. 16–47.
6. Atkinson M.D. Biological flora of British Islands. *Betula pendula* Roth (*Betula verrucosa* Ehrh.) and *Betula pubescens* Ehrh. // *J. Ecol.* 1992. Vol. 80. N 175. P. 837–870.
7. Spiecker H., Hein S., Makkonen-Spiecker K., Thies M. Valuable broadleaved forests in Europe. Leiden-Boston: Brill, 2009. 255 pp.
8. Беляева Н.Г., Нешатаева В.Ю. Фитоценозическое разнообразие березовых неморально-травяных лесов Юго-Западного Подмосквья // Фиторазнообразие Восточной Европы. 2017. Т. 11. № 1. С. 63–73.
9. Šomšák L., Šimonovič V., Kollár J. Phytocoenoses of pine forests in the central part of the Záhorská nížina lowland // *Biologia (Bratislava)*. 2004. Vol. 59. N 1. P. 101–113.
10. Briggs J.C. Global biogeography. Amsterdam: Elsevier, 1995. 454 pp.
11. Isaaks E.H., Srivastava R.M. An introduction to applied geostatistics. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1989. 561 pp.
12. Cressie N.A.C. The origins of Kriging // *Math. Geol.* 1990. Vol. 22. N 3. P. 239–252.
13. Popov S.Yu. The climatic patterning of Sphagnum sect. Sphagnum species distribution in the East European Plain // *Arctoa*. 2016. Vol. 25. N 2. P. 332–352.
14. Попов С.Ю. Использование методов геостатистики для моделирования ареалов видов (на примере видов рода Sphagnum) // Труды КарНЦ. Сер. Биогеография. 2017. N 6. С. 70–83.
15. BIOCLIM project [электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.andra.fr/bioclim> (дата обращения: 23.03.2018)
16. Ahti T., Hämet-Ahti L., Jalas J. Vegetation zones and their sections in northwestern Europe // *Ann. Bot. Fen.* 1968. Vol. 5. P. 169–211.
17. Курнаев С.Ф. Лесорастительное районирование СССР. М.: Наука, 1973. 203 с.
18. Алисов Б.П. Климат СССР. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1956. 126 с.
19. Grinnel J. The niche-relationships of the California Thrasher. Foundation of Ecology. Chicago.: Univ. Chicago Press, 1991. 125 pp.
20. Спиридонов А.И. Геоморфология европейской части СССР. М.: Высшая школа, 1978. 335 с.
21. Сурагина С.А. Листостебельные мхи Волгоградской области (Юго-Восток Европейской России) // *Arctoa*. 2001. Vol. 10. P. 45–70.
22. Спирина У.Н., Золотов В.И. Мхи Оренбургского государственного природного заповедника (юго-восток Европейской части России) // *Arctoa*. 2004. Vol. 13. P. 51–56.

Поступила в редакцию  
23.03.2018

Принята к печати  
06.06.2018

## ECOLOGY

ON THE DISTRIBUTION OF *PLEUROZIUM SCHREBERI* (BRYOPHYTA, HYLOCOMIACEAE) ON THE EAST EUROPEAN PLAIN AND EASTERN FENNOSCANDIA

S.Yu. Popov

*Department of Ecology, School of Biology,  
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia  
e-mail: sergei.popov.2015@yandex.ru*

*Pleurozium schreberi* is one of the most common moss species in the forest area. It is the dominant in the forests of blueberry and Oxalis types. It can occur in small quantities in almost all types of forests, even in bogs. It is also a typical component of the moss layer in the tundra. The article deals with the spread of *P. schreberi* in the territory of the East European plain and Eastern Fennoscandia. On the basis of the literature sources on the occurrence of the species in different regions, according to point data, a model map of the species distribution using the kriging method was created. Overlaying the model map and the maps of spatial distribution of climatic parameters and the map of vegetation zones, the biogeographic preferences of the species were found out. *P. schreberi* is characterized by the greatest distribution in the Forest zone. Here its occurrence is high and it is phytocoenotical active species. The occurrence of *P. schreberi* decrease sharply in the transition from the Forest to Steppe zone. Here it is already a rare species, growing exclusively in pine and birch pegs. In the open Steppe this species disappears. Starting from the steppe zone and further to the South, the occurrence of *P. schreberi* decrease gradually, as the temperatures increase and decrease in precipitation, as well as forest extinction. In the North, where the species is highly active, its range abruptly ends on the coast of the Arctic Ocean. This distribution of *P. schreberi* is associated with both coenotic preferences and due to climate – it becomes rare in regions with summer temperatures above +23°C and rainfall of less than 400 mm per year.

**Keywords:** *Pleurozium shreberi*, East-European Plain, BIOCLIM, kriging-method, biogeography, species occurrence, model maps

**Сведения об авторе**

Попов Сергей Юрьевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры общей экологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-52-54; e-mail: sergei.popov.2015@yandex.ru

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА  
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ»**

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: «введение», «материалы и методы», «результаты», «обсуждение результатов», «выводы», «список литературы». Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но даже в этом случае они должны содержать резюме и ключевые слова. Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (\*.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, 12 кегль, междустрочный интервал – полуторный), включая список литературы. На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК. В следующих строках приводятся: название работы, инициалы и фамилии авторов, наименование подразделения биологического факультета МГУ, e-mail автора, ответственного за переписку с редакцией. Далее следуют резюме статьи на русском языке (100–250 слов) и ключевые слова (6–10). После текста статьи на отдельной странице печатается резюме на английском языке с заглавием и ключевыми словами (полный перевод русской версии). На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью, научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (2–3 таблицы или рисунка с соответствующим уменьшением объема текста). Подписи к рисункам и фотографиям даются на отдельной странице в конце рукописи, они должны содержать расшифровки всех используемых сокращений, а рисунки и таблицы – иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (рис. 1, табл. 2). Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов (разрешение должно быть не менее 300 точек на дюйм), не допускается вставка рисунков и фотографий в основной текст. Таблицы печатаются на отдельных страницах в конце рукописи. Каждая графа таблицы должна иметь заголовок.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При ссылке на несколько источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) включает от 10 до 25 ссылок, оформленных следующим образом:

- 1) **Книга:** *Holliday R.* Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.
- 2) **Статья в сборнике:** *Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M.* Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Ed. by J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.
- 3) **Статья в журнале:** *Hayflick L.* Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
- 4) **Тезисы докладов (материалы) конференции:** *Болеева Г.С., Борзых А.А.* Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.
- 5) **Автореферат диссертации:** *Борисенков М.Ф.* Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар, 2012. 23 с.
- 6) **Электронный ресурс:** Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).
- 7) **Электронная публикация:** *Bizzarro J.J.* Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ). Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании. При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны курсивом соответствующие латинские названия (род, вид) согласно Международным кодексам номенклатуры.

Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования. Не принимаются к печати работы, которые уже опубликованы или отправлены на печать в другие издания.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Рукописи после рецензирования отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 2 недели, в противном случае статья будет рассматриваться как вновь поступившая.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу [vestnik@mail.bio.msu.ru](mailto:vestnik@mail.bio.msu.ru). Тел. 8-495-938-27-01.

С полным текстом правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала – [vestnik-bio-msu.elpub.ru](http://vestnik-bio-msu.elpub.ru).