

УДК 582.263:546.712:576.32/36

**СОДЕРЖАНИЕ СУХОГО ВЕЩЕСТВА В КЛЕТКАХ
CHLORELLA VULGARIS В СОСТОЯНИИ ХЛОРОЗА
И ДОБАВЛЕНИИ $MnCl_2$ В ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ**

*Ильючик Ирина Анатольевна, ст. преподаватель
Никандров Виталий Николаевич, д.б.н., профессор
Полесский государственный университет*

В предыдущей статье мы уже упоминали о значении хлореллы (*Chlorella*) как объекта биотехнологии, в частности, для сельского хозяйства, а также о подверженности ее культуры хлорозу – подавлению образования хлорофилла и снижению эффективности фотосинтеза, в основе кото-

рого лежат нарушения энзиматических систем, катализирующих биосинтез пигментов [1].

Наиболее часто хлороз проявляется в отсутствие или при недоступности железа в питательной среде, а также в отсутствие марганца, меди, серы, калия и других элементов [2]. В ряде случаев хлороз устраняли внесением в питательную среду марганца. Вместе с тем избыточное внесение этого микроэлемента отрицательно сказывается на биосинтезе хлорофилла [3].

Однако нами при добавлении хлорида марганца в питательную среду были получены несколько неожиданные результаты. Так, при концентрации эффектора 0,01–10,00 мг/л рост культуры завершался уже на 5–е сутки, а доля клеток в состоянии хлороза заметно (в 1,9–2,5 раза) превосходила таковую в контрольном варианте, причем хлороз проявился уже на 5–е сутки. Можно было бы думать, что подобное явление обусловлено избытком катионов марганца в питательной среде. Это не согласуется с тем, что при добавлении хлорида марганца в питательную среду в концентрации 50 мг/л хлороз проявлялся лишь на 7–е сутки, причем доля клеток в состоянии хлороза уменьшалась в сравнении с контрольным вариантом в 2,5 раза. При внесении же в среду эффектора в максимальной концентрации – 137,5 мг/л хлороз не обнаруживался вообще, а биомасса в период 5–7–е сутки даже возрастала на 18% [1]. Эти результаты не позволяли понять обнаруженную особенность влияния хлорида марганца.

Цель настоящей работы – выявить влияние $MnCl_2$, в условиях ведущих к развитию хлороза, на содержание сухого вещества в клетках хлореллы – как одному из интегральных показателей состояния клетки.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлась зеленая одноклеточная водоросль хлорелла (*Chlorella vulgaris* IBCE C-19) из альгологической коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Для достижения хлороза условия культивирования изменяли как описано нами ранее [1] по сравнению с известными для физиологически полноценной культуры [4]. В питательную среду экспериментальных вариантов вносили $MnCl_2$ до конечной концентрации 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 5,00; 10,00; 50,00 и 137,50 мг/л. В контрольном варианте эффектор не добавляли.

Для определения сухого вещества, трижды отмытые в дистиллированной воде клетки (1 мл), высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при 80 °С и взвешивали на аналитических весах.

Все эксперименты выполнены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с вычислением t -критерия Стьюдента (Statistica 6.0).

Результаты и их обсуждение. Исходная посевная культура содержала 37,7 мкг сухого вещества на млн клеток. Через сутки роста уровень этого показателя в контроле возрос в 1,86 раза, а в остальных вариантах – на 14–38%. Изменения уровня сухого вещества в клетках хлореллы по отношению к первым суткам можно разделить на шесть типов (таблица, рисунок).

Таблица – Динамика накопления сухого вещества в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду $MnCl_2$ ($n = 9$)

Концентрация $MnCl_2$, мг/л	Количество сухого вещества, мкг/млн клеток			
	Сутки культивирования			
	1	3	5	7
Контроль	70,0 ± 2,2	42,9 ± 1,6	84,2 ± 4,3	108,9 ± 6,9
0,01	52,2 ± 4,2*	34,2 ± 1,3*	79,5 ± 5,5	94,1 ± 4,1*
0,05	52,1 ± 3,9*	26,1 ± 1,2*	89,3 ± 4,0	147,6 ± 3,8*
0,10	47,8 ± 2,8*	49,9 ± 2,4	175,6 ± 2,6*	105,1 ± 9,7
0,50	51,4 ± 2,7*	30,8 ± 1,3*	175,8 ± 3,2*	95,9 ± 2,9
1,00	42,8 ± 3,1*	25,5 ± 2,3*	162,4 ± 7,1*	99,9 ± 2,4
5,00	72,7 ± 5,0	16,1 ± 0,2*	162,8 ± 2,2*	168,4 ± 3,5*
10,00	46,5 ± 3,1*	19,0 ± 1,1*	118,8 ± 3,9*	178,7 ± 9,1*
50,00	45,0 ± 2,9*	13,6 ± 0,1*	68,4 ± 6,5*	117,9 ± 6,7
137,50	49,7 ± 2,8*	21,8 ± 2,5*	46,1 ± 3,6*	43,1 ± 2,2*

Примечание: * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

а) содержание сухого вещества на 3–и сутки по сравнению с 1–ми снижено на 39–50%, к 5–м суткам возросло на 20–71%, а к 7–м суткам рост достиг 56–183% (характерно для контроля, концентраций $MnCl_2$ 0,01 и 0,05 мг/л);

б) уровень сухого вещества на 3–и сутки по сравнению с 1–ми сутками не менялся, а на 5–е и 7–е сутки возрастал по сравнению с 1–ми сутками на 242 и 120% соответственно (характерно для концентрации $MnCl_2$ 0,1 мг/л);

в) уровень сухого остатка на 3–и сутки по сравнению с 1–ми падал на 40%, но на 5–е возрастал на 240–280%, но к 7–м суткам рост показателя не превышал 87–133% (для концентраций $MnCl_2$ 0,5 и 1,0 мг/л);

г) уровень сухого вещества на 3–и сутки по сравнению с 1–ми сутками упал на 78%, а на 5–е и 7–е сутки поднялся на 124 и 132% соответственно (для концентрации $MnCl_2$ 5,0 мг/л);

д) содержание сухого вещества на 3–и сутки по сравнению с 1–ми падало на 59–70%, а к 5–м и 7–м суткам возросло на 52–155 и 152–284% соответственно (для концентраций $MnCl_2$ 10,0 и 50,0 мг/л);

е) при максимальной концентрации эффектора содержание сухого остатка не превысило уровень 1–х суток на всем протяжении эксперимента, причем уменьшение этого показателя на 3–и сутки составило 56%.

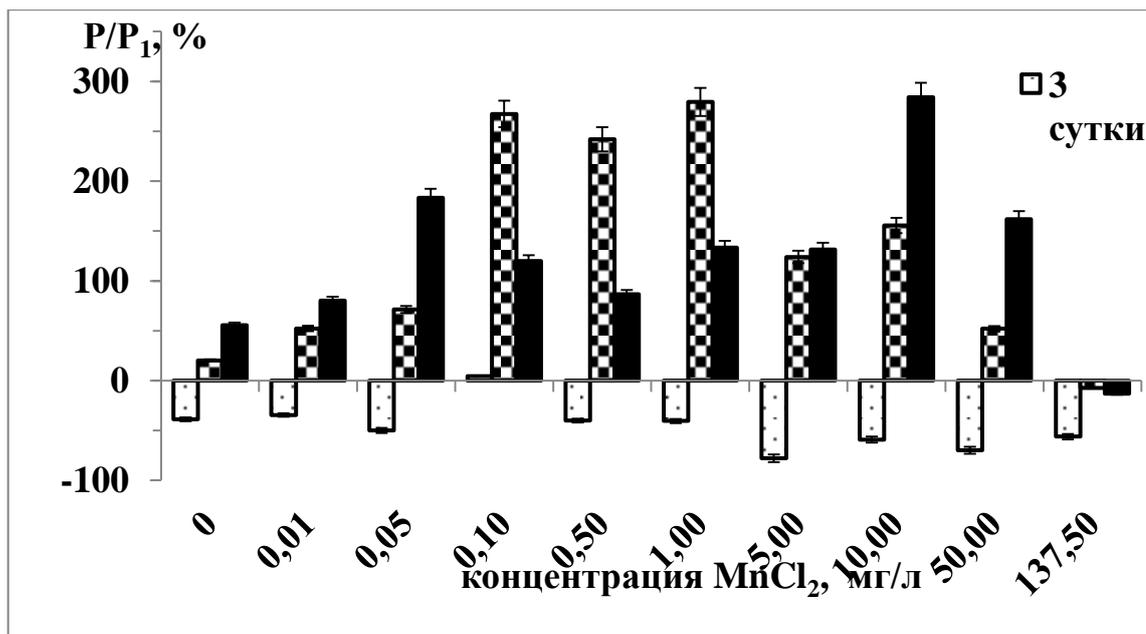


Рисунок – Изменения содержания сухого вещества в клетках *Ch. vulgaris* при росте (% к 1–м суткам культивирования, принятым за 100%) культуры на питательной среде с добавлением $MnCl_2$

Сопоставление выявленных особенностей изучаемого показателя с ранее полученными материалами об изменениях количества клеток культуры хлореллы [1] свидетельствует об определенных различиях: практически во всех вариантах, включая контрольный, проявление хлороза совпадало с уменьшением клеток в культуре, и лишь при максимальной концентрации $MnCl_2$, где хлороз не наблюдался, рост культуры продолжался и концентрация клеток к 7–м суткам в сравнении с 1–ми возросла в 2,2 раза, а уровень внутриклеточного белка в этот же период упал в 5,8 раз [1]. Складывается впечатление, что в этом варианте (т.е. при максимальной концентрации хлорида марганца) происходило своеобразное «разбухание» клеток, способствующее замедлению развития хлороза.

Список использованных источников

1. Ильючик, И.А. Влияние $MnCl_2$ на физиолого–биохимические показатели клеток *Chlorella vulgaris* в состоянии хлороза / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3 (26). – С. 389–394.
2. Carrasco–Gil, S. Silicon induced Fe deficiency affects Fe, Mn, Cu and Zn distribution in rice (*Oryza sativa* L.) growth in calcareous conditions / Carrasco–Gil S. et al. // *Plant Physiol and Biochem.* – 2018. – Vol. 125. – P. 153–163.
3. Huang, Y.L. Manganese toxicity in sugarcane plantlets grown on acidic soil of Southern China / Huang Y.L. et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – No 3. – e0148956.
4. Ильючик, И.А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Веснік Палескага дзяржаўнага універсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук.* – 2018. – № 1. – С. 53–64.