

**ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА МАРГАНЦА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* ШТАММА С 111 IBCE С-19**

**И.А. Ильючик, В.Н. Никандров**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

В последнее время почти во всех странах мира уделяют огромное внимание увеличению производства высокобелковых и витаминных продуктов, поиску богатых и дешевых источников белков и других питательных веществ [1]. Среди разнообразных организмов, которые рассматривают в качестве альтернативного источника белка, видное место занимают микроводоросли [2], в частности *Chlorella vulgaris*.

Хлорелла характеризуется вариабельностью физиолого-биохимических свойств и химического состава, зависящей от состава питательной среды, что позволяет осуществлять управляемый биосинтез ею ценных природных соединений [3]. Она является одним из перспективных возобновляемых ресурсов органического сырья [2], так как способна превращать 9–10% солнечной энергии в биомассу с теоретическим выходом около 280 т/га в год [4]. Дальнейшая интенсификация технологии культивирования хлореллы требует углубленного изучения механизмов регуляции метаболизма и жизнедеятельности ее клетки, а также введения в питательную среду эффекторов, стимулирующих процессы метаболизма.

Одним из таковых эффекторов может служить марганец – истинный биоэлемент, поступающий в клетки в форме ионов  $Mn^{2+}$  [5]. В растениях он необходим для фоторазложения воды. Быстро проникая в клетки, марганец способствует значительному увеличению интенсивности фотосинтеза, участвуя в окислении, существенно активизирует полный круг метаболических реакций [6].

Недостаток марганца у фотосинтезирующих микроорганизмов тормозит деление клеток, вызывая нарушение их физиологических функций, сопровождающееся нарушением в структуре хлоропластов. При его дефиците у хлореллы образуются необычно большие клетки неправильной формы, а на полностью освобожденной от марганца среде почти полностью прекращается рост водорослей [7].

Избыток марганца также опасен для растений. При его концентрации в сухой биомассе свыше 0,2–0,5 г/кг на листьях, стеблях, побегах появляются некротические коричневые пятна, нарушается соотношение Fe/Mn, вызывая депрессию нуклеинового обмена [8]. В основе состояния хлороза также лежат процессы нарушения enzymатических систем, катализирующих биосинтез пигментов фотосинтеза [9]. Токсичность марганца связывают с дисфункцией митохондрий и увеличением генерирования активных форм кислорода [10]. Известно, что в экстенсивной культуре хлорелла может длительно сохранять жизнеспособность при высоком содержании марганца в среде культивирования [7, 11].

В литературе крайне мало данных о влиянии  $Mn^{2+}$  в широком диапазоне концентраций на физиолого-биохимические процессы микроводорослей. В то же время информация об оптимальных концентрациях марганца в питательной среде крайне разнородна. Следует отметить, что и механизм биологического действия  $Mn^{2+}$  на физиолого-биохимические процессы в живых организмах еще далек от исчерпывающей ясности.

**Цель работы** – раскрыть особенности динамики накопления биомассы, белка и фотосинтетических пигментов в клетках зеленой микроводоросли *Ch. vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при добавлении  $MnCl_2$  в питательную среду в широком диапазоне концентраций.

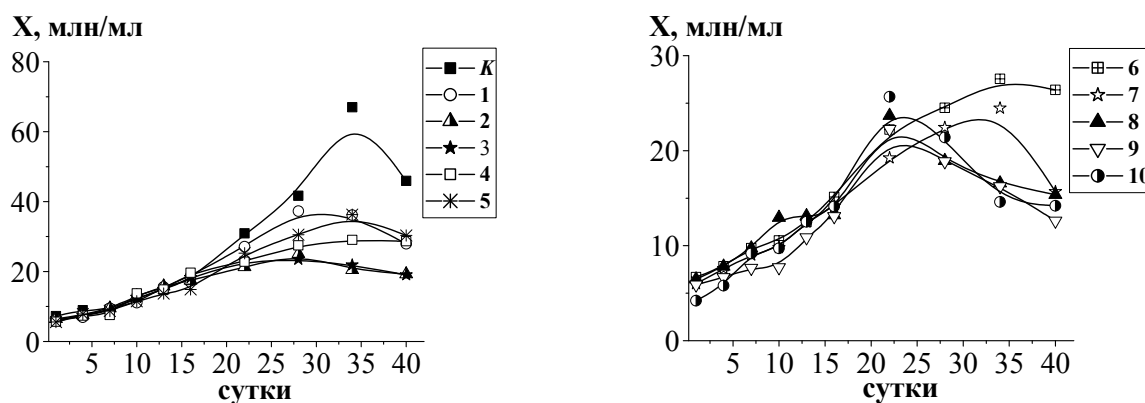
**Материалы и методы.** Исследования выполнены на альгологически чистой культуре *Chlorella vulgaris* биологического штамма С 111 ИВСЕ С-19 из коллекции РУП «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Микроводоросль выращивали на среде Тамия (концентрация  $MnCl_2$  0,50 мг/л) [12], которая являлась в условиях эксперимента контрольным вариантом. В остальные варианты вносили  $MnCl_2$  «хч» до конечной концентрации 0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 и 25,0 мг/л. В одном из вариантов соль  $MnCl_2$  отсутствовала – «нулевой».

Культивирование культуры, забор аликвот и определение концентрации общего белка (мкг/мл) проводили как подробно описано нами ранее [13]. Концентрацию исследуемых пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) (мг/л) в клетках хлореллы определяли по [14].

Исследования проведены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*), уровень значимости ( $P \leq 0,05$ ).

**Результаты.** В течение 40 сут культивирования в контрольном варианте уровень биомассы линейно нарастал в период с 1–34-х сут, увеличение достигло 9,2 раза (рисунок 1).



**Рисунок 1.** – Динамика накопления биомассы культурой хлореллы при добавлении в питательную среду  $MnCl_2$  (мг/л): *K* – контроль (среда Тамия); 1 - 0; 2 - 0,010; 3 - 0,025; 4 - 0,050; 5 - 0,100; 6 - 1,000; 7 - 2,500; 8 - 5,000; 9 - 10,000; 10 - 25,000

В отсутствие  $MnCl_2$  в питательной среде на протяжении всего культивирования (за исключением 7, 13, 16-х сут) рост культуры угнетался на 10,0–46,1% (рисунок 1).

По сравнению со средой Тамия во всех опытных вариантах с  $MnCl_2$  в среде, снижалось накопление биомассы на протяжении всего периода культивирования. Особенно заметно это было в периоды 1–4-е сут (на 11,1–42,2%) и 22–40-е сут (на 16,9–78,2%). В период 7–16-е сут наблюдался небольшой рост биомассы при концентрациях  $MnCl_2$  в среде 0,01–0,05 мг/л (на 12%). При других концентрациях  $Mn^{2+}$  в среде рост хлореллы угнетался, особенно при трех максимальных концентрациях эффектора (на 11,9–37,4%) (рисунок 1).

В контрольном варианте в период 1–10-е сут содержание белка в клетках хлореллы снижалось на 12,7%. К 16-м сут уровень его возрос в 2,3 раза (максимальный за весь период культивирования). Затем к 22-м суткам он падал на 34,8%, и к 34-м сут возрастал в 2,6 раза. Дальнейшего роста уровня внутриклеточного белка не наблюдалось (рисунок 2).

В культуральной жидкости содержание белка в контроле в период 1–7-е сут возросло в 2,6 раза и было максимальным за весь период культивирования. К 10-м сут уровень его снижался на 14,2%, после чего наблюдалось резкое падение его уровня в 44,9 раза (22-е сут), а на 34-е сут белок вовсе не обнаружили, хотя к 40-м сут он вновь накапливался (рисунок 2).

В «нулевом» варианте, а также при концентрации хлорида марганца в питательной среде 0,010, 0,025, 2,50–10,00 мг/л на 13-е сут роста культуры уровень белка в клетках хлореллы был ниже контроля на 14–31%, а при концентрации 0,1–1,0 мг/л превышал его на 17,5–50,1%. При максимальной концентрации эффектора этот показатель практически не отличался от такового в контроле. На 16, 22 и 40-е сут почти во всем диапазоне концентраций эффектора уровень белка в клетках превышал таковой в контроле на 19–46, 40–144 и 10–49,7% соответственно (рисунок 2).

В среде, не содержащей соли марганца, можно выделить следующие изменения концентрации внутриклеточного белка: на 22-е сут – рост на 45%, на 34-е сут – спад на 38,6%; изменения содержания белка в культуральной жидкости на 10, 22 и 40-е сутки – уменьшение на 59,5%, рост на 520,5%, спад на 16,7% соответственно, в сравнении с контролем (рисунок 2).

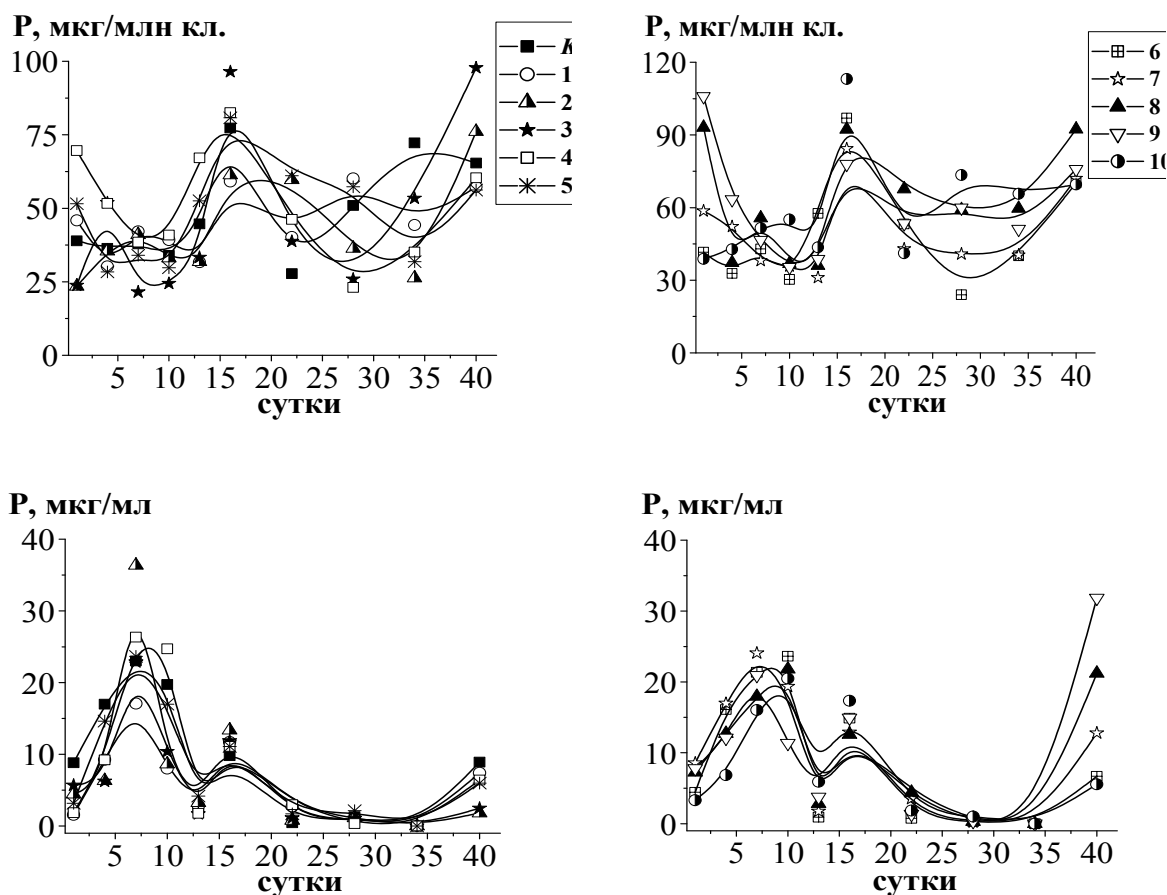


Рисунок 2. – Динамика накопления внутриклеточного белка хлореллой (А) и белка в культуральной жидкости (Б) при добавлении в питательную среду  $MnCl_2$  (мг/л): К – контроль (среда Тамия); 1 - 0; 2 - 0,010; 3 - 0,025; 4 - 0,050; 5 - 0,100; 6 - 1,000; 7 - 2,500; 8 - 5,000; 9 - 10,000; 10 - 25,000

В сравнении с контролем при всех концентрациях  $MnCl_2$  в питательной среде в период 1–10-е сут, а также на 28-е и 40-е сут наблюдали снижение уровня белка в культуральной жидкости на 13,8–83,9%. Исключением были 7-е сут, когда при концентрации эффектора 0,01 и 0,05 мг/л выявлен рост уровня белка на 58,0 и 14,6% соответственно. Подобную картину отметили и на 10-е сут: при концентрации соли 0,05, 1,00 и 5,00 мг/л уровень белка возрос на 25,1, 19,7 и 10,4% соответственно, а также на 28-е сут: при концентрации соли 0,1, 2,5, 5,0 и 10,0 мг/л рост его уровня составил 64,9, 43,7, 138,3 и 257,9% соответственно. В период 13–22-е сут выявлено увеличение уровня белка в культуральной жидкости на 13,7–900%, за исключением 13-х суток при концентрации эффектора 0,025, 0,050, 1,000 и 2,500 мг/л (снижение на 31,5, 28,6, 63,3 и 30,2% соответственно в сравнении с контролем) (рисунок 2).

При оценке общей продуктивности биомассы было сопоставлено накопления белка в ней с количеством клеток. По данному показателю предпочтительной оказалась среда Тамия ( $MnCl_2$  0,50 мг/л). Так, через 34-е и 40-ок сут концентрация внутриклеточного белка в данном варианте достигала 4,84 и 3,00 мг/мл соответственно.

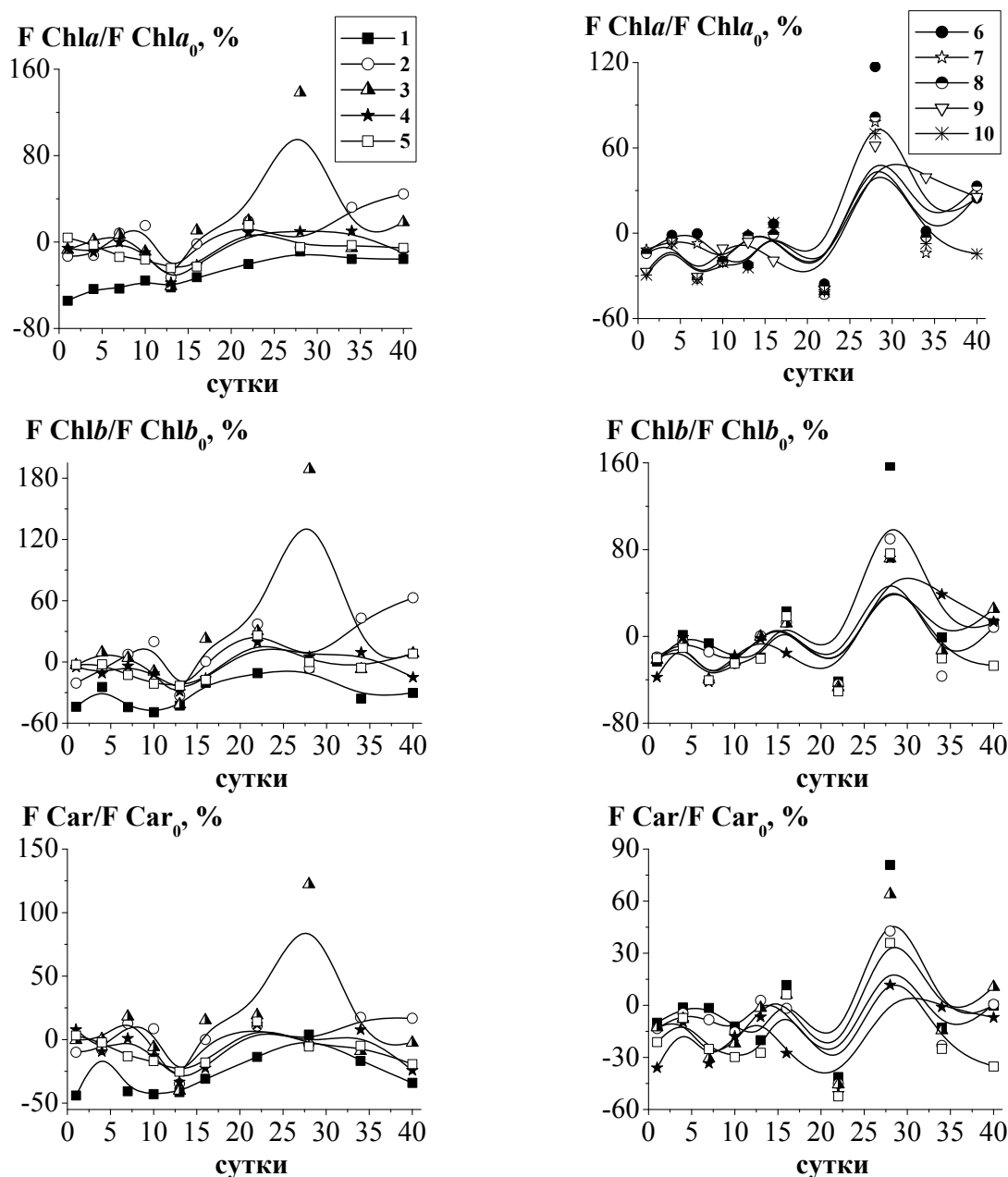


Рисунок 3. – Изменения (% к контролю – среда Тамия, принятому за 100%) уровня хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду  $MnCl_2$  (мг/л): 1 – 0; 2 – 0,010; 3 – 0,025; 4 – 0,050; 5 – 0,100; 6 – 1,000; 7 – 2,500; 8 – 5,000; 9 – 10,000; 10 – 25,000

Величина отношения содержания белка клетки/культуральная жидкость в контрольном варианте в начале культивирования уменьшалась с 4,42 до 1,72 к 10-м сут. Она резко увеличивалась к 13-м сут до 18,04 и к 28-м суткам до 39,16, снижаясь до 7,34 в конце культивирования. При добавлении  $MnCl_2$  в питательную среду изменения данного отношения носили сложный характер в зависимости от концентрации эффектора и времени культивирования.

За весь период культивирования концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в контрольном варианте возросли в 1,7 раза и их изменения были однотипны (рисунок 3).

Динамика уровня хлорофилла *a* в контрольном варианте в период 1–22-е сут, приближалась к линейной зависимости, что согласуется с линейной динамикой накопления биомассы культурой. Однако, через 28 сут его концентрация падала в контроле на 44%, вновь возрастала в последующий период культивирования, достигая максимума в конце культивирования, и увеличиваясь в 1,7 раза по сравнению с 28-ми сут.

В период 1–7-е сут роста культуры концентрация хлорофилла *a* в клетках контрольного варианта возросла на 75%. К 10-м суткам его уровень снизился на 25%, а с 13-х до 22-х сут наблюдался рост его концентрации на 31% в сравнении с 10-ми сут. На 28-е сут уровень пигмента вновь падал на 44% в сравнении с 22-и сут, однако к концу культивирования практически не отличался от такового 22-х сут (рисунок 3).

Следует также отметить, что при всех концентрациях  $MnCl_2$  в среде культивирования *Ch. vulgaris*, в период 1–22 сут уровень фотосинтетических пигментов был, за редким исключением, ниже в сравнении с контролем. На 22-е сут при концентрации  $MnCl_2$  0,01–0,10 мг/л уровень хлорофилла *a* возрос на 9–20, хлорофилла *b* на 19–37, каротиноидов на 11–19% соответственно. При концентрации соли 1,0–25,0 мг/л наблюдалось максимальное снижение их содержания: хлорофилла *a* на 36–43, хлорофилла *b* на 42–51, каротиноидов на 41–52% соответственно в сравнении с контролем.

На 28-е сут картина существенно менялась. В сравнении с контролем при концентрации эффектора 0,01–0,10 мг/л, уровень хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов снизился, кроме варианта 0,025 мг/л, в котором наблюдали увеличение на 138, 188 и 122% соответственно. При концентрациях  $MnCl_2$  1,00–25,00 мг/л в данный период культивирования выявлен рост уровня хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов на 62–82, 72–157 и 12–81% соответственно. В последующие периоды (34, 40-е сут) также наблюдали колебания уровня фотосинтетических пигментов относительно контрольного варианта, но они не были столь велики (рисунок 3).

**Заключение.** Изложенные выше результаты свидетельствуют о том, что исключение из питательной среды хлорида марганца негативно сказывается на росте культуры хлореллы. Снижение или увеличение концентрации эффектора в среде Тамия не способствуют накоплению биомассы *Ch. vulgaris*, поэтому оптимальной концентрацией  $MnCl_2$  в среде культивирования явилась – 0,50 мг/л (среда Тамия), время роста – 34-е сутки. Добавление  $MnCl_2$  во всех исследуемых концентрациях, тем не менее, не вызвало угнетение роста и гибели культуры. Следует также заметить, что марганец играет важную роль в фиксации  $CO_2$ , фосфорно-энергетическом обмене и устранении супероксидных радикалов. Можно думать, что при изменениях уровня фосфатов и азотистых соединений в питательной среде, оптимальным будет иная концентрация  $Mn^{2+}$ . Для этого необходимы дальнейшие исследования.

Судя по полученным материалам, что культура хлореллы в процессе развития проходит несколько функционально-метаболические перестроек, носящих колебательный характер, а добавление  $MnCl_2$  в питательную среду в зависимости от концентрации способно изменять их характер. Уровни сдвигов концентраций фотосинтетических пигментов практически совпадают со сдвигами концентрации внутриклеточного белка. Выяснение причин функционально-метаболических перестроек в культуре микроводоросли хлореллы составляет задачу наших дальнейших исследований.

#### Список использованных источников

1. Люндышев, В.А. Технологии производства продукции животноводства / В.А. Люндышев. – Минск, 2018. – 292 с.
2. Single cell protein production: A review / G. Suman [et al.] // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – Vol. 4, № 9. – P. 251–262.
3. Оптимизация условий выращивания хлореллы / С.С. Мельников [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 3. – С. 52–56.

4. Khan, M.I. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products / M.I. Khan, J.H. Shin, J.D. Kim // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – Vol. 17. – P. 1–21.
5. Fisher, W.W. Manganese and the evolution of photosynthesis / W.W. Fisher, J. Cannabis, J.E. Johnson // *Orig Life Evol Biosph*. – 2015. – Vol. 45, iss. 3. – P. 351–357.
6. Белоус, О.Г. Влияние микроэлементов на интенсивность фотосинтеза растений чая в зоне влажных субтропиков России / О.Г. Белоус // *Современные проблемы науки и образования*. – 2011. – № 5.
7. Упитис, В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В.В. Упитис. – Рига, 1983. – 240 с.
8. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water / S. Krishna [et al.] // *Arch Toxicol*. – 2014. – Vol. 88, iss. 1. – P. 47–64.
9. Manganese toxicity in sugarcane plantlets grown on acidic soil of Southern China / Y.L. Huang [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, iss. 3. – P. e0148956.
10. Manganese ions enhance mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission from Krebs cycle oxidoreductases by inducing permeability transition / E. Bonke [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. – 2016. – Vol. 99. – P. 43–53.
11. Лукьянов, В.А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В.А. Лукьянов, А.И. Стифеев. – Курск, 2014. – 181 с.
12. Влияние сульфата никеля на урожай биомассы и содержание белка в клетках *Chlorella vulgaris* в динамике роста культуры / И.А. Ильючик [и др.] // *Вестн. Палескага дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук*. – 2020. – № 2. – С. 32–39.
13. Ильючик, И.А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении MnCl<sub>2</sub> в питательную среду / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Вестн. Палескага дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук*. – 2018. – №1. – С. 53–64.
14. Ильючик, И.А. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Вестні Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 299–309.