

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Пугачева Татьяна Талгатовна

**Мониторинг формирования, субклеточного распределения и
расходования резервов фосфора и азота в фототрофных
микроорганизмах методами аналитической просвечивающей
электронной микроскопии**

03.03.04 — Клеточная биология, цитология и гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Соловченко Алексей Евгеньевич

Москва — 2019 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Список сокращений.....	6
2. Введение	8
3. Обзор литературы.....	15
3.1. Краткий обзор методов аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).....	15
3.1.1. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС) и спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ).....	15
3.1.2. Энергофильтрующая ПЭМ (ЭФПЭМ) и элементное картирование.....	18
3.2. Структура клеток оксигенных фотоавтотрофных микроорганизмов	21
3.2.1. Ультраструктурная организация клеток цианобактерий и микроводорослей	21
3.2.2. Изменения в ультраструктурной организации микроводорослей и цианобактерий при наличии и отсутствии азота и фосфора в среде культивирования	25
3.3. Внутриклеточные резервы фосфора цианобактерий и микроводорослей	26
3.3.1. Полифосфатные включения в качестве внутриклеточных резервов фосфора.....	26
3.3.2. Пути биосинтеза и катаболизма полифосфатов	27
3.3.3. Избыточное поглощение неорганического фосфата цианобактериями и микроводорослями из среды.....	32
3.3.4. Визуализация и идентификация фосфорсодержащих включений методами аналитической ПЭМ.....	36
3.4. Внутриклеточные резервы азота цианобактерий и микроводорослей.....	38
3.4.1. Поглощение азота из среды микроводорослями и цианобактериями	38
3.4.2. Цианофициновые гранулы в качестве резервов азота цианобактерий	41
3.4.3. Гуанин и мочевая кислота в качестве потенциальных резервов азота микроводорослей	42
3.4.4. Визуализация и идентификация резервов азота методами аналитической ПЭМ	46
3.5. Перспективы использования в биотехнологии микроводорослей и цианобактерий, аккумулирующих фосфор- и азотсодержащие включения	47
3.5.1. Проблемы получения и неэффективного использования фосфорных и азотных минеральных удобрений и эвтрофикации водоемов	47
3.5.2. Глобальная проблема дефицита фосфора.....	48
3.5.3. Преимущества использования микроводорослей и цианобактерий для биоизъятия излишков фосфора и азота из сточных вод	50
3.5.4. Преимущества использования микроводорослей и цианобактерий в качестве биоудобрений	53
3.5.5. Нерешенные вопросы и проблемы использования микроводорослей и цианобактерий в биотехнологии	54
3.6. Заключение к обзору литературы.....	55
4. Материалы и методы	56

4.1. Штаммы микроводорослей и цианобактерий, условия культивирования.....	56
4.1.1. Общая информация.....	56
4.1.2. Штамм <i>Chlorella vulgaris</i> CCALA 256: восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору.....	58
4.1.3. Штамм <i>Desmodesmus</i> sp. IPPAS S-2014: культивирование в среде с азотом, голодание по азоту и стационарная культура	59
4.1.4. Штаммы <i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1, <i>Desmodesmus</i> sp. IPPAS S-2014, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7118 и <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120: восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	60
4.1.5. Штамм <i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1: стационарная культура.....	62
4.1.6. Штамм <i>Tetradesmus obliquus</i> IPPAS S-2023.....	62
4.1.7. Штамм <i>Amphidinium carterae</i> NCMA CCMP1314: восстановление азотного питания после голодания по азоту	63
4.1.8. Штамм <i>Lobosphaera incisa</i> SAG 2468: голодание по фосфору и восстановление азотного питания после голодания по азоту	64
4.2. Подготовка образцов для анализа методами традиционной и аналитической ПЭМ	64
4.3. Анализ образцов методами традиционной и аналитической ПЭМ	67
4.3.1. Анализ методом традиционной ПЭМ.....	67
4.3.2. Элементный анализ методами ЭДРС и СХПЭЭ.....	67
4.3.3. Элементное картирование по фосфору и азоту методом ЭФПЭМ.....	69
4.3.4. Метод количественного анализа резервов фосфора и азота микроводорослей и цианобактерий на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ.....	70
4.4. Независимое подтверждение результатов аналитической ПЭМ	75
4.4.1. Анализ методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР)	75
4.4.2. Анализ методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) .	75
4.4.3. Анализ методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии комбинационного рассеяния (КР)	76
4.5. Определение дифференциальной экспрессии генов.....	77
4.5.1. Выделение тотальной РНК.....	77
4.5.2. Секвенирование, сборка и аннотирование транскриптома.....	77
4.5.3. Выбор референсного и целевых генов <i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	78
4.5.4. Метод ПЦР в режиме реального времени	81
5. Результаты и обсуждение	83
5.1. Ультраструктурные особенности исследуемых эукариотических микроводорослей.....	83
5.2. Формирование резервов фосфора микроводорослей при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде.....	86
5.2.1. Накопление биомассы и изменения в составе клеточных включений	86

5.2.2. Формирование фосфорсодержащих включений в микроводорослях после возобновления фосфорного питания	91
5.2.3. Ультраструктурная организация вакуолярных фосфорсодержащих включений	97
5.3. Изменение экспрессии генов <i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде.....	104
5.4. Формирование фосфорсодержащих включений у цианобактерий при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде.....	110
5.4.1. Формирование фосфорсодержащих включений недиазотрофными цианобактериями	110
5.4.2. Формирование фосфорсодержащих включений диазотрофными цианобактериями при наличии и при отсутствии связанного азота в среде	118
5.5. Расходование и формирование азотсодержащих включений микроводорослей при азотном голодании и при переходе от азотного голодания к избытку неорганического азота в среде	124
5.5.1. Формирование азотсодержащих включений — общее свойство представителей различных групп микроводорослей.....	124
5.5.2. Химическая природа азотсодержащих включений микроводорослей <i>Desmodesmus</i> sp. и <i>Amphidinium carterae</i>	126
5.5.3. Расходование азотсодержащих включений при азотном голодании.....	130
5.5.4. Формирование азотсодержащих включений при переходе от азотного голодания к избытку неорганического связанного азота в среде	132
5.6. Метод количественной оценки содержания и внутриклеточной локализации резервов фосфора и азота на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ	138
5.6.1. Разработка метода.....	138
5.6.2. Применение метода к элементным картам азота и фосфора клеток микроводорослей и цианобактерий	139
5.6.3. Оценка гетерогенности клеток в исследуемых культурах в отношении аккумуляирования ими резервов фосфора и азота	151
6. Заключение	161
7. Выводы.....	165
8. Благодарности.....	166
9. Список литературы.....	168
Приложение 1	189
Приложение 2	190
Приложение 3	191
Приложение 4	192
Приложение 5	193
Приложение 6	195
Приложение 7	196

Приложение 8	197
Приложение 9	198
Приложение 10	199
Приложение 11	200
Приложение 12	202
Приложение 13	204
Приложение 14	205
Приложение 15	206
Приложение 16	207
Приложение 17	208
Приложение 18	209

1. Список сокращений

АС-включение	— клеточное азотсодержащее включение
ГВС	— газо-воздушная смесь
ГДФ	— гуанозиндифосфат
ГОГАТ	— глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза
ГС	— глутамин-синтетаза
ГТФ	— гуанозинтрифосфат
ИСП-МС	— масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
кДНК	— комплементарная ДНК
КР	— комбинационное рассеяние
НАД	— никотинамидадениндинуклеотид
Нано-МСВИ (NanoSIMS)	— масс-спектрометрия вторичных ионов с нанометровым разрешением
ПГБ	— поли-(R)-3-гидроксibuтират
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ПЭМ	— просвечивающая электронная микроскопия
СПЭМ	— сканирующая просвечивающая электронная микроскопия
СХПЭЭ (EELS)	— спектроскопия характеристических потерь энергии электронов
ФАР	— фотосинтетически активная радиация
ФД	— ферредоксин
ФоС-включение	— клеточное фосфорсодержащее включение
ХПЭЭ	— характеристические потери энергии электронов
ЭДРС (EDX)	— энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
ЭФПЭМ (EFTEM)	— энергофильтрующая просвечивающая электронная микроскопия

ЯМР	— ядерный магнитный резонанс
EDX (ЭДРС)	— energy dispersive X-ray spectroscopy
EFTEM (ЭФПЭМ)	— energy-filtered transmission electron microscopy
EELS (СХПЭЭ)	— electron energy loss spectroscopy
DAPI	— 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамидино-2-фенилиндол)
HAADF	— high-angle annular dark-field
NanoSIMS (Нано-МСВИ)	— Nano-Secondary-Ion Mass Spectrometry
N-карта	— элементная ЭФПЭМ-карта азота
P-карта	— элементная ЭФПЭМ-карта фосфора
VTC	— vacuolar transporter chaperone, вакуолярный транспортный шаперон

2. Введение

Актуальность темы исследования. Фосфор и азот являются ключевыми биогенными элементами, необходимыми для функционирования всех живых организмов. Фосфор входит в состав важнейших соединений, таких как нуклеиновые кислоты, АТФ и фосфолипиды; он играет ключевую роль в энергетических процессах клетки [Lehninger et al., 2000, P. 23, 51, 280, 487]. Азот является компонентом важнейших биохимических соединений, таких как белки, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты [Lehninger et al., 2000, P. 76-77, 273-275]. Соединения указанных элементов участвуют в важнейших процессах клеточного метаболизма у всех живых организмов, в том числе, у одноклеточных кислородных фотоавтотрофных микроорганизмов (эукариотических микроводорослей и прокариотических цианобактерий).

Ввиду ограниченной доступности фосфора и азота в среде обитания микроводоросли и цианобактерии способны к внутриклеточному запасанию фосфора и азота, поглощенного из окружающей среды. Анализ механизмов, лежащих в основе этих процессов, — ключ к пониманию фундаментальной картины клеточной биологии этих микроорганизмов при дефиците либо избытке элементов минерального питания.

Одноклеточные фототрофные организмы, накапливающие фосфор и азот в больших количествах, потенциально могут быть использованы в биотехнологии для решения важнейших экологических и социально-экономических проблем, связанных: (i) с повсеместным использованием низкоэффективных азотных и фосфорных минеральных удобрений, приводящим к эвтрофикации водных экосистем в результате вымывания этих удобрений с полей в составе сточных вод [Carpenter et al., 2005]; (ii) с негативным воздействием производства азотсодержащих удобрений на окружающую среду [Snyder et al., 2009, P. 256]; (iii) с незамкнутостью глобального геохимического цикла фосфора и с невозобновляемостью природных фосфатных месторождений [Cordell et al., 2009]. Фосфориты и апатиты — единственный «концентрированный» источник фосфора для получения минеральных фосфорных удобрений. По прогнозам, они будут исчерпаны в ближайшие 50–100 лет [Steen, 1998; Smil, 2000], что приведет к глобальному дефициту фосфора [Solovchenko et al., 2016].

Фототрофные микроорганизмы, накапливающие значительные количества фосфора и азота, потенциально могут быть использованы для создания более эффективных и безопасных для окружающей среды биоудобрений, а также для изъятия фосфора и азота из сточных вод и возврата их в агроэкосистемы [Mulbry et al., 2005; Singh et al., 2016].

Однако на настоящий момент использование указанных микроорганизмов в биотехнологии затруднено ввиду недостатка фундаментальных знаний о клеточной биологии этих микроорганизмов в отношении формирования и расходования внутриклеточных резервов фосфора и азота.

Степень разработанности темы исследования. Известно, что в клетках микроводорослей и цианобактерий фосфор может накапливаться в виде фосфорсодержащих включений (ФoS-включений), представляющих собой полифосфаты [Kuhl, 1974; Allen, 1984; Nishikawa et al., 2006]. Полифосфатные включения в этих фототрофных микроорганизмах являются внутриклеточными резервами фосфора: в случае недостатка доступного фосфора в среде данные включения метаболизируются [Adamec et al., 1979; Allen, 1984; Voříšek, Zachleder, 1984; Nishikawa et al., 2006], а в случае избытка, наоборот, аккумулируются [Allen, 1984; Powell et al., 2008; 2009].

Микроводоросли и цианобактерии обладают способностью поглощать неорганический фосфор из среды в большем количестве, чем им необходимо для поддержания метаболизма, активного роста и деления клетки. Указанный феномен называют избыточным поглощением фосфора [Jensen, Sicko, 1974; Powell et al., 2008; 2009; Dyhrman, 2016, P. 158]. Для некоторых микроводорослей и цианобактерий было показано, что избыточное поглощение фосфора, сопряженное с образованием полифосфатных ФoS-включений, особенно ярко выражено в клетках при восстановлении фосфорного питания, то есть при добавлении фосфора к клеткам, культивируемым в бесфосфорной среде. Указанный феномен получил название «избыточное образование полифосфатов» [Jensen, Sicko, 1974; Allen, 1984; Kulaev et al., 2004, P. 174; Dyhrman, 2016, P. 158]. Хотя классические исследования избыточного поглощения фосфора и биохимии полифосфатов были выполнены в 60-х годах прошлого столетия (см. [Miyachi et al., 1961; 1964]), на настоящий момент знания о процессах формирования, расходования, субклеточного распределения и структуре внутриклеточных включений фосфора в этих микроорганизмах при восстановлении фосфорного питания немногочисленны и фрагментарны.

Внутриклеточными резервами азота у цианобактерий служат азотсодержащие включения (АС-включения), представляющие собой структурированные цианофициновые гранулы [Allen, 1984]. В отношении резервов азота у эукариотических микроводорослей на настоящий момент лишь для некоторых видов микроводорослей [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972; Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013; Moudříková et al., 2017a] показано накопление АС-включений в вакуолях их клеток. Однако формирование и расходование указанных включений у микроводорослей

практически не изучались, поэтому данные включения можно рассматривать лишь в качестве потенциальных внутриклеточных резервов азота.

Таким образом, подробное изучение процессов внутриклеточного запасаения и субклеточного распределения фосфора и азота в микроводорослях и цианобактерий — одна из задач современной клеточной биологии этих фототрофных организмов.

О формировании и расходовании ФоС- и АС-включений можно судить по их представленности, распределению и локализации в клетках в различных условиях культивирования. До недавнего времени в арсенале специалистов по физиологии и ультраструктурной организации микроводорослей не было метода, способного одновременно предоставлять информацию о точной субклеточной локализации клеточных включений и их элементном составе. Однако эта информация необходима для понимания механизмов формирования и расходования резервов основных элементов минерального питания в клетках. Из всех известных аналитических методов только методы аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) позволяют исследовать ФоС- и АС-включения на субклеточном уровне с нанометровым пространственным разрешением и достоверно определять их локализацию в клетке. Эти методы органично дополняют традиционные методы ПЭМ, предоставляющие информацию об ультраструктурной реорганизации клеток в различных условиях культивирования.

Однако до недавнего времени, за редким исключением, аналитическая ПЭМ применялась для исследования объектов неживой природы, например, в материаловедении. Чтобы раскрыть потенциал современных методов аналитической ПЭМ для исследования клеток фототрофных микроорганизмов, требовалась дополнительная проработка ряда аспектов получения изображений и их количественной обработки.

Настоящая работа посвящена изучению формирования, субклеточного распределения и структуры ФоС- и АС-включений микроводорослей и цианобактерий методами аналитической ПЭМ.

Цель работы: изучить методами аналитической просвечивающей электронной микроскопии влияние присутствия в среде фосфора и азота на внутриклеточное распределение, формирование и структуру фосфор- и азотсодержащих включений у микроводорослей и цианобактерий.

Задачи:

1) Разработать и протестировать усовершенствованный метод анализа субклеточного распределения и количественной оценки содержания резервов фосфора и азота в микроводорослях и цианобактериях на элементных картах, полученных методом энергофильтрующей ПЭМ, и с его помощью выявить субклеточное распределение резервов фосфора и азота у микроводорослей и цианобактерий.

2) Методами традиционной и аналитической ПЭМ охарактеризовать формирование и ультраструктурные особенности фосфорсодержащих включений у микроводоросли *Chlorella vulgaris* при восстановлении фосфорного питания.

3) Проанализировать изменение уровня экспрессии генов, потенциально вовлеченных в метаболизм полифосфатов у микроводоросли *Chlorella vulgaris* при восстановлении фосфорного питания.

4) Охарактеризовать формирование фосфорсодержащих включений у diaзотрофных и недiazотрофных цианобактерий при восстановлении фосфорного питания и изучить влияние наличия связанного азота в среде на формирование указанных включений у diaзотрофной цианобактерии.

5) Охарактеризовать химическую природу и содержание внутриклеточных резервов азота микроводорослей *Desmodesmus* sp. и *Amphidinium carterae* при восстановлении азотного питания.

Объектом исследования являлись кислородные фотоавтотрофные микроорганизмы – штаммы эукариотических микроводорослей и прокариотических цианобактерий, способные к аккумуляции ФОС- и/или АС-включений.

Предметом исследования являлась способность кислородных фотоавтотрофных микроорганизмов аккумулятировать ФОС- и АС-включения.

Научная новизна работы. В работе впервые методы аналитической ПЭМ применены для изучения представленности и субклеточного распределения внутриклеточных резервов фосфора и азота фототрофных микроорганизмов в связи с наличием или отсутствием этих элементов в среде. С помощью указанного метода получена важная информация, дополняющая общую картину ультраструктурной реорганизации клетки при акклимации к дефициту и избытку фосфора и азота в среде. В работе впервые показано, что вакуолярные ФОС-включения микроводорослей обладают характерной ультраструктурной организацией. Предположительно, такая организация определяется их формированием с участием ферментных VTC-комплексов в

мембране вакуоли. Впервые у микроводорослей охарактеризована дифференциальная экспрессия генов, вовлеченных в метаболизм полифосфатов; показано, что VTC-подобный белок, представляющий полифосфат-полимеразу и расположенный в мембране вакуоли, может участвовать в избыточном образовании полифосфатных ФоС-включений в клетках в первые часы после восстановления фосфорного питания. В отношении цианобактерий впервые определено, что наличие либо отсутствие азота в среде не влияет на избыточное образование полифосфатных ФоС-включений у diaзотрофных цианобактерий. Для микроводорослей впервые подтверждено, что их АС-включения действительно являются внутриклеточными резервами азота и что в первые часы после восстановления азотного питания у микроводорослей происходит избыточное образование АС-включений. Разработан новый усовершенствованный метод анализа ЭФПЭМ-карт фосфора и азота для количественной оценки содержания и локализации резервов фосфора и азота в клетках микроводорослей и цианобактерий.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе исследованы аспекты избыточного образования полифосфатных ФоС-включений микроводорослями и цианобактериями при восстановлении фосфорного питания методами аналитической ПЭМ. Полученные данные расширяют фундаментальные представления о механизмах синтеза полифосфатов у микроводорослей и участвующих в этом процессе ферментах. В работе также с помощью методов аналитической ПЭМ изучен метаболизм АС-включений микроводорослей в зависимости от наличия азота в среде. Показано, что АС-включения микроводорослей действительно являются их внутриклеточными резервами азота. Полученные результаты вносят значительный вклад в формирование комплексной картины метаболизма азота в микроводорослях. С помощью методов аналитической ПЭМ получена важная информация, дополняющая общую картину ультраструктурной реорганизации клеток фототрофных микроорганизмов при акклимации к дефициту и избытку фосфора и азота в среде.

Результаты работы могут быть использованы в биотехнологии для разработки систем биологической очистки сточных вод от фосфора и азота микроводорослями и цианобактериями с дальнейшим их использованием в качестве биоудобрений. Полученные знания могут быть полезны при создании усовершенствованных технологий доочистки (polishing phase) сточных вод от фосфора и азота с помощью культур микроводорослей и цианобактерий, кондиционированных путем лишения их биогенных элементов.

В работе усовершенствованы методы аналитической ПЭМ для количественной оценки содержания и локализации внутриклеточных ФоС- и АС-включений, а именно, разработан усовершенствованный метод анализа ЭФПЭМ-карт фосфора и азота для количественной оценки

содержания и локализации резервов фосфора и азота в клетках фототрофных микроорганизмов. Указанный метод может быть полезен для цитологических и микробиологических исследований, а также во всех областях, где необходимы (сравнительные) оценки субклеточного распределения цианофитина, полифосфатов и других включений, богатых фосфором и (или) азотом.

Методология и методы исследования. В настоящей работе основные результаты получены на: (1) модельных зеленых микроводорослях *Chlorella vulgaris* и *Desmodesmus* sp.; (2) модельной динофитовой микроводоросли *Amphidinium carterae*; и (3) модельных цианобактериях *Nostoc* sp. В ходе выполнения работы был использован метод клеточной биологии – традиционная ПЭМ в комбинации с современными методами аналитической ПЭМ с применением методов молекулярной биологии и современных методов спектроскопии: спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) и лазерной сканирующей микро-спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).

Положения, выносимые на защиту:

1) Аналитическая ПЭМ дает ценную информацию о субклеточном распределении резервов фосфора и азота у фототрофных микроорганизмов.

2) Формирование и структура фосфорсодержащих включений отражают функционирование механизмов акклимации микроводорослей к доступности фосфора в среде культивирования.

3) Формирование фосфорсодержащих включений при восстановлении фосфорного питания у цианобактерий происходит не только при наличии экзогенного связанного азота, но и в условиях diazotрофии.

4) Азотсодержащие включения микроводорослей представляют собой пуриновые кристаллы и выполняют роль внутриклеточных резервов азота.

5) Основные резервы фосфора в микроводорослях локализованы в вакуолях и (или) цитозоле.

Апробация работы. Основные результаты работы изложены в 8 статьях в зарубежных рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы доложены на трех международных конференциях (Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», 11-15 апреля 2016, Москва, Россия; Российская международная конференция по

криоэлектронной микроскопии RICSEM-2017, 6-8 июня 2017, Москва, Россия; 6th Congress of International Society for Applied Phycology, 18-23 июня 2017, Нант, Франция) и одной всероссийской конференции с международным участием (Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», 24-27 декабря 2014, Москва, Россия).

3. Обзор литературы

3.1. Краткий обзор методов аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

Метод традиционной ПЭМ является мощным инструментом для исследований ультраструктуры и морфологии различных биологических объектов. Использование методов аналитической ПЭМ совместно с традиционной ПЭМ предоставляет уникальную возможность получать информацию об элементном составе изучаемых объектов с нанометровым разрешением [Egerton, 2009; Brydson et al., 2014]. Среди методов аналитической ПЭМ широкое применение в элементном анализе биологических объектов нашли метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) [Warley, 2016], метод спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и основанное на СХПЭЭ элементное картирование методом энергофильтрующей ПЭМ (ЭФПЭМ) [Aronova, Learman, 2012]. Ниже кратко рассмотрим физические принципы каждого из этих методов.

3.1.1. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС) и спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ)

В методах аналитической ПЭМ используются неупругорассеянные электроны, то есть электроны, которые при прохождении через образец в колонне просвечивающего электронного микроскопа теряют часть своей энергии. Метод ЭДРС использует один из процессов неупругого рассеяния электронов, при котором происходит возбуждение внутренних оболочек атомов образца [Синдо, Оикава, 2006, С. 17; Эгертон, 2010, С. 181-182]. Обратный переход атомов образца из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием характеристического рентгеновского излучения, которое и измеряется в методе ЭДРС [Буравков, Шахмалов, 1983; Brydson et al., 2014].

В методе СХПЭЭ так же, как и в ЭДРС, используются неупругорассеянные электроны. Однако при регистрации спектров ХПЭЭ измеряются общие потери энергии прошедших через образец в колонне просвечивающего электронного микроскопа электронов. Соответственно, метод СХПЭЭ (в отличие от ЭДРС) учитывает все процессы неупругого рассеяния электронов, включающие коллективные возбуждения валентных электронов (плазмонные возбуждения), возбуждение внутренних оболочек атомов, эмиссию тормозного рентгеновского излучения с непрерывным спектром (тормозное излучение) и другие [Синдо, Оикава, 2006, С. 17].

Таким образом, в методе ЭДРС детектируется вторичный сигнал по отношению к процессу возбуждения атома образца падающими электронами — характеристическое рентгеновское излучение, генерируемое атомами образца при переходе из возбужденного состояния в основное. Метод же СХПЭЭ основан на детектировании первичного сигнала, а именно, на измерении энергии, которая теряется прошедшими электронами в результате возбуждения атомов образца [Эгертон, 2010, С. 197].

Для иллюстрации рассмотрим процессы, происходящие при возбуждении внутренних оболочек атома образца в колонне просвечивающего электронного микроскопа на примере возбуждения электрона К-оболочки (рис. 1).

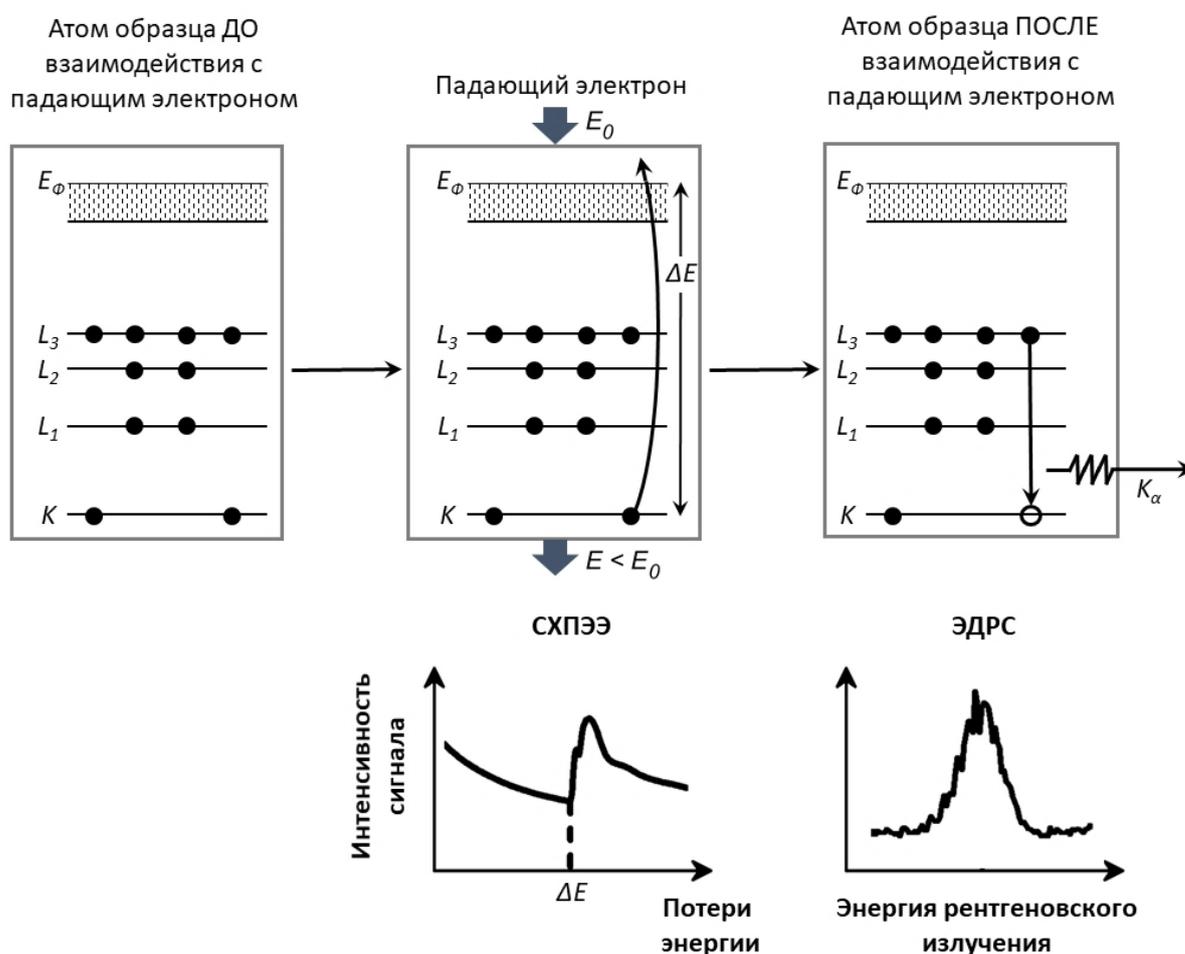


Рис. 1 Возбуждение внутренних оболочек атома образца в колонне просвечивающего электронного микроскопа и получающиеся в результате этого процесса спектр потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и энергодисперсионный спектр (ЭДРС). E_ϕ — уровень Ферми, ниже которого все энергетические уровни заняты электронами в основном состоянии; K , L_1 , L_2 , L_3 — внутренние оболочки атома образца; E_0 — энергия падающего на образец электрона до взаимодействия с атомом образца; ΔE — разница энергий между К-оболочкой и уровнем Ферми; E — энергия падающего электрона после прохождения через образец; K_α — рентгеновский фотон, образовавшийся в результате перехода атома образца из возбужденного состояния в основное (из [Синдо, Оикава, 2006, С. 25] с изменениями)

Падающий электрон в колонне просвечивающего электронного микроскопа при прохождении через образец вступает во взаимодействие с электроном внутренней К-оболочки атома образца и отдает ему часть своей энергии (рис. 1). При этом электрон, получивший энергию, переходит в возбужденное состояние. Поскольку все энергетические уровни ниже уровня Ферми заняты электронами в основном состоянии, электрон в возбужденном состоянии может перейти только на один из незанятых энергетических уровней выше уровня Ферми [Синдо, Оикава, 2006, С. 25] (рис. 1). Таким образом, когда падающий электрон, проходя через образец, теряет количество энергии, большее чем ΔE , которое соответствует разнице энергий между К-оболочкой и уровнем Ферми, то вероятность перехода электрона с К-оболочки атома образца на незанятый энергетический уровень выше уровня Ферми резко возрастает. В результате при построении спектра потерь энергии электронов (графика зависимости количества прошедших через образец электронов (интенсивности сигнала) от величины потери энергии ими) в спектре потерь энергии возникает острый пик, начинающийся со значения ΔE (рис. 1). При этом у данного пика имеется «хвост» в области более высоких энергий. Благодаря своей форме, пик в спектре потерь энергии также называют краем (поглощения). Поскольку пороговая энергия края является определенной для каждого химического элемента, то по значению ΔE в спектре потерь можно проводить идентификацию элементов в образце [Эгертон, 2010, С. 199].

При переходе атома образца из возбужденного состояния в основное электрон с более высокого энергетического уровня переходит на вакансию на более низком энергетическом уровне способом, удовлетворяющим правилам отбора [Синдо, Оикава, 2006, С. 26, 145, 146; Эгертон, 2010, С. 181]. При этом избыточная энергия выделяется в виде характеристического рентгеновского излучения [Буравков, Шахмалов, 1983; Brydson et al., 2014], в случае с переходом электрона с L-оболочки на незанятое состояние К-оболочки в виде рентгеновского фотона K_α (рис. 1). При построении энергодисперсионного спектра (графика зависимости количества рентгеновских фотонов (интенсивности сигнала) от величины их энергии) в спектре появляется пик с энергией указанного рентгеновского фотона (рис. 1). Поскольку характеристическое рентгеновское излучение имеет конкретную энергию, соответствующую каждому элементу, то, измеряя энергию пика излучения в энергодисперсионном спектре, можно проводить идентификацию элементов в образце [Буравков, Шахмалов, 1983; Синдо, Оикава, 2006, С. 26].

Анализ образцов методами ЭДРС и СХПЭЭ в режиме сканирующей ПЭМ позволяет получать информацию об элементном составе выбранного точечного участка образца, например, от интересующей субклеточной структуры.

Следует отметить, что для метода СХПЭЭ является принципиальным использование ультратонких срезов образцов, поскольку для данного метода необходимо, чтобы толщина среза была не больше средней длины свободного пробега электрона (для наилучших результатов — не более половины). Средняя длина свободного пробега электрона — среднее расстояние, которое электрон проходит между актами рассеяния [Синдо, Оикава, 2006, С. 20]. Такие условия необходимы для того, чтобы избежать возникновения множественного рассеяния — процесса, в результате которого один падающий электрон при прохождении через образец значительной толщины теряет энергию на двух и более электронах атомов образца, что затрудняет анализ и интерпретацию спектров потерь энергии.

3.1.2. Энергофильтрующая ПЭМ (ЭФПЭМ) и элементное картирование

Энергетическая фильтрация — это получение двумерных изображений с помощью СХПЭЭ [Синдо, Оикава, 2006, С. 130]. Фильтрованное по энергии изображение в просвечивающем электронном микроскопе получают путем селекции электронов с выбранной энергией. Метод, с помощью которого получают фильтрованные по энергии ПЭМ-изображения, называют энергофильтрующей ПЭМ (ЭФПЭМ). Изображения с энергетической фильтрацией элемента получают путем пропускания на камеру электронов с конкретным значением потери энергии [Эгертон, 2010, С. 199-200].

Данный метод позволяет получать ПЭМ-изображения, фильтрованные по энергии, соответствующей краю поглощения интересующего нас элемента. Однако, к сожалению, для проведения элементного картирования (регистрации карты распределения интересующего элемента) получения такого изображения недостаточно, поскольку в спектре потерь энергии регистрируется высокий фон. Высокий фон в спектрах потерь генерируется проходящими через образец электронами, теряющими энергию при прохождении вблизи ядер атомов. Для получения чистого изображения, показывающего распределение элемента, требуется обработка фильтрованного изображения путем вычитания фоновой компоненты под краем поглощения данного элемента в его спектре [Синдо, Оикава, 2006, С. 130].

Энергетически-фильтрованное изображение для выбранного элемента является суперпозицией изображения в пике данного элемента и фона. Чтобы получить чистое изображение распределения данного элемента, из него необходимо вычесть изображение фона. В настоящее время для вычитания фона широко применяются два метода: трехконный метод и двухконный метод (метод скачкового отношения) [Синдо, Оикава, 2006, С. 131].

В двухоконном методе в одном и том же поле зрения записывают два ЭФПЭМ-изображения: одно при энергии E_1 непосредственно ниже значения пика потерь энергии (края поглощения) интересующего элемента (т.н. предкраевое изображение), второе — при энергии E_2 сразу над краем поглощения (т.н. посткраевое изображение) (см. рис. 2 а). Затем для каждого пикселя каждого из этих двух изображений рассчитывают интенсивность сигнала по следующей формуле [Синдо, Оикава, 2006, С. 131]:

$$I_C(x, y) = \frac{I_2(x, y)}{I_1(x, y)}, \quad (1)$$

где $I_C(x, y)$ — результирующая интенсивность сигнала интересующего элемента для пикселя карты с координатами (x, y) , $I_1(x, y)$ — интенсивность этого пикселя в предкраевом изображении, $I_2(x, y)$ — интенсивность этого пикселя в посткраевом изображении.

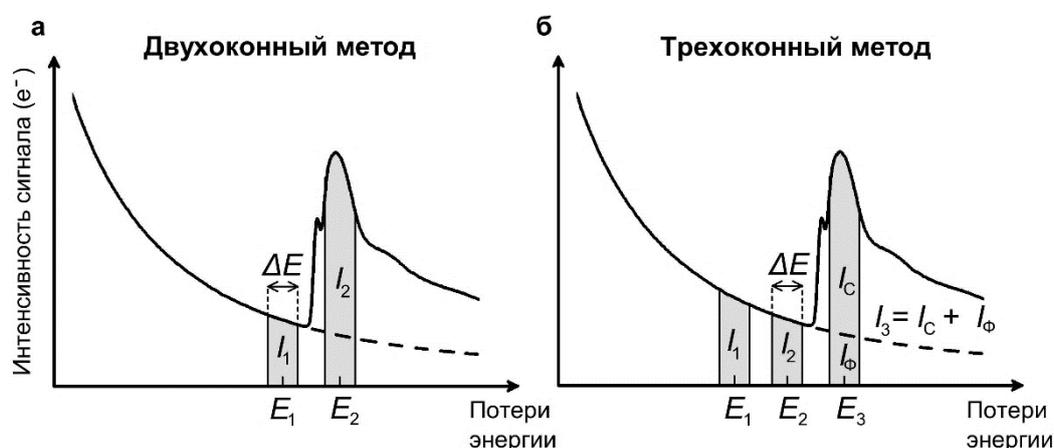


Рис. 2. Принцип двухоконного (а) и трехоконного (б) методов вычитания фона при элементном картировании методом ЭФПЭМ. В (а): E_1 — значение энергии первого «окна» ниже значения пика потерь энергии (края поглощения) интересующего элемента для получения предкраевого изображения, E_2 — значение энергии второго «окна» сразу над краем поглощения для получения посткраевого изображения, I_1 и I_2 — интенсивность сигнала в первом и во втором энергетическом «окне», соответственно. В (б): E_1 — значение энергии первого «окна» ниже значения края поглощения интересующего элемента для получения первого предкраевого изображения, E_2 — значение энергии второго «окна» ниже значения края поглощения интересующего элемента для получения второго предкраевого изображения, E_3 — значение энергии третьего «окна» сразу над краем поглощения для получения посткраевого изображения, I_1 , I_2 и I_3 — интенсивность сигнала в первом, во втором и третьем энергетическом «окне», соответственно, I_C — результирующая интенсивность сигнала интересующего элемента, I_ϕ — рассчитанная интенсивность фона. ΔE — величина «окна», интервал значений потерь энергии, используемый для получения ЭФПЭМ-изображений (из [Синдо, Оикава, 2006, С. 131-132] с изменениями)

Результирующая интенсивность сигнала интересующего элемента $I_C(x,y)$ в двухоконном методе показывает отношение сигнала от элемента к фону, поэтому второе название этого метода — метод скачкового отношения. Хотя результирующая интенсивность сигнала $I_C(x,y)$ в двухоконном методе не дает количественной информации о содержании элемента, данный метод полезен для наблюдения распределения элементов в образцах, дающих сильный фон [Синдо, Оикава, 2006, С. 132].

В трехоконном методе необходимо записать три ЭФПЭМ-изображения: два предкраевых изображения (I_1 и I_2) и одно посткраевое изображение (I_3) (см. рис. 2 б). Затем интенсивность фона аппроксимируют степенной функцией согласно следующей формуле:

$$I_{\Phi} = C \times E^{-r}, \quad (2)$$

где I_{Φ} — интенсивность фона, C и r — параметры, рассчитанные исходя из предкраевых изображений.

Таким образом, рассчитывают интенсивность фона I_{Φ} на посткраевом участке спектра (см. рис. 2 б). Чтобы получить чистый сигнал интересующего элемента $I_C(x,y)$ для каждого пикселя карты с координатами (x,y) , из посткраевого изображения $I_3(x,y)$ вычитается фон согласно следующей формуле:

$$I_C(x,y) = I_3(x,y) - I_{\Phi}(x,y), \quad (3)$$

где $I_C(x,y)$ — результирующая интенсивность сигнала интересующего элемента для пикселя карты с координатами (x,y) , $I_3(x,y)$ — интенсивность этого пикселя в посткраевом изображении, I_{Φ} — интенсивность фона, рассчитанная для данного пикселя.

Результирующая интенсивность сигнала интересующего элемента $I_C(x,y)$ в трехоконном методе показывает двумерное распределение чистого сигнала от интересующего элемента и, таким образом, дает количественную информацию о содержании данного элемента [Синдо, Оикава, 2006, С. 132]. Однако данный метод не лишен недостатков: элементные карты, рассчитанные таким методом, содержат высокий уровень шума из-за проводимой аппроксимации и вычисления двух констант.

3.2. Структура клеток окислительных фотоавтотрофных микроорганизмов

К одноклеточным окислительным фотоавтотрофным микроорганизмам относятся прокариотические цианобактерии и эукариотические микроводоросли. Ниже кратко рассмотрим ультраструктурную организацию клеток этих микроорганизмов и ее изменения при отсутствии азота и фосфора в среде.

3.2.1. Ультраструктурная организация клеток цианобактерий и микроводорослей

Общая схема ультраструктурной организации цианобактерий представлена на рис. 3.

Как у всех прокариот, у цианобактерий нет оформленного ядра: геномная ДНК у них расположена непосредственно в цитозоле в зоне так называемого нуклеоида (рис. 3). Рядом с зоной нуклеоида локализуются скопления рибосом (рис. 3).

Цианобактерии также, как и другие прокариотические микроорганизмы, не имеют мембранных органоидов, за исключением плоских мембранных «цистерн» – фотосинтезирующих тилакоидов, мембраны которых покрыты белковыми светособирающими комплексами – фикобилисомами (рис. 3). Ключевой фермент темновых реакций фотосинтеза – фермент рибулозобисфосфаткарбоксилаза – локализован у цианобактерий в многогранных однослойных белковых телах полиэдрической формы – карбоксисомах (рис. 3) [Allen, 1984]. Отвечающие за плавучесть клеток газовые везикулы (рис. 3) у цианобактерий не являются мембранными органоидами, поскольку представляют собой наполненные воздухом структуры, оболочка которых состоит из белков [Walsby, 1994].

К углерод-запасующим компартментам клеток цианобактерий относятся α -гранулы гликогена, липидные β -гранулы, и гранулы поли-(R)-3-гидроксипутирата (ПГБ) (рис. 3).

Цианобактерии относятся к грамотрицательным бактериям: их клетки имеют многослойную клеточную стенку, расположенную снаружи цитоплазматической мембраны и состоящую из пептидогликанового слоя, периплазматического пространства и наружной мембраны (рис. 3). На поверхности клеточных стенок многих цианобактерий выявляются разнообразные структуры такие, как шипы, пили и поверхностный S-слой (рис. 3, [Баулина, 2010, С. 19]).

В клетках цианобактерий функцию резервов фосфора и азота осуществляют расположенные в цитозоле полифосфатные PhoC-включения (см. раздел 3.3) и AC-включения (цианофициновые гранулы, см. раздел 3.4.2), соответственно (рис. 3).

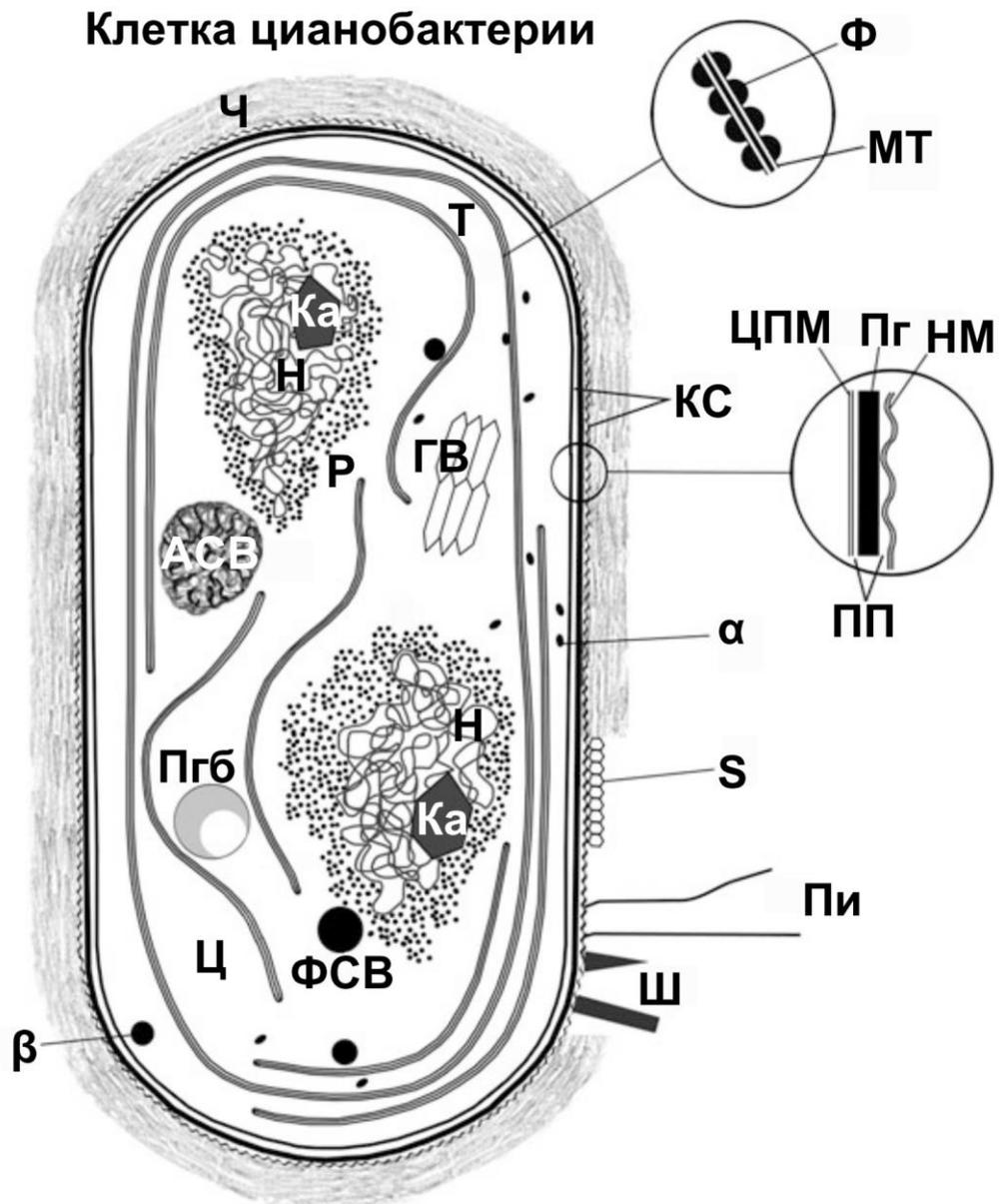


Рис. 3 Общая схема ультраструктурной организации вегетативной клетки цианобактерии на срезе. АСВ — азотсодержащее включение (цианофициновая гранула), α — α-гранулы гликогена, β — липидная β-гранула высокой электронной плотности, ГВ — газовые везикулы, имеющие белковую оболочку, Ка — карбоксисома (полиэдральное тело, содержащее рибулозобисфосфаткарбоксилазу), КС — клеточная стенка, МТ — мембрана тилакоида, Н — зона нуклеоида, НМ — наружная мембрана, Пг — пептидогликановый слой, Пгб — гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, Пи — пили, ПП — периплазматическое пространство, Р — рибосомы, Т — тилакоиды, Ц — цитозоль, ЦПМ — цитоплазматическая мембрана, Ч — чехол, Φ — фикобилисома, ФСВ — фосфорсодержащее полифосфатное включение, Ш — шипы, S — поверхностный S-слой (адаптировано из [Баулина, 2010, С. 19])

Микроводоросли, в отличие от цианобактерий, относятся к эукариотическим организмам. Их клетки содержат характерные для эукариотических клеток мембранные структуры: ядро,

вакуоли, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум и митохондрии (рис. 4). Снаружи от цитоплазматической мембраны клетки микроводорослей окружены клеточной стенкой, состоящей из полисахаридов и пектиновых веществ [Горбунова, 1991, С.17-18].

Клетки зеленых микроводорослей содержат окруженные двухмембранной оболочкой фотосинтезирующие пластиды – хлоропласты (рис. 4). Хлоропласты включают уплощенные мембранные «мешочки» – тилакоиды, содержащие хлорофилл и каротиноиды. В хлоропласте микроводорослей также выявляются следующие структуры (рис. 4): пиреноид, являющийся местом локализации рибулозобисфосфаткарбоксилазы; крахмальные зерна, представляющие собой запасной продукт для хранения излишков фотоассимилированного углерода; и пластоглобулы – углерод-запасающие липидные глобулы внутри хлоропласта. Углерод-запасающие липидные глобулы микроводорослей также локализуются и в цитозоле (рис. 4).

Функцию основных внутриклеточных резервов фосфора в микроводорослях выполняют полифосфатные ФоС-включения (рис. 4, см. раздел 3.3), которые локализуются в различных клеточных компартментах, таких как цитозоль, вакуоли, хлоропласт, ядро [Hase et al., 1963; Voříšek, Zachleder, 1984].

Для некоторых видов микроводорослей [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972; Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013; Moudříková et al., 2017a] было показано, что в вакуолях их клеток могут накапливаться АС-включения (рис. 4). Указанные АС-включения можно рассматривать в качестве потенциальных внутриклеточных резервов азота (см. раздел 3.4.3).

Клетка микроводоросли

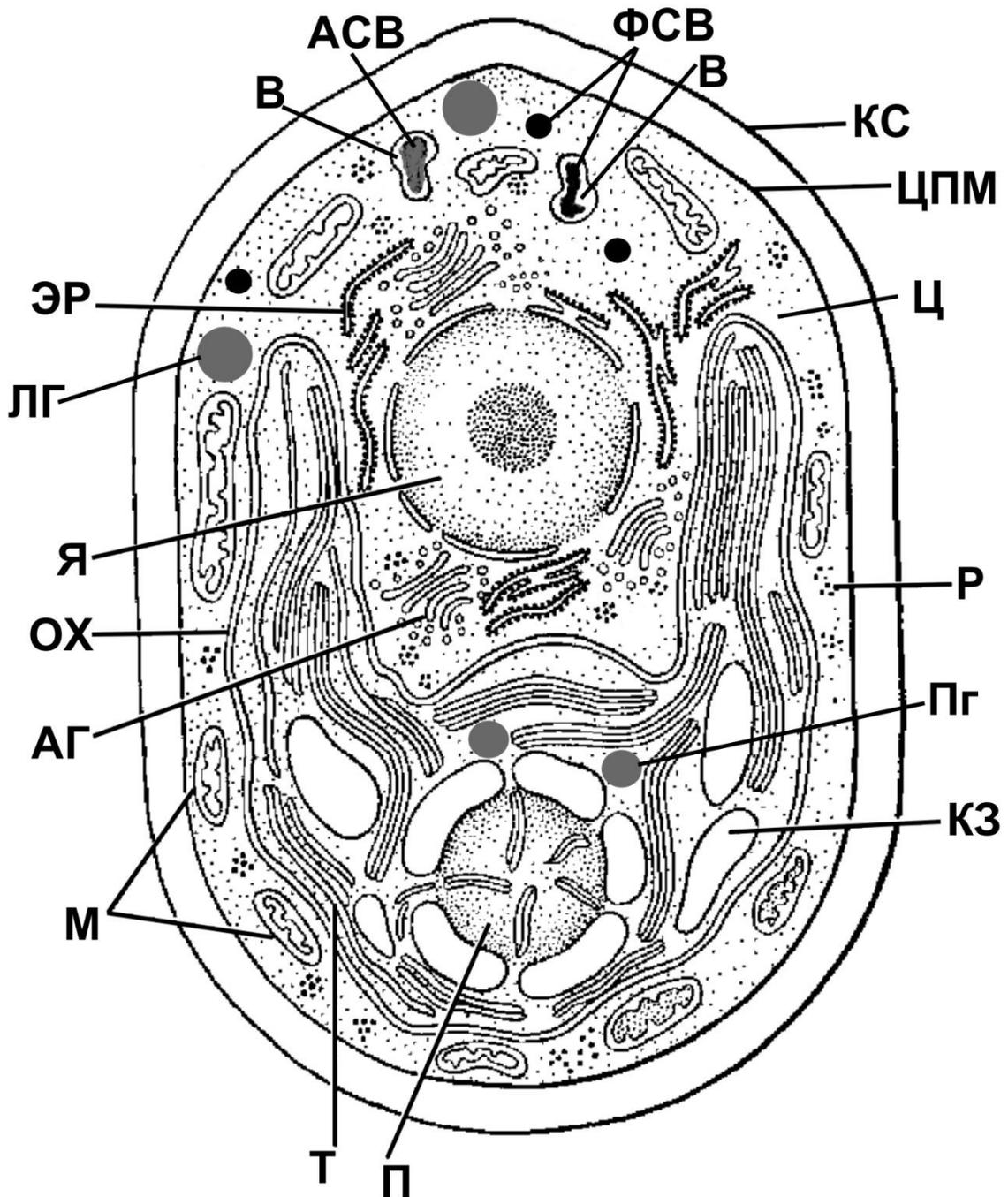


Рис. 4 Общая схема ультраструктурной организации клетки зеленой микроводоросли на срезе. АГ – Аппарат Гольджи, АСВ — азотсодержащее включение, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно (в хлоропласте), КС – клеточная стенка, ЛГ — липидная глобула, М – митохондрии, ОХ – оболочка хлоропласта (двухмембранная), П – пиреноид (в хлоропласте), Пг – пластоглобула (=липидная глобула в хлоропласте), Р – рибосомы, Т – тилакоиды хлоропласта, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Ц – цитозоль, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Я — ядро (адаптировано из [Горбунова, 1991, С.40])

3.2.2. Изменения в ультраструктурной организации микроводорослей и цианобактерий при наличии и отсутствии азота и фосфора в среде культивирования

Цианобактерии по сравнению с большинством клеток эукариотических микроорганизмов обладают менее совершенной системой гомеостаза, но вместе с ней значительно более выраженной способностью быстро перестраиваться (структурно и метаболически) в изменившихся условиях местообитания [Баулина, 2010, С. 11]. Адаптационные возможности цианобактерий ярко выражаются в значительных изменениях их ультраструктуры при культивировании в различных условиях (при голодании по макро- или микроэлементам, на ярком свете, в темноте и др.), то есть в так называемой ультраструктурной пластичности цианобактерий [Баулина, 2010, с. 12-14].

При культивировании цианобактерий в среде, дефицитной по фосфору либо азоту, в клетках наблюдается общее снижение скорости синтеза белков (снижение количества рибосом), деградация тилакоидов, формирование липидных β -гранул и интенсивное аккумулятивное включение определенных внутриклеточных включений [Jensen, Sicko, 1974; Allen, 1984; Schwarz, Forchhammer, 2005]. При голодании по фосфору к аккумулятивным включениям относятся АС-включения (цианофициновые гранулы), при голодании по азоту – полифосфатные ФоС-включения [Jensen, Sicko, 1974; Barlow et al., 1979; Allen, 1984]. При этом при голодании по фосфору из клеток исчезают ФоС-включения, а при голодании по азоту – АС-включения [Allen, 1984].

При восстановлении фосфорного или азотного питания наблюдается обратная картина ультраструктурных реорганизаций клеток цианобактерий: после добавления в среду дефицитного элемента в клетках начинают формироваться ФоС- (см. раздел 3.3.3) или АС-включения, соответственно [Jensen, Sicko, 1974; Allen, 1984].

Ультраструктурная реорганизация клеток эукариотических микроводорослей при голодании по азоту и фосфору в общих чертах схожа с реорганизацией в клетках цианобактерий, хотя их изменение ультраструктуры не выглядит настолько значительным, как у цианобактерий [Баулина, 2010, С. 11]. При голодании по азоту либо фосфору в клетках микроводорослей происходит аккумулятивное включение углерод-запасующих структур (крахмальных зерен и/или липидных глобул) [Grobelaar, 2004; Pribyl et al., 2014; Vitova et al., 2015], а также контролируемая деградация тилакоидов в хлоропласте, которая сопровождается уменьшением общей площади хлоропласта в клетках [Gorelova et al., 2015; 2018]. Кроме того, в микроводорослях при азотном голодании происходит увеличение толщины клеточной стенки за счет утолщения полисахаридного слоя [Gorelova et al., 2015].

При культивировании микроводорослей в бесфосфорной среде резервы фосфора – ФоС-включения – метаболизируются клетками [Adamec et al., 1979; Voříšek, Zachleder, 1984; Nishikawa et al., 2006], а при восстановлении фосфорного питания – вновь накапливаются [Nishikawa et al., 2006; Yagisawa et al., 2016] (подробнее см. раздел 3.3.3).

На настоящий момент в литературе нет данных о динамике АС-включений микроводорослей при азотном голодании и при восстановлении азотного питания, а также при фосфорном голодании, поэтому данные включения можно рассматривать лишь в качестве потенциальных внутриклеточных резервов азота (подробнее см. раздел 3.4.3).

3.3. Внутриклеточные резервы фосфора цианобактерий и микроводорослей

3.3.1. Полифосфатные включения в качестве внутриклеточных резервов фосфора

Фосфор является одним из ключевых макроэлементов, необходимых для функционирования живых организмов: он входит в состав важнейших соединений, таких как нуклеиновые кислоты, АТФ и фосфолипиды, и играет ключевую роль в энергетических процессах клетки [Lehninger et al., 2000, P. 23, 51, 280, 487]. Фосфор в клетках микроводорослей и цианобактерий может накапливаться в виде фосфорсодержащих включений (ФоС-включений), которые в основном представляют собой полифосфатные включения [Kuhl, 1974; Allen, 1984; Nishikawa et al., 2006].

Полифосфаты имеют общую формулу $M_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ [Kulaev et al., 2004, P. 5]: их анионы представляют собой цепочки, в которых каждый атом фосфора связан с каждым соседним атомом фосфора через атом кислорода, образуя таким образом линейную неразветвленную структуру (см. рис. 5). Анионы полифосфатов могут образовывать комплексы с двухвалентными катионами, такими как Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} [Kulaev et al., 2004, P. 45-46].

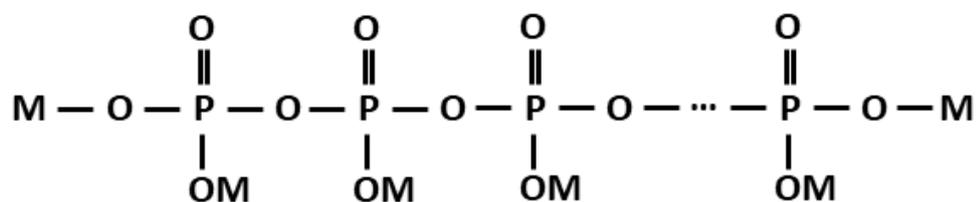


Рис. 5. Структура полифосфатной цепи, в которой М — протон H^+ или одновалентный катион металла (K^+ , Na^+) (из [Kulaev et al., 2004, P. 5])

Полифосфатные включения в клетках микроводорослей и цианобактерий являются депо для внутриклеточных резервов фосфора: в случае недостатка доступного фосфора в среде данные

включения клеткой метаболизируются [Adames et al., 1979; Allen, 1984; Voříšek, Zachleder, 1984; Nishikawa et al., 2006], а в случае избытка, наоборот, аккумулируются [Allen, 1984; Powell et al., 2008; 2009]. Запасание фосфора в виде полифосфатов характерно для многих видов цианобактерий и эукариотических микроводорослей, хотя для некоторых видов способность к образованию полифосфатов так и не была показана [Cembella et al., 1984].

Показана гетерогенность полифосфатов в микроводорослях и цианобактериях, заключающаяся в их различной растворимости и, по-видимому, в различной функциональности. В работах Miyachi с соавторами [Miyachi, Miyachi, 1961; Miyachi, Tamiya, 1961a; 1961b; Miyachi et al., 1964] описаны четыре фракции полифосфатов в микроводорослях: А, В, С и D. Каждая фракция полифосфатов является донором фосфора для конкретного метаболического пути в зависимости от освещенности и фазы клеточного цикла. В синхронных культурах в течение жизненного цикла микроводорослей поглощаемые из среды неорганические фосфаты сначала обнаруживаются в полифосфатах фракции С, затем в полифосфатах фракции А, нуклеотидах и в ДНК [Miyachi, Tamiya, 1961a]. Фракции полифосфатов А и С представляют собой более доступные кислото-растворимые фракции полифосфатов, которые аккумулируются на свету при избытке неорганического фосфата в среде. Аккумуляция фракций А и С в значительной степени зависит от интенсивности фотосинтеза. Указанные фракции являются донорами фосфата для ДНК и белков [Miyachi, Miyachi, 1961]. Биосинтез и деградация щелочнорастворимых, не растворимых в кислоте полифосфатных фракций В и D зависят от других источников энергии, а не от фотосинтеза. Фракции В и D являются эндогенными источниками фосфата, которые используются в отсутствие внешних источников фосфора. Наличие кислото-растворимой и щелочнорастворимой (=не растворимой в кислоте) фракций полифосфатов также было показано и для цианобактерий [Grillo, Gibson, 1979].

Ниже будут рассмотрены пути метаболизма полифосфатов в цианобактериях и в микроводорослях.

3.3.2. Пути биосинтеза и катаболизма полифосфатов

На рис. 6 представлена обобщенная схема метаболизма полифосфатов в клетках микроводорослей и цианобактерий. В основном, ферменты цианобактерий, участвующие в синтезе и катаболизме полифосфатов, изучены более подробно, чем ферменты эукариотических микроводорослей [Dyhrman, 2016, P. 162]. Ниже рассмотрим основные стадии метаболизма полифосфатов у обеих групп микроорганизмов подробнее.

В отношении доступности для живых организмов соединения фосфора в окружающей среде делятся на две группы: биодоступные или биодоступные. К простым биодоступным формам относится неорганический фосфат (см. рис. 6), который микроводоросли и цианобактерии способны транспортировать из среды в клетку в неизменном виде [Atlas et al., 1976; Dignum et al., 2005]. К неорганическим фосфатам относятся анионы ортофосфорной кислоты: фосфат PO_4^{3-} , гидрофосфат HPO_4^{2-} и дигидрофосфат H_2PO_4^- . Более сложные формы биодоступного фосфора, включающие растворенный органический фосфор (dissolved organic phosphorus = DOP), разлагаются до неорганического фосфата под действием специализированных ферментов — фосфатаз, ассоциированных с клеточной стенкой или секретируемых клетками в среду (см. рис. 6, реакция №1). Одними из важнейших среди указанных ферментов у микроводорослей и цианобактерий являются щелочные фосфатазы.

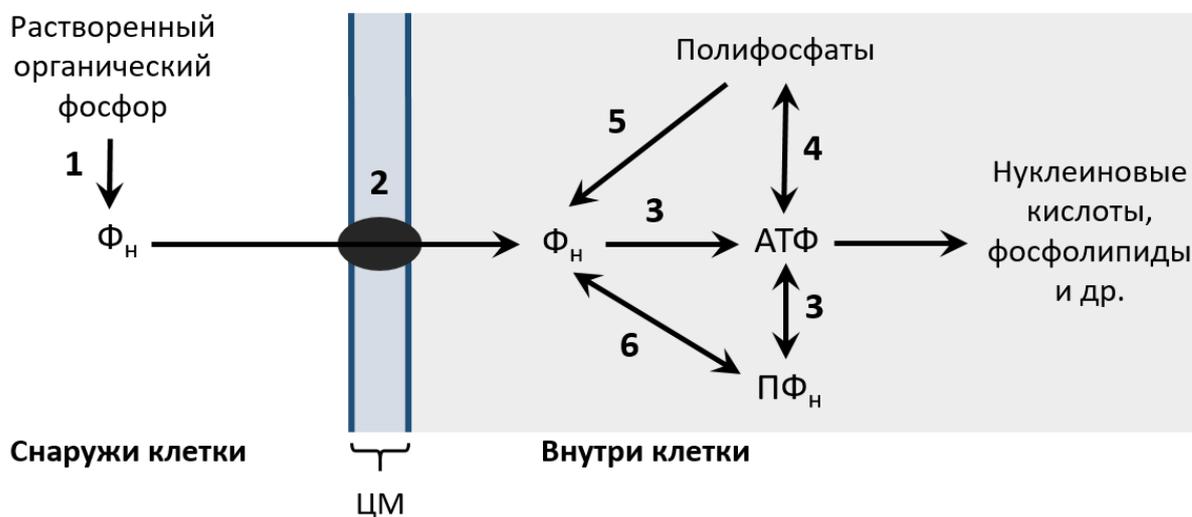


Рис. 6 Обобщенная схема метаболизма полифосфатов в клетках микроводорослей и цианобактерий. Числа на рисунке соответствуют следующим ферментам: 1 — внеклеточные фосфатазы, 2 — система транспорта неорганического фосфата, 3 — АТФ-синтаза, 4 — полифосфат-киназа, полифосфат-полимераза, 5 — полифосфатаза, 6 — пиррофосфатаза. Ф_n — неограниченный фосфат, ПФ_n — пиррофосфат, ЦМ — цитоплазматическая мембрана. Наружная мембрана клеточной стенки цианобактерий не изображена (из [Dignum et al., 2005] с изменениями)

Щелочные фосфатазы являются одними из наиболее хорошо изученных ферментов, используемых цианобактериями для гидролиза соединений растворенного органического фосфора. Указанные ферменты катализируют реакцию отщепления неорганического фосфата от соединений с фосфомоноэфирными связями. Щелочные фосфатазы цианобактерий — это разнообразная группа фосфатаз, которые кодируются большим количеством различных генов [Scanlan et al., 2009]. В многочисленных исследованиях показано, что экспрессия указанных

ферментов обычно значительно увеличивается при низком содержании неорганического фосфата в среде [см. соответствующие ссылки в обзоре Dyhrman, 2016, P. 162].

По сравнению с цианобактериями, гены щелочных фосфатаз и кодируемые ими фосфатазы у микроводорослей изучены слабо. Известны только три выделенные, очищенные и охарактеризованные щелочные фосфатазы микроводорослей, среди которых *Chlamydomonas reinhardtii* [Quisel et al., 1996], *Prorocentrum minimum* (= *Prorocentrum cordatum*) [Dyhrman, Palenik, 1997] и *Emiliana huxleyi* [Xu et al., 2006]. Для двух предполагаемых щелочных фосфатаз диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* [Dyhrman et al., 2012] и пелагофитовой водоросли *Aureococcus anophagefferens* [Wurch et al., 2011], выявленных в транскриптомах соответствующих микроводорослей, показано, что их экспрессия, как и у цианобактерий, увеличивается при низком содержании неорганического фосфата в среде.

В геномах цианобактерий были найдены гены секретируемых кислых фосфатаз, так называемых пурпурных кислых фосфатаз [Schenk et al., 2000; Yeung et al., 2009]. Пурпурные кислые фосфатазы участвуют в расщеплении фосфоэфирных связей различных субстратов и отличаются от других фосфатаз кислым рН-оптимумом и характерным фиолетовым цветом [Yeung et al., 2009]. Характерный цвет фосфатаз обусловлен переносом заряда с тирозина на атом металла с валентностью III (Fe, Mn или Zn) в активном центре фермента [Schenk et al., 1999]. Указанные фосфатазы цианобактерий имеют высокую степень гомологии с пурпурными кислыми фосфатазами растений и млекопитающих [Schenk et al., 2000]. В многочисленных исследованиях показано, что у растений данные секретируемые фосфатазы принимают непосредственное участие в отщеплении неорганического фосфата от органических фосфорсодержащих соединений в почве [см. соответствующие ссылки в обзоре Schenk et al., 2013, P. 474]. В геномах некоторых зеленых микроводорослей также были аннотированы гены пурпурных кислых фосфатаз, а именно, в геномах микроводорослей *Chlorella sorokiniana* (GenBank ID: PRW60148.1) [Arriola et al., 2018], *Micractinium conductrix* (GenBank ID: PSC73849.1) [Arriola et al., 2018] и *Chlorella variabilis* (GenBank ID: XP_005845616.1) [Blanc et al., 2010].

Поглощение неорганического фосфата клетками осуществляется с помощью специальных фосфатных транспортеров, расположенных в цитоплазматической мембране клеток (см. рис. 6, реакция №2); их тип и обилие в мембране влияют на кинетику поглощения субстрата.

У цианобактерий транспортировка через наружную мембрану (на рис. 6 не изображена) неорганического фосфата и некоторых органических фосфорсодержащих соединений, таких как β-глицерофосфат и глюкозо-6-фосфат, обеспечивается порообразующими транспортными

системами — поринами, расположенными непосредственно в наружной мембране [Hoiczuk, Hansel, 2000; Reistetter et al., 2013]. Расположенные в цитоплазматической мембране цианобактерий фосфатные транспортеры разделяют по аффинности к переносимому через мембрану фосфату на низкоскоростные высокоаффинные и высокоскоростные низкоаффинные транспортеры. Каждый из типов транспортеров активируется в зависимости от наличия либо отсутствия фосфора в среде. Активация системы фосфатных транспортеров высокой аффинности происходит при голодании по фосфору (показано для цианобактерии *Synechococcus* sp. [Donald et al., 1997], для высокоаффинных транспортеров *phoA*, *pstS* цианобактерии *Prochlorococcus* MED4 [Reistetter et al., 2013] и для высокоаффинного транспортера *pstS2* *Synechocystis* sp. [Pitt et al., 2010]). Активация системы фосфатных транспортеров низкой аффинности, напротив, происходит при наличии достаточного количества фосфора в среде (показано для низкоаффинного транспортера *pstS1* *Synechocystis* sp. [Pitt et al., 2010]).

Обычно в геномах эукариотических микроводорослей выявляется множество фосфатных транспортеров, которые имеют высокую степень гомологии с фосфатными транспортерами других организмов [Gobler et al., 2011; Read et al., 2013]. В геноме модельной зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* было выявлено несколько фосфатных транспортеров: четыре транспортера (РТА1-4), имеющих высокую степень гомологии с H^+ -фосфатными транспортерами растений и транспортером Pho84p *Saccharomyces cerevisiae*, а также по крайней мере 10 гомологов (РТВ1-9 и РТВ12) натрий-фосфатных транспортеров животных и транспортера Pho89p *S. cerevisiae* [Grossman, Aksoy, 2015, P. 349]. Несмотря на разнообразие выявляемых в геномах микроводорослей фосфатных транспортеров, лишь малая их часть охарактеризована в отношении их непосредственной функции в клетке [Dyhrman, 2016, P. 160].

Так же, как и у цианобактерий, у эукариотических микроводорослей фосфатные транспортеры делятся на две группы: высокоаффинные и низкоаффинные. При недостатке фосфора в среде активируется система фосфатных транспортеров высокой аффинности, а при наличии фосфора в достаточных количествах — система фосфатных транспортеров низкой аффинности [Grossman, Takahashi, 2001]. Такой эффект был продемонстрирован для микроводорослей *Thalassiosira weissflogii* [Donald et al., 1997], *Euglena gracilis* [Chisholm, Stross, 1976] и *Scenedesmus quadricauda* [Jansson, 1993], а также для натрий-фосфатного транспортера высокой аффинности РТВ2 [Kobayashi et al., 2003; Chang et al., 2005; Moseley et al., 2006] и H^+ -фосфатного транспортера высокой аффинности РТА3 [Moseley et al., 2006] микроводоросли *C. reinhardtii*.

Синтез полифосфатов в микроводорослях и цианобактериях обеспечивается ферментами — полифосфат-киназами (= полифосфат-полимеразами = АТФ-полифосфат-фосфотрансферазами; см. рис. 6, реакция №4). Полифосфат-киназа переносит фосфат с молекулы АТФ на конец полифосфатной цепи. Стоит отметить, что катализируемая ею реакция является обратимой, то есть полифосфат-киназа может принимать участие не только в синтезе полифосфатной цепи, но и в ее деградации. Полифосфат-киназа в цианобактериях кодируется геном *ppk1*, который является общим для всех цианобактерий и достаточно хорошо охарактеризован [Scanlan et al., 2009].

Ген полифосфат-полимеразы *vtc4* в эукариотах был не так давно идентифицирован [Hothorn et al., 2009]. Полифосфат-полимераза Vtc4 в эукариотах функционирует в составе большого мембранного комплекса вакуолярного транспортного шаперона (vacuolar transporter chaperone, VTC), который наиболее подробно изучен в дрожжах [Müller et al., 2002, 2003; Hothorn et al., 2009; Gerasimaitė et al., 2014, 2016]. VTC-комплексы дрожжей состоят из нескольких субъединиц различных типов, среди которых каталитическая субъединица Vtc4, синтезирующая полифосфатную цепь с использованием АТФ, и вспомогательные субъединицы Vtc1, Vtc2 и Vtc3 [Gerasimaitė et al., 2016]. VTC-комплекс дрожжей существует в двух вариантах: Vtc4/Vtc3/Vtc1, в основном локализованный в мембране вакуоли, и Vtc4/Vtc2/Vtc1, выявляющийся на периферии клетки (эндоплазматический ретикулум, ядерная оболочка). Недавно также была описана еще одна регуляторная субъединица VTC-комплекса Vtc5, связывающаяся с субъединицами Vtc2 и Vtc3 и регулирующая синтез полифосфатных цепей [Desfougères et al., 2016].

Гомологи Vtc4 и других субъединиц VTC-комплекса аннотированы в геномах некоторых микроводорослей: *Thalassiosira pseudonana* [Hothorn et al., 2009], *Aureococcus anophagefferens* [Wurch et al., 2011], *Emiliania huxleyi* [Dyhrman et al., 2006], *Chlorella variabilis* [Blanc et al., 2010], *Micractinium conductrix* [Arriola et al., 2018], *Monoraphidium neglectum* [Bogen et al., 2013], *Auxenochlorella protothecoides* [Gao et al., 2014], *Raphidocelis subcapitata* [Suzuki et al., 2018], *Chlamydomonas reinhardtii* [Aksoy et al., 2014]. Однако о функционировании субъединиц VTC-комплекса в микроводорослях известно очень мало.

В геномах трех эукариотических микроводорослей (красной одноклеточной водоросли *Cyanidioschyzon merolae*, коккоидных микроводорослей *Ostreococcus tauri* и *Ostreococcus lucimarinus*) были аннотированы гены-гомологи бактериального гена *ppk1*, кодирующего полифосфат-киназу [Whitehead et al., 2013]. Однако подробно выявленные гены и кодируемые ими полифосфат-киназы не изучались.

Реакцию отщепления неорганического фосфата от конца полифосфатной цепи в реакции гидролиза осуществляют ферменты полифосфатазы (рис. 6, реакция №5). В клетках цианобактерий полифосфатаза кодируется геном *ppx* [Gómez-García et al., 2003; 2013], экспрессия которого значительно увеличивается при голодании по фосфору [Gómez-García et al., 2003]. У цианобактерий в деградации полифосфатов также участвует фермент полифосфат-киназа PPK2, кодируемая геном *ppk2* [Zhang et al., 2002]. Указанная полифосфат-киназа отличается от полифосфат-киназы PPK1 тем, что она переносит неорганический фосфат с конца полифосфатной цепи на молекулу гуанозиндифосфата (ГДФ) с образованием гуанозинтрифосфата (ГТФ). Катализируемая ею реакция также является обратимой, однако, равновесие реакции сильно сдвинуто в сторону образования ГТФ и деградации полифосфатной цепи [Zhang et al., 2002].

В настоящий момент в научной литературе полифосфатазы микроводорослей не описаны. Хотя в геноме эукариотической коккоидной микроводоросли *Ostreococcus tauri* был аннотирован ген-гомолог бактериального гена *ppk2*, кодирующего полифосфат-киназу, участвующую в деградации полифосфатов [Whitehead et al., 2013], выявленный ген и кодируемая им полифосфат-киназа подробно не изучались.

Полифосфатные включения микроводорослей выявляются в различных клеточных компартментах, таких как цитозоль, вакуоли, хлоропласт [Hase et al., 1963; Voříšek, Zachleder, 1984]. Скорее всего, в клетках микроводорослей для каждого из этих компартментов существует свой набор ферментов, обеспечивающих синтез и деградацию полифосфатных цепей, а также транспортеров неорганического фосфата.

Из рассмотрения доступной нам литературы очевидно, что к настоящему времени картина метаболизма полифосфатов в клетках цианобактерий и микроводорослей во многом фрагментарна. Так, конкретные механизмы биосинтеза и катаболизма полифосфатов, а также регуляция этих процессов, изучены очень слабо, особенно в клетках микроводорослей.

3.3.3. Избыточное поглощение неорганического фосфата цианобактериями и микроводорослями из среды

Микроводоросли и цианобактерии обладают способностью поглощать неорганический фосфат из среды в большем количестве, чем им необходимо для поддержания метаболизма, активного роста и деления. Указанный феномен называют избыточным поглощением фосфора (luxury uptake of phosphorus) [Jensen, Sicko, 1974; Powell et al., 2008; 2009; Dyhrman, 2016, P. 158]. При этом избыточно поглощенный фосфор может запасаться в клетках в виде ФоС-включений

(полифосфатов, см. разделы 3.3.1-3.3.2) для использования клетками в будущем при необходимости [Adamec et al., 1979; Allen, 1984; Voříšek, Zachleder, 1984; Nishikawa et al., 2006].

Исследователи предполагают, что способность к избыточному поглощению фосфора, вероятно, развилась как адаптация микроводорослей и цианобактерий к нестабильному уровню содержания доступного фосфора в окружающей среде [Watanabe et al., 1988; de Mazancourt, Schwartz, 2012]. Эту гипотезу подтверждают эксперименты [Watanabe et al., 1987; 1988], в которых было раскрыто регулирование поглощения фосфора и образования полифосфатов во время вертикальных миграций охрофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo*. Ночью *Heterosigma akashiwo* мигрировала к более глубокому водному слою с высоким содержанием фосфора, поглощала его и использовала для удлинения полифосфатных цепей. Днем эта микроводоросль поднималась к поверхностным водам, содержащим фосфор в очень низких концентрациях, и использовала накопленный за ночь фосфор для фотофосфорилирования путем деградации полифосфатных цепей. Указанная особенность метаболизма микроводоросли *Heterosigma akashiwo* была показана как на вертикальных миграциях в природной морской воде [Watanabe et al., 1987], так и при симуляции этих миграций в лабораторных условиях [Watanabe et al., 1988].

Считается, что избыточное поглощение фосфора является стратегией конкуренции микроводорослей и цианобактерий при нестабильном уровне содержания фосфора в среде. Указанная стратегия направлена на поглощение как можно большего количества фосфора в периоды его наличия в среде: в водных экосистемах стратегия позволяет лишить фосфора микроорганизмов-конкурентов, не способных поглощать фосфор с такой скоростью и в таком количестве [Donald et al., 1997; de Mazancourt, Schwartz, 2012].

Для некоторых цианобактерий еще в 70-80х годах прошлого века с помощью различных методов (см. табл.1) было показано, что избыточное поглощение фосфора, сопряженное с образованием полифосфатных ФОС-включений, особенно ярко выражено в клетках при восстановлении фосфорного питания, то есть при добавлении фосфора к клеткам, культивируемых в бесфосфорной среде. Указанный феномен получил название «избыточное образование полифосфатов» («polyphosphate overplus phenomenon») [Jensen, Sicko, 1974; Allen, 1984; Dyhrman, 2016, P. 158]. Избыточное образование полифосфатных ФОС-включений при восстановлении фосфорного питания в первые часы после добавления фосфора (см. табл.1) было показано для не способных к образованию гетероцист цианобактерий *Plectonema boryanum* [Jensen, Sicko, 1974; Baxter, Jensen, 1980a, b], *Anacystis nidulans* [Grillo, Gibson, 1979], *Microcystis aeruginosa* [Jacobson, Halmann, 1982] и для diaзотрофной гетероцист-образующей

цианобактерии *Calothrix parietina* [Livingstone, Whitton, 1983]. Избыточное накопление ФоС-включений в *Microcystis aeruginosa* с 4 дня после восстановления фосфорного питания также наблюдали с помощью методов ПЭМ и ЭДРС в работе [Barlow et al., 1979].

Табл. 1. Избыточное образование полифосфатов в клетках цианобактерий и микроводорослей при восстановлении фосфорного питания

Штамм микроорганизма	Время до выявления полифосфатов	Метод определения полифосфатов	Ссылка
Цианобактерии			
<i>Plectonema boryanum</i> UTEX 581	2 ч	ПЭМ, ЭДРС	[Jensen, Sicko, 1974; Baxter, Jensen, 1980a, b]
<i>Synechococcus</i> sp. (= <i>Anacystis nidulans</i>)	1 ч	Добавление ³² P, биохимическое определение	[Grillo, Gibson, 1979]
<i>Microcystis aeruginosa</i> UV-006	4 д	ПЭМ ЭДРС	[Barlow et al., 1979]
<i>Microcystis aeruginosa</i>	20 мин	Добавление ³² P, биохимическое определение	[Jacobson, Halmann, 1982]
<i>Calothrix parietina</i> Durham No. 550	15 мин	Световая микроскопия, контрастирование основными красителями	[Livingstone, Whitton, 1983]
Микроводоросли			
<i>Chlorella vulgaris</i> (Beijerinck) var. <i>viridis</i> (Chodat)	1 ч	Добавление ³² P, биохимическое определение	[Aitchison, Butt, 1973]
<i>Heterosigma akashiwo</i> ONE-1	2 ч	Добавление ³² P, биохимическое определение, спектроскопия ЯМР	[Watanabe et al., 1989]
<i>Chlamydomonas acidophila</i> KT-1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> C-9	1 д	Флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI, спектроскопия ЯМР, биохимическое определение	[Nishikawa et al., 2006]
<i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D-14	4 ч	Флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI	[Yagisawa et al., 2016]
	6 ч	ПЭМ	

Феномен избыточного образования полифосфатов [Kulaev et al., 2004, P. 174] с помощью различных методов также был продемонстрирован для нескольких микроводорослей (см. табл.1).

Для микроводоросли *Chlorella vulgaris* было показано, что в клетках, культивируемых в течение 36 ч в бесфосфорной среде, полифосфаты начинают образовываться уже через 1 ч после добавления фосфора [Aitchison, Butt, 1973]. При этом содержание кислото-растворимой фракции

полифосфатов через 2 ч начинает резко увеличиваться и достигает пика на 8 ч после добавления фосфора (4 мкмоль/10¹⁰ клеток). Пик содержания щелочнорастворимой фракции является менее интенсивным (1 мкмоль/10¹⁰ клеток), он приходится на 4 ч после добавления фосфора. Исследователи в работе [Aitchison, Butt, 1973] также сравнили избыточное образование кислото-растворимой фракции полифосфатов в клетках при разном времени культивирования в бесфосфорной среде (от 0 до 36 ч) и показали, что чем дольше период голодания по фосфору, тем ярче выражен эффект образования указанной фракции полифосфатов. Формирование полифосфатных ФоС-включений в первые часы после добавления фосфора к голодным клеткам также было показано для красной одноклеточной водоросли *Cyanidioschyzon merolae* [Yagisawa et al., 2016] и для охрофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo* [Watanabe et al., 1989].

В работе [Nishikawa et al., 2006] сравнивали образование полифосфатов в зеленых микроводорослях *Chlamydomonas acidophila* и *Chlamydomonas reinhardtii* через один и через три дня после восстановления фосфорного питания. По сравнению с мезофильной микроводорослью *C. reinhardtii*, содержание полифосфатов в ацидофильной *C. acidophila* КТ-1 было в 2,5 раза меньше как через один день, так и через три дня после добавления фосфора к голодным клеткам. Авторы объяснили более низкое содержание полифосфатов в *C. acidophila* тем, что клеточная мембрана *C. acidophila* обладает специфическими свойствами, которые ограничивают скорость поглощения фосфата из окружающей среды. Исследователи в работе [Nishikawa et al., 2006] также сравнили избыточное образование полифосфатов в клетках при коротком (6 дней) и более долгом (14 дней) времени культивирования в бесфосфорной среде. Как для *C. acidophila*, так и для *C. reinhardtii* оказалось, что содержание полифосфатов в клетках через один день после восстановления фосфорного питания выше в 1,5-2 раза при более долгом культивировании в бесфосфорной среде, чем при коротком. Для обеих микроводорослей через три дня после добавления фосфора к голодным клеткам уровень полифосфатов при коротком и при более длительном времени культивирования в бесфосфорной среде устанавливался на одинаковом уровне.

В целом, на данный момент избыточное поглощение фосфора и избыточное образование полифосфатов в цианобактериях и микроводорослях при избытке фосфора в среде изучено очень слабо [Dyhrman, 2016, P. 158], в то время как механизмы и регуляция фосфорного метаболизма в этих организмах при недостатке фосфора изучены достаточно подробно [Cembella et al., 1984; Voříšek, Zachleder, 1984; Gómez-García et al., 2003; Chang et al., 2005; Schwarz, Forchhammer, 2005; Moseley et al., 2006; Grossman, Aksoy, 2015].

3.3.4. Визуализация и идентификация фосфорсодержащих включений методами аналитической ПЭМ

Для выявления полифосфатных ФоС-включений в клетках используются различные химические и физические методы, включающие (био)химический анализ, хромогенные тесты, ферментативные методы, различные виды хроматографии, флуориметрические методы с использованием 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), спектроскопию ^{31}P -ЯМР, лазерную сканирующую микро-спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) и аналитические методы ПЭМ (подробный обзор методов см. в работах [Hupfer et al., 2008; Majed et al., 2012]).

Практически все используемые методы позволяют анализировать только образцы суспензий клеток, что дает информацию о содержании полифосфатов в популяции клеток в среднем. Лишь некоторые из известных методов способны дать информацию о содержании ФоС-включений на клеточном и/или субклеточном уровне, то есть предоставить информацию о гетерогенности клеточной популяции. К таким методам относятся флуориметрические методы с использованием 4',6-диамидино-2-фенилиндола [Gomes et al., 2013], лазерная сканирующая микро-спектроскопия КР [Moudříková et al., 2017b] и аналитические методы ПЭМ [Aronova, Learman, 2012; Warley, 2016]. Поскольку ФоС-включения в клетках микроводорослей могут быть локализованы в различных клеточных компартментах, таких как цитозоль, вакуоли и хлоропласт [Hase et al., 1963; Voříšek, Zachleder, 1984], то точное опеределение их внутриклеточной локализации является важным при исследовании клеточных резервов фосфора. Среди указанных выше методов лишь аналитические методы ПЭМ обладают нанометровым разрешением, достаточным для достоверного определения внутриклеточной локализации ФоС-включений в клетках микроводорослей.

Широко распространенным методом аналитической ПЭМ для идентификации ФоС-включений в клетках микроводорослей и цианобактерий является метод ЭДРС. В табл.2 перечислены штаммы микроорганизмов, в которых ФоС-включения были выявлены с помощью метода ЭДРС. В указанных работах энергодисперсионные спектры получали от выбранной точечной области образца, содержащей выявляемые включения.

Обычно в энергодисперсионных спектрах от ФоС-включений микроводорослей и цианобактерий, помимо пиков Р и О, выявляются пики Са, К и Mg (см. табл.2), ионы которых образуют комплексы с полифосфатами [Kulaev et al., 2004, P. 5, 45-46]. В спектрах от включений некоторых микроорганизмов при определенных условиях культивирования также появляются

пики Na, Cl, Zn, S и N небольшой интенсивности [Tillberg et al., 1979; 1984; Baxter, Jensen, 1980b; Jensen et al., 1982b; Pettersson et al., 1985; Goldberg et al., 2001; Ruiz et al., 2001; Ota et al., 2016].

Табл. 2 Выявление фосфорсодержащих включений в клетках цианобактерий и микроводорослей методом ЭДРС. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены тяжелые металлы, которые в эколого-токсикологических исследованиях поглощались микроорганизмами и накапливались в полифосфатных ФоС-включениях

Штамм микроорганизма	Элементы, выявляемые в спектрах от включений*	Ссылка
Цианобактерии		
<i>Microcystis aeruginosa</i> UV-006	-	[Barlow et al., 1979]
<i>Plectonema boryanum</i> UTEX 581	Ca, K, Mg	[Sicko-Goad et al., 1975]
	-	[Kessel, 1977]
	Ca, K, Mg	[Baxter, Jensen, 1980a]
	Ca, K, Mg, Cl, Zn, Ba, Mn	[Baxter, Jensen, 1980b]
	Ca, K, Mg, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn	[Jensen et al., 1982a]
<i>Plectonema boryanum</i>	Ca, K, Mg, S	[Goldberg et al., 2001]
<i>Anabaena cylindrica</i> 1403/2a	Ca, K, Mg, Cl, Na, S, Al	[Pettersson et al., 1985]
Микроводоросли		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> Chick	Ca, K, Mg	[Adamec et al., 1979]
<i>Chlorella saccharophila</i> UTEX 27	Ca, K, Mg, Cl, S, Pb, Zn	[Jensen et al., 1982b]
<i>Parachlorella kessleri</i> NIES-2152	N	[Ota et al., 2016]
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	Ca, Mg, S	[Tillberg et al., 1979; 1984]
<i>Scenedesmus quadricauda</i> Greifswald/15	-	[Voříšek, Zachleder, 1984]
<i>Chlamydomonas eugametos</i> UTEX 9	Ca, K, Mg	[Siderius et al., 1996]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cw15 arg7A	Ca, Mg	[Komine et al., 2000]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Ca, Mg, Zn	[Ruiz et al., 2001]
<i>Chlamydomonas acidophila</i>	Cd	[Nishikawa et al., 2003]
<i>Navicula incerta</i> UTEX 2043	Ca, Mg, Pb, Zn	[Jensen et al., 1982b]
<i>Nitzschia closterium</i> LB 1052/8B	Ca, K, Pb	[Jensen et al., 1982b]

* - помимо пиков C, P, O, аппаратных пиков и пиков от контрастирующих веществ

В ряде работ в контексте экологической токсикологии метод ЭДРС использовался для детекции тяжелых металлов в полифосфатных ФоС-включениях микроводорослей и цианобактерий (см. табл.2). В этих работах было показано, что при определенных концентрациях ионов тяжелых металлов в среде они начинают поглощаться микроорганизмами и накапливаться

в ФоС-включениях. Данный эффект был продемонстрирован для Al [Pettersson et al., 1985], Ba и Mn [Baxter, Jensen, 1980b], Cd [Jensen et al., 1982a; Nishikawa et al., 2003], Co, Cu, Hg и Ni [Jensen et al., 1982a], Pb и Zn [Jensen et al., 1982a,b]. Авторы указанных работ предполагают, что аккумулялирование ионов тяжелых металлов в полифосфатных включениях способствует снижению их токсического действия.

Применение другой разновидности аналитической ПЭМ — метода ЭФПЭМ, основанном на СХПЭЭ, позволяет получать качественные карты распределения фосфора с выбранного участка образца [Агонова, Learman, 2012]. Другими словами, данный метод позволяет не только идентифицировать ФоС-включения в клетках, но и визуализировать их субклеточное распределение. Указанный метод был успешно применен для визуализации ФоС-включений в клетках свободноживущей цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 9229 и симбиотической цианобактерии *Nostoc* sp., выделенной из симбиоза с растением *Gunnera manicata* [Jäger et al., 1997]. Исходя из полученных ЭФПЭМ-карт фосфора, авторы данной работы [Jäger et al., 1997] пришли к выводу, что в свободноживущей цианобактерии содержание ФоС-включений намного выше, чем в симбиотической. При этом количественная оценка содержания ФоС-включений на полученных картах не проводилась.

Элементное картирование методом ЭФПЭМ для выявления ФоС-включений имеет явное преимущество среди других известных методов, которое заключается в возможности визуализации ФоС-включений на субклеточном уровне с нанометровым разрешением. Количественная оценка содержания ФоС-включений в клетках на ЭФПЭМ-картах была бы полезна в исследованиях метаболизма этих включений. Однако в доступной нам литературе нет сообщений о методах, позволяющих проводить такую количественную оценку содержания и внутриклеточной локализации ФоС-включений на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ.

3.4. Внутриклеточные резервы азота цианобактерий и микроводорослей

3.4.1. Поглощение азота из среды микроводорослями и цианобактериями

Азот — один из важнейших элементов, необходимых для функционирования всех живых организмов, он является компонентом таких ключевых биохимических соединений, как нуклеотиды, нуклеиновые кислоты и белки [Lehninger et al., 2000, P. 76-77, 273-275]. Азот в состав органических соединений ассимилируется из неорганических источников азота, таких как нитрат (NO_3^-), нитрит (NO_2^-), аммоний (NH_4^+), аммиак (NH_3) и атмосферный азот (N_2).

Микроводоросли и цианобактерии способны поглощать неорганический азот в форме нитрата, нитрита и аммония и включать его в органические соединения.

На рис. 7 представлена упрощенная схема ассимиляции неорганического азота в органические соединения в клетках микроводорослей. После поглощения неорганический азот сначала восстанавливается до аммония, и только после этого направляется на синтез аминокислот. При этом восстановление нитрата и нитрита осуществляется с помощью ферментов нитратредуктазы и нитритредуктазы, соответственно [Barsanti, Gualtieri, 2006, P. 209]. Нитратредуктаза микроводорослей локализована в цитозоле. В качестве кофактора она использует восстановленную форму никотинамидадениндинуклеотида ($\text{НАД}_{\text{вос}}$), который в процессе реакции окисляется с восстановлением нитрата до нитрита. У цианобактерий нитратредуктаза в качестве кофактора использует ферредоксин [Barsanti, Gualtieri, 2006, P. 209]. Нитрит восстанавливается до аммония под действием нитритредуктазы и ее кофактора ферредоксина. Нитритредуктаза микроводорослей расположена в хлоропластах. Как у микроводорослей, так и у цианобактерий кофактором нитритредуктазы является ферредоксин.

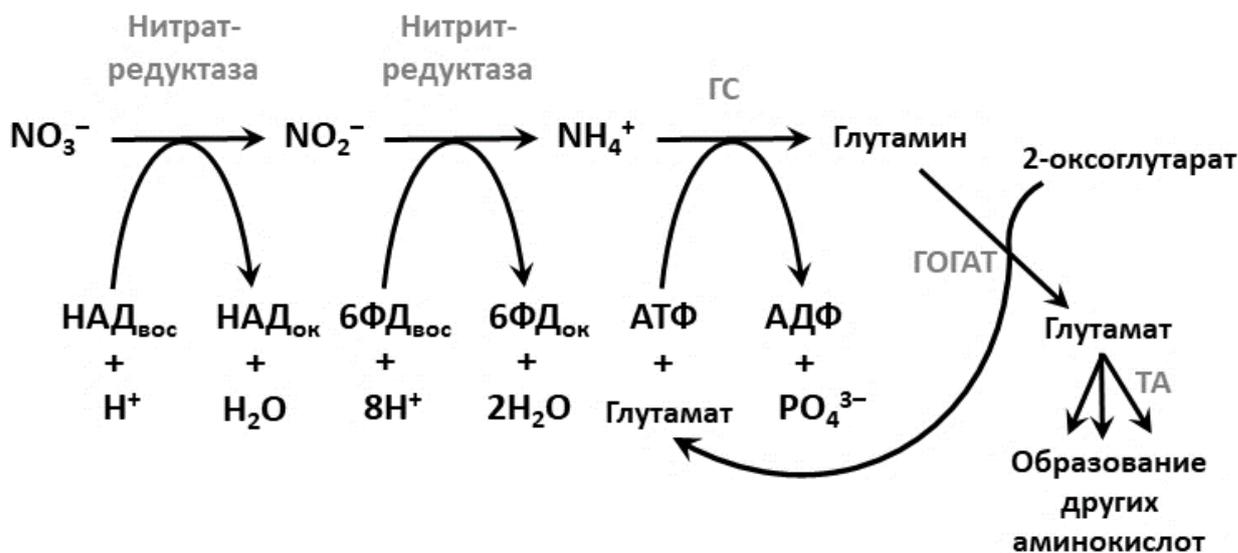


Рис. 7 Упрощенная схема ассимиляции неорганического азота в органические соединения микроводорослями. $\text{НАД}_{\text{вос}}$ и $\text{НАД}_{\text{ок}}$ — никотинамидадениндинуклеотид восстановленный и окисленный, соответственно; $\text{ФД}_{\text{вос}}$ и $\text{ФД}_{\text{ок}}$ — ферредоксин восстановленный и окисленный, соответственно; ГС — глутамин-синтетаза; ГОГАТ - глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза; ТА — различные аминотрансферазы (из [Cai et al., 2013] с изменениями)

Под действием глутамин-синтетазы (ГС) с использованием АТФ аммоний включается в состав глутамата с образованием аминокислоты глутамина. Затем глутамин взаимодействует с молекулой 2-оксоглутарата с образованием двух молекул глутамата под действием глутамин-оксоглутарат-аминотрансферазы (ГОГАТ). Фермент ГОГАТ тоже использует кофакторы (на рис.

7 не изображены). У микроводорослей ферменты ГС и ГОГАТ расположены в хлоропластах, хотя их изозимы могут находиться и в цитозоле [Barsanti, Gualtieri, 2006, P. 210]. Образовавшиеся в процессе ассимиляции неорганического азота молекулы глутамата транспортируются в цитозоль, где подвергаются трансаминации различными ферментами, в результате чего образуются другие аминокислоты.

Аммоний является предпочтительной формой неорганического азота, поскольку его не нужно восстанавливать, а значит, тратить энергию на реакции восстановления. Согласно исследованиям, в целом микроводоросли предпочитают поглощать неорганический азот именно в форме аммония, а не нитрата: поглощение нитрата из среды не начинается, пока в среде не израсходуется весь аммоний [Maestrini et al., 1986]. Поскольку азот в форме нитрата обладает самой высокой степенью окисления, то нитрат является самой термодинамически стабильной формой неорганического азота в водных средах. В связи с этим нитрат является преобладающей формой связанного азота в водных экосистемах [Barsanti, Gualtieri, 2006, P. 208]. Следует также отметить, что при повышении pH среды в присутствии высоких уровней аммония возможны токсические эффекты, связанные с образованием аммиака [Abeliovich, Azov, 1976].

Многие цианобактерии способны к фиксации атмосферного азота, N_2 (к диазотрофии) [Bothe, 1982]. Ключевым ферментом азотфиксации является нитрогеназный ферментный комплекс, состоящий из нитрогеназы и редуктазы нитрогеназы [Fay, 1992]. Нитрогеназа представляет собой тетрамер, состоящий из четырех субъединиц ($2\alpha 2\beta$), которые содержат четыре железо-серных кластера ($4Fe-4S$) и две молекулы железо-молибденового (Mo-Fe) кофактора, в котором на один атом молибдена приходится 8 атомов железа и 8 атомов серы без образования железо-серного кластера. Редуктаза нитрогеназы содержит две одинаковые субъединицы с железо-серным кластером. Железо-молибденовый кофактор нитрогеназы обеспечивает восстановление атмосферного азота до аммиака, а электроны для этой реакции поставляются редуктазой нитрогеназы. Восстановление атмосферного азота является весьма энергозатратным процессом: на один моль восстановленного азота необходимо затратить 12-15 моль АТФ [Fay, 1992]. Все диазотрофные (азотфиксирующие) цианобактерии начинают синтезировать нитрогеназный ферментный комплекс и приступают к азотфиксации только в условиях отсутствия в среде доступных источников связанного азота.

Молекулярный кислород ингибирует реакцию азотфиксации, окисляя и разрушая субъединицы нитрогеназного ферментного комплекса [Fay, 1992]. В связи с этим у многих нитчатых цианобактерий фиксация азота осуществляется в специализированных клетках с многослойной оболочкой — гетероцистах, обеспечивающих анаэробное микроокружение для

эффективного функционирования и защиты нитрогеназы [Kumar et al., 2010]. К гетероцист-образующим diaзотрофным цианобактериям относятся представители родов *Anabaena*, *Nodulana*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix* и других. У некоторых diaзотрофных цианобактерий, не способных к образованию гетероцист, фиксация азота происходит только в анаэробных и микроаэробных условиях [Stewart, Lex, 1970; Rippka, Waterbury, 1977].

3.4.2. Цианофициновые гранулы в качестве резервов азота цианобактерий

В клетках многих цианобактерий азот может аккумулироваться в виде АС-включений, представляющих собой структурированные цианофициновые гранулы [Allen, 1984]. Цианофицин (= мульти-L-аргинил-поли-[L-аспарагиновая кислота]) — это обогащенный азотом полимер, остов которого состоит из остатков аспарагиновой кислоты, а боковые цепи из аргинина (рис. 8).

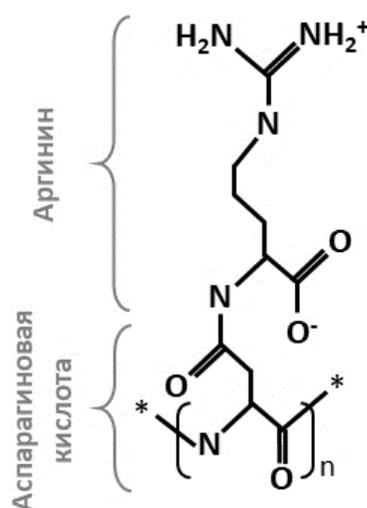


Рис. 8 Химическая структура цианофицина — обогащенного азотом полимера, остов которого состоит из остатков аспарагиновой кислоты, а боковые цепи из аргинина (из [Oppermann-Sanio, Steinbüchel, 2002])

Синтез цианофицина в клетках осуществляется ферментом цианофицин-синтетазой, которая кодируется геном *cphA* [Obst, Steinbüchel, 2006]. Цианофицин-синтетаза обеспечивает АТФ-зависимое удлинение цепи цианофицина путем присоединения аспарагиновой кислоты и аргинина к ее концу. Биодegradация цианофицина осуществляется цианофициназой, кодируемой геном *cphB*, которая отщепляет от цианофициновой цепи дипептид, состоящий из аргинина и аспарагиновой кислоты [Oppermann-Sanio, Steinbüchel, 2002]. Образовавшийся в результате

реакции деградации дипептид гидролизуется до аргинина и аспарагиновой кислоты под действием фермента изоаспартил-дипептидазы [Hejazi et al., 2002].

Цианофициновые АС-включения цианобактерий играют ключевую роль в запасании азота, то есть являются внутриклеточными резервами азота. При избытке азота в среде цианофициновые гранулы накапливаются при переходе от экспоненциального к стационарной фазе роста и исчезают при сбалансированном возобновлении роста культуры [Simon, 1973; Lawry, Simon, 1982; Mackerras et al., 1990], а при культивировании в безазотной среде гранулы цианофицина метаболизируются [Allen et al., 1980; Allen, Hutchison, 1980].

С точки зрения микроорганизма цианофицин является идеальным внутриклеточным резервом азота [Simon, 1987], поскольку он является нерастворимым при внутриклеточных значениях рН и ионной силы, а один мономер цепи цианофицина запасает целых 5 атомов азота. Обычно в водных экосистемах цианобактерии часто сталкиваются с ограничением или истощением источников азота в окружающей среде [Howarth, Cole, 1985]. Считается, что способность эффективно запасать азот дает цианобактериям конкурентное преимущество перед другими организмами [Mackerras et al., 1990].

3.4.3. Гуанин и мочевая кислота в качестве потенциальных резервов азота микроводорослей

На настоящий момент лишь для некоторых видов микроводорослей было показано, что в вакуолях их клеток могут накапливаться включения, содержащие соединения азота. Для некоторых из них удалось идентифицировать химическую природу этих соединений: в одних микроводорослях были определены включения мочевой кислоты [Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013], в других — включения гуанина [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972; Moudříková et al., 2017a] (см. рис. 9).



Рис. 9 Химическая структура мочевой кислоты и гуанина

В работах [Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013] с помощью метода газовой хроматографии–масс-спектрометрии кристаллоидные АС-включения динофитовых симбиотических микроводорослей были идентифицированы как кристаллы мочевой кислоты. Данные динофитовые микроводоросли, предположительно, относящиеся к *Symbiodinium* sp., исследовали в составе их природных симбиозов с коралловыми полипами *Aiptasia* sp. [Clode et al., 2009] и *Pocillopora damicornis* [Kopp et al., 2013]. В ряде исследований [Yamashita et al., 2009; Raina et al., 2017; Rosset et al., 2017] кристаллоидные включения симбиотических микроводорослей *Symbiodinium* sp. по аналогии с работами [Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013] были обозначены как включения мочевой кислоты.

Внутриклеточные гранулы свободноживущей динофитовой микроводоросли *Gonyaulax polyedra* были определены как включения гуанина путем осуществления бумажной хроматографии и измерения растворимости, плавучей плотности, спектров поглощения, флуоресценции и фосфоресценции выделенных из клеток указанных гранул [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972]. По аналогии с [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972] выявленные включения *Gonyaulax polyedra* в работах [Schmitter, 1971; Lewis, Burton, 1988] также обозначили как гуанин. Недавно с помощью метода лазерной сканирующей микро-спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) кристаллоидные включения в клетках зеленой микроводоросли *Desmodesmus quadricauda* и охрофитовой микроводоросли *Trachydiscus minutus* также были идентифицированы как гуанин [Moudříková et al., 2017a].

В везикулярных электронноплотных гранулах свободноживущей зеленой микроводоросли *Tetraselmis suecica* был детектирован азот, но при этом идентификация химической природы гранул не проводилась [Nassiri et al., 1997].

О метаболизме включений мочевой кислоты у микроводорослей известно очень мало. Имеющиеся сведения фрагментарны и относятся к симбиотическим динофитовым микроводорослям в составе симбиозов с коралловыми полипами при культивировании в среде с азотом [Kopp et al., 2013; Rosset et al., 2017]. В работе [Kopp et al., 2013] с помощью метода ПЭМ и масс-спектрометрии вторичных ионов с нанометровым разрешением (нано-МСВИ) (Nano-Secondary-Ion Mass Spectrometry, NanoSIMS) было показано, что в клетках динофитовых микроводорослей при кратковременном увеличении содержания азота в среде происходит быстрое (через 45 мин) включение добавленного в среду азота ^{15}N в состав кристаллов мочевой кислоты. Через 6 ч азот ^{15}N ремобилизуется из кристаллов мочевой кислоты микроводорослей и направляется в клетки симбионта — кораллового полипа. В исследовании [Rosset et al., 2017] на ПЭМ-изображениях измеряли относительную площадь кристаллоидных включений

(обозначенных как кристаллы мочевой кислоты) в клетках симбиотической микроводоросли *Symbiodinium* sp. при разном содержании источников азота и фосфора в среде. Оказалось, что при одновременном избытке азота и недостатке фосфора в среде происходит заметное увеличение содержания кристаллов мочевой кислоты в клетках. При этом при избытке источников обоих элементов, при недостатке источников обоих элементов, а также при одновременном недостатке азота и избытке фосфора в среде такой эффект не наблюдался.

На настоящий момент в литературе отсутствуют сведения о метаболизме включений гуанина в клетках микроводорослей.

Пути биосинтеза и деградации АС-включений гуанина и мочевой кислоты микроводорослей, а также участвующие в них ферменты, также не исследованы. Скорее всего, как и во всех живых организмах, в микроводорослях биосинтез гуанина *de novo* происходит из 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (см. рис. 10, реакции №1-15) с участием целой группы ферментов [Lehninger et al., 2000, P. 863-866; Ashihara et al., 2018, P. 91]. При этом все атомы азота в гуанине происходят из аминокислот (см. рис. 10, реакции №1,2,4,8,13). Биосинтез мочевой кислоты, вероятнее всего, происходит из гуанина или аденина (см. рис. 10, реакции №16-23) с помощью ключевого фермента ксантин-дегидрогеназы (оксидазы) (рис. 10, реакции №17, 23) [Hafez et al., 2017, P. 476; Ashihara et al., 2018, P. 91], а распад осуществляется до аммиака (рис. 10, реакции №24-32) с помощью ряда ферментов, по-видимому, так же, как это происходит в растениях и бактериях [Hafez et al., 2017, P. 478].

Ключевая роль ксантин-дегидрогеназы (рис. 10, реакции №17, 23) в биосинтезе мочевой кислоты в кристаллоидных АС-включениях была подтверждена для динофитовых симбиотических микроводорослей [Clode et al., 2009]: при инкубации с аллопуринолом (потенциальным ингибитором ксантин-дегидрогеназы) из клеток исчезали все включения мочевой кислоты к 7 дню культивирования. В транскриптом микроводоросли *Symbiodinium* sp. [Корр et al., 2013], накапливающей гранулы мочевой кислоты, также были выявлены транскрипты, кодирующие ключевые ферменты синтеза и деградации мочевой кислоты — ксантин-дегидрогеназу (рис. 10, реакции №17, 23) и уриказу (рис. 10, реакция №24), соответственно.

В связи с вышеизложенным, можно сделать вывод о том, что метаболизм и динамика формирования и деградации АС-включений микроводорослей, в том числе, в условиях отсутствия азота в среде, практически не изучались. Ввиду слабой изученности метаболизма указанных включений (как мочевой кислоты, так и гуанина), строго говоря, данные включения можно рассматривать лишь в качестве потенциальных внутриклеточных резервов азота.

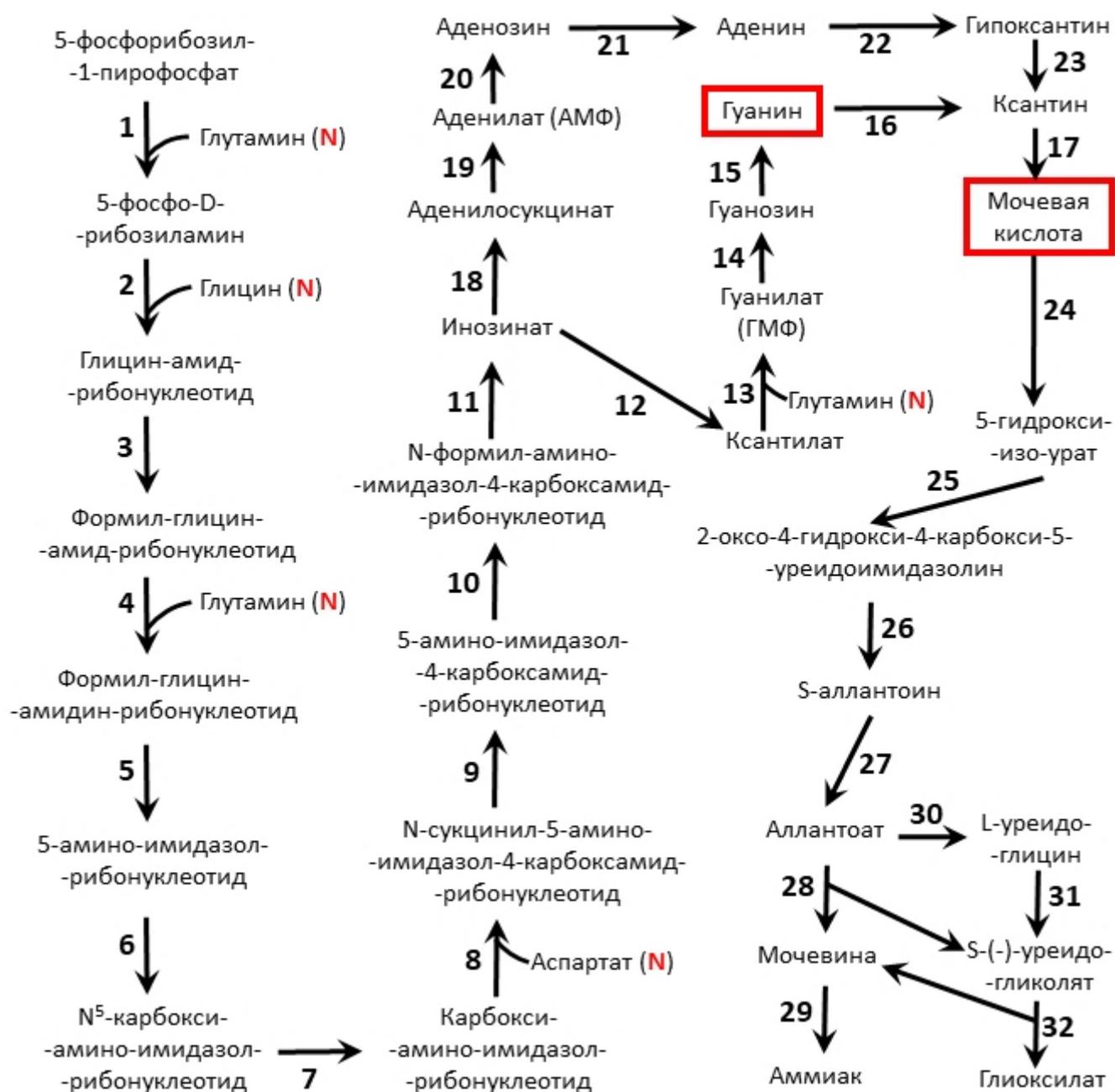


Рис. 10 Возможные пути биосинтеза и деградации гуанина и мочевой кислоты азотсодержащих включений микроводорослей. Красным отмечены атомы азота аминокислот, включаемые в состав мочевой кислоты или гуанина. В схеме для облегчения восприятия не указаны другие участники реакций (АТФ, H_2O , кофакторы и др.). Ферменты: 1 — амидотрансфераза, 2 — синтетаза, 3 — трансформилаза, 4 — амидотрансфераза, 5 — циклаза, 6 — синтетаза, 7 — мутаза, 8 — синтетаза, 9 — лиаза, 10 — трансформилаза, 11 — синтаза, 12 — дегидрогеназа, 13 — амидотрансфераза, 14 — 5'-нуклеотидаза или фосфатаза, 15 — нуклеозидаза, 16 — гуанин-деаминаза, 17 — ксантин-дегидрогеназа (оксидаза), 18 — синтетаза, 19 — лиаза, 20 — 5'-нуклеотидаза или фосфатаза, 21 — нуклеозидаза, 22 — аденин-деаминаза, 23 — ксантин-дегидрогеназа, 24 — уриказа (урат-оксидаза), 25 — гидролаза, 26 — декарбоксилаза, 27 — аллантиназа, 28 — аллантиказа, 29 — уреаза, 30 — деиминаза, 31 — аминоксидролаза, 32 — гидролаза (обобщено и адаптировано из [Lehninger et al., 2000, P. 865-866; Hafez et al., 2017, P. 476, 478; Ashihara et al., 2018, P. 91])

3.4.4. Визуализация и идентификация резервов азота методами аналитической ПЭМ

Для выявления резервов азота в клетках цианобактерий используются методы химического анализа [Simon, 1973], ^1H -ЯМР спектроскопии [Erickson et al., 2001] и ПЭМ в комбинации с методами аналитической ПЭМ — СХПЭЭ и ЭФПЭМ-картированием [Golecki, Heinrich, 1991; Albertano et al., 1993; Jäger et al., 1997]. Методы химического анализа [Simon, 1973] и ^1H -ЯМР спектроскопии [Erickson et al., 2001] позволяют анализировать только образцы суспензий клеток, что дает информацию о содержании цианофицина в популяции клеток в среднем. Методы СХПЭЭ и ЭФПЭМ-картирование, напротив, позволяют получать информацию о распределении цианофициновых АС-включений в пределах одной клетки, то есть на субклеточном уровне, и, таким образом, оценить гетерогенность клеток в культуре.

Методы СХПЭЭ и ЭФПЭМ-картирование были успешно применены для идентификации и визуализации цианофициновых АС-гранул в свободноживущих цианобактериях [Golecki, Heinrich, 1991], в цианобактериях в составе симбиозов с растениями [Albertano et al., 1993; Jäger et al., 1997], а также в клетках рекомбинантного штамма бактерии *Ralstonia eutropha*, экспрессирующих цианофицин-синтетазу цианобактерии *Nostoc (Anabaena) sp. PCC 7120* [Koop et al., 2007].

В нескольких работах [Nassiri et al., 1997; Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013] методы аналитической ПЭМ также были использованы для идентификации АС-включений в клетках микроводорослей. В работе [Nassiri et al., 1997] с помощью метода СХПЭЭ было показано, что при добавлении кадмия в среду к зеленой микроводоросли *Tetraselmis suecica* кадмий аккумулируется в везикулярных электронноплотных АС-включениях микроводоросли в форме ионов Cd^{2+} . При этом была выявлена положительная корреляция между количественным содержанием Cd^{2+} и содержанием азота в этих включениях. Авторы этого исследования [Nassiri et al., 1997] предположили, что данные АС-включения состоят из полипептидов, которые принимают участие в детоксикации кадмия. В работах [Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013] элементные ЭФПЭМ-карты азота позволили на ПЭМ-изображениях подтвердить то, что азот в клетках симбиотических динофитовых микроводорослей аккумулируется именно в кристаллоидных включениях, и, таким образом, визуализировать идентифицированные кристаллы мочевой кислоты в клетках с субклеточным разрешением.

Итак, элементное картирование методом ЭФПЭМ позволяет визуализировать как АС-включения цианобактерий, так и АС-включения микроводорослей на субклеточном уровне. Количественная оценка содержания АС-включений в клетках на ЭФПЭМ-картах была бы полезна в исследованиях метаболизма этих включений. Однако в научной литературе нет

сведений о методах, позволяющих проводить такую количественную оценку содержания АС-включений в этих микроорганизмах.

3.5. Перспективы использования в биотехнологии микроводорослей и цианобактерий, аккумулирующих фосфор- и азотсодержащие включения

3.5.1. Проблемы получения и неэффективного использования фосфорных и азотных минеральных удобрений и эвтрофикации водоемов

По оценкам исследователей число людей, живущих на Земле, продолжит увеличиваться и достигнет 9,6 млрд в 2050 году и 10,9 млрд в 2100 году [Gerland et al., 2014]. Рост населения и сопровождающий его рост потребления оказывают огромное давление на пищевую промышленность, в результате чего ей необходимо постоянно увеличивать объемы производства пищевых продуктов. Для удовлетворения этого спроса необходимо интенсивное развитие сельского хозяйства, в том числе активное использование всё больших площадей земли, всё больших объемов воды, энергии и удобрений [Tilman et al., 2002]. Фосфор и азот — основные элементы в составе используемых в сельском хозяйстве удобрений.

В производстве азотсодержащих удобрений используется аммиак, получаемый по процессу Габера [Erisman et al., 2008]. В указанном процессе смесь водорода и азота пропускают через нагретый катализатор под высоким давлением, в результате чего водород и азот вступают в реакцию соединения. Водород добывают путем паровой конверсии, чаще всего — природного газа [Dincer, Acar, 2015], а азот экстрагируют путем фракционной перегонки сжиженного атмосферного воздуха [Smith, Klosek, 2001]. Мировое производство аммиака оказывает огромное негативное воздействие на окружающую среду, включающее выбросы углекислого газа (1,38 кг на 1 кг произведенного аммиака) и других газов, влияющих на развитие глобального потепления (например, закиси азота) [Snyder et al., 2009, P. 256].

Источником фосфора для изготовления удобрений служат невозобновляемые природные фосфатные породы [Cordell et al., 2009]. Добываемые минеральные фосфаты обрабатывают 93% серной кислотой, в результате чего образуется фосфорная кислота, которую затем обычно используют для получения основной формы фосфорных удобрений — водорастворимых солей фосфорной кислоты [Santos, Pires, 2018]. В процессе изготовления фосфорных удобрений большую роль играет производство серной кислоты, которое сопровождается токсичными выбросами сернистого ангидрида и кислотных паров. Еще одной экологической проблемой является образование побочного продукта при получении фосфорной кислоты — фосфогипса

(дигидрата сульфата кальция, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), который обладает высокой токсичностью [Cordell et al., 2009].

Основная проблема использования азотных и фосфорных минеральных удобрений заключается в низкой эффективности поглощения их из почвы сельскохозяйственными растениями. По оценкам исследователей растениями усваиваются только 31–49% и 15–30% вносимых с удобрениями азота и фосфора, соответственно [Cordell et al., 2009; Solovchenko et al., 2016; Santos, Pires, 2018]. Значительная часть вносимых на сельскохозяйственные угодья источников азота и фосфора вымывается с полей со сточными водами, часть азотных удобрений при этом также подвергается денитрификации, минерализации и потерям в результате преобразования в аммиак и улетучивания [Smil, 2000; Cassman et al., 2002; Choudhury, Kennedy, 2005].

Вымываемые с полей фосфор- и азотсодержащие компоненты удобрений попадают в водоемы, внося значительный вклад в развитие эвтрофикации водных экосистем [Carpenter et al., 2005]. Эвтрофикация — насыщение водоемов биогенными элементами, такими как азот и фосфор. Она сопровождается стремительным ростом цианобактерий и водорослей, в том числе продуцирующих токсины, и приводит к снижению содержания растворенного в воде кислорода и заморам живущих в водоемах животных [Smith, Schindler, 2009]. Эвтрофикация у берегов морей и океанов вносит существенный вклад в расширение мертвых зон морских экосистем, общая площадь которых продолжает стремительно увеличиваться с 1960-х годов [Diaz, Rosenberg, 2008].

Таким образом, в настоящее время мировое производство и масштабное использование минеральных фосфорных и азотных удобрений оказывают огромное негативное воздействие на окружающую среду, нанося колоссальный вред природным экосистемам.

3.5.2. Глобальная проблема дефицита фосфора

Все современное сельское хозяйство сильно зависит от производства как азотных, так и фосфорных удобрений. Однако, в отличие от азотных удобрений, производство фосфорных удобрений сопряжено с разработкой невозобновляемых природных источников — фосфатных пород, которые сформировались на Земле 10-15 млн лет назад [Cordell et al., 2009]. По оценкам исследователей все месторождения фосфатных пород на Земле будут исчерпаны в ближайшие 50–100 лет [Steen, 1998; Smil, 2000]. Кроме того, природные источники фосфатных пород распределены на Земле крайне неравномерно: большинство из них сосредоточено на территории нескольких стран, среди которых Марокко, Китай, Алжир, США, ЮАР и Иордания [Solovchenko

et al., 2016]. Более чем 85% мировых месторождений фосфатных пород контролируется всего тремя странами (Марокко, США, Китай), среди которых лидирует Марокко [Bennett, Elser, 2011]. Источники фосфатных пород, расположенные на территории Марокко и в подконтрольной ей Западной Сахаре, составляют более трети мировых запасов высококачественных минеральных фосфатов [Cordell et al., 2009]. Даже в сфере добычи нефти глобальный дисбаланс выражен не так сильно — десяток стран-членов Организации стран-экспортёров нефти контролируют всего 80% мировых месторождений нефти [Bennett, Elser, 2011]. Кроме того, в энергетике уже сейчас существуют перспективные технологии, основанные на альтернативных возобновляемых источниках энергии, которые не используют ископаемое топливо, не зависят от его добычи и влияния стран-экспортёров нефти [Dresselhaus, Thomas, 2001]. В связи с вышеизложенным, истощение мировых запасов фосфатных пород, вероятнее всего, будет иметь более существенные глобальные социально-экономические последствия, чем дефицит ископаемого топлива.

Фосфор является одним из наиболее химически активных элементов, поэтому он, попадая в почву в составе удобрений, достаточно быстро превращается в формы фосфора, недоступные растениям. В результате растения усваивают только 15–30% вносимого с удобрениями фосфора [Cordell et al., 2009]. Существенная часть вносимых на сельскохозяйственные угодья источников фосфора, попадая в сточные воды, безвозвратно выводится из агроэкосистем. В отличие от азота, фосфор не образует долгоживущих газообразных соединений, которые бы способствовали быстрому атмосферному переносу элемента, а также его естественному возврату в агроэкосистемы, как это происходит с молекулярным азотом в результате азотфиксации симбиотическими и несимбиотическими диазототрофными бактериями [Gopalakrishnan et al., 2015, P. 356-357].

Фосфор может быть извлечен из отходов производства и потребления пищевых продуктов и повторно использоваться в качестве удобрения. Такой процесс повторного использования может включать внесение отходов сельскохозяйственных культур обратно в почву, изготовление компоста из бытовых пищевых отходов, отходов предприятий пищевой промышленности и розничной продажи продовольственных товаров, а также использование экскрементов человека и животных. Такие источники фосфора являются возобновляемыми и доступными, однако, из-за низкого содержания фосфора их необходимо намного больше, чем минеральных удобрений из фосфатных пород, что делает их экономически малоэффективными [Cordell et al., 2009].

Ввиду истощения мировых запасов фосфатных пород, низкой эффективности вносимых фосфорных удобрений, безвозвратной потери значительной части фосфора со сточными водами,

а также неэффективности повторного использования фосфора из отходов производства и потребления пищевых продуктов вопрос об изъятии фосфора из сточных вод и возврате его в агроэкосистемы становится весьма актуальным.

3.5.3. Преимущества использования микроводорослей и цианобактерий для биоизъятия излишков фосфора и азота из сточных вод

Городские и промышленные сточные воды, как и сельскохозяйственные, содержат значительные количества фосфора и азота, которые при попадании в водоемы могут вызвать их эвтрофикацию [Cai et al., 2013]. Поэтому разработка эффективных систем по изъятию фосфора и азота из сточных вод любого происхождения является весьма актуальной.

Традиционно для изъятия фосфора и азота из сточных вод используют химические методы. Для удаления излишков азота изменяют рН раствора: при рН 10,5–11,5 азот находится в форме аммиака и переносится из раствора в воздух посредством выпаривания. Однако осуществление этого процесса имеет высокие эксплуатационные расходы и может вызвать загрязнение воздуха [Santos, Pires, 2018]. Изъятие избытка азота также осуществляют путем окисления аммиака. Хлор, добавленный в процессе обработки сточных вод, окисляет азот в аммиаке до молекулярного азота или других стабильных соединений. Однако при этом могут образоваться побочные токсичные вещества, такие как хлорорганические соединения [Santos, Pires, 2018]. Одним из распространенных подходов изъятия излишков фосфора из сточных вод является его химическое осаждение с помощью соединений железа, алюминия или меди. Однако, фосфор, осажденный таким способом, имеет низкую степень биодоступности, и большая его часть обычно теряется на полигонах [de-Bashan, Bashan, 2004]. Одной из используемых в настоящее время альтернатив химическому осаждению является технология улучшенного биологического удаления фосфора (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR), использующая процессы аккумуляции фосфора гетеротрофными бактериями [McGrath, Quinn, 2003].

Более перспективным решением проблемы излишков фосфора и азота в сточных водах является использование фотосинтетических микроорганизмов — микроводорослей и цианобактерий, способных, в отличие от гетеротрофных бактерий в технологиях улучшенного биологического удаления фосфора, расти в аэробной среде, а также аккумулялировать еще и азот [Solovchenko et al., 2016]. Одно из важнейших преимуществ данного подхода заключается в том, что из выращенной на сточных водах биомассы микроводорослей и цианобактерий можно получить ряд полезных продуктов, таких, например, как высокоэффективные биоудобрения

[Mulbry et al., 2005; Mahanty et al., 2017] и биотопливо [Parmar et al., 2011], производство которых становится экономически выгодным при использовании сточных вод [Pittman et al., 2011]. Цианофицин, выделенный из выращенной на сточных водах биомассы цианобактерий, может быть химически преобразован в производное с уменьшенным содержанием аргинина [Joentgen et al., 1998], которое затем может быть использовано как биоразлагаемый заменитель полиакрилата в различных технических процессах [Schwamborn, 1998]. Обогащенная фосфором биомасса микроводорослей и цианобактерий является потенциальным источником полифосфатов, которые могут быть выделены из клеток и использованы в различных областях медицины, для создания биоматериалов и в пищевой промышленности (подробный обзор способов применения полифосфатов см. в работе [Kulaev et al., 2004, P. 188-191]).

В ходе исследований было показано, что изъятие фосфора и азота из сточных вод с использованием микроводорослей и цианобактерий является крайне эффективным [Mulbry et al., 2008; 2009; Chinnasamy et al., 2010; Chi et al., 2011; Li et al., 2011; Markou, Georgakakis, 2011; Su et al., 2011]: биоизъятие значительных количеств фосфора и азота микроводорослями и цианобактериями с одновременным накоплением их биомассы было продемонстрировано для городских [Chi et al., 2011; Li et al., 2011; Su et al., 2011], промышленных [Chinnasamy et al., 2010; Markou, Georgakakis, 2011] и сельскохозяйственных [Mulbry et al., 2008; 2009; Markou, Georgakakis, 2011] сточных вод.

Зеленые микроводоросли чаще других микроводорослей используются в исследованиях по биоизъятию азота и фосфора из сточных вод (см. табл. 3). При этом среди зеленых микроводорослей в отношении возможностей биоизъятия самыми изучаемыми являются представители рода *Chlorella*. Эффективность изъятия фосфора и азота для разных видов *Chlorella* варьирует в пределах от 8 до 100%; в целом, представители вида *Chlorella vulgaris* более эффективны, чем другие виды *Chlorella* (табл.3).

Также широко используются в работах по биоизъятию биогенных элементов микроводоросли из семейства Scenedesmaceae (род *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus*). Их эффективность варьируется в широких пределах (20–100%; табл.3).

Цианобактерии наравне с микроводорослями привлекательны для разработки технологий по биоизъятию фосфора и азота из сточных вод. К наиболее подходящим для биоизъятия цианобактериям относятся нитчатые цианобактерии, поскольку собранные в нити клетки легче отделить от очищенных сточных вод, чем индивидуальные клетки [Markou, Georgakakis, 2011]. В исследованиях по биоизъятию широко используются нитчатые цианобактерии рода *Spirulina* и *Oscillatoria* (табл.3) с эффективностью биоизъятия 72–100%.

Табл. 3 Эффективность биоизъятия азота и фосфора из сточных вод штаммами микроводорослей и цианобактерий

Штамм микроорганизма	Эффективность изъятия азота (%)	Эффективность изъятия фосфора (%)	Ссылка
Зеленые микроводоросли			
<i>Chlorella kessleri</i> UTEX 398	8-19	8-20	[Lee, Lee, 2001]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> FACHB-9	87-89	70	[Hongyang et al., 2011]
<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1602	-	45-72	[Hernandez et al., 2006]
<i>Chlorella vulgaris</i> AG30007	92	87	[Mujtaba et al., 2018]
<i>Chlorella vulgaris</i>	23-100	46-94	[Aslan, Kapdan, 2006]
<i>Chlorella vulgaris</i> NTM06	55-99	-	[Khan., Yoshida, 2008]
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	30-95	20-55	[González et al., 1997]
<i>Chlorella vulgaris</i> CICESE	55-88	12-100	[Ruiz-Marín et al., 2010]
<i>Chlorella vulgaris</i> FACHB-1227	81	85	[Lv et al., 2018]
<i>Parachlorella kessleri</i> TY	73	81	[Lv et al., 2018]
<i>Chlorococcum</i> sp. GD	73	81	[Lv et al., 2018]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	42-83	13-14	[Kong et al., 2010]
<i>Scenedesmus</i> sp.	30-100	30-100	[Zhang et al., 2008]
<i>Scenedesmus dimorphus</i> (Turp.) Kutz	-	20-55	[González et al., 1997]
<i>Scenedesmus obliquus</i> CICESE	79-100	47-98	[Ruiz-Marín et al., 2010]
<i>Scenedesmus quadricauda</i> FACHB-1468	77	82	[Lv et al., 2018]
<i>Scenedesmus obliquus</i> FACHB-417	71	62	[Lv et al., 2018]
<i>Desmodesmus</i> sp. CHX1	79	92	[Luo et al., 2018]
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	100	100	[Chokshi et al., 2016]
Диатомовые микроводоросли			
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> SA91B33	80-100	50-100	[Craggs et al., 1997]
Гаптофитовые микроводоросли			
<i>Isochrysis galbana</i> (Clone T-ISO)	99	-	[Valenzuela-Espinoza et al., 1999]
Цианобактерии			
<i>Oscillatoria</i> sp. SA91CY1	100	100	[Craggs et al., 1997]
<i>Spirulina platensis</i> UMACC 161	96-100	87-99	[Phang et al., 2000]
<i>Spirulina</i> sp. SF	84-96	72-87	[Olguín et al., 2003]

Таким образом, биоизъятие излишков фосфора и азота из сточных вод с помощью подходящих штаммов микроводорослей и цианобактерий является весьма перспективным, главным образом, ввиду их высокой эффективности изъятия и возможности дальнейшего использования биомассы микроводорослей и цианобактерий для получения полезных продуктов.

3.5.4. Преимущества использования микроводорослей и цианобактерий в качестве биоудобрений

Биомасса микроводорослей, обогащенная фосфором и азотом, может быть использована в качестве биоудобрений [Mulbry et al., 2005]. Одним из основных преимуществ биоудобрений на основе микроводорослей по сравнению с минеральными удобрениями заключается в том, что высвобождение доступных для растений фосфора и азота из них происходит постепенно, с очень низкой скоростью [Mulbry et al., 2005; Ray et al., 2013]. Такая скорость оптимальна для поглощения растениями: вероятность того, что доступный фосфор и азот из удобрений не успеет поглотиться растениями и будет вымыт из почвы со сточными водами, резко снижается. Таким образом, при использовании биоудобрений (в отличие от минеральных удобрений) риск загрязнения водных экосистем излишками фосфора и азота и развития их эвтрофикации значительно снижен.

Применение микроводорослей для биоизъятия фосфора из сточных вод и дальнейшее использование обогащенной фосфором биомассы в качестве биоудобрений позволяет вернуть смываемый с полей фосфор в агроэкосистемы. Осуществление этой задачи внесло бы значительный вклад в решение глобальной проблемы дефицита фосфора [Solovchenko et al., 2016].

Еще одним преимуществом биоудобрений на основе микроводорослей является то, что при их использовании не нужно проводить пахотные работы [Mulbry et al., 2005], как при использовании минеральных удобрений, что сильно экономит рабочие ресурсы и энергию. Зеленые микроводоросли являются перспективной группой микроводорослей для создания биоудобрений: эффективность биоудобрений на основе микроводорослей рода *Chlorella* и *Acutodesmus* была продемонстрирована в работах [Yadavalli, Heggers, 2013] и [Garcia-Gonzalez, Sommerfeld, 2016], соответственно.

Биомасса цианобактерий, обогащенная фосфором, также может быть использована в качестве высокоэффективных биоудобрений с низкой скоростью высвобождения доступного для растений фосфора [Ray et al., 2013]. Для ряда цианобактерий (*Anabaena variabilis*, *Nostoc*

muscorum, *Aulosira fertissima* и *Tolypothrix tenuis*) была продемонстрирована эффективность их использования в качестве биоудобрений [Singh et al., 2016].

Возможность наличия различных загрязняющих веществ в составе биоудобрений, например, различных патогенов, может вызывать беспокойство о безопасности их применения. Тем не менее, считается, что риски, связанные с использованием биоудобрений в сельском хозяйстве, являются очень низкими [Mulbry et al., 2005; Wilfert et al., 2015].

Итак, биоудобрения на основе микроводорослей и цианобактерий являются дружественной по отношению к окружающей среде альтернативой минеральным удобрениям, фосфор и азот из которых более эффективно поглощаются растениями и в меньшей степени вымываются с полей со сточными водами, снижая риск загрязнения водных экосистем излишками фосфора и азота.

3.5.5. Нерешенные вопросы и проблемы использования микроводорослей и цианобактерий в биотехнологии

Накапливающие азот и фосфор микроводоросли и цианобактерии могут быть применены в биотехнологии для биоизъятия излишков фосфора и азота из сточных вод и дальнейшего их использования в качестве биоудобрений [Ray et al., 2013; Solovchenko et al., 2016]. Однако, на настоящий момент использование этих микроорганизмов в указанных биотехнологических процессах затруднено ввиду ряда нерешенных вопросов и проблем.

Разработка биотехнологических систем с контролируемым, эффективным изъятием фосфора из сточных вод с помощью микроводорослей требует детального представления о механизмах и регуляции процессов избыточного поглощения фосфора [Powell et al., 2008; 2009; Dyrhman, 2016, P. 158] в клетках этих организмов. Особенно важным является понимание метаболизма полифосфатов — основных клеточных резервов фосфора микроводорослей [Kulaev et al., 2004, P. 174]. Тем не менее, на сегодняшний день о механизмах синтеза и деградации полифосфатов, а также о регуляции этих процессов у микроводорослей в условиях избытка фосфора в среде известно очень мало. Знания о ферментах, участвующих в синтезе полифосфатов в клетках микроводорослей, и о их регуляции позволят разработать технологии для создания высокоэффективных генно-инженерных штаммов микроводорослей с увеличенной способностью к поглощению фосфора из среды и избыточному образованию полифосфатов [Solovchenko et al., 2016].

При разработке систем эффективного изъятия фосфора из сточных вод с помощью цианобактерий встает вопрос об использовании diaзотрофных или недiazотрофных штаммов. Однако влияние diaзотрофии на избыточное поглощение фосфора из среды и избыточное образование полифосфатов в цианобактериях [Jensen, Sicko, 1974; Allen, 1984] до сих пор не изучалось.

Для создания высокоэффективных биотехнологических систем изъятия азота из сточных вод с помощью микроводорослей необходимы знания о способностях этих организмов к накоплению азота в условиях избытка азота. Несмотря на то, что на настоящий момент показано наличие потенциальных резервов азота в клетках некоторых микроводорослей [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972; Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013; Moudříková et al., 2017a], распространенность этого явления среди микроводорослей, а также метаболизм этих потенциальных резервов в условиях отсутствия/избытка азота в среде не изучались.

Таким образом, использование микроводорослей и цианобактерий, способных к накоплению фосфора и азота, в биотехнологии затруднено ввиду недостатка фундаментальных сведений о метаболизме клеточных резервов фосфора и азота.

3.6. Заключение к обзору литературы

Проведенный анализ литературы позволяет сделать вывод о том, что использование в биотехнологии микроводорослей и цианобактерий, аккумулирующих ФоС- и АС-включения — перспективное решение проблем, среди которых глобальный дефицит фосфора, ущерб для окружающей среды из-за производства минеральных удобрений и неэффективность используемых минеральных удобрений, приводящая к эвтрофикации водоемов. Многообещающими в этом плане являются зеленые микроводоросли, относящиеся к роду *Chlorella* и к семейству Scenedesmaceae, и нитчатые цианобактерии, например, представители родов *Anabaena* и *Nostoc*. Слабая изученность механизмов и регуляции накопления ФоС- и АС-включений в этих микроорганизмах тормозит разработку биотехнологий на их основе. О метаболизме ФоС- и АС-включений можно судить по их распределению и локализации в клетках. Из всех известных аналитических методов только методы аналитической ПЭМ позволяют исследовать эти включения на субклеточном уровне и достоверно определять их локализацию. Количественная оценка определенного методом аналитической ПЭМ содержания ФоС- и АС-включений в клетках была бы полезна в исследованиях метаболизма этих включений.

4. Материалы и методы

4.1. Штаммы микроводорослей и цианобактерий, условия культивирования

4.1.1. Общая информация

Основная информация об исследуемых в работе штаммах, их кратких обозначениях и условиях их культивирования в отношении наличия источников фосфора и азота в среде приведена в табл. 4. Во всех экспериментах культивирование штаммов проводили минимум в двух биологических повторностях ($n \geq 2$).

Табл. 4. Исследованные в работе штаммы микроводорослей и цианобактерий, условия их культивирования (подробнее см. в разделах 4.1.2. — 4.1.8.)

Полное наименование штамма и его краткое обозначение	Краткое описание условий культивирования	Используемая культуральная среда, источники фосфора и азота в ее составе
Эукариотические микроводоросли		
<i>Chlorella vulgaris</i> CCALA 256 <i>C. vulgaris</i> 256	Восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	1) Бесфосфорная среда Тамия (Тамиуа) [Кузнецов, Владимирова, 1964]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота KNO_3 • без источника фосфора 2) Среда Тамия (Тамиуа) [Кузнецов, Владимирова, 1964]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота KNO_3 • источник фосфора KH_2PO_4
<i>Desmodesmus</i> sp. IPPAS S-2014 <i>Desmodesmus</i> sp.	Восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	1) Бесфосфорная среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота $NaNO_3$ • без источника фосфора 2) Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота $NaNO_3$ • источник фосфора K_2HPO_4
	Голодание по азоту	Безазотная среда BG-11 ₀ [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • без источника азота • источник фосфора K_2HPO_4
	Культивирование в среде с азотом	Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота $NaNO_3$ • источник фосфора K_2HPO_4
	Оптимальные для стационарной культуры	Среда 1/2 SŠ [Zachleder, Šetlík, 1982]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота KNO_3

Полное наименование штамма и его краткое обозначение	Краткое описание условий культивирования	Используемая культуральная среда, источники фосфора и азота в ее составе
		<ul style="list-style-type: none"> • источник фосфора KH_2PO_4
Эукариотические микроводоросли		
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1 <i>C. vulgaris</i> IPPAS C-1	Восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	1) Бесфосфорная среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3 • без источника фосфора 2) Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3 • источник фосфора K_2HPO_4
	Оптимальные для стационарной культуры	Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3 • источник фосфора K_2HPO_4
<i>Tetradesmus obliquus</i> IPPAS S-2023 <i>T. obliquus</i> S-2023	Оптимальные для непрерывного культивирования	Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3 • источник фосфора K_2HPO_4
<i>Amphidinium carterae</i> NCMA CCMP1314 <i>A. carterae</i> CCMP1314	Восстановление азотного питания после голодания по азоту	1) Безазотная среда f/2 [Guillard, Ryther, 1962]: <ul style="list-style-type: none"> • без источника азота • источник фосфора NaH_2PO_4 2) Среда f/2 [Guillard, Ryther, 1962]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3, содержащий изотоп ^{15}N • источник фосфора NaH_2PO_4
<i>Lobosphaera incisa</i> SAG 2468 <i>L. incisa</i> 2468	Восстановление азотного питания после голодания по азоту	1) Безазотная среда BG-11, модифицированная по [Boussiba, Vonshak, 1991]: <ul style="list-style-type: none"> • без источника азота • источник фосфора K_2HPO_4 2) Среда BG-11, модифицированная по [Boussiba, Vonshak, 1991]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3 • источник фосфора K_2HPO_4
	Голодание по фосфору	Бесфосфорная среда BG-11, модифицированная по [Boussiba, Vonshak, 1991]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO_3 • без источника фосфора

Полное наименование штамма и его краткое обозначение	Краткое описание условий культивирования	Используемая культуральная среда, источники фосфора и азота в ее составе
Цианобактерии (прокариоты)		
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7118 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7118	Восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	1) Бесфосфорная среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO₃ • без источника фосфора 2) Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO₃ • источник фосфора K₂HPO₄
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	При отсутствии источников азота восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	1) Бесфосфорная безазотная среда BG-11 ₀ [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • без источника азота • без источника фосфора 2) Безазотная среда BG-11 ₀ [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • без источника азота • источник фосфора K₂HPO₄
	Восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору	1) Бесфосфорная среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO₃ • без источника фосфора 2) Среда BG-11 [Rippka et al., 1979]: <ul style="list-style-type: none"> • источник азота NaNO₃ • источник фосфора K₂HPO₄

4.1.2. Штамм *Chlorella vulgaris* CCALA 256: восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору

Штамм свободноживущей микроводоросли *Chlorella vulgaris* CCALA 256 (Семейство Chlorellaceae, Класс Trebouxiophyceae, Отдел Chlorophyta) был выделен из пресного озера Пулуке (Puruke) в Новой Зеландии (1982) и депонирован в Коллекции культур автотрофных организмов (Culture Collection of Autotrophic Organisms, CCALA) в городе Требонь (Třeboň), Чехия (<http://ccala.butbn.cas.cz/en/>). Штамм *C. vulgaris* 256 получали из указанной коллекции. Голодные по фосфору клетки получали путем культивирования *C. vulgaris* 256 (начальная концентрация хлорофилла 25 мг л⁻¹) в 5 л бесфосфорной среды Тамия (Tamiya), содержащей в качестве источника азота нитрат калия (KNO₃, 5 г л⁻¹) [Кузнецов, Владимирова, 1964] и не содержащей источников фосфора, в V-образном (V-bag) биореакторе NOVAgreen® (NOVAgreen, Германия)

внутри теплицы. Клетки культивировали при постоянном барботировании газо-воздушной смесью (ГВС) CO₂ и воздуха с концентрацией CO₂ 2,5% со скоростью 5 л мин⁻¹ при естественном солнечном освещении (март в г. Юлих, Германия), комбинируемом с дополнительным освещением 250 мкмоль фотонов фотосинтетически активной радиации (ФАР) м⁻² с⁻¹. После 8 дней культивирования в бесфосфорной среде, культуру отбирали и ресуспендировали в том же объеме полной среды Тамия, содержащей, помимо источника азота, источник фосфора KН₂РO₄ (1,25 г л⁻¹).

Культивирование штамма *C. vulgaris* 256 проводили совместно с профессором кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ Соловченко А.Е. и сотрудником института биологических наук и наук о Земле Юлихского исследовательского центра FZJ (Юлих, Германия) доктором Ладиславом Недбалом (Ladislav Nedbal).

4.1.3. Штамм *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014: культивирование в среде с азотом, голодание по азоту и стационарная культура

Штамм симбиотической микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (Семейство Scenedesmaceae, Класс Chlorophyceae, Отдел Chlorophyta), ранее обозначенный как *Desmodesmus* sp. 3Dr86E-1, был выделен сотрудниками кафедры биоинженерии из симбиоза с гидроидным полипом *Dynamena pumila* [Горелова и др., 2012], образцы которого были собраны в верхней части сублиторальной зоны (0–2 м) Ругозерской губы Кандалакшского залива Белого моря (66° 34' с.ш., 33° 08' в.д.). Предкультуру *Desmodesmus* sp. получали путем культивирования клеток в 0,75-л колбах на воздухе в 300 мл среды BG-11, содержащей в качестве источников азота и фосфора нитрат натрия (NaNO₃, 1,5 г л⁻¹) и гидрофосфат калия (K₂HPO₄, 0,04 г л⁻¹) [Rippka et al., 1979], при постоянной температуре 25°C и постоянном освещении 40 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹. Предкультуру поддерживали на экспоненциальной фазе роста путем ежедневных разбавлений средой. Для культивирования в среде с азотом или для создания условий дефицита азота клетки предкультуры осаждали центрифугированием (1200 ×g, 5 мин), дважды отмывали безазотной средой BG-11₀, содержащей в качестве источника фосфора K₂HPO₄ (0,04 г л⁻¹) и не содержащей источников азота [Rippka et al., 1979], и ресуспендировали в полной среде BG-11 или безазотной среде BG-11₀ до плотности культуры по содержанию хлорофилла 25 мг л⁻¹. Клетки культивировали в полной среде BG-11 или в безазотной среде в стеклянных колоннах (6 см внутренний диаметр, 1,5 л объем) при постоянной температуре 27°C, постоянном освещении 480 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹ и барботировании воздухом со скоростью 0,3 л мин⁻¹.

Стационарную культуру штамма *Desmodesmus* sp. для анализа методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) получали путем культивирования клеток в 50-мл флаконах в 35 мл среды 1/2 SŠ, содержащей в качестве источников азота и фосфора нитрат калия (KNO_3 , 2 г л⁻¹) и дигидрофосфат калия (KH_2PO_4 , 0,34 г л⁻¹) [Zachleder, Šetlík, 1982], соответственно, на воздухе при комнатной температуре 20°C при дневном естественном освещении 20 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹.

Культивирование штамма *Desmodesmus* sp. в экспериментах по культивированию в среде с азотом и при азотном голодании проводили совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ Селях И.О., Семеновой Л.Р. и Щербаковым П.Н. Культивирование штамма *Desmodesmus* sp. для анализа методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР проводили совместно с доцентом кафедры биомолекулярной физики института физики Карлова университета (Прага, Чехия) доктором Петером Мойжешем (Peter Mojzeš).

4.1.4. Штаммы *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014, *Nostoc* sp. PCC 7118 и *Nostoc* sp. PCC 7120: восстановление фосфорного питания после голодания по фосфору

В работе использовали штамм пресноводной свободноживущей микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Семейство Chlorellaceae, Класс Trebouxiophyceae, Отдел Chlorophyta), выделенный из лужи в Архангельской области в России (1960) и депонированный в коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS института физиологии растений РАН (<http://collection.cellreg.org/>).

Для анализа формирования ФоС-включений у diaзотрофных и недiazотрофных цианобактерий при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде в работе исследовали два цианобактериальных штамма рода *Nostoc* (Семейство Nostocaceae, Отдел Cyanobacteria): *Nostoc* sp. PCC 7118 и *Nostoc* sp. PCC 7120, ранее обозначенные как *Anabaena* sp. PCC 7118 [Khudyakov and Pinevich, 1991] и *Anabaena* sp. PCC 7120 [López-Gomollón et al., 2007], соответственно.

Штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 и цианобактерий *Nostoc* sp. PCC 7118 и *Nostoc* sp. PCC 7120 подвергали условиям дефицита фосфора с последующим восстановлением фосфорного питания. В случае штамма *Nostoc* sp. PCC 7120, способного к diaзотрофии, эксперимент по восстановлению фосфорного питания после

голодания по фосфору проводили в двух вариантах: 1) при наличии источника азота в среде, 2) при отсутствии источника азота в среде.

В работе предкультуры штаммов получали путем культивирования клеток в 0,75-л колбах (*C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus* sp.) или стеклянных колоннах (6 см внутренний диаметр, 1,5 л объем) (*Nostoc* sp. PCC 7118, *Nostoc* sp. PCC 7120) в 300 мл среды BG-11, при освещении 40 мкмоль фотонов ФАР м⁻² с⁻¹ без барботирования (*C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus* sp.) или с постоянным барботированием ГВС CO₂ и воздуха с концентрацией CO₂ 2% со скоростью 0,3 л мин⁻¹ (*Nostoc* sp. PCC 7118, *Nostoc* sp. PCC 7120). Для получения предкультуры *Nostoc* sp. PCC 7120, адаптированной к безазотной среде, клетки *Nostoc* sp. PCC 7120 культивировали в безазотной среде BG-11₀ в тех же условиях, которые указаны выше для предкультуры *Nostoc* sp. PCC 7120, в течение 20 дней. Предкультуры поддерживали на экспоненциальной фазе роста путем ежедневных разбавлений соответствующей средой.

Для создания условий дефицита фосфора клетки предкультур осаждали центрифугированием (1200 ×g, 5 мин), дважды отмывали бесфосфорной средой BG-11 (в случае предкультуры *Nostoc* sp. PCC 7120, адаптированной к безазотной среде, бесфосфорной средой BG-11, также не содержащей источников азота) и ресуспендировали в той же среде, которой отмывали, до плотности культуры по содержанию хлорофилла 25 мг л⁻¹. Клетки культивировали в бесфосфорной среде (в случае клеток *Nostoc* sp. PCC 7120, адаптированных к безазотной среде, в бесфосфорной безазотной среде) в стеклянных колоннах (внутренний диаметр 6 см, объем 1,5 л) при постоянной температуре 27°C, постоянном освещении 480 мкмоль фотонов ФАР м⁻² с⁻¹ и барботировании ГВС CO₂ и воздуха (с концентрацией 5% CO₂ при культивировании *C. vulgaris* IPPAS C-1, 20% CO₂ — *Desmodesmus* sp., 2% CO₂ — *Nostoc* sp. PCC 7118 и *Nostoc* sp. PCC 7120) со скоростью 0,3 л мин⁻¹.

После остановки деления клеток (после 11 дней голодания по фосфору при культивировании *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Nostoc* sp. PCC 7118, после 20 дней — при культивировании *Desmodesmus* sp., после 13 дней — при культивировании *Nostoc* sp. PCC 7120, адаптированной к безазотной среде, после 27 дней — при культивировании *Nostoc* sp. PCC 7120 в среде, содержащей источник азота) клетки отбирали, ресуспендировали в том же объеме среды BG-11 (в случае клеток *Nostoc* sp. PCC 7120, адаптированных к безазотной среде, в том же объеме безазотной среды), содержащей источник фосфора K₂HPO₄ (конечная концентрация 400 мкмоль л⁻¹ = 0,07 г л⁻¹), и культивировали в тех же условиях, при которых создавали условия дефицита фосфора.

Культивирование штаммов *C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus* sp., *Nostoc* sp. PCC 7118 и *Nostoc* sp. PCC 7120 в экспериментах по восстановлению фосфорного питания проводили совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Селях И.О., к.б.н. Семеновой Л.Р. и Щербаковым П.Н.

4.1.5. Штамм *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1: стационарная культура

Стационарную культуру штамма *C. vulgaris* IPPAS C-1 получали путем культивирования клеток в 50-мл флаконах в 35 мл среды BG-11, содержащей в качестве источников азота и фосфора нитрат натрия (NaNO_3 , 1,5 г л⁻¹) и гидрофосфат калия (K_2HPO_4 , 0,04 г л⁻¹) [Rippka et al., 1979], соответственно, на воздухе при комнатной температуре 20°C при дневном естественном освещении 20 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹.

Культивирование штамма *C. vulgaris* IPPAS C-1 проводили совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Селях И.О., к.б.н. Семеновой Л.Р. и Щербаковым П.Н.

4.1.6. Штамм *Tetradesmus obliquus* IPPAS S-2023

Штамм свободноживущей пресноводной микроводоросли *Tetradesmus obliquus* IPPAS S-2023 (Семейство Scenedesmaceae, Класс Chlorophyceae, Отдел Chlorophyta), ранее обозначенный как *Acutodesmus obliquus* 46, был выделен из прибрежных каменных ванн острова Покормёжный Белого моря (66° 28' 45.6" с.ш., 33° 31' 22.7" в.д.) сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ [Ismagulova et al., 2017]. Клетки *T. obliquus* S-2023 культивировали в 0,75-л колбах на воздухе в 300 мл среды BG-11, при постоянной температуре 25°C и постоянном освещении 40 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹. Культуру поддерживали на экспоненциальной фазе роста путем ежедневных разбавлений средой.

Культивирование штамма *T. obliquus* S-2023 проводили совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Селях И.О., к.б.н. Семеновой Л.Р. и Щербаковым П.Н.

4.1.7. Штамм *Amphidinium carterae* NCMA CCMP1314: восстановление азотного питания после голодания по азоту

Штамм морской свободноживущей динофитовой микроводоросли *Amphidinium carterae* NCMA CCMP1314 (Семейство Gymnodiniaceae, Класс Dinophyceae, Отдел Dinoflagellata) был выделен из пролива Нантакет (Nantucket Sound) в Северной Атлантике в 1954 году и депонирован в Национальном центре морских водорослей и микробиоты (National Center for Marine Algae and Microbiota, NCMA) в городе Фэлмэф (Falmouth), штат Массачусетс, США (<https://ncma.bigelow.org/ccmp1314#.XVg25ugzY-U>). Штамм *A. carterae* CCMP1314 получали из указанной коллекции.

Предкультуру *A. carterae* CCMP1314 получали путем культивирования клеток в 650-мл культуральном флаконе типа «культуральный матрас» площадью 175 см² в 300 мл среды f/2, содержащей в качестве источников азота и фосфора нитрат натрия (NaNO₃, 0,075 г л⁻¹) и дигидрофосфат натрия (NaH₂PO₄, 0,005 г л⁻¹) [Guillard, Ryther, 1962], соответственно, на воздухе при комнатной температуре 20°C при дневном естественном освещении 20 мкмоль фотонов ФАР м⁻² с⁻¹.

Для создания дефицита азота клетки предкультуры осаждали центрифугированием (2000 ×g, 5 мин), дважды отмывали безазотной средой f/2, содержащей в качестве источника фосфора NaH₂PO₄ (0,005 г л⁻¹) и не содержащей источников азота, и ресуспендировали в 300 мл той же среды. Клетки культивировали в безазотной среде в трех 650-мл культуральных флаконах типа «культуральный матрас» площадью 175 см² (по 100 мл клеточной суспензии в каждом), поставленных вертикально на боковую сторону, при комнатной температуре 20°C, при периодическом освещении 12 ч свет / 12 ч темнота интенсивностью 20 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹ и при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере PS-M3D (Grant Instruments Ltd, Великобритания) со скоростью 10 оборотов мин⁻¹ с поршневым встряхиванием (reciprocating shaking) при наклоне шейкера на 30°. На 4 день культивирования в безазотной среде интенсивность периодического освещения увеличили до 80 мкмоль фотонов ФАР м⁻² с⁻¹. Через 5 дней после начала культивирования в безазотной среде клетки из трех флаконов отбирали, ресуспендировали в том же объеме полной среды f/2, содержащей в качестве источников азота и фосфора NaNO₃ (0,075 г л⁻¹) и NaH₂PO₄ (0,005 г л⁻¹), смешивали, разделяли на три новых культуральных флакона и продолжали культивировать при тех же условиях. Добавленный к голодным по азоту клеткам источник азота нитрат натрия (NaNO₃) содержал изотоп ¹⁵N.

Культивирование штамма *A. carterae* ССМР1314 проводили совместно с доцентом кафедры биомолекулярной физики института физики Карлова университета (Прага, Чехия) доктором Петером Мойжешем (Peter Mojzeš).

4.1.8. Штамм *Lobosphaera incisa* SAG 2468: голодание по фосфору и восстановление азотного питания после голодания по азоту

Штамм свободноживущей пресноводной микроводоросли *Lobosphaera incisa* SAG 2468 (Семейство Trebouxiaceae, Класс Trebouxiophyceae, Отдел Chlorophyta) [Zorin et al., 2014], ранее обозначенный как *Parietochloris incisa*, был выделен из небольшого участка талой воды на склоне горы Татяма в Японии [Watanabe et al., 1996]. Предкультуру *L. incisa* 2468 получали путем культивирования клеток в 250-мл стеклянных колбах в модифицированной по [Boussiba, Vonshak, 1991] среде BG-11, содержащей в качестве источников азота и фосфора нитрат натрия (NaNO_3 , 1,5 г л⁻¹) и гидрофосфат калия (K_2HPO_4 , 0,04 г л⁻¹), на инкубационном шейкере Innova 44 (New Brunswick, США) со скоростью перемешивания 150 об мин⁻¹ в атмосфере, обогащенной CO_2 (200 мл мин⁻¹), при постоянной температуре 25°C и постоянном освещении 100 мкмоль фотонов ФАР м⁻²·с⁻¹. Для экспериментов по голоданию по фосфору или азоту клетки предкультуры осаждали центрифугированием (3000 ×g, 5 мин), ресуспендировали в модифицированной по [Boussiba, Vonshak, 1991] среде BG-11, лишенной источника фосфора или азота (см. табл.4), и культивировали в условиях, указанных выше для предкультуры. Через 10 дней голодания по азоту проводили восстановление азотного питания путем добавления в среду источника азота NaNO_3 до конечной концентрации 1,5 г л⁻¹.

Культивирование штамма *L. incisa* 2468 было выполнено совместно с аспиранткой лаборатории биотехнологии микроводорослей Университета Бен-Гуриона в Негеве (Беэр-Шева, Израиль) Камиллой Кокаби (Kamila Kokabi).

4.2. Подготовка образцов для анализа методами традиционной и аналитической ПЭМ

Обобщенная схема подготовки образцов в представленной работе для анализа методами традиционной и аналитической ПЭМ представлена на рис. 11.



Рис. 11 Обобщенная схема подготовки образцов в представленной работе для анализа методами традиционной и аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Подчеркиванием и жирным шрифтом выделены используемые контрастирующие соединения и тип получаемых срезов по толщине. Методы аналитической ПЭМ: СХПЭЭ – спектроскопия характеристических потерь энергии электронов, ЭДРС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, ЭФПЭМ – энергофильтрующая ПЭМ.

Клетки цианобактерий и микроводорослей, используемые в работе фиксировали в 2% (по объему) глутаровом альдегиде в 0,1 М какодилатном буфере (рН 6,8–7,2 в зависимости от рН культуры) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем фиксировали в 1% (по массе) тетраоксиде осмия (OsO_4) в том же буфере в течение 4 ч при комнатной температуре.

В отношении фиксации *A. carterae* ССМР1314 непосредственно перед процедурой фиксации клетки *A. carterae* ССМР1314 осаждали центрифугированием ($2000 \times g$, 30 с) и ресуспендировали в соответствующем объеме 1% (по массе) раствора легкоплавкой агарозы ($T = 35^\circ\text{C}$) в 0,1 М какодилатном буфере для получения суспензии с плотностью клеток около 10^8 – 10^9 клеток мл^{-1} . После затвердения агарозы скальпелем под биноклем вырезали кубики агарозы $1 \times 1 \times 1 \text{ мм}^3$ и отбирали те, в которых клетки были распределены наиболее плотно. Затем

выбранные кубики агарозы с заключенными в них клетками фиксировали согласно протоколу, описанному выше.

Обезвоживание фиксированных образцов проводили в серии водных растворов этилового спирта возрастающих концентраций 30%, 50%, 70%, 80%, 96% (по объему) и 100% этиловом спирте (Sigma, США). Затем часть образцов (для анализа методом традиционной ПЭМ) обрабатывали 2% (по массе) уранилацетатом в абсолютном этиловом спирте (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре (рис. 11). Образцы для анализа методами аналитической ПЭМ уранилацетатом не обрабатывали (рис. 11). Обезвоженные образцы заключали в эпоксидную смолу аралдит (Fluka, Германия).

Фиксация клеток цианобактерий и микроводорослей *Chlorella vulgaris* CCALA 256 и *Desmodesmus* sp. и их заливка в смолы были выполнены совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Баулиной О.И. и д.б.н. Гореловой О.А.

Фиксация клеток *Lobosphaera incisa* SAG 2468 и их заливка в смолы были выполнены совместно с аспиранткой лаборатории биотехнологии микроводорослей Университета Бен-Гуриона в Негеве (Беэр-Шева, Израиль) Камилой Кокаби (Kamilya Kokabi).

В каждом эксперименте (см. раздел 4.1.1) фиксацию клеток каждого исследуемого штамма проводили для каждой биологической повторности ($n \geq 2$).

Ультратонкие срезы с толщиной менее 70 нм заключенных в смолу образцов получали на ультрамикротоме LKB-8800 (LKB, Швеция). Ввиду обильного выкрашивания части клеточного материала из срезов, а именно материала вакуолярных включений клеток, при приготовлении ультратонких срезов некоторых образцов, для данных образцов также получали срезы с толщиной около 200–250 нм (такие срезы далее в тексте работы обозначены как толстые) на том же ультрамикротоме. Для анализа методом традиционной ПЭМ использовали ультратонкие срезы образцов, для анализа методами аналитической ПЭМ – ультратонкие и толстые (см. рис. 11). Срезы помещали на медные сеточки для электронной микроскопии с ультратонкой подложкой из формвара (Ted Pella, США). Срезы для анализа методом традиционной ПЭМ (см. рис. 11) контрастировали в цитрате свинца согласно протоколу Рейнольдса [Reynolds, 1963].

Приготовление срезов проводили в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ (центр коллективного пользования МГУ).

4.3. Анализ образцов методами традиционной и аналитической ПЭМ

4.3.1. Анализ методом традиционной ПЭМ

Анализ ультратонких срезов образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) с катодом из LaB₆ при ускоряющем напряжении 100 кВ, а также на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония) с катодом из гексаборида лантана (LaB₆) при ускоряющем напряжении 200 кВ в светлопольном широкопольном режиме.

ПЭМ-анализ образцов на микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) проводили совместно с сотрудником кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Гореловой О.А.

Для каждого исследуемого образца ПЭМ-анализ проводили на 30 случайно выбранных срезах клеток ($n = 30$).

4.3.2. Элементный анализ методами ЭДРС и СХПЭЭ

Анализ образцов проводили с использованием следующих методов аналитической ПЭМ: ЭДРС, СХПЭЭ и элементное картирование методом ЭФПЭМ (см. раздел 4.3.3).

Для проведения элементного анализа с выбранного точечного участка образца аналитический микроскоп JEM-2100 (JEOL, Япония) оснащен светлопольным детектором для работы в режиме сканирующей ПЭМ (СПЭМ) (JEOL, Япония), темнопольным Gatan 806 HAADF-детектором (high-angle annular dark-field) (Gatan, США), рентгеновским кремний-дрейфовым детектором X-Max с активной площадью кристалла 80 мм² (Oxford Instruments, Великобритания) и постколонным энергетическим фильтром GIF Quantum ER (Gatan, США).

Элементный анализ образца методом ЭДРС проводили с использованием указанного рентгеновского детектора X-Max (Oxford Instruments, Великобритания). Энергодисперсионные рентгеновские спектры от выбранных точечных участков образца регистрировали в диапазоне энергий рентгеновского излучения от 0 до 10 кэВ в режиме светлопольной СПЭМ. Время набора сигнала для одного спектра составляло 30 с. Регистрацию и обработку энергодисперсионных спектров проводили в режиме «Point&ID» в программе INCA (Oxford Instruments, Великобритания). Полученные спектры приводили в диапазоне 0,15–4 кэВ, в который входят наиболее интенсивные пики всех биологически значимых элементов P, N, O, K, Ca, Mg, Na, Cl и S (см. соответствующие значения энергии характеристического рентгеновского излучения в приложении 1).

Для каждого исследуемого образца получение ЭДРС-спектров с клеточных ФоС- или АС-включений проводили для 40 ФоС- или АС-включений ($n = 40$).

Информация в спектрах ЭДРС о содержании выявляемых элементов является качественной, то есть по получаемым спектрам ЭДРС можно делать достоверный вывод только о качественном составе образца без определения количеств (как абсолютных, так и относительных) атомов выявляемых элементов. Отношение интенсивностей пиков выявляемых элементов в каждом энергодисперсионном спектре не равно отношению концентраций атомов этих элементов в анализируемой области образца [Синдо, Оикава, 2006, С. 156 — 157]. Чтобы количественно сравнивать спектры ЭДРС между собой, необходимо получить информацию об отношениях концентраций выявляемых элементов между собой в каждом из спектров (например, соотношения P/N для каждого спектра).

Известно, что отношение концентраций выявляемых элементов между собой определяется отношением интенсивностей их пиков в спектре и так называемым k -фактором [Синдо, Оикава, 2006, С. 156]. Значение k -фактора зависит от множества параметров, в том числе, от толщины и локального состава образца (подробное описание см. в [Синдо, Оикава, 2006, С. 152, 156]). Есть два пути определения k -фактора: теоретический расчет и экспериментальное определение с помощью эталонных образцов с известным элементным составом. Что касается теоретического расчета k -фактора, то точность количественного анализа с теоретически рассчитанным k -фактором является низким, особенно для соединений с сильно отличающимися атомными номерами [Синдо, Оикава, 2006, С. 157, 158]. Биологические образцы, а именно срезы клеток, контрастированные тетраоксидом осмия, являются гетерогенными образцами с сильно отличающимися атомными номерами из-за присутствия в их составе различных атомов множества биологически значимых элементов (см. приложение 1) и атомов осмия. Для экспериментального расчета k -фактора необходимо подготовить эталонные образцы с известным составом, который будет близок к составу анализируемого образца [Синдо, Оикава, 2006, С. 158]. Изготовление эталонных образцов для гетерогенных биологических образцов (срезов клеток) является весьма затруднительным, поскольку клеточный срез содержит множество атомов различных элементов (см. приложение 1), концентрации которых в разных участках клеточного среза могут значительно различаться.

Ввиду сложностей проведения достоверного количественного ЭДРС-анализа биологических образцов в нашей работе количественную оценку содержания элементов по спектрам ЭДРС не проводили.

Элементный анализ методом СХПЭЭ проводили с использованием постколонного энергетического фильтра GIF Quantum ER (Gatan, США). Ввиду ограничения по толщине образцов, анализируемых этим методом [Синдо, Оикава, 2006, С. 110], для проведения элементного анализа методом СХПЭЭ использовали ультратонкие срезы образцов. Спектры ХПЭЭ регистрировали от выбранных точечных участков образца в диапазоне энергий от 100 до 600 эВ в темнопольном сканирующем режиме с использованием HAADF-детектора (Gatan, США). В указанный диапазон энергий входят наиболее интенсивные пики биологически значимых элементов Р, N, О и Са, выявляемых в спектрах потерь энергии электронов (см. соответствующие значения в приложении 2). Для аппроксимации фона в спектрах использовалась степенная функция. Регистрацию и обработку спектров ХПЭЭ проводили в программе Digital micrograph (Gatan, США).

Для каждого исследуемого образца получение спектров ХПЭЭ с клеточных ФоС- или АС-включений проводили для 10 ФоС- или АС-включений ($n = 10$).

4.3.3. Элементное картирование по фосфору и азоту методом ЭФПЭМ

Пространственно-разрешенный элементный анализ осуществляли путем проведения элементного картирования по N и по Р методом ЭФПЭМ с использованием постколонного энергетического фильтра GIF Quantum ER (Gatan, США). Поскольку метод ЭФПЭМ основан на методе СХПЭЭ, для элементного картирования методом ЭФПЭМ также использовали ультратонкие срезы образцов. Перед элементным картированием для каждой анализируемой области образца регистрировали карту толщины. Элементное картирование проводили только для областей образца, для которых толщина в каждой точке не превышала оптимальное значение для ЭФПЭМ, равное 0.5λ , где λ средняя длина свободного пробега неупругого рассеяния для выбранных экспериментальных условий (см. [Синдо, Оикава, 2006, С. 105 — 106]).

Картирование по N и по Р осуществляли с использованием трехконного метода с шириной энергетической щели 15 эВ. Два предкраевых изображения при 371 эВ и 388 эВ и одно пост-краевое изображение при 412 эВ получали для картирования по N (CCD бининг 4). Для картирования по Р (CCD бининг 2) получали два предкраевых изображения при 104 эВ и 121 эВ и одно посткраевое изображение при 144 эВ. Указанные энергетические окна были выбраны, основываясь на полученных спектрах ХПЭЭ для предотвращения перекрытия с пиками других элементов. При картировании использовали апертурную диафрагму диаметром 40 мкм. Карты распределения элементов рассчитывались автоматически с использованием программного

обеспечения Digital micrograph (Gatan, США) после выравнивания полученных изображений и аппроксимации фона. Для аппроксимации фона использовали степенную функцию.

Картирование проводили на срезах образцов, не контрастированных уранилацетатом, ввиду близости пика урана со стороны меньших значений энергии к пику фосфора (см. приложение 2), который затрудняет аппроксимацию фона при картировании по фосфору.

Для повышения контраста изображений путем отфильтровывания неупруго рассеянных электронов для каждой картированной области образцов были получены энергофильтрованные изображения в пике нулевых потерь (ширина энергетической щели 15 эВ).

Картирование по N или по P методом ЭФПЭМ для каждого анализируемого образца проводили на 18 клеточных срезах ($n = 18$).

4.3.4. Метод количественного анализа резервов фосфора и азота микроводорослей и цианобактерий на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ

Разработанный автором настоящей диссертационной работы метод количественного анализа резервов фосфора и азота включал количественную оценку содержания и локализации резервов фосфора и азота в клетках микроводорослей и цианобактерий на соответствующих элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ. С помощью указанного метода количественный анализ резервов фосфора и азота проводили для клеток микроводорослей *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus* sp. и цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118. Полученные карты клеточных срезов подвергали одному из двух альтернативных алгоритмов обработки карт (последовательности действий) (см. рис. 12).

Конкретный алгоритм обработки карт выбирали в зависимости от типа и количества включений интереса, представленных на картах срезов. Для обработки элементных карт фосфора (P-карт), на которых количество ФоС-включений не превышало 10 на один клеточный срез, и карт азота (N-карт) использовали алгоритм “А”, для обработки P-карт, на которых количество включений превышало 10 на один клеточный срез, использовали алгоритм “Б” (см. рис. 12). Все вычисления проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

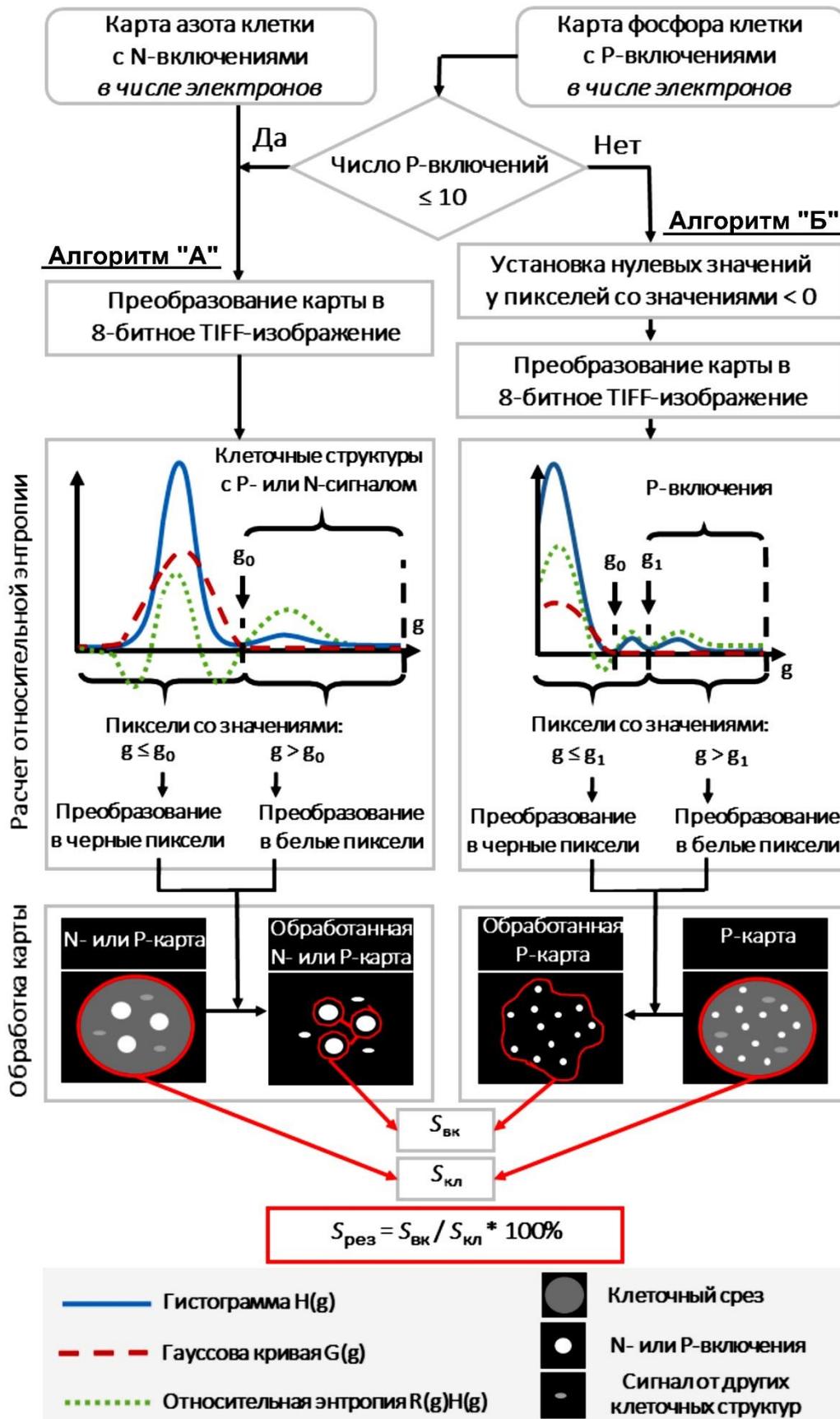


Рис. 12 Схема обработки P- и N-карт, полученных методом ЭФПЭМ. Метод количественного анализа резервов фосфора и азота включает два альтернативных алгоритма. Алгоритм «А» (левый столбец) используется для обработки N-карт и P-карт клеточных срезов,

содержащих менее 10 ФоС-включений на один клеточный срез, алгоритм «Б» (правый столбец) используется для Р-карт клеточных срезов с более чем 10 ФоС-включений на один клеточный срез. Оба алгоритма основаны на сравнении апостериорной вероятности того, что пиксель карты содержит полезную информацию, и Гауссовой априорной вероятности того, что пиксель относится к шуму. Разница между ними выражается для каждого пикселя в значении относительной энтропии. Положительные значения относительной энтропии для пикселей, сгруппированных в правой части гистограммы, свидетельствуют о том, что указанные пиксели не относятся к шуму. После расчета относительной энтропии для каждого пикселя карты и соответствующего преобразования карты в бинарное черно-белое изображение проводится простая оценка относительной площади и локализации интересующих включений на анализируемом клеточном срезе. $S_{вк}$ — общая площадь клеточных включений (в пикселях), $S_{кл}$ — общая площадь клеточного среза (в пикселях), $S_{рез}$ — относительная площадь клеточных резервов азота или фосфора. Р-включения — фосфорсодержащие включения, N-включения — азотсодержащие включения

Оба алгоритма обработки карт были основаны на сравнении апостериорной вероятности того, что пиксель карты содержит полезную информацию, и Гауссовой априорной вероятности того, что пиксель относится к шуму. Разница между ними выражалась для каждого пикселя в значении относительной энтропии. Положительные значения относительной энтропии для пикселей, сгруппированных в правой части гистограммы, свидетельствовали о том, что указанные пиксели не относятся к шуму (см. рис. 12, расчет относительной энтропии). После расчета относительной энтропии для каждого пикселя карты и соответствующего преобразования карты в бинарное черно-белое изображение проводили простую оценку относительной площади и локализации включений интереса на анализируемом клеточном срезе.

Первый этап в обоих алгоритмах обработки состоял в преобразовании исходной карты (в которой каждый пиксель имеет значение интенсивности сигнала, выраженное в числе электронов) в 8-битное TIFF-изображение. Преобразование проводили следующим образом: пикселям карты придавали значения градаций серого с использованием линейной трансформации, описанной в работе [Trebbia, Mory, 1990], в результате которой получали изображение, каждый пиксель которого имел значение g — одно из 256 значений градации серого ($g_{мин} = 0$, $g_{макс} \leq 255$). Алгоритм “Б” отличался дополнительным этапом — установкой нулевых значений у пикселей с отрицательными значениями до преобразования карты в TIFF-изображение (правая колонка в рис. 12).

Второй этап, общий для обоих алгоритмов обработки, включал расчет относительной энтропии для каждого пикселя полученного TIFF-изображения (подробнее см. [Trebbia, Mory, 1990], обоснование указанного расчета см. в работе [Trebbia, Bonnet, 1990]). Гистограмма $H(g)$

апостериорной вероятности того, что пиксель карты содержит полезную информацию, вместе с остальными параметрами были рассчитаны по следующим формулам:

$$g_{\text{cp}} = \frac{1}{P} \sum gH(g), \quad (4)$$

$$\sigma^2 = \text{variance}(H) = \frac{1}{P-1} \sum [(g - g_{\text{cp}})^2 H(g)], \quad (5)$$

где $P = \sum H(g)$ общее число пикселей в карте, g_{cp} — среднее значение градации серого для пикселей карты.

Затем рассчитывали Гауссову априорную вероятность $G(g)$ и относительную энтропию $q(H/g)$ для пикселей каждой градации серого, g , по следующим формулам:

$$G(g) = \left(\frac{P}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \right) e^{[-(g-g_{\text{cp}})^2/2\sigma^2]}, \quad (6)$$

$$q\left(\frac{H}{G}\right) = \frac{1}{P} \sum R(g)H(g), \quad (7)$$

$$\text{где } R(g) = \log \left[\frac{H(g)}{G(g)} \right]. \quad (8)$$

Третий этап включал построение гистограммы $H(g)$, Гауссовой кривой $G(g)$ и относительной энтропии, $R(g)H(g)$, на одном графике (см. рис. 12).

Пиксели с градациями серого (g) в правой части гистограмм имели положительные значения относительной энтропии, что означало, что апостериорная вероятность, $H(g)$, для данных пикселей была больше, чем Гауссова априорная вероятность $G(g)$ при тех же экспериментальных условиях (одинаковое количество электронов, приходящихся на указанное число пикселей) [Trebba, Bonnet, 1990; Trebba, Mory, 1990]. То есть пиксели N- и P-карт со значениями g , большими чем g_0 (см. рис. 12), относились к клеточным структурам, содержащим N и P, соответственно, тогда как остальные пиксели относились к шуму. Таким образом, метод позволил на N- и P-картах отличить структуры, содержащие N и P, соответственно, от пикселей, относящихся к шуму.

Заключительный этап включал преобразование карты в бинарное черно-белое изображение, при котором преобразование пикселя карты в белый пиксель происходило, если он содержал полезную информацию об элементе интереса, и в черный пиксель — если содержание элемента интереса было недостаточным. В алгоритме “А” пиксели со значениями градации серого $g > g_0$ преобразовывали в белые пиксели, а пиксели со значениями $g \leq g_0$ — в черные (см. левая колонка на рис. 12). В этом случае площадь включений интереса на обработанной карте вычисляли путем очерчивания вручную областей с включениями, избегая попадания в эти

области пикселей от других клеточных структур. Эта операция не занимала много времени, поскольку общее количество включений не превышало 10. Общую площадь клеточных включений ($S_{вк}$, в пикселях) рассчитывали как суммарное для всего клеточного среза число белых пикселей в очерченных областях (рис. 12).

В алгоритме “Б” пиксели со значениями градации серого $g > g_1$ преобразовывали в белые пиксели, а пиксели со значениями $g \leq g_1$ — в черные (см. правая колонка на рис. 12). На кривой относительной энтропии Р-карт значение g_1 определяли как окончание первого пика с правой стороны от g_0 . Этот пик соответствовал структурам, содержащим фосфор, за исключением ФоС-включений. Пиксели со значениями $g > g_1$ соответствовали ФоС-включениям. Область, в которую входили все включения, на обработанной карте очерчивали вручную. Общую площадь клеточных включений ($S_{вк}$, в пикселях) рассчитывали как число белых пикселей в очерченной области (рис. 12).

Общую площадь клеточного среза ($S_{кл}$, в пикселях) измеряли на картах до обработки. Относительную площадь клеточных резервов азота или фосфора ($S_{рез}$, в процентах) рассчитывали по следующей формуле:

$$S_{рез} = \frac{S_{вк}}{S_{кл}} * 100\% \quad (9)$$

$S_{кл}$ и $S_{вк}$ измеряли на картах случайных клеточных ультратонких срезов ($n = 18$) и на соответствующих обработанных картах, соответственно, с использованием программного обеспечения ImageJ (НИН, Bethesda MA, США).

Относительные площади клеточных резервов азота или фосфора ($S_{рез}$) рассчитывали для случайных клеточных ультратонких срезов ($n = 18$ для каждого анализируемого образца).

При измерении $S_{вк}$ для ФоС-включений локализация указанных включений была определена на соответствующих ПЭМ-изображениях анализируемых клеточных срезов. Для ФоС-включений *Nostoc* sp. PCC 7118 определяли, ассоциированы ли они с клеточными гранулами, содержащими поли-(R)-3-гидроксибутират (ПГБ). Для ФоС-включений *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus* sp. определяли вакуолярную, цитозольную, хлоропластную или ядерную локализацию. В случае, когда точное определение локализации включения было затруднено, его локализацию отмечали как «не определена».

Традиционная статистическая обработка полученных результатов для относительных площадей клеточных резервов азота и фосфора была несообразной, поскольку в наши задачи

входила характеристика гетерогенности клеток культур и число анализируемых клеточных срезов для каждого образца было ограничено ($n = 18$).

4.4. Независимое подтверждение результатов аналитической ПЭМ

4.4.1. Анализ методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Для анализа методом спектроскопии ЯМР клетки микроводорослей дважды отмывали культуральной средой, не содержащей фосфор, осаждали центрифугированием ($3000 \times g$, 2 мин) и ресуспендировали в 0,6 мл бесфосфорной среды. В образец добавляли дейтерированную воду (10% от объема образца) для стабилизации резонансных условий. Регистрацию спектров для изотопа ^{31}P проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 600 (Bruker, Германия) в лаборатории магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ. Спектры регистрировали за 8500-9000 сканов при рабочей частоте 242.94 МГц, температуре 298 К и времени задержки 2 с скан $^{-1}$. Химические сдвиги анализировали относительно 85% H_3PO_4 . Обработку спектров проводили с помощью программного обеспечения TopSpin 2.0 и MestReNova NMR (Mestrelab Research, Испания).

Анализ образцов методом спектроскопии ЯМР проводился для каждой биологической повторности ($n = 2$).

Анализ образцов методом спектроскопии ЯМР был выполнен совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ д.б.н. Польшаковым В.И.

4.4.2. Анализ методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС)

Для анализа методом ИСП-МС клетки *C. vulgaris* IPPAS C-1 дважды отмывали культуральной средой, не содержащей фосфор, осаждали центрифугированием ($3000 \times g$, 2 мин) и лиофильно высушивали. Затем лиофильно высушенные образцы растворяли в 65% азотной кислоте Suprapur[®] (Sigma Aldrich, США) и разбавляли деионизированной водой EasyRure[®] (Thermo Fisher Scientific, США). Содержание фосфора в образцах определяли с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой Element 2 (Thermo Finnigan, США) в лаборатории экспериментальной геохимии геологического факультета МГУ. При измерении содержания фосфора в качестве внутреннего стандарта использовался раствор индия.

Анализ культур клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 методом ИСП-МС проводился для каждой биологической повторности ($n = 2$). Для оценки различий уровня содержания фосфора использовали параметрический t-критерий Стьюдента ($n = 2$).

Анализ методом ИСП-МС был проведен совместно с сотрудником лаборатории экспериментальной геохимии геологического факультета МГУ д.б.н. Бычковым А.Ю.

4.4.3. Анализ методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии комбинационного рассеяния (КР)

Анализ клеток микроводорослей методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР проводили согласно протоколу, специально разработанному для исследования микроводорослей [Moudříková et al., 2016; 2017a]. Клетки *A. carterae* ССМР1314 осаждали центрифугированием ($2000 \times g$, 30 с) и ресуспендировали в соответствующем объеме 1% (по массе) раствора легкоплавкой агарозы ($T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$) в искусственной морской воде для получения суспензии с плотностью клеток около 10^8 – 10^9 клеток мл^{-1} . Искусственную морскую воду с рН 7,8 готовили на деионизированной воде с добавлением солей NaCl (конечная концентрация 450 мМ), KCl (10 мМ), CaCl₂ (9 мМ), MgCl₂·6H₂O (30 мМ) и MgSO₄·7H₂O (16 мМ). Клетки *Desmodesmus* sp. осаждали центрифугированием ($2000 \times g$, 30 с) и ресуспендировали в 0,5 мл культуральной среды, используемой для этого микроорганизма (табл.4).

Суспензии клеток анализировали на оборудованном спектрометром КР лазерном конфокальном сканирующем микроскопе WITec alpha300 RSA (WITec, Германия). Для значительного снижения высокого сигнала аутофлуоресценции хлорофилла перед регистрацией спектров КР с соответствующим картированием всей клетки проводили фотообесцвечивание анализируемой клетки микроводоросли, как описано в работе [Moudříková et al., 2016]. Спектры КР регистрировали при длине волны возбуждения лазера 532 нм, с плотностью потока фотонов 4.5×10^{11} мкмоль (фотонов)· м^{-2} · с^{-1} и временем интегрирования 80 мс на точку. Величина диапазона для картирования составляла 60 см^{-1} .

Спектры КР с соответствующим картированием всей анализируемой клетки регистрировали для, по крайней мере, 5 клеток для каждого образца ($n = 5$). Полученные карты обрабатывали с помощью программного обеспечения WITec Project Plus (WITec, Германия) и алгоритмов Matlab (MathWorks, США), как описано в работе [Moudříková et al., 2016].

Анализ методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР был выполнен совместно с доцентом кафедры биомолекулярной физики института физики Карлова

университета (Прага, Чехия) доктором Петером Мойжешем (Peter Mojzeš) и аспиранткой института биологических наук и наук о Земле Юлихского исследовательского центра (Юлих, Германия) Лу Гао (Lu Gao).

4.5. Определение дифференциальной экспрессии генов

4.5.1. Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК из клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 для секвенирования и сборки транскриптома выделяли с помощью набора RNEasy Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу изготовителя. Клетки, ресуспендированные в буфере для лизиса (Buffer RLT) из указанного набора, разрушали в гомогенизаторе TissueLyser II (Qiagen, Германия). Выделенную РНК хранили при -70°C .

Тотальную РНК из клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 для определения дифференциальной экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени выделяли с помощью набора Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия). Клетки (приблизительно 1×10^7 клеток в объеме суспензии, взятой для выделения РНК) осаждали центрифугированием ($3000 \times g$, 2 мин), ресуспендировали в 600 мкл буфера для лизиса (Buffer RLT Plus) из указанного набора Rneasy Plus Mini Kit и помещали в пробирку FastPrep® объемом 2 мл для разрушения клеток с гранулами лизирующей матрицы А (MP Biomedicals, LLC, США). Затем клетки подвергали разрушению в гомогенизаторе FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals, LLC, США) при скорости 6 м сек⁻¹ в течение 40 сек. После обработки в гомогенизаторе клеточный лизат отделяли от гранул лизирующей матрицы центрифугированием ($8000 \times g$, 5 мин) и переносили в центрифужную колонку для удаления геномной ДНК (gDNA Eliminator spin column) из указанного набора Rneasy Plus Mini Kit. Далее процедуру выделения РНК проводили согласно протоколу изготовителя набора Rneasy Plus Mini Kit. Полученную РНК хранили при -70°C .

Процедуры по выделению РНК из клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 были выполнены совместно с сотрудником кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ к.б.н. Карповой О.В. и сотрудником Института биоорганической химии к.б.н. Мамедовым И.З.

4.5.2. Секвенирование, сборка и аннотирование транскриптома

Из полученной тотальной РНК выделяли фракцию мРНК с поли(А)-хвостами с помощью магнитных гранул с олиго(dT) (Illumina, США). С полученной фракции мРНК синтезировали библиотеки кДНК с помощью набора NextFlex Rapid Directional RNA-Seq Kit (Bioo Scientific,

США) согласно протоколу изготовителя. Библиотеки кДНК разводили до 10 пМ и секвенировали с обоих концов каждого фрагмента (длина чтения 100 нуклеотидов) с помощью прибора HiSeq2000 (Illumina, США) и набора TruSeq v.3 sequencing chemistry (Illumina, США). Исходные данные обрабатывали с помощью программного пакета CASAVA v. 1.8.2 (Illumina, США). Сборку проводили с помощью программы CLC genomics Workbench (Qiagen, Германия) с минимальной длиной контига 300 нуклеотидов. Контиги аннотировали в соответствии с их молекулярной функцией и соответствующими биологическими процессами с помощью программы Blast2GO (www.blast2go.com) v3.0 InterPro scan [Jones et al., 2014] с аннотацией Nr и Pfam [Götz et al., 2008] в базах данных Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>).

Секвенирование и сборка транскриптома были выполнены совместно с сотрудником центрального европейского института технологии университета Масарика (CEITEC, Masaryk University, Брно, Чехия) к.б.н. Давыдовым А.Н. и с ведущим научным сотрудником Института биоорганической химии российской академии наук к.б.н. Звягиным И.В.

4.5.3. Выбор референсного и целевых генов *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1

Контиги, относящиеся к генам, потенциально вовлеченным в метаболизм полифосфатов, и гену эндогенного контроля, отбирали из собранного транскриптома *C. vulgaris* IPPAS C-1, исходя из аннотации контигов, а также при выравнивании последовательностей известных генов других микроорганизмов с интересующей функцией с контигами полученного транскриптома *C. vulgaris* IPPAS C-1 с помощью программы BLAST [Altschul et al., 1990].

Поиск ближайших гомологичных последовательностей к выявленным контигам проводили в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI GeneBank с помощью программы BLAST [Altschul et al., 1990]. Множественные выравнивания последовательностей проводили в программе Geneious v8.6 (Biomatters Ltd, Новая Зеландия) с использованием встроенной в программу модели Geneious Alignment с параметрами по умолчанию.

При выборе референсного и целевых генов, потенциально вовлеченных в метаболизм полифосфатов, анализировали транскриптом *C. vulgaris* IPPAS C-1, полученный сборкой *de novo* (см. раздел 4.5.2). Для достоверного анализа экспрессии целевых генов необходимо нормировать их экспрессию относительно гена, транскрипция которого не изменяется в условиях проводимого эксперимента (референсного гена = гена эндогенного контроля). Для оценки экспрессии целевых генов микроводорослей в условиях отсутствия и избытка источников фосфора в среде наиболее подходящими в качестве референсных генов являются гены

убиквитинлигаз, актиноподобных белков, β -тубулина и кальмодулина [Alexander et al., 2012; Ji et al., 2015]. В качестве референсного гена в нашей работе из транскриптома *C. vulgaris* IPPAS C-1 выбрали контиг, транслированная последовательность которого (GenBank: MK334250) имела высокую степень идентичности с участками генов убиквитинлигаз E3 микроводорослей и растений (см. приложение 3). Для дизайна праймеров для проведения ПЦР в реальном времени мы выбрали участок последовательности выявленного контига MK334250, который имел 98% идентичности с убиквитинлигазой E3 *Chlorella sorokiniana* (приложение 3).

При анализе транскриптома *C. vulgaris* IPPAS C-1 нами был обнаружен гомолог субъединиц комплекса VTC, полифосфат-полимеразы, осуществляющей биосинтез полифосфатных цепей, — контиг, последовательность которого (GenBank: MK334249) имела высокую степень идентичности с белками Vtc1, Vtc2 и Vtc4 как зеленых микроводорослей, так и грибов, в том числе дрожжей (см. приложение 4). Поскольку указанный контиг MK334249 имел высокую степень идентичности с доменом, характерным для трех белков комплекса VTC (Vtc1, Vtc2 и Vtc4), то достоверно определить к какому из них относится выявленный контиг не представлялось возможным. Однако, поскольку все три белка Vtc1, Vtc2 и Vtc4 принимают участие в синтезе полифосфатных цепей в составе комплекса VTC [Gerasimaitė et al., 2016], то по изменению экспрессии домена, характерного для указанных трех белков, можно косвенно судить об изменении активности комплекса VTC в целом в данных экспериментальных условиях. Для того, чтобы оценить дифференциальную экспрессию комплекса VTC в клетках *C. vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде мы провели дизайн праймеров для проведения ПЦР в реальном времени на участке контига MK334249, который имел 84% идентичности с белком Vtc1 микроводоросли *C. variabilis* (приложение 4).

Поскольку в метаболизм полифосфатов, помимо полифосфат-полимеразы, вовлечены также фосфатазы, участвующие в гидролизе фосфатсодержащих соединений с высвобождением неорганического фосфата — субстрата полифосфат-полимеразы, и белки-транспортеры неорганического фосфата, обеспечивающие его доставку в клетку, то гены, относящиеся к указанным белкам также были выбраны для анализа их экспрессии.

Для анализа экспрессии генов транспортеров неорганического фосфата *C. vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора из транскриптома выбрали два контига: MK334251 и MK334252. Последовательность контига MK334251 имела высокую степень идентичности с доменом, характерным для транспортеров фосфата высокой аффинности и натрий-фосфатных симпортеров микроводорослей (приложение

5), последовательность контига МК334252 — с доменом, характерным для H^+ -фосфатных симпортеров микроводорослей (приложение 6). Таким образом, для анализа выбрали натрий-фосфатный симпортер и H^+ -фосфатный симпортер. Для дизайна праймеров мы выбрали участок контига МК334251, имеющего 91% идентичности с транспортером фосфата *Chlorella sorokiniana* (приложение 5), и участок контига МК334252, имеющего 89% идентичности с H^+ -фосфатным симпортером *C. sorokiniana* (приложение 6), соответственно.

Для оценки экспрессии фосфатаз при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора мы из транскриптома выбрали контиг, транслированная последовательность которого (GenBank: МК334253) имела высокую степень идентичности с пурпурными кислыми фосфатазами микроводорослей (приложение 7). Дизайн праймеров к указанной фосфатазе *C. vulgaris* IPPAS C-1 проводили к участку контига МК334253, имеющему 92% идентичности с пурпурной кислой фосфатазой *C. sorokiniana* (приложение 7).

Для каждого выбранного гена *C. vulgaris* IPPAS C-1 получали праймеры (табл. 5) для проведения ПЦР в реальном времени.

Табл. 5 Последовательности праймеров для амплификации в ПЦР в режиме реального времени, использованных в работе

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Кодируемый белок
Ref прямой	TAGAGGATTCCGAGGACATCTG	Убиквитинлигаза E3
Ref обратный	CAGGTGGAAGTGGTGGTTG	
VTC прямой	ATCATTCGCTTCCCGTACG	Вакуолярный транспортный шаперон (vacuolar transport chaperone, VTC)
VTC обратный	AGGAACTTGGAGAACTTGGG	
Trans1 прямой	AAGGCGCTGACGATGAAG	Натрий-фосфатный симпортер
Trans1 обратный	AAGATGTCTGGGTCATTCACG	
Trans2 прямой	ACATCCTGCTTAACAACGGG	H^+ -фосфатный симпортер
Trans2 обратный	CAGGAAGAGTAGGAAGAGCATG	
Phosph прямой	TCSTATGCTGACCTCTACTACTC	Пурпурная кислая фосфатаза
Phosph обратный	TTCCCTGGCACAAGACTG	

Праймеры получали, используя в качестве матриц последовательности контиг, относящихся к выбранным генам. Дизайн праймеров проводили с помощью программы для конструирования праймеров для ПЦР в реальном времени RealTime PCR Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., <https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) с параметрами по умолчанию. Все использованные в работе праймеры для ПЦР в режиме реального времени при амплификации давали эффективность реакции $\geq 90\%$ и приводили к образованию продукта с единственным пиком на кривой плавления (табл.5).

4.5.4. Метод ПЦР в режиме реального времени

Синтез одноцепочечной кДНК на матрице РНК для проведения ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора для обратной транскрипции QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. В реакцию синтеза кДНК для каждого образца брали по приблизительно 250 нг РНК.

ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям изготовителя, прибора QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечения Applied Biosystems QuantStudio™ Real-Time PCR Software Version 1.3 (Thermo Fisher Scientific, США).

Каждая реакционная смесь (конечный объем 10 мкл) содержала 0,25 мкл каждого праймера (см. табл. 5) с концентрацией 10 мкМ (прямой и обратный, конечная концентрация в смеси каждого 0,25 мкМ); 5 мкл двухкратного буфера с флуоресцентным красителем SYBR Green QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, содержащего HS-Taq-ДНК-полимеразу, из указанного набора; 1 мкл кДНК, полученной в реакции синтеза кДНК на матрице РНК и разведенной в 25 раз (реакции с праймерами Ref1, VTC, Trans2) или 5 раз (Ref1, Trans5, Pho1, Pho2); 3,5 мкл воды, очищенной от РНКаз.

Значение C_i определялось как номер цикла, при котором флуоресцентный сигнал реакции пересекает базовую линию, с использованием программного обеспечения Applied Biosystems QuantStudio™ Real-Time PCR Software Version 1.3 (Thermo Fisher Scientific, США) с параметрами по умолчанию. Разведение кДНК подбирали для каждой пары праймеров таким образом, чтобы значение C_i реакции для проб, в которых анализируемый транскрипт присутствовал в детектируемых количествах, было не менее 21 и не более 30. Реакции с праймерами Ref1 гена эндогенного контроля проводили при двух разведениях кДНК: при разведении в 5 раз для нормирования результатов реакций с праймерами Trans5, Pho1, Pho2 и при разведении в 25 раз для нормирования результатов реакций с праймерами VTC, Trans2.

Непосредственно перед проведением реакции осуществляли предварительную инкубацию реакционной смеси для активации HS-Taq-ДНК-полимеразы (95°C, 15 мин). Реакция включала 35 циклов, каждый цикл состоял из денатурации ДНК (94°C, 15 с), отжига праймеров (58°C, 30 с) и синтеза цепи ДНК (72°C, 30 с). После проведения реакции получали кривые плавления продуктов амплификации. Контроли без матрицы и обратной транскрипции были включены.

Все измерения экспрессии проводились в двух биологических и двух аналитических повторностях ($n = 4$). Расчет дифференциальной экспрессии генов для клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде проводили относительно «нулевой» точки эксперимента — голодных по фосфору клеток. Обработку полученных данных и расчет дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью программного обеспечения Thermo Fisher Cloud Data Analysis (Thermo Fisher Scientific, США) с параметрами по умолчанию, при которых экспрессия генов вычислялась по формуле:

$$\Delta = 2^{-(C_t - C_t^0)}, \quad (10)$$

где Δ — дифференциальная экспрессия гена для анализируемого образца клеток при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора, C_t — номер цикла для анализируемого образца, при котором флуоресцентный сигнал реакции пересекает базовую линию, C_t^0 — номер цикла для образца голодных по фосфору клеток, при котором флуоресцентный сигнал реакции пересекает базовую линию.

Для оценки различий уровня экспрессии генов использовали параметрический t-критерий Стьюдента ($n = 4$).

Приготовление реакционных смесей для проведения ПЦР в реальном времени осуществляли совместно с сотрудником кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ к.б.н. Карповой О.В. и сотрудником кафедры микробиологии биологического факультета МГУ к.б.н. Виноградовой Е.Н.

5. Результаты и обсуждение¹

5.1. Ультраструктурные особенности исследуемых эукариотических микроводорослей²

При работе над данным разделом диссертации использована следующая публикация автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Solovchenko, A. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, L. Semenova, T. Ismagulova, A. Lukyanov, I. Mamedov, E. Vinogradova, O. Karpova, I. Konyukhov, S. Vasilieva, P. Mojzeš, C. Dijkema, M. Vecherskaya, I. Zvyagin, L. Nedbal, O. Gorelova // *Algal Research*. – 2019a. – <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>.

В представленной работе исследовали клетки окислительных фотоавтотрофных микроорганизмов, способных к формированию внутриклеточных ФоС- и АС- включений, а именно клетки эукариотических микроводорослей и прокариотических цианобактерий (см. раздел 4.1). В этом разделе рассматривается организация клетки исследованных в данной работе зеленых микроводорослей, организация исследованных цианобактерий обсуждается ниже в разделах 5.4.1 и 5.4.2.

При анализе ультратонких срезов клеток микроводорослей методами традиционной и аналитической ПЭМ у всех исследуемых микроводорослей выявлялись ключевые общие черты ультраструктурной организации клеток эукариотических окислительных фототрофных микроорганизмов (см. раздел 3.2.1). На рис. 13 и в приложении 8 они показаны на примере исследованных микроводорослей — представителей Chlorophyta. В наших исследованиях у микроводорослей выявлялись следующие клеточные компартменты: ядро, вакуоли с вакуолярным содержимым, хлоропласт, крахмальные зерна и пиреноид в составе хлоропласта и митохондрии (рис. 13 а,б, приложение 8). В хлоропластах микроводорослей пиреноид представляет собой особую структуру высокой или средней электронной плотности. Пиреноид — место локализации рибулозобисфосфаткарбоксилазы, одного из ключевых ферментов темновых реакций фотосинтеза. Пиреноид окружен электроннопрозрачными зёрнами крахмала (рис. 13 б, приложение 8), являющегося запасным продуктом для хранения излишков фотоассимилированного углерода в клетках микроводорослей. В хлоропластах также выявляются зёрна крахмала, не ассоциированные с пиреноидом (рис. 13 а,б).

¹ Если не указано иное, представлены результаты ПЭМ и аналитической ПЭМ образцов, исследованных на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (см. раздел 4.3).

² Ультраструктурная организация цианобактерий обсуждается ниже в разделах 5.4.1 и 5.4.2.

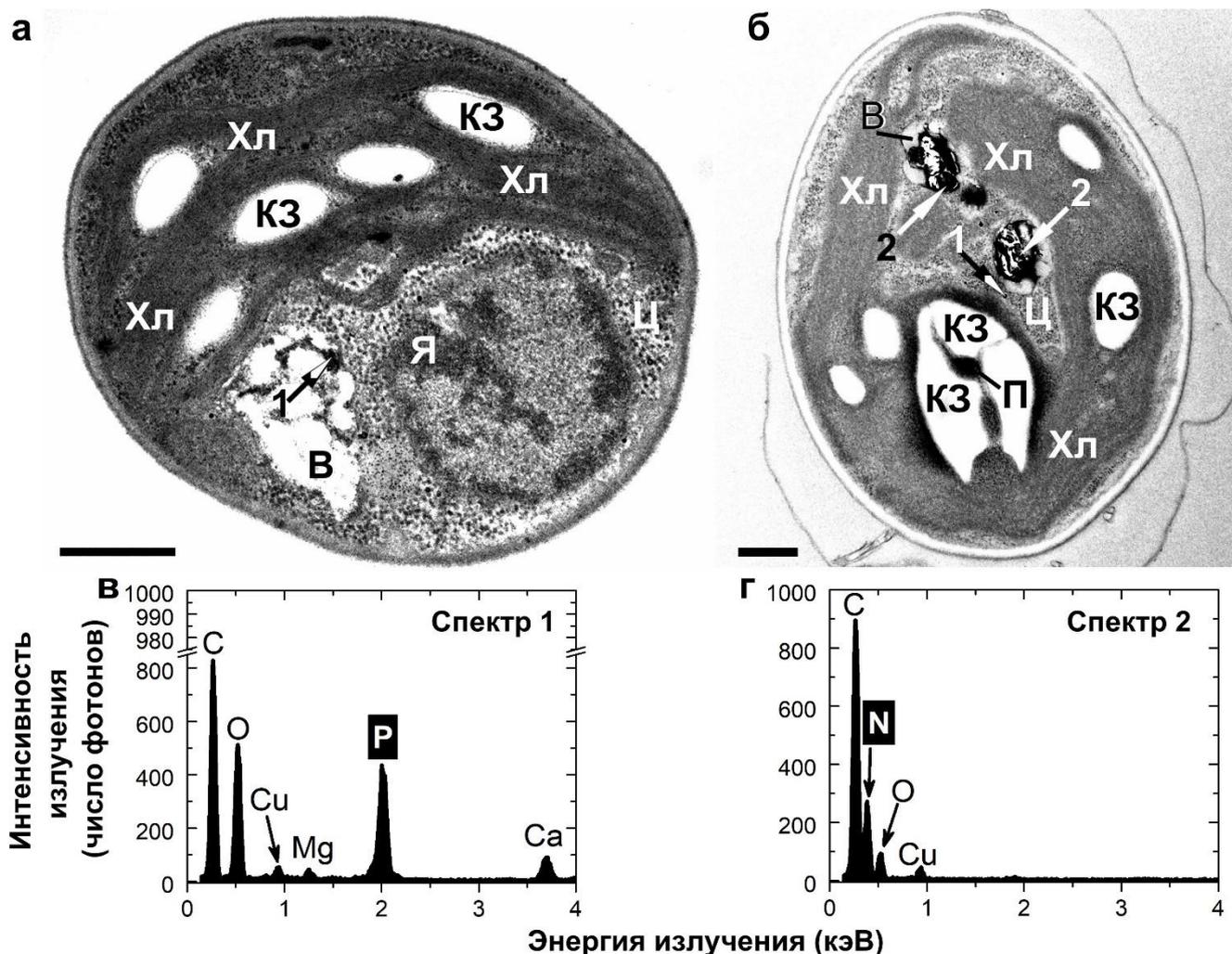


Рис. 13 Ультраструктурные особенности клеток микроводорослей на примере *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (а) и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (б). (а,б) ПЭМ-изображения ультратонких срезов клеток микроводорослей, показывающие клеточные компартменты микроводорослей: вакуоли (В), ядро (Я), крахмальные зерна (КЗ) и пиреноид (П) в составе хлоропласта (Хл), а также электронноплотные включения в вакуолях и цитозоле (Ц), которые отмечены белыми и черно-белыми стрелками: 1 – фосфорсодержащие (ФоС-) включения, 2 – азотсодержащие (АС-) включения. (в,г) Типичные энергодисперсионные спектры³ ФоС- (в, спектр 1) и АС- (г, спектр 2) включений, предоставляющие информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Точечные участки образца, с которых получали спектры с включений, отмечены стрелочками с цифрами 1 и 2. ПЭМ-изображения представлены для контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца ультратонких срезов клеток на стационарной фазе роста. ПЭМ-изображение (а) получено на микроскопе JEM-1011 совместно с сотрудником биологического факультета МГУ д.б.н. Гореловой О.А. Спектры представлены для не контрастированных ультратонких срезов (см. рис. 11). Масштабные отрезки: 0,5 мкм

³ Здесь (и далее в результатах) представлен ЭДРС-спектр – типичный для данного типа (ФоС- или АС-) включений. Это значит, что спектры от большинства анализируемых включений этого типа ($n = 40$, см. раздел 4.3.2) для исследуемого образца были аналогичны представленному типичному спектру в части качественного состава выявляемых элементов. Количественный ЭДРС-анализ в представленной работе не проводили (см. раздел 4.3.2)

Важным моментом в контексте настоящего исследования является принципиальная способность применяемых методов просвечивающей электронной микроскопии к визуализации включений, содержащих резервы азота и фосфора. Анализ ультратонких срезов клеток показал, что в вакуолях микроводорослей присутствуют электронноплотные включения (рис. 13 а,б, приложение 8). В зависимости от вида микроводоросли и условий культивирования выявляемые в клетках включения относились к ФоС-включениям (рис. 13 а,в) и/или к АС-включениям (рис. 13 б,г).

Состав выявляемых включений определяли с помощью ЭДРС. В ЭДРС-спектрах от ФоС-включений (рис. 13 в) выявлялись пик фосфора ($K_{\alpha} = 2,01$ кэВ) и пик кислорода ($K_{\alpha} = 0,53$ кэВ), которые являются характерными пиками для спектров от полифосфатных включений. В большинстве спектров от указанных включений выявлялся пик магния ($K_{\alpha} = 1,25$ кэВ) и пик кальция ($K_{\alpha} = 3,69$ кэВ) в качестве минорных элементов (рис. 13 в). В спектрах от АС-включений выявлялся пик азота ($K_{\alpha} = 0,39$ кэВ) (рис. 13 г). В спектрах от обоих типов включений всегда присутствовал пик углерода ($K_{\alpha} = 0,28$ кэВ) — основного химического элемента соединений эпоксидной смолы и органических соединений в биологических образцах. Также в спектрах выявлялся пик меди ($L_{\alpha} = 0,93$ кэВ) — основного компонента сеточек, на которые монтировались срезы перед их ПЭМ-анализом.

ФоС-включения в исследованных микроводорослях также выявлялись в цитозоле (рис. 13, б), хлоропластах и ядре (количественную оценку содержания всех перечисленных ФоС-включений см. в разделе 5.6).

Таким образом, методы традиционной и аналитической ПЭМ в наших экспериментальных условиях позволяли визуализировать основные компартменты и субкомпартменты клеток микроводорослей, такие как ядро, хлоропласт, вакуоли с вакуолярным содержимым, митохондрии, пиреноид и зерна крахмала [Bernier, 1993]. Ключевой возможностью использованных методов в сочетании с выбранными объектами явилась их способность к визуализации электронноплотных включений в вакуолях, цитозоле и других компартментах клетки.

Применение методов аналитической ПЭМ, в частности, ЭДРС, позволило получать информацию об элементном составе выявляемых включений и различать ФоС- и АС-включения непосредственно на клеточных срезах. На основании вышеизложенных результатов в дальнейших экспериментах методы аналитической ПЭМ использовали для идентификации и

визуализации ФоС- и АС-включений в клетках микроводослей в зависимости от отсутствия либо наличия азота и/или фосфора в среде культивирования.

5.2. Формирование резервов фосфора микроводорослей при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде⁴

5.2.1. Накопление биомассы и изменения в составе клеточных включений

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

(1) Solovchenko, A. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, L. Semenova, T. Ismagulova, A. Lukyanov, I. Mamedov, E. Vinogradova, O. Karpova, I. Konyukhov, S. Vasilieva, P. Mojzeš, C. Dijkema, M. Vecherskaya, I. Zvyagin, L. Nedbal, O. Gorelova // *Algal Research*. – 2019a. – <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>;

(2) Solovchenko, A. Luxury phosphorus uptake in microalgae / A. Solovchenko, T. Ismagulova, A. Lukyanov, S. Vasilieva, I. Konyukhov, S. Pogosyan, E. Lobakova, O. Gorelova // *Journal of Applied Phycology*. – 2019b. – <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>.

Одним из важнейших этапов исследований формирования резервов фосфора является стандартизация экспериментальных протоколов и обеспечение воспроизводимости наблюдаемых в отношении внутриклеточных включений эффектов. Это необходимо для понимания основных закономерностей, связывающих синтез и катаболизм резервов азота и фосфора с кинетическими и физиологическими параметрами роста культур и статусом их минерального питания.

Важным методологическим вопросом является стандартизация условий фосфорного голодания для получения модельных культур в стандартном состоянии, что является залогом воспроизводимости дальнейших результатов. Следует отметить, что значительные количественные и качественные различия в опубликованных в литературе данных являются следствием отсутствия стандартного подхода к индукции фосфорного голодания клеток микроводорослей. В нашей работе голодными по фосфору считали клетки, у которых в результате культивирования в бесфосфорной среде останавливалось деление клеток. Добавление источника фосфора в среду к голодным клеткам микроводорослей индуцировало возобновление

⁴ Исследование проводили на модельных штаммах зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* – штаммы IPPAS C-1 и CCALA 256.

деления клеток, которое приводило к экспоненциальному росту культуры с последующим замедлением роста и выходом культуры на стационарную фазу (рис. 14).

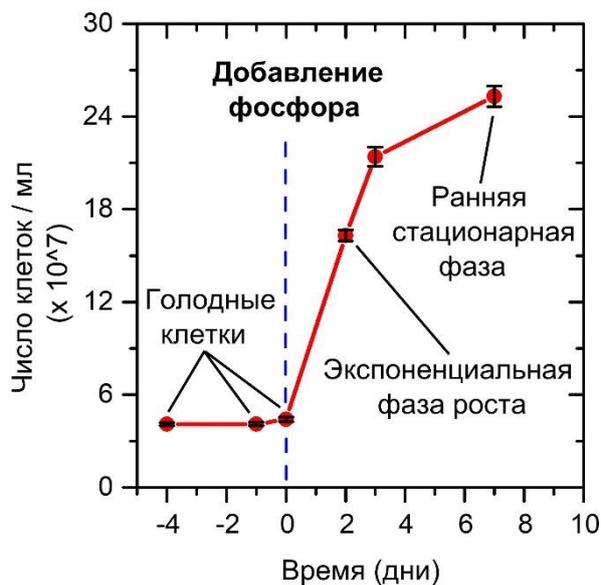


Рис. 14 Накопление биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде. Отсчет времени по горизонтальной оси отмечен относительно момента добавления фосфора к голодным клеткам (день 0). Для каждой точки кривой роста показаны среднее значение для трех биологических повторностей и соответствующая стандартная ошибка среднего ($n = 3$). На рисунке приведены результаты для штамма IPPAS C-1, результаты для штамма SCALA 256 были аналогичными. Кривая роста получена совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Селях И.О. и к.б.н. Семеновой Л.Р.

Для определения изменений в составе клеточных включений микроводоросли *Chlorella vulgaris* методом аналитической ПЭМ исследовали клетки с характерных фаз роста (рис. 15): голодные по фосфору (день 0, см. рис. 14), с экспоненциальной фазы роста (день 2) и с ранней стационарной фазы (день 7).

Отличительной особенностью ультраструктуры голодных по фосфору клеток *Chlorella vulgaris* было большое количество липидных глобул – клеточных структур, в которых аккумулируются нейтральные липиды (триацилглицеролы) (рис. 15 а), которые не выявлялись в клетках при оптимальных условиях культивирования (рис. 13 а).

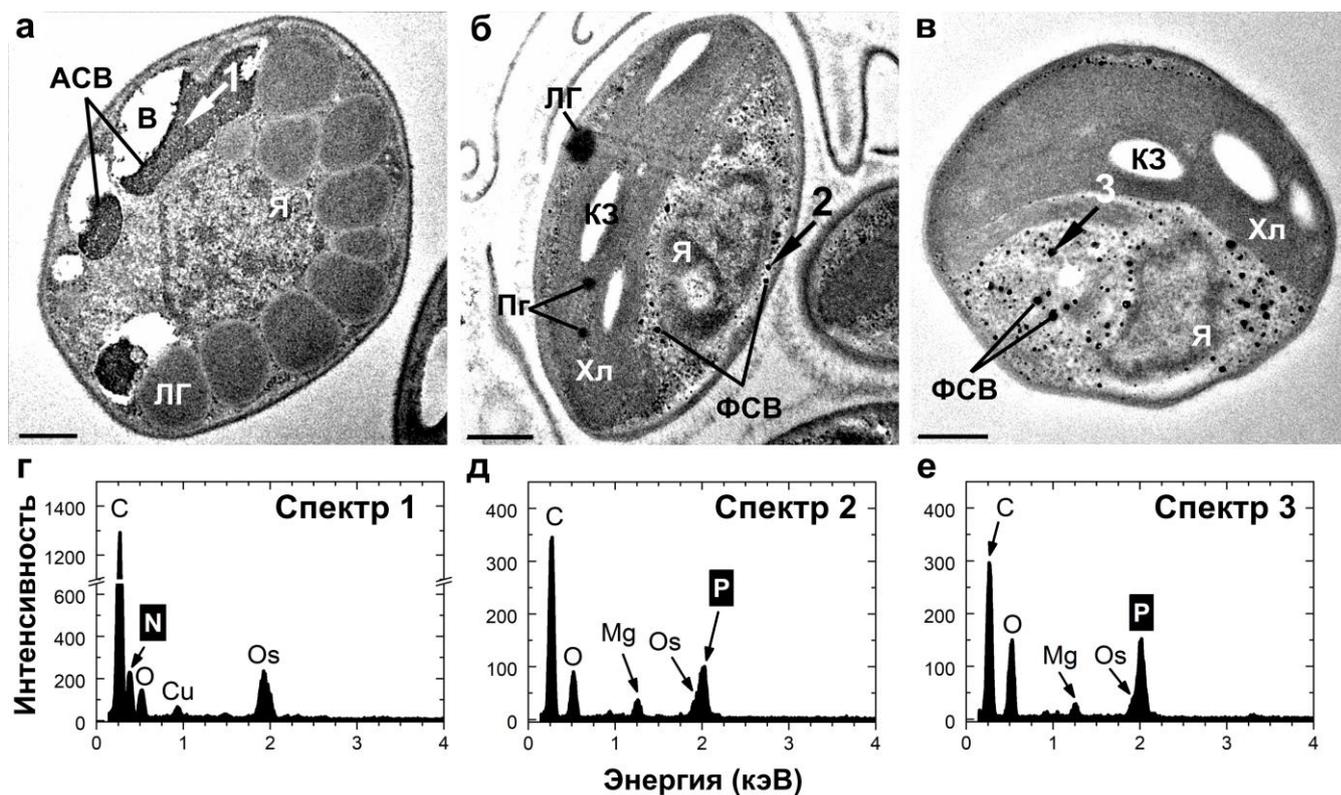


Рис. 15. Изменения в составе клеточных включений микроводоросли *Chlorella vulgaris* при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде: (а,г) - голодание по фосфору (день 0), (б,д) - экспоненциальная фаза роста после добавления фосфора (день 2), (в,е) - ранняя стационарная фаза после добавления фосфора (день 7). (а-в) ПЭМ-изображения⁵ клеток с включениями. (г-е) Типичные энергодисперсионные спектры⁶ соответствующих включений (спектры 1-3), предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Точечные области азотсодержащих (спектр 1) и фосфорсодержащих (спектры 2,3) включений, с которых снимали спектры 1-3, отмечены стрелочками с соответствующей цифрой. На рисунке приведены результаты для штамма IPPAS C-1, результаты для штамма CCALA 256 были аналогичными. ПЭМ-изображения и спектры представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, ЛГ — липидная глобула, Пг — пластоглобула, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Хл — хлоропласт, Я — ядро. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

⁵ Здесь (и далее в результатах) представлены ПЭМ-изображения срезов клеток, типичных для анализируемого микроорганизма в данных условиях культивирования ($n = 30$, см. разделы 4.3.1, 4.3.2), если не указано иное.

⁶ Здесь (и далее в результатах) представлен ЭДРС-спектр – типичный для данного типа (Фос- или АС-) включений. Это значит, что спектры от большинства анализируемых включений этого типа ($n = 40$, см. раздел 4.3.2) для исследуемого образца были аналогичны представленному типичному спектру в части качественного состава выявляемых элементов (см. раздел 4.3.2)

Кроме того, в вакуолях клеток голодной по фосфору культуры выявлялись АС-включения (рис. 15 а,г), при этом ФоС-включения не были обнаружены ни в одном из клеточных компартментов. В энергодисперсионных спектрах от АС-включений (рис. 15 г) выявлялся интенсивный пик азота ($K_{\alpha} = 0,39$ кэВ). АС-включения, локализованные в вакуолях, занимали значительную их часть и имели размеры 0,1-2,5 мкм.

К экспоненциальной фазе роста АС-включения из клеток исчезали, вместо них в клетках формировались ФоС-включения (рис. 15 б,д), которые также детектировались и в клетках ранней стационарной фазы (рис. 15 в,е). ФоС-включения на экспоненциальной и стационарной фазах роста имели размер 0,01-0,5 мкм и были локализованы преимущественно в цитозоле (рис. 15 в,е), а также в вакуолях, хлоропласте и ядре (количественную оценку содержания всех перечисленных ФоС-включений см. в разделе 5.6).

После восстановления фосфорного питания в экспоненциальной фазе роста в клетках выявлялись единичные липидные глобулы, а также пластоглобулы – липидные глобулы, локализованные в хлоропластах (рис. 15 б). К стационарной фазе роста из клеток исчезали все липидные глобулы (рис. 15 в).

С помощью анализа клеток микроводорослей с характерных стадий роста методом спектроскопии ЯМР на резонансной частоте ядер изотопа фосфора-31 было показано наличие полифосфатов в клетках на экспоненциальной и на ранней стационарной фазах (рис. 16 а,б) и их отсутствие в голодных по фосфору клетках (рис. 16 в).

В совокупности данные аналитической ПЭМ и спектроскопии ЯМР позволяют сделать вывод о том, что наблюдаемые нами ФоС-включения в клетках на экспоненциальной и на ранней стационарной фазах (рис. 15 б,в), вероятнее всего, представляют собой полифосфаты [Siderius et al., 1996].

Данные ЯМР спектроскопии в отношении выявления полифосфатов в клетках в нашей работе являются качественными, а не количественными: по полученным ЯМР-спектрам нельзя достоверно сравнить количественное содержание полифосфатов в клетках в разных образцах (например, в клетках с экспоненциальной (рис. 16 б) и со стационарной фаз роста (рис. 16 а)). Это связано с тем, что величина ЯМР-сигнала от полифосфатных включений в спектрах не является количественным показателем общего количества полифосфатов в клетках, поскольку на детектор поступает ЯМР-сигнал только от поверхностного слоя полифосфатных включений [Solovchenko et al., 2019a].

Наблюдаемые изменения в ультраструктуре клеток при голодании по фосфору и после восстановления фосфорного питания в отношении формирования и последующего расходования липидных глобул согласуются с известными изменениями в содержании триацилглицеролов при голодании микроводорослей по фосфору или азоту и при дальнейшем восстановлении питания [Vitova et al., 2015]. Считается, что при дефиците фосфора или азота клетки направляют на синтез липидных глобул избыточно фиксированный при фотосинтезе углерод, который из-за недостатка фосфора или азота клетки не могут направить на синтез других клеточных структур. Предполагается, что этот процесс снижает риск фотоокислительного повреждения клеток [Vitova et al., 2015].

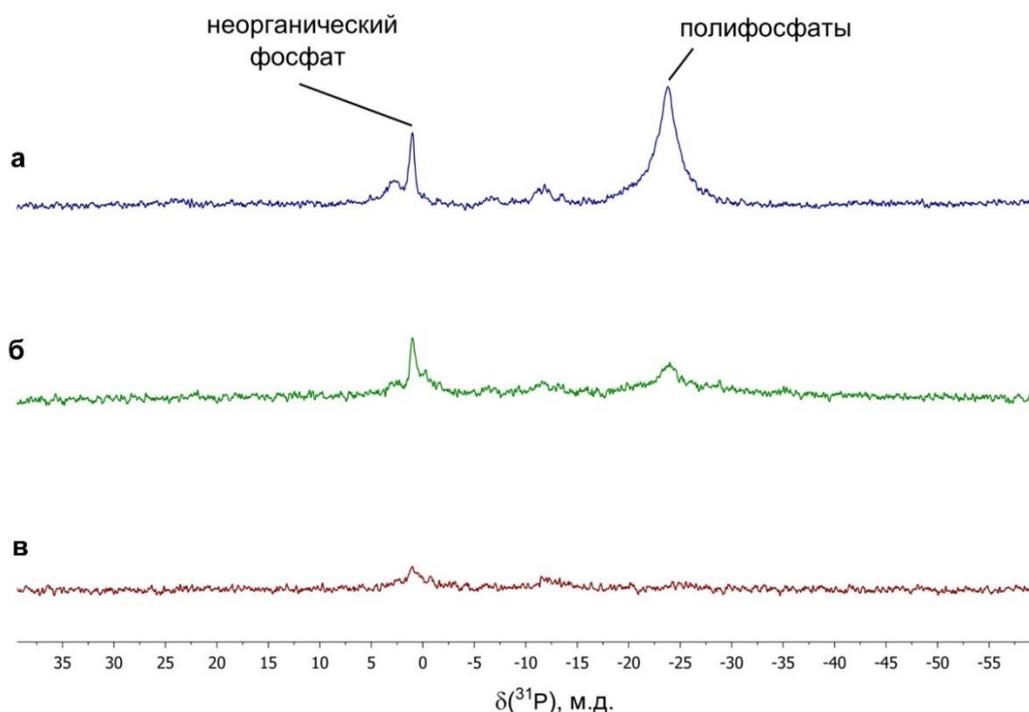


Рис. 16 ЯМР-спектры на ядрах фосфора-31 от клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде: (а) — клетки с ранней стационарной фазы после добавления фосфора (день 7), (б) — клетки с экспоненциальной фазы роста после добавления фосфора (день 2), (в) — голодные по фосфору клетки (день 0). Приведенные ЯМР-спектры подтверждают наличие в клетках с экспоненциальной и с ранней стационарной фаз наличие полифосфатов (а,б) и их отсутствие в голодных по фосфору клетках (в). Спектры представлены для одной из двух анализируемых биологических повторностей эксперимента ($n = 2$). Спектры для второй биологической повторности были аналогичными. На рисунке приведены результаты для штамма IPPAS C-1, результаты для штамма CCALA 256 были аналогичными.

В отношении расходования клетками ФОС-включений полученные для голодных по фосфору клеток *C. vulgaris* результаты согласуются с данными для другого штамма этого же вида

[Aitchison, Butt, 1973], для которого было показано, что при культивировании в бесфосфорной среде содержание полифосфатов снижается.

Для красной одноклеточной водоросли *Cyanidioschyzon merolae* [Yagisawa et al., 2016], охрофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo* [Watanabe et al., 1989] и зеленых микроводорослей *Chlamydomonas acidophila* КТ-1 и *Ch. reinhardtii* С-9 [Nishikawa et al., 2006] было показано отсутствие полифосфатных ФоС-включений в голодных по фосфору клетках и их активное образование после добавления фосфора, что согласуется с результатами, полученными в этой работе для *C. vulgaris* IPPAS С-1.

Таким образом, на основании анализа клеток *C. vulgaris* с характерных стадий роста методами спектроскопии ЯМР и ЭДРС можно заключить, что в голодных по фосфору клетках отсутствуют ФоС-включения, в том числе полифосфаты, а при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде в клетках на экспоненциальной и на ранней стационарной фазах роста после добавления фосфора происходит формирование ФоС-включений в виде полифосфатов. При этом в вакуолях клеток голодной по фосфору культуры методом ЭДРС выявляются АС-включения, которые исчезают из клеток к экспоненциальной фазе роста. Кроме того, с помощью традиционной ПЭМ мы показали, что в голодных по фосфору клетках исследуемой микроводоросли происходит формирование углерод-запасующих компартментов – липидных глобул. Применение метода аналитической ПЭМ, в свою очередь, позволило получить важную информацию о представленности включений азота и фосфора у микроводорослей, дополняющую общую картину ультраструктурной реорганизации клетки при акклимации к дефициту и избытку фосфора в среде.

5.2.2. Формирование фосфорсодержащих включений в микроводорослях после возобновления фосфорного питания

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

(1) Solovchenko, A. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, L. Semenova, T. Ismagulova, A. Lukyanov, I. Mamedov, E. Vinogradova, O. Karpova, I. Konyukhov, S. Vasilieva, P. Mojzeš, C. Dijkema, M. Vecherskaya, I. Zvyagin, L. Nedbal, O. Gorelova // *Algal Research*. – 2019a. – <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>;

(2) Solovchenko, A. Luxury phosphorus uptake in microalgae / A. Solovchenko, T. Ismagulova, A. Lukyanov, S. Vasilieva, I. Konyukhov, S. Pogosyan, E. Lobakova, O. Gorelova // *Journal of Applied Phycology*. – 2019b. – <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>.

Для анализа изменений в составе включений микроводорослей при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде исследовали клетки в первые 4 часа после добавления фосфора в среду.

Исследование методом аналитической ПЭМ показало, что при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде происходит формирование ФоС-включений в вакуолях в первые 4 часа после добавления фосфора в клетках микроводорослей (рис. 17): ФоС-включения детектировались уже через 30 мин после добавления фосфора (рис. 17 а,в).

В клетках через 30 мин на срезах многих вакуолей выявлялись сквозные отверстия с низкой электронной плотностью, по внутренним краям которых детектировали небольшие ФоС-включения (0,05-0,2 мкм) (рис. 17 а). Вероятнее всего, эти сквозные отверстия в срезах сформировались во время приготовления (резки) срезов и часть включений могла выкрошиться из вакуолей из среза, оставив по краям отверстий остатки ФоС-включений. В клетках через 4 часа выявлялись лишь единичные сквозные отверстия в вакуолях, а ФоС-включения с размерами 0,04-0,8 мкм занимали большую площадь вакуолей. В представленной работе не проводили количественное сравнение содержания и размеров (статистически значимое) ФоС-включений, формирующихся через 30 мин и через 4 часа после добавления фосфора из-за выкрашивающегося содержимого вакуолей. Таким образом, приведенные данные являются качественными (не количественными): они подтверждают, что ФоС-включения начинают формироваться уже через 30 мин после добавления фосфора, и продолжают выявляться в клетках через 4 часа.

В связи с вышеизложенным, можно сделать вывод, что в исследуемой микроводоросли происходит избыточное образование полифосфатных ФоС-включений [Dyhrman, 2016, P. 158] при восстановлении фосфорного питания.

Кроме формирования ФоС-включений, ультраструктурные особенности клеток не изменились по сравнению с голодными по фосфору клетками: в клетках и через 30 мин, и через 4 часа также выявлялись липидные глобулы (рис. 17 а,б). Таким образом, в первые часы после восстановления фосфорного питания еще не происходят резкие изменения ультраструктуры клеток (за исключением формирования ФоС-включений).

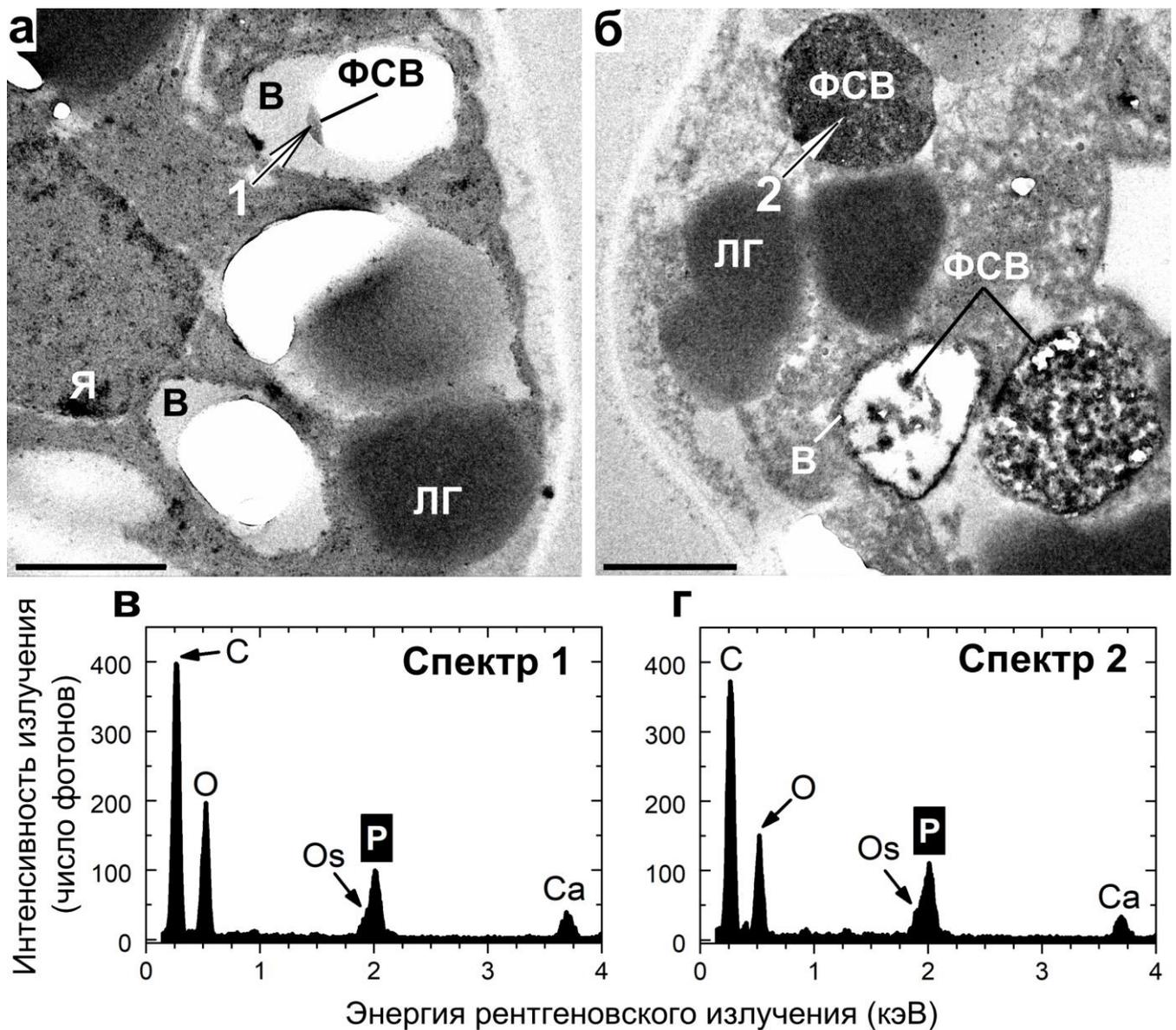


Рис. 17 Формирование фосфорсодержащих включений в клетках *Chlorella vulgaris* при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде в первые 4 ч после добавления фосфора в среду: (а,в) — 30 мин после добавления фосфора, (б,г) — 4 ч после добавления фосфора. (а,б) ПЭМ-изображения клеток с включениями. (в,г) Типичные энергодисперсионные спектры (спектры 1,2) соответствующих включений, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Точечные области фосфорсодержащих включений, с которых снимали спектры 1-2, отмечены стрелочками с соответствующей цифрой. На рисунке приведены результаты для штамма CCALA 256, результаты для штамма IPPAS C-1 были аналогичными. ПЭМ-изображения и спектры представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). В — вакуоль, ЛГ — липидная глобула, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Я — ядро. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

По данным анализа методом ИСП-МС формирование ФоС-включений в первые часы после добавления фосфора сопровождалось увеличением массовой доли фосфора в клетках (по сравнению с голодными клетками) до 6% от сухого веса (рис. 18). При этом не были выявлены статистически значимые различия между значениями массовой доли фосфора для клеток разных стадий роста после добавления фосфора, однако, все они достоверно отличались от голодных клеток (рис. 18, приложение 9). Это можно объяснить тем, что в ИСП-МС анализе оценивается относительное количество фосфора – его массовая доля от сухого веса клеток. Добавление фосфора к голодным клеткам индуцирует возобновление клеточных делений (рис. 14), что приводит к росту количества клеток и к увеличению их сухой массы, из-за чего дальнейшее (на стадиях после 30 минут после добавления фосфора) статистически значимое увеличение массовой доли фосфора не происходит (рис. 18, приложение 9).

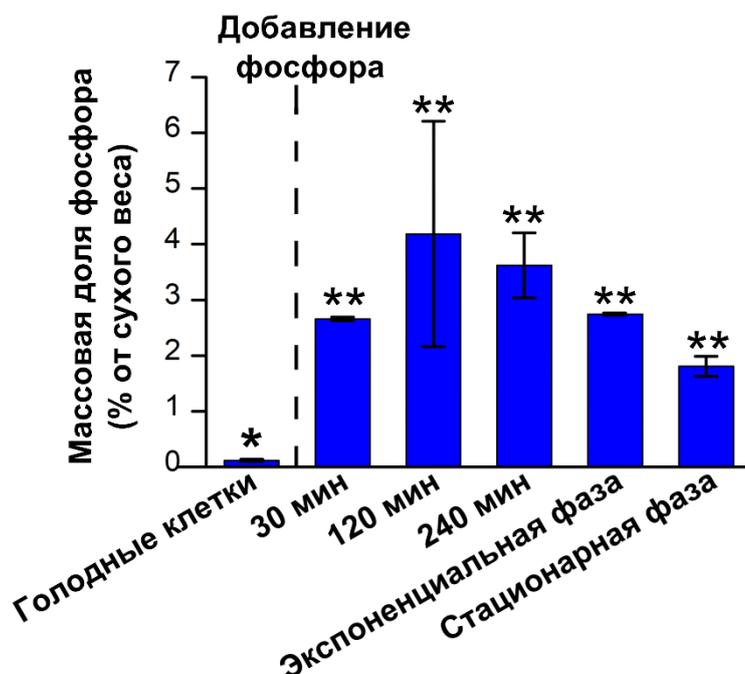


Рис. 18 Увеличение массовой доли фосфора в клетках *Chlorella vulgaris* после перехода от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде. На гистограмме для каждой фазы роста культуры показаны среднее значение для двух биологических повторностей и соответствующая стандартная ошибка среднего ($n = 2$) (см. приложение 9). Значение массовой доли фосфора для голодных клеток (отмечено одной звездочкой (*)) статистически значимо отличалось от значений массовой доли фосфора для клеток после добавления фосфора на всех стадиях роста (отмечены двумя звездочками (**), $p \leq 0,05$, t-критерий Стьюдента, см. приложение 8). Между собой значения массовой доли фосфора для клеток на стадиях роста после добавления фосфора (отмечены двумя звездочками (**)) не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$, t-критерий Стьюдента, см. приложение 9). На рисунке приведены результаты для штамма IPPAS C-1, результаты для штамма CCA1A 256 были аналогичными

Обычно у микроводорослей, культивируемых в условиях ограниченной доступности фосфора, массовая доля фосфора в клетках составляет около 1% [Grobbeelaar, 2004; 2013]. При избыточном поглощении фосфора микроводорослями [Powell et al., 2008; 2009; Dyhrman, 2016, P. 158] массовая доля фосфора в них может значительно увеличиться, вплоть до 4–6% от сухого веса [Powell et al., 2011]. Таким образом, резкое увеличение массовой доли фосфора в клетках после добавления фосфора к голодным клеткам можно объяснить активацией процессов избыточного поглощения фосфора [Powell et al., 2008; 2009; Dyhrman, 2016, P. 158], то есть процессов интенсивного транспорта неорганического фосфата из среды внутрь клеток. Полученные методом аналитической ПЭМ результаты (рис. 17) также позволяют сделать вывод о том, что неорганический фосфат, транспортируемый в голодные клетки из среды, направляется на синтез ФоС-включений (полифосфатов) уже через 30 мин после добавления фосфора в среду к голодающим клеткам.

Полученные результаты согласуются с данными для другого штамма *Chlorella vulgaris* [Aitchison, Butt, 1973], для микроводорослей *Cyanidioschyzon merolae* [Yagisawa et al., 2016] и *Heterosigma akashiwo* [Watanabe et al., 1989], для которых также показано формирование полифосфатных ФоС-включений при восстановлении фосфорного питания в первые часы после добавления фосфора (см. табл. 1). В указанных работах полифосфатные ФоС-включения выявлялись с помощью методов ПЭМ и флуоресцентной микроскопии, сопряженной с окрашиванием 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) [Yagisawa et al., 2016], биохимических методов определения полифосфатов [Aitchison, Butt, 1973; Watanabe et al., 1989] и ЯМР спектроскопии [Watanabe et al., 1989].

В некоторых работах [Aitchison, Butt, 1973; Nishikawa et al., 2006] было показано, что длительность периода культивирования клеток в бесфосфорной среде влияет на интенсивность образования полифосфатов при восстановлении фосфорного питания. В связи с этим, при сравнении результатов разных экспериментов необходимо учитывать длительность периода культивирования клеток в бесфосфорной среде и состояние культуры на момент добавления фосфора. В работе [Aitchison, Butt, 1973] клетки *Chlorella vulgaris* перед добавлением фосфора культивировали в бесфосфорной среде всего в течение 34 ч. Авторы показали, что за это время клетки успели израсходовать все запасы полифосфатов. Но, скорее всего, за столь короткий период клетки еще не успели полностью израсходовать все доступные резервы, поскольку ключевой симптом фосфорного голодания — остановка деления клеток — не наблюдался. В нашей же работе для получения голодной по фосфору культуры *C. vulgaris* IPPAS C-1, у которой прекратились деления клеток, клетки культивировали в бесфосфорной среде, в среднем, 11 дней, т. е. до истощения клеточной квоты фосфора и остановки деления клеток (см. раздел 4.1.4). Этот

методический подход имеет важное значение для стандартизации экспериментального протокола и получения корректных результатов при исследовании фосфорного голодания и избыточного поглощения этого элемента.

При ПЭМ-анализе клеток микроводоросли *Cyanidioschyzon merolae* [Yagisawa et al., 2016] элементный состав выявляемых включений непосредственно на клеточных срезах не подтверждали. При этом исходя из полученных ПЭМ-изображений клеток с электронноплотными включениями, авторы предложили схему синтеза полифосфатных включений в *C. merolae* при восстановлении фосфорного питания. Первый этап синтеза в предложенной схеме включал синтез мелких полифосфатных гранул в цитозоле или в мелких везикулах, второй этап — транспорт синтезированных гранул к крупным вакуолям, третий этап — внедрение гранул в вакуоли, и, наконец, четвертый этап — аккумулярование полифосфатов в вакуолях с образованием крупных полифосфатных включений. В нашей работе ФоС-включения в первые часы после восстановления фосфорного питания выявлялись преимущественно в крупных вакуолях (рис. 17), а не в везикулах или цитозоле. Таким образом, судя по характеру образования ФоС-включений у *C. vulgaris* в нашей работе, можем сделать вывод, что синтез указанных включений у *C. vulgaris* происходит не по схеме, предложенной в работе [Yagisawa et al., 2016]. Скорее всего, синтез ФоС-включений у *C. vulgaris* в первые часы после восстановления фосфорного питания происходит непосредственно в вакуолях.

Таким образом, в нашей работе методом аналитической ПЭМ показано, что в первые часы инкубации исследуемых штаммов зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*, акклиматизированных к дефициту фосфора, в среде с заведомым избытком фосфора в клетках в результате избыточного поглощения фосфора происходит формирование резервов фосфора — полифосфатных ФоС-включений. Методом ИСП-МС подтверждено увеличение массовой доли фосфора в клетках (по сравнению с голодными клетками) после добавления в среду фосфора (до 6% от сухого веса в первые два часа). Ввиду представленных результатов голодные по фосфору культуры штаммов зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 и *Chlorella vulgaris* CCALA 256 являются перспективными для разработки систем быстрого (в течение нескольких часов) изъятия избытка фосфора из сточных вод.

5.2.3. Ультраструктурная организация вакуолярных фосфорсодержащих включений

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

(1) Shebanova, A. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy / A. Shebanova, T. Ismagulova, A. Solovchenko, O. Baulina, E. Lobakova, A. Ivanova, A. Moiseenko, K. Shaitan, V. Polshakov, L. Nedbal, O. Gorelova // *Protoplasma*. – 2017. – V. 254. – P. 1323–1340;

(2) Solovchenko, A. Luxury phosphorus uptake in microalgae / A. Solovchenko, T. Ismagulova, A. Lukyanov, S. Vasilieva, I. Konyukhov, S. Pogosyan, E. Lobakova, O. Gorelova // *Journal of Applied Phycology*. – 2019b. – <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>;

(3) Kokabi, K. Metabolomic foundation for differential responses of lipid metabolism to nitrogen and phosphorus deprivation in an arachidonic acid-producing green microalga / K. Kokabi, O. Gorelova, T. Ismagulova, M. Itkin, S. Malitsky, S. Boussiba, A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg // *Plant Science*. – 2019. – V. 283. – P. 95–115.

При исследовании ФоС-включений микроводорослей *C. vulgaris* IPPAS С-1 и *C. vulgaris* 256 методами традиционной и аналитической ПЭМ мы обнаружили, что вакуолярные ФоС-включения имели большие структурно упорядоченные области, которые наиболее четко были выражены у ФоС-включений клеток *C. vulgaris* 256 на стационарной фазе роста после восстановления фосфорного питания (рис. 19 а,б). Структурно упорядоченные области ФоС-включений часто прилегали к внутренней стороне тонопласта (мембраны вакуоли).

На больших увеличениях в определенных участках ФоС-включений на срезах выявлялись взаимно параллельные структуры низкой и высокой электронной плотности, чередующиеся с периодом $4,90 \pm 0,12$ нм (указано среднее значение и стандартная ошибка, $n = 30$) (рис. 19 в). Выявленные электронноплотные структуры представляли собой тяжи электронноплотных гранул, расположенных линейно или зигзагообразно. На ПЭМ-изображениях выявленные электронноплотные тяжи выглядели как отдельные провода в многожильном кабеле (рис. 19 в, отмечены указателем). Указанные тяжи гранул, собранные в группы и чередующиеся со структурами низкой электронной плотности, были соединены мостообразными структурами средней электронной плотности толщиной $1,64 \pm 0,07$ нм ($n = 30$).

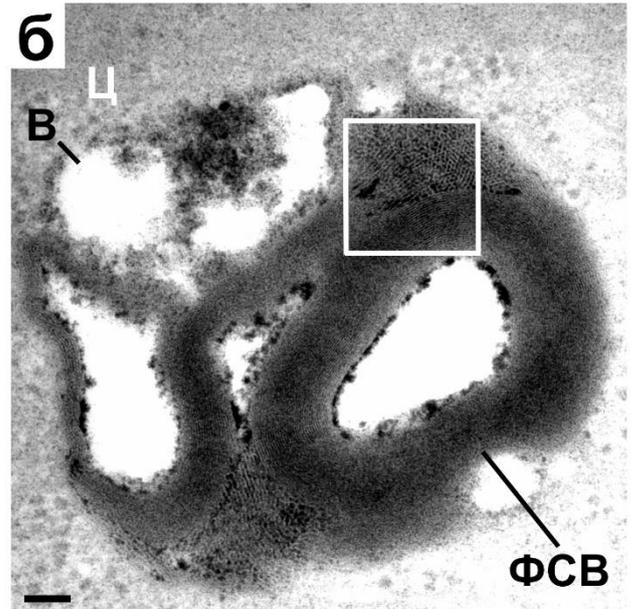
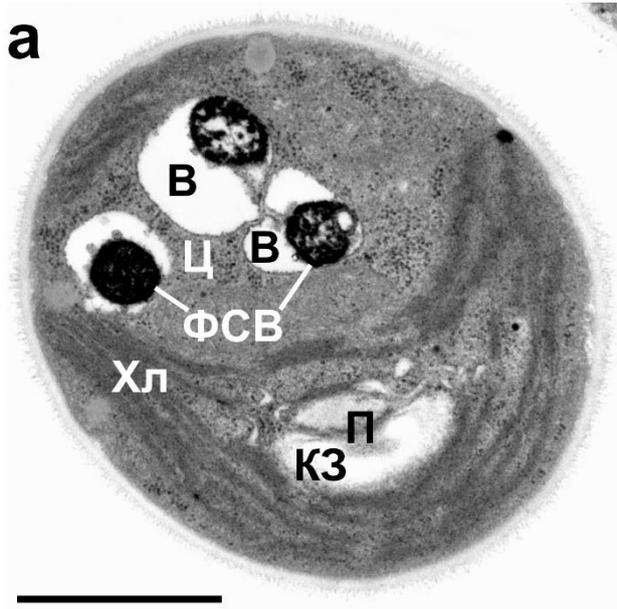


Рис. 19 (на предыдущей странице) Ультраструктурная организация вакуолярных фосфорсодержащих включений *Chlorella vulgaris* ССАЛА 256: (а) - ПЭМ-изображение клетки с вакуолярными фосфорсодержащими включениями (ФСВ), (б) - ПЭМ-изображение вакуолярного ФСВ, (в) - увеличенный фрагмент изображения (б), отмеченный в (б) белой рамкой. Результаты представлены для контрастированных цитратом свинца без использования уранилацетата ультратонких срезов клеток на стационарной фазе роста после восстановления фосфорного питания (9 дней после добавления фосфора к голодным по фосфору клеткам). Указателем отмечена область ФСВ, заполненная тяжами электронноплотных гранул, формирующими ультраструктурную организацию, обозначенную в тексте как «многожильный кабель» (продольное сечение). Решеткой (#) отмечена область, в которой электронноплотные гранулы образуют сотообразную структуру, представляющую собой поперечное сечение тяжей электронно-плотных гранул, т.н. поперечное сечение «многожильного кабеля». Стрелочками показаны мостообразные структуры средней электронной плотности, соединяющие тяжи электронно-плотных гранул. Короткие белые отрезки в (в) рядом с указателем и решеткой (#) имеют длину 5 нм. ПЭМ-изображения получены на микроскопе JEM-1011 совместно с сотрудником кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Гореловой О.А. В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, П — пиреноид, Ц — цитозоль, Хл — хлоропласт. Масштабные отрезки: а — 1 мкм; б — 100 нм; в — 50 нм

В определенных участках ФоС-включений на срезах также выявлялись электронноплотные гранулы, окруженные матриксом с низкой электронной плотностью, которые в совокупности образовывали сотообразные структуры (рис. 19 б, отмечены решеткой (#)). Гранулы в сотообразных структурах имели диаметр $5,07 \pm 0,31$ нм ($n = 30$) и были соединены несколькими мостообразными структурами средней электронной плотности толщиной $1,31 \pm 0,07$ нм ($n = 30$). С точки зрения модели «многожильного кабеля», сотообразные структуры представляют собой поперечное сечение «многожильного кабеля», сформированное сечениями отдельных проводов кабеля.

Вероятнее всего, на полученных выше изображениях мы видим продольные, поперечные и тангенциальные срезы параллельных структур, представляющих тяжи электронноплотных гранул, которые окружены электроннопрозрачным матриксом и скручены внутри вакуоли.

Интересно, что ультраструктурная организация типа «многожильный кабель» также отчетливо выявлялась в периферийной области вакуолярных ФоС-включений клеток микроводоросли *Lobosphaera incisa* SAG 2468 на 3 день фосфорного голодания (рис. 20).

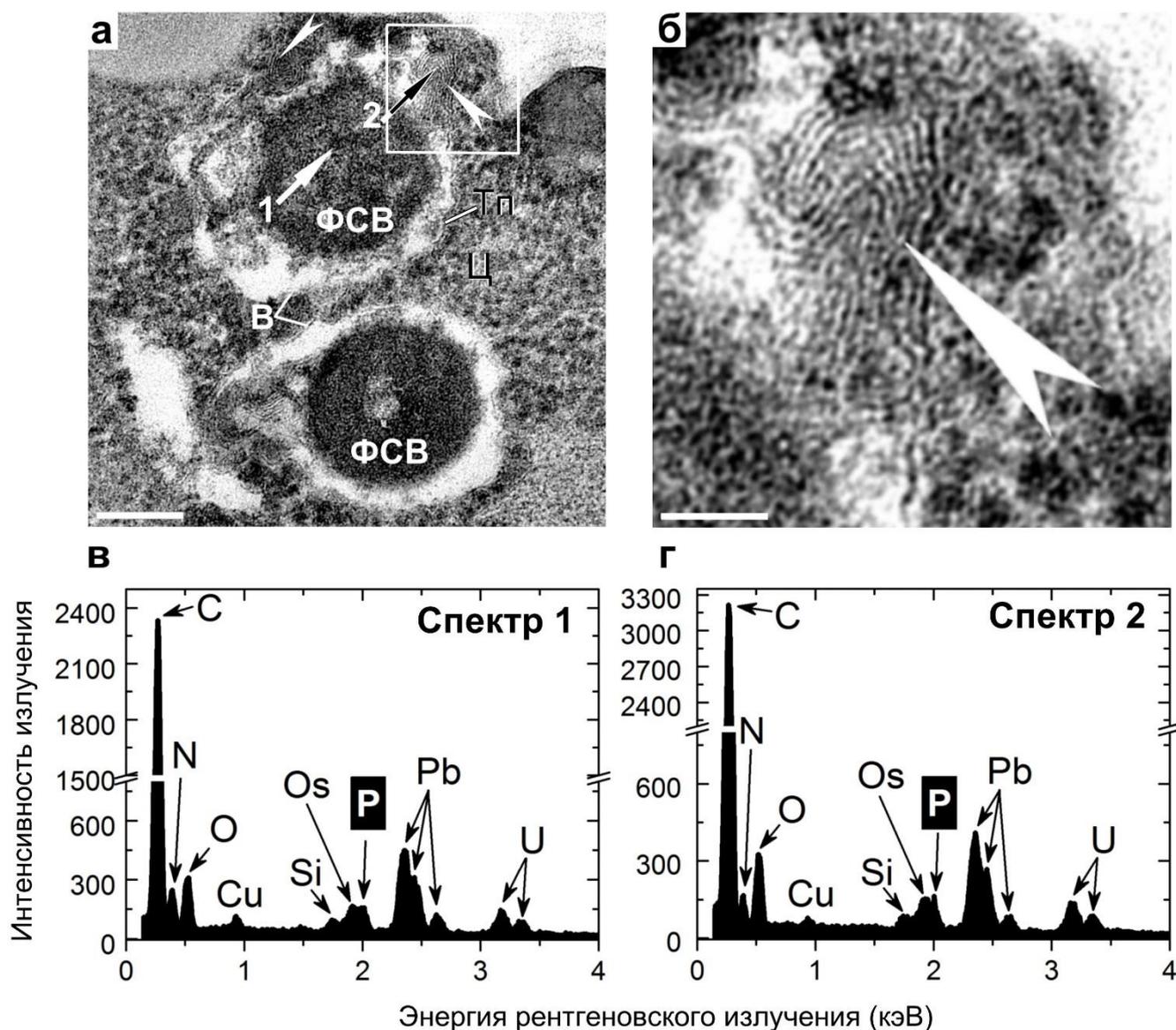


Рис. 20 Ультраструктурная организация вакуолярных фосфорсодержащих включений микроводоросли *Lobosphaera incisa* SAG 2468 на 3 день фосфорного голодания: (а) — ПЭМ-изображение вакуолярных фосфорсодержащих (ФoS-) включений, (б) — увеличенный фрагмент изображения (а), отмеченный в (а) белой рамкой, (в) — типичный энергодисперсионный спектр центральной области соответствующих включений (спектр 1), (г) — типичный энергодисперсионный спектр периферийной области соответствующих включений, имеющей ультраструктурную организацию типа «многожильный кабель» (спектр 2). Точечные области ФoS-включений, с которых снимали спектры 1 и 2 отмечены стрелочками с соответствующей цифрой. На рисунке представлены типичные энергодисперсионные спектры соответствующих включений, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Результаты представлены для контрастированных цитратом свинца и уранилацетатом ультратонких срезов. В — вакуоль, Тп — тонопласт (мембрана вакуоли), ФoS — фосфорсодержащее включение, Ц — цитозоль. Указателями отмечена периферийная область ФoS-включений, имеющая ультраструктурную организацию, обозначенную в тексте как «многожильный кабель». Масштабные отрезки: (а) — 200 нм, (б) — 100 нм

Периферийная область ФоС-включений *L. incisa* 2468, имеющая организацию типа «многожильный кабель», прилежала с внутренней стороны к тонопласту вакуоли. В отличие от периферийной в центральной области включений большие структурно упорядоченные области не выявлялись (рис. 20 а), однако, их элементный состав по данным анализа методом ЭДРС был идентичен (рис. 20 в,г). В энергодисперсионных спектрах от указанных областей ФоС-включений помимо пиков фосфора и кислорода, характерных для полифосфатов, выявлялся пик азота (рис. 20 в,г). Вероятнее всего, появление азота в спектрах связано с наличием в ФоС-включениях белков, имеющих ферментативную активность, и/или азотсодержащих веществ, играющих запасующую азот функцию. В спектрах от ФоС-включений также выявлялись пики осмия ($M_{\beta} = 1,98$ кэВ), свинца ($M_{\alpha} = 2,35$ кэВ, $M_{\beta} = 2,44$ кэВ) и урана ($M_{\alpha} = 3,17$ кэВ, $M_{\beta} = 3,34$ кэВ), происходящие от используемых контрастирующих веществ, и пик кремния ($K_{\alpha} = 1,74$ кэВ) — элемента аппаратного фона.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что мембрана вакуоли (тонопласт), вероятнее всего, вовлечена в процессы синтеза и формирования полифосфатных цепей в ФоС-включениях. Мы предполагаем, что в клетках микроводорослей происходят сопряженные процессы синтеза и переноса полифосфатной цепи внутрь вакуоли, схожие с описанными для ацидокальцисом дрожжей. Указанные процессы в ацидокальцисомах дрожжей основаны на работе эндогенной полифосфат-полимеразы — большого мембранного комплекса вакуолярного транспортного шаперона VTC [Müller et al., 2002, 2003; Hothorn et al., 2009; Gerasimaitė et al., 2014, 2016].

Гомолог субъединиц VTC был аннотирован нами в транскриптом *C. vulgaris* IPPAS C-1 (см. раздел 5.3). Мы предполагаем, что активность VTC-подобного комплекса в микроводорослях определяет упаковку гранул в вакуолярных ФоС-включениях (рис. 21). Непрерывный синтез полифосфатных цепей множеством VTC-подобных комплексов, расположенных в мембране вакуоли близко друг к другу, приводит к появлению ультраструктурной организации типа «многожильный кабель». Распределение и скручивание завершенных полифосфатных цепей в вакуолярном люмене происходит в зависимости от плотности упаковки содержимого вакуоли. Мы предполагаем, что ультраструктурная организация «многожильный кабель» в ФоС-включениях *L. incisa* 2468 становится отчетливо видна на 3 день голодании по фосфору (рис. 20) из-за перераспределения содержимого вакуолей в результате процесса контролируемой деградации полифосфатов, вызванного отсутствием источника фосфора в среде.

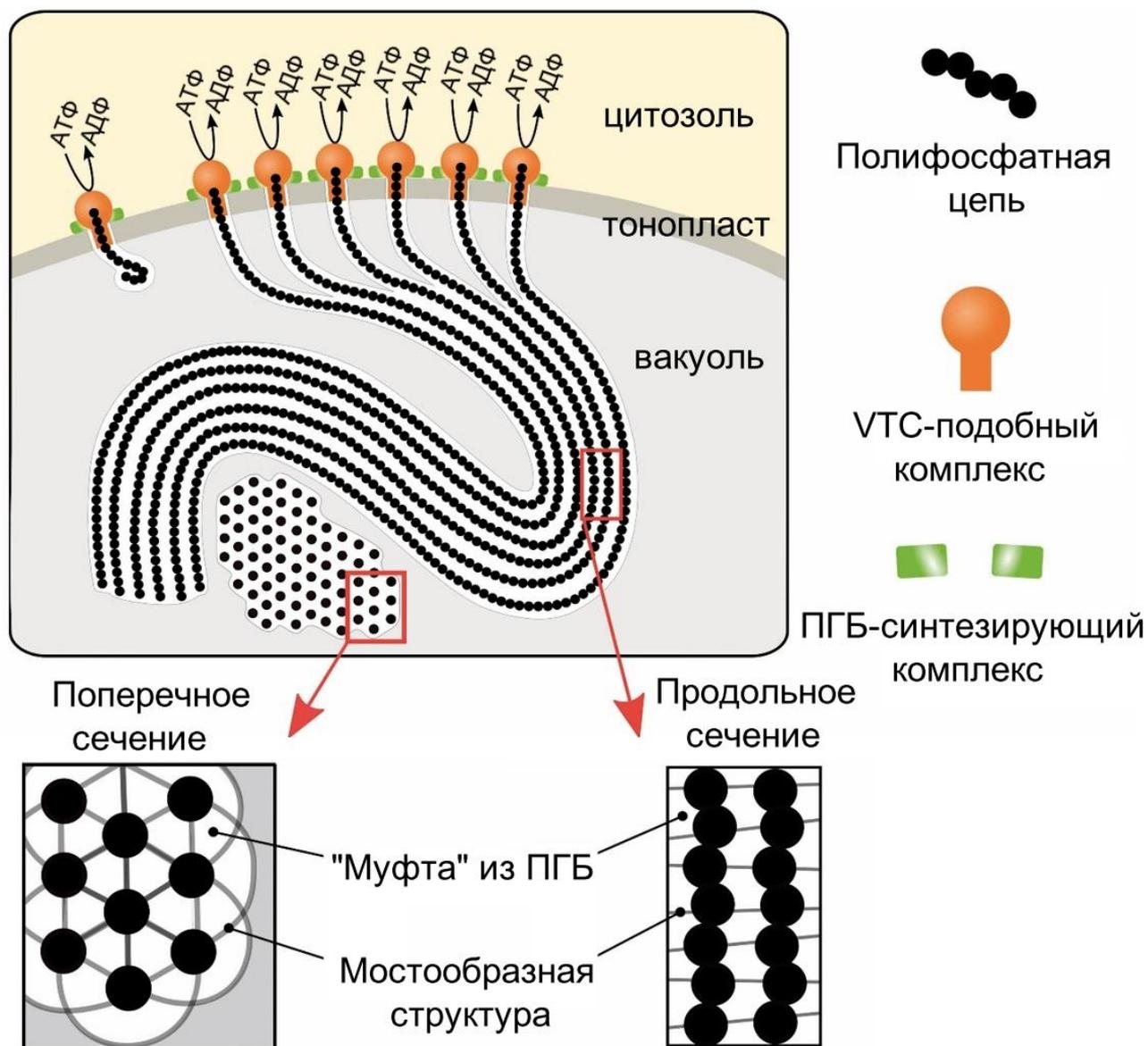


Рис. 21 Гипотетическое схематическое представление сопряженных процессов синтеза и переноса полифосфатных цепей внутрь вакуоли микроводорослей, осуществляемых расположенными в мембране вакуоли VTC-подобными комплексами и приводящих к образованию фосфорсодержащих включений (см. рис. 19, 20). Вероятнее всего, каждая полифосфатная цепь покрыта поли-(R)-3-гидроксибутиратом (ПГБ) — «муфтой» из ПГБ, при этом полифосфатные цепи связаны между собой мостообразными структурами. Ультраструктурная организация фосфорсодержащих включений типа «многожильный кабель» возникает, вероятнее всего, в результате одновременной активности множества VTC-подобных комплексов, близко расположенных друг к другу в мембране вакуоли (тонопласте). Схема составлена совместно с сотрудником кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ д.б.н. Гореловой О.А.

Основываясь на данных Ota et al. [2016], полученных для ФоС-включений микроводоросли *Parachlorella kessleri* NIES-2152 и показывающих, что органические вещества в

составе ФоС-включений не являются сахарами и липидами, мы исключили возможность того, что материал электроннопрозрачного матрикса относится к сахарам и/или липидам. Из научной литературы известно, что полифосфатные цепи могут образовывать комплексы с поли-(R)-3-гидроксibuтиратом (ПГБ) [Reusch, 2000]. Такие комплексы были обнаружены в мембранах многих организмов (см. соответствующие ссылки в обзоре [Kulaev et al., 2004, P. 46]), хотя детальная структура этих комплексов до сих пор не ясна. В связи с вышеизложенным, мы предполагаем, что, вероятнее всего, материал электроннопрозрачного матрикса, окружающего тяжи электронно-плотных гранул, представляет собой ПГБ, а мостообразные структуры представляют собой белково-фосфолипидные монослои, похожие на те, что покрывают ПГБ-гранулы цианобактерий [Kunasundari, Sudesh, 2011]. Таким образом, вероятнее всего, тяжи электронно-плотных гранул окружены так называемой «муфтой» из ПГБ (рис. 21).

В подтверждение того, что мостообразные структуры представляют собой белково-фосфолипидные монослои выступает тот факт, что синтез ПГБ в микроорганизмах происходит таким образом, что формирующаяся гранула ПГБ оказывается покрыта белковым фосфолипидным монослоем [Tian et al., 2005]. Кроме того, измеренные на ПЭМ-изображениях размеры мостообразных структур хорошо соотносятся с размерами липидного бислоя: размер мостообразных структур составляет половину от расчетного размера липидного бислоя (3 – 4 нм) [Lewis, Engelman, 1983; Rawicz et al., 2000].

Исходя из полученных данных об ультраструктуре ФоС-включений, мы предполагаем, что синтез полифосфатных цепей происходит в результате активности множества близко расположенных друг к другу VTC-подобных и ПГБ-синтезирующих комплексов (рис. 21). Насколько нам известно, в представленной работе впервые описана ультраструктурная организация типа «многожильный кабель» для ФоС-включений и предложена модель функционирования VTC-подобных и ПГБ-синтезирующих комплексов, ассоциированных с мембраной тонопласта и обеспечивающих формирование такой структуры.

5.3. Изменение экспрессии генов *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде

При работе над данным разделом диссертации использована следующая публикация автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Solovchenko, A. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, L. Semenova, T. Ismagulova, A. Lukyanov, I. Mamedov, E. Vinogradova, O. Karpova, I. Konyukhov, S. Vasilieva, P. Mojzeš, C. Dijkema, M. Vecherskaya, I. Zvyagin, L. Nedbal, O. Gorelova // *Algal Research*. – 2019a. – <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>.

Для ответа на вопрос, как меняется экспрессия генов, потенциально вовлеченных в метаболизм полифосфатов у микроводорослей, при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде, мы провели сравнительный анализ дифференциальной экспрессии следующих генов у модельной микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1: генов VTC-подобного белка, натрий-фосфатного симпортера, H⁺-фосфатного симпортера и пурпурной кислой фосфатазы (см. разделы 4.5.3, 4.5.4).

Результаты проведения ПЦР в режиме реального времени показали, что через 120 мин после добавления неорганического фосфора в среду к голодным по фосфору клеткам экспрессия генов VTC-подобного белка и натрий-фосфатного симпортера увеличивается (в 4 раза и 3,5 раза, соответственно) (см. рис. 22 и приложение 10), в то время как экспрессия генов H⁺-фосфатного симпортера и пурпурной кислой фосфатазы значительно снижается (в 10 раз и 20 раз, соответственно).

В экспоненциальной фазе роста культуры экспрессия гена VTC-подобного белка возвращается к уровню, как в голодных клетках, а в стационарной фазе — снова увеличивается (в 49 раз по сравнению с голодными клетками).

Временное увеличение экспрессии гена VTC-подобного белка через 120 мин после добавления фосфора коррелирует с формированием ФоС-включений в вакуолях в первые часы после добавления в среду фосфора (рис. 17). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что VTC-подобный белок у зеленых микроводорослей потенциально вовлечен в синтез ФоС-включений, образующихся в вакуолях в первые часы после перехода от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде. Формирование полифосфатных ФоС-включений в клетках *C. vulgaris* IPPAS C-1 на стационарной фазе роста (рис. 15, 16), по-видимому, также происходит при активном участии VTC-подобного белка.

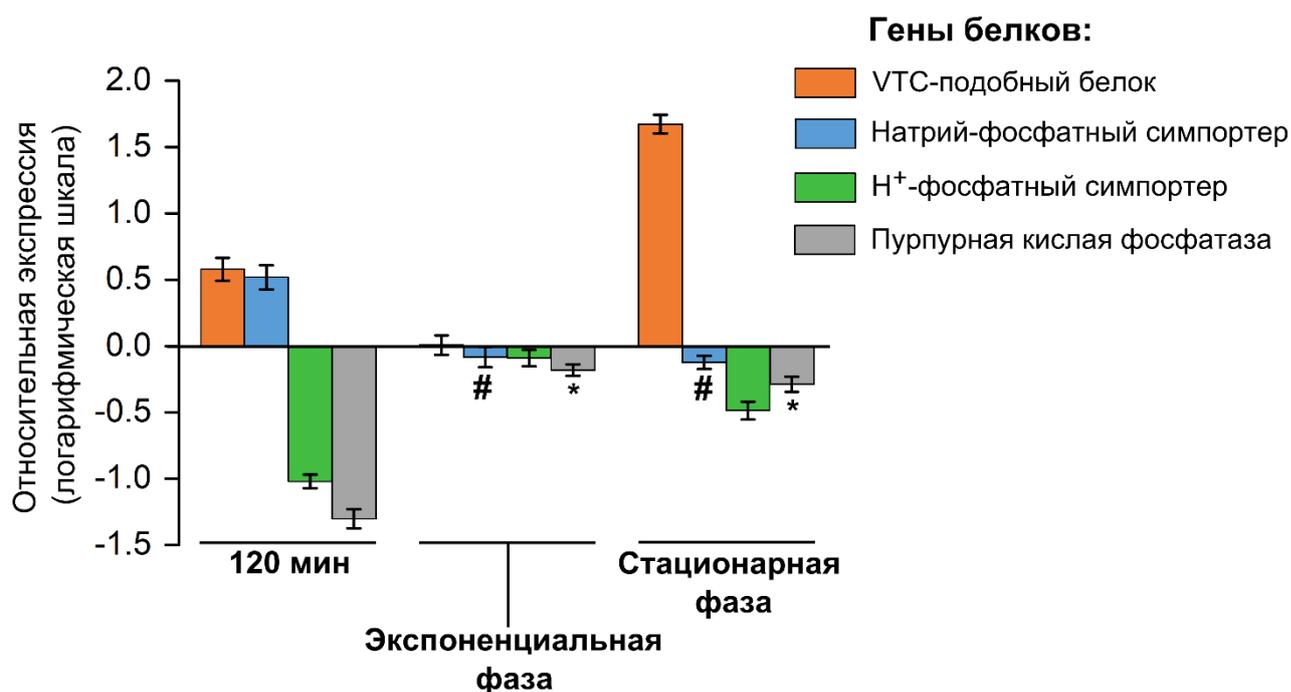


Рис. 22 Анализ экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм полифосфатов, у микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде. На графике приведены значения экспрессии генов в логарифмической шкале (логарифм по основанию 10) относительно экспрессии соответствующих генов в голодных по фосфору клетках (день 0). Значения экспрессии генов в линейном масштабе см. в приложении 10. Относительные уровни экспрессии нормализованы относительно экспрессии референсного гена убиквитилигазы E3. На графике показаны среднее значение ($n = 4$) и соответствующая стандартная ошибка. На графике звездочкой (*) или решеткой (#) отмечены изменения, не являющиеся между собой статистически значимыми ($p > 0,05$, t-критерий Стьюдента, см. приложение 10). Все остальные неотмеченные изменения являются статистически значимыми ($p \leq 0,05$, t-критерий Стьюдента)

Скорее всего, не у всех групп микроводорослей именно VTC-подобный белок обеспечивает синтез ФоС-включений, образующихся в первые часы после восстановления фосфорного питания. В геноме красной одноклеточной водоросли *Cyanidioschyzon merolae* ген-гомолог полифосфат-полимеразы Vtc4 не был обнаружен [Yagisawa et al., 2016], вместо него был аннотирован ген-гомолог бактериального гена *ppk1*, кодирующего полифосфат-киназу [Whitehead et al., 2013]. В работе [Yagisawa et al., 2016] авторы предполагают, что именно белок-гомолог полифосфат-киназы PPK1 вовлечен в образование полифосфатных ФоС-включений в *C. merolae* в первые часы после добавления фосфора к голодным клеткам (см. табл.1). Авторы даже предложили схему синтеза полифосфатных включений в *C. merolae* при восстановлении фосфорного питания без участия вакуолярного VTC-комплекса, согласно которой сначала

происходит синтез мелких полифосфатных гранул в цитозоле или в мелких везикулах, а затем внедрение этих гранул в крупные вакуоли и их аккумуляция там.

На момент написания этой работы в научной литературе не обнаружилось данных об экспрессии комплекса VTC и (или) других полифосфат-полимераз в зеленых микроводорослях в зависимости от наличия фосфора в среде. Однако есть исследования изменения экспрессии VTC при отсутствии источников фосфора в среде для кокколитофоровой микроводоросли *Emiliania huxleyi* [Dyhrman et al., 2006] и при малых концентрациях фосфата в среде для диатомовой микроводоросли *Thalassiosira pseudonana* [Dyhrman et al., 2012]. В обоих микроводорослях экспрессия генов *vtc* была значительно выше в клетках в дефицитной по фосфору среде, чем в полной среде. При этом содержание полифосфатов в клетках *Thalassiosira pseudonana* при малых концентрациях фосфора в среде было значительно выше, чем в клетках на полной среде [Dyhrman et al., 2012]. Авторы в обеих работах объясняют полученные результаты способностью исследуемых микроводорослей при снижении фосфора в среде синтезировать полифосфаты, выполняющие роль важного депо для краткосрочного хранения неорганического фосфата. По мнению авторов, указанная способность позволяет данным микроводорослям эффективно конкурировать с другими микроорганизмами в океанических экосистемах, в которых часто наблюдаются локальные колебания содержания доступного фосфора [Dyhrman et al., 2006]. Важно отметить, что в обеих работах отбор проб клеток, дефицитных по фосфору, проводили в начале стационарной фазы роста культуры. Таким образом, данные клетки нельзя назвать вполне «голодными по фосфору», поскольку дефицит фосфора в среде еще не начал ограничивать рост культуры. В эксперименте же, проведенном в нашем исследовании, экспрессию комплекса VTC при восстановлении фосфорного питания сравнивали с голодными по фосфору клетками, в которых полифосфатов уже не было (см. рис. 15), а экспрессия комплекса VTC была минимальна.

Исследования экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез полифосфатов, затруднены, поскольку катализируемые ими реакции являются обратимыми, в том числе, обратимой является реакция полифосфат-полимеразы *vtc4* [Dyhrman et al., 2016, P. 157]. Другими словами, увеличение экспрессии полифосфат-полимеразы *vtc4* может быть связано как с реакцией синтеза полифосфатов, так и с реакцией их деградации. Однако несмотря на то, что полифосфат-полимераза может участвовать в мобилизации полифосфатов, судя по всему, увеличение ее экспрессии не связано с резким сокращением содержания полифосфатов в клетке [Dyhrman et al., 2016, P. 158]. Кроме того, в нашем исследовании мы использовали голодные по фосфору клетки, в которых на момент добавления фосфора полифосфатов уже не было (см. рис. 15). То есть наблюдаемое нами увеличение уровня экспрессии VTC-подобного белка в *C. vulgaris* IPPAS C-1 через 120 мин после добавления фосфора если и связано с деградацией полифосфатов, то только

с деградацией тех полифосфатов, которые успели синтезироваться в клетке за эти 120 мин посредством этого же фермента.

В нашем исследовании показано, что формирование полифосфатов в клетках *C. vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку фосфора в среде совпадает по времени с увеличением экспрессии гена VTC-подобного белка. Значит, вероятнее всего, VTC-подобный белок в *C. vulgaris* IPPAS C-1 потенциально вовлечен в избыточное образование полифосфатов при восстановлении фосфорного питания. Это важно для создания высокоэффективных генно-инженерных штаммов микроводорослей путем сверхэкспрессии указанного белка для увеличения их способности к избыточному образованию полифосфатов [Solovchenko et al., 2016].

Исходя из полученных результатов можно заключить, что формирование и структура ФоС-включений отражают функционирование механизмов акклимации микроводорослей к доступности фосфора в среде культивирования, то есть механизмов синтеза полифосфатных ФоС-включений при восстановлении фосфорного питания.

В экспоненциальной и стационарной фазах роста оба исследуемых гена транспортеров фосфата зарепрессированы относительно голодных клеток, то есть их экспрессия при наличии фосфора в среде была ниже, чем в голодных клетках (рис. 22). Полученные результаты позволяют нам отнести данные транспортеры к транспортерам высокой аффинности, экспрессия которых, как известно, увеличивается при недостатке фосфора в среде [Kobayashi et al., 2003; Chang et al., 2005; Moseley et al., 2006] (см. также раздел 3.3.2). Кроме того, исследуемый натрий-фосфатный симпортер *C. vulgaris* IPPAS C-1 имеет высокую степень гомологии с аннотированными фосфатными транспортерами высокой аффинности *C. variabilis* (XP_005843014.1), *Tetraselmis chuii* (AAO47330.1) и *Ectocarpus siliculosus* (CBJ33891.1) (см. приложение 5). В научной литературе отсутствуют данные об изменении экспрессии генов H⁺-фосфатных и натрий-фосфатных транспортеров в микроводорослях при переходе от фосфорного голодания к избытку фосфора в среде. Однако наши результаты согласуются с данными, полученными для микроводоросли *Ch. reinhardtii* при голодании по фосфору с тем условием, что мы в нашей работе наблюдаем обратный процесс перехода от голодания по фосфору к его избытку: при голодании по фосфору в клетках *Ch. reinhardtii* снижается экспрессия натрий-фосфатного транспортера высокой аффинности РТВ2 [Kobayashi et al., 2003; Chang et al., 2005; Moseley et al., 2006] и H⁺-фосфатного транспортера высокой аффинности РТА3 [Moseley et al., 2006].

Однако в нашем исследовании гены транспортеров различаются по паттерну экспрессии в первые часы после добавления фосфора к голодным клеткам: экспрессия гена натрий-

фосфатного симпортера индуцируется добавлением в среду неорганического фосфора, гена H^+ -фосфатного симпортера — репрессируется. H^+ -фосфатный симпортер, вероятно, является высокоаффинным транспортером, который обладает высокой аффинностью к фосфату, но сравнительно небольшой скоростью транспорта фосфата [Kobayashi et al., 2003; Chang et al., 2005; Moseley et al., 2006]. При добавлении избытка фосфора к голодным клеткам микроводоросли попадают в условия с достаточным количеством фосфора, при которых транспорт фосфата с помощью фосфатных транспортеров низкой аффинности становится более целесообразным, чем с транспортерами высокой аффинности, ввиду их более высокой скорости транспорта [Grossman, Takahashi, 2001]. Значительную репрессию гена H^+ -фосфатного симпортера в первые часы можно объяснить тем, что данный транспортер высокой аффинности активно синтезируется в голодных по фосфору клетках, а с появлением избытка фосфора в среде его синтез перестает быть целесообразным для клетки, поэтому его экспрессия снижается. При этом значительное снижение его экспрессии происходит за достаточно короткое время — в 10 раз за два часа.

Натрий-фосфатный симпортер также, скорее всего, является транспортером высокой аффинности. Однако его экспрессия в первые часы после добавления фосфора, в отличие от H^+ -фосфатного симпортера, временно увеличивается. Таким образом, согласно полученным нами данным, на определенной стадии эксперимента экспрессия транспортера высокой аффинности выше в клетках в среде с избытком фосфора, чем в клетках при голодании по фосфору, что нетипично для транспортеров такого типа [Moseley et al., 2006; Pitt et al., 2010; Reistetter et al., 2013]. Полученные результаты позволяют предположить, что исследуемый в работе натрий-фосфатный симпортер относится к транспортерам, которые вносят вклад в наблюдаемое нами интенсивное поступление фосфата в клетки в первые часы при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде (рис. 18) несмотря на то, что данный транспортер, скорее всего, относится к высокоаффинным транспортерам.

Пурпурная кислая фосфатаза в экспоненциальной и стационарной фазах роста культуры остается зарепрессированной по сравнению с голодными клетками (в 1,5 раза и в 1,9 раза, соответственно), хотя и не в такой большой степени, как в первые часы после добавления неорганического фосфата (рис. 22, приложение 10). Это объясняется тем, что задача пурпурной кислой фосфатазы, выделяемой голодными клетками в среду — расщепление фосфатсодержащих соединений для высвобождения неорганических фосфатов (см. раздел 3.3.2), недостаток которых испытывают клетки в голодной по фосфору культуре. При добавлении избытка фосфора к голодным клеткам синтез и выделение пурпурной кислой фосфатазы клетками перестает быть целесообразным ввиду появления в среде огромного количества свободного и доступного к поглощению неорганического фосфата, и, как следствие, экспрессия

гена пурпурной кислой фосфатазы значительно снижается. В экспоненциальной и стационарной фазах по мере роста культуры количество фосфата в среде уменьшается в результате поглощения клетками, что приводит к небольшому росту экспрессии пурпурной кислой фосфатазы по сравнению с экспрессией в первые часы после добавления фосфора.

В литературе отсутствуют данные о влиянии наличия фосфора в среде на экспрессию секретируемых кислых фосфатаз в микроводорослях, в том числе пурпурной кислой фосфатазы. Однако наши результаты согласуются с данными, полученными для растений, демонстрирующие увеличение экспрессии генов пурпурной кислой фосфатазы в условиях недостатка фосфора в среде. Увеличение экспрессии генов пурпурной кислой фосфатазы при голодании по фосфору было показано для растений *Lycopersicon esculentum* [Bozzo et al., 2002; 2004], *Arabidopsis thaliana* [Del Pozo et al., 1999], *Medicago truncatula* [Xiao et al., 2006], *Lupinus albus* [Miller et al., 2001], *Oryza sativa* [Zhang et al., 2011] и *Solanum tuberosum* [Zimmermann et al., 2004]. Исходя из перечисленных известных данных для растений в бесфосфорных условиях и полученных нами результатов можно сделать вывод о том, что изменение экспрессии пурпурной кислой фосфатазы при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде у микроводоросли *C. vulgaris* IPPAS C-1 является «зеркальным» изменениям при фосфорном голодании: при отсутствии фосфора в среде ее экспрессия увеличивается, при возобновлении фосфорного питания — снижается. При этом значительное снижение экспрессии пурпурной кислой фосфатазы у *C. vulgaris* IPPAS C-1 происходит в очень короткие сроки: уже через два часа после добавления фосфора к голодным клеткам ее экспрессия снижается в 20 раз (рис. 22).

Таким образом, для микроводоросли *C. vulgaris* показали, что при переходе от фосфорного голодания к избытку в среде неорганического фосфора: (i) происходит временное увеличение (в 4 раза) экспрессии гена полифосфат-полимеразы — VTC-подобного белка, расположенного в мембране тонопласта и участвующего в синтезе полифосфатов; (ii) гены транспортеров неорганического фосфата отличаются по паттерну экспрессии: экспрессия одного из генов индуцируется добавлением в среду неорганического фосфора, другого — репрессируется; (iii) экспрессия гена пурпурной кислой фосфатазы значительно снижается после добавления в среду фосфора (за первые два часа в 20 раз).

5.4. Формирование фосфорсодержащих включений у цианобактерий при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде

В представленной работе также исследовали формирование ФоС-включений у прокариотических цианобактерий. Формирование ФоС-включений недiazотрофными цианобактериями исследовали на примере *Nostoc* sp. PCC 7118 — нитчатого цианобактериального штамма, не способного к образованию гетероцист, и, как следствие, к diaзотрофии — фиксации молекулярного атмосферного азота. Ввиду неспособности указанного штамма к азотфиксации, эксперимент по возобновлению фосфорного питания с этим штаммом проводили при наличии источников доступного связанного азота в среде (см. табл.4). Формирование ФоС-включений diaзотрофными цианобактериями исследовали на примере нитчатого штамма *Nostoc* sp. PCC 7120, близкородственного штамма *Nostoc* sp. PCC 7118. Штамм *Nostoc* sp. PCC 7120, в отличие от *Nostoc* sp. PCC 7118, при недостатке связанного азота в среде способен к образованию гетероцист и к фиксации молекулярного атмосферного азота. Для исследования влияния diaзотрофии на изменения в составе его включений при восстановлении фосфорного питания эксперимент по добавлению фосфора к голодным по фосфору клеткам проводили как при наличии, так и при отсутствии источников связанного азота в среде (см. табл.4).

5.4.1. Формирование фосфорсодержащих включений недiazотрофными цианобактериями

Для определения изменений в составе включений *Nostoc* sp. PCC 7118 методом аналитической ПЭМ исследовали голодные по фосфору клетки, деление которых остановилось (рис. 23 а, в), и через 7 дней после добавления фосфора к голодным клеткам (рис. 23 б, г).

Поскольку исследованный цианобактериальный штамм *Nostoc* sp. PCC 7118 относится к прокариотическим микроорганизмам, то его клетки (рис. 23 а,б, приложение 11) значительно отличались по ультраструктурным особенностям от клеток исследованных выше эукариотических микроводорослей (рис. 13, разделы 3.2.1, 5.1, 5.2). В клетках цианобактерий нет оформленного ядра и нет оформленных мембранных органоидов, как у эукариотических микроводорослей (в том числе, вакуолей), за исключением плоских «цистерн» — фотосинтезирующих тилакоидов. Тилакоиды отчетливо выявляются на ПЭМ-изображениях клеток *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 23 а,б, приложение 11). Геномная ДНК в клетках цианобактерий расположена в цитозоле в зоне так называемого нуклеоида. На ПЭМ-изображениях клеток

исследованной цианобактерии нуклеоид был виден при контрастировании уранилацетатом (см. приложение 11).

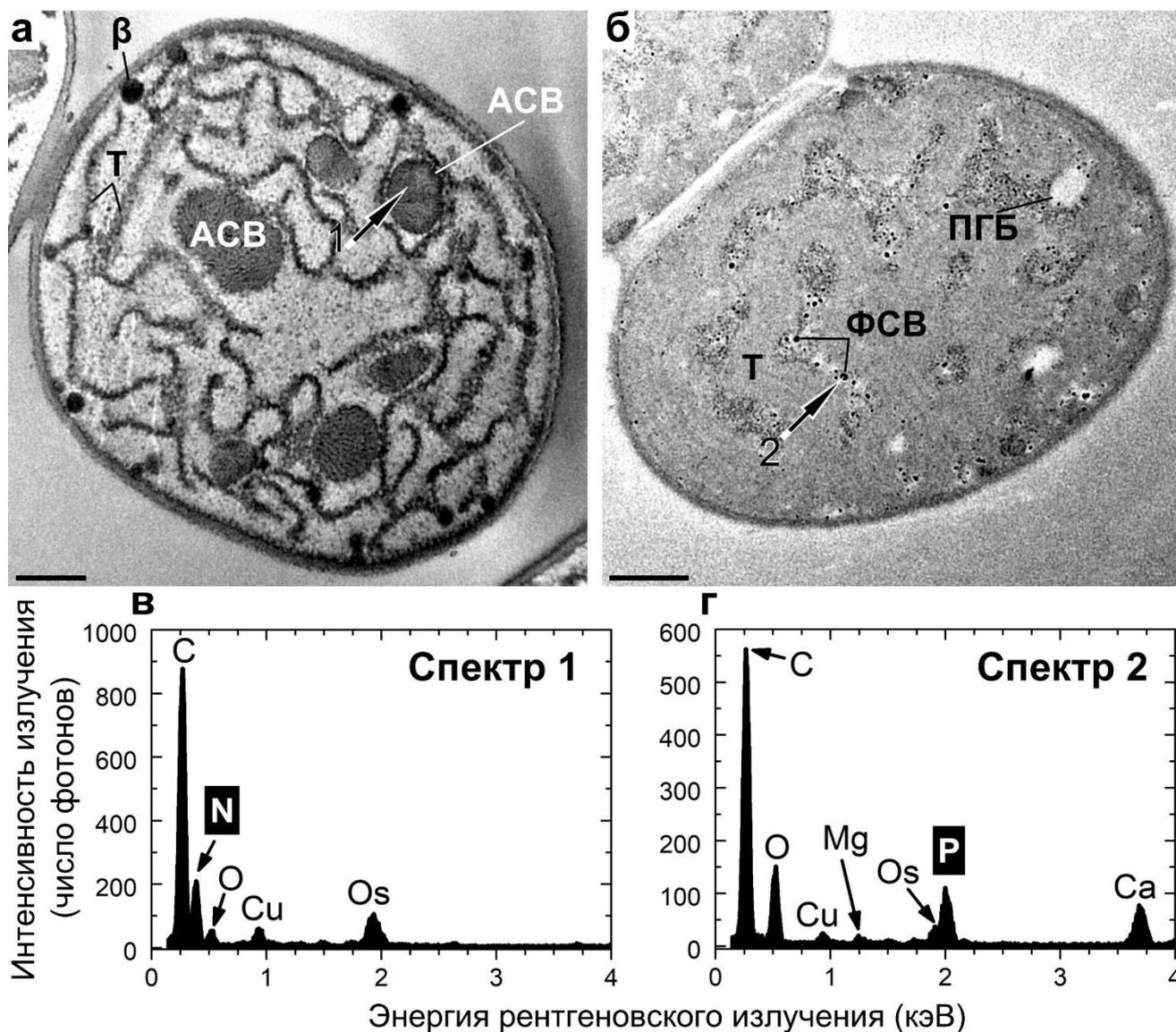


Рис. 23 Изменения в составе включений недiazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 при восстановлении фосфорного питания: (а,в) - голодная по фосфору культура, (б,г) - 7 дней после добавления фосфора к голодным клеткам. (а,б) ПЭМ-изображения клеток с включениями, типичных для соответствующих стадий эксперимента. (в,г) Типичные энергодисперсионные спектры (спектры 1,2) соответствующих включений, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Точечные области фосфорсодержащих включений, с которых снимали спектры 1-2, отмечены стрелочками с соответствующей цифрой. ПЭМ-изображения и спектры представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение (цианофициновая гранула), β — липидная β -гранула высокой электронной плотности, ПГБ — гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, Т — тилакоиды, ФСВ — фосфорсодержащее включение. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

У голодных по фосфору клеток *Nostoc* sp. PCC 7118 цитозоль обладал низкой электронной плотностью и имел высокую степень однородности (рис. 23 а, приложение 11). Тилакоиды в голодных по фосфору клетках были немногочисленны и разделены друг от друга значительным пространством цитозоля и обладали высокой электронной плотностью (рис. 23 а). Между тилакоидами в цитозоле были распределены липидные β -гранулы и АС-включения — цианофициновые гранулы (рис. 23 а, приложение 11). При этом ФоС-включения в клетках указанной культуры не обнаруживались. Энергодисперсионные спектры от выявленных АС-включений (рис. 23 в) содержали интенсивный пик азота. Размер АС-включений варьировал от 0,15 до 1,5 мкм.

Через 7 дней после восстановления фосфорного питания ультраструктура клеток *Nostoc* sp. PCC 7118 значительно менялась (рис. 23 б). Электронная плотность тилакоидов в клетках этой культуры была значительно ниже, чем у голодных по фосфору клеток (рис. 23 а,б). В клетках через 7 дней после добавления фосфора к голодной культуре значительную часть клеточного среза занимали лентообразные группы расположенных близко друг к другу тилакоидов (рис. 23 б). Область цитозоля в клетках этой культуры обладала более высокой электронной плотностью по сравнению с голодными по фосфору клетками, а также характеризовалась «зернистой» структурой из-за большого количества рибосом и электронноплотных ФоС-включений (рис. 23 б, приложение 11). Липидные β -гранулы и АС-включения из клеток этой культуры исчезали, вместо них в клетках в цитозоле аккумулировались ФоС-включения (рис. 23 б), в спектрах от которых выявлялись пики фосфора, магния и кальция (рис. 23 г). ФоС-включения исследуемой цианобактерии имели небольшие размеры (0,01-0,09 мкм) по сравнению с микроводорослями. В клетках на этой стадии также выявлялись гранулы ПГБ, являющиеся источниками углерода у цианобактерий.

Таким образом, реакция недiazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 на отсутствие источников фосфора и на их избыток в среде схожа с реакцией микроводорослей (рис. 23) — при голодании по фосфору в клетках выявляются АС-включения и отсутствуют ФоС-включения, тогда как при возобновлении фосфорного питания АС-включения метаболизируются, вероятнее всего, для поддержания роста и делений клеток, а избыток фосфора накапливается в клетках в виде ФоС-включений.

В голодной по фосфору культуре цианобактерии дефицит фосфора отражается на ультраструктуре клеток: из-за недостатка фосфора клеточный метаболизм замедлен, тилакоиды немногочисленны, рибосом в цитозоле мало, избыток фиксированного в результате фотосинтеза углерода (по аналогии с микроводорослями, см. рис. 15 а) запасен в липидных β -гранулах в

цитозоле. Предполагается, что такое запасание углерода в липидных глобулах защищает фотоавтотрофную клетку от фотоокислительного повреждения [Vitova et al., 2015]. При восстановлении фосфорного питания в клетках площадь, занимаемая тилакоидами увеличивается, исчезают липидные β -гранулы, в цитозоле образуются рибосомы в большом количестве, что придает цитозолу «зернистость» на ПЭМ-изображениях.

Наблюдаемые различия в ультраструктуре голодных по фосфору клеткок и клеток после восстановления фосфорного питания согласуются с данными для других цианобактерий [Jensen, Sicko, 1974; Schwarz, Forchhammer, 2005], для которых также были показаны аналогичные изменения в тилакоидах, цитозоле и липидных β -гранулах.

Различия в электронной плотности тилакоидов у голодных по фосфору клеток и клеток после восстановления фосфорного питания можно объяснить тем, что при фосфорном голодании у цианобактерий происходят значительные изменения липидного состава фотосинтетических мембран тилакоидов [Schwarz, Forchhammer, 2005], что влияет на сродство мембран к контрастирующим агентам, в том числе, к тетраоксиду осмия. Вероятнее всего, в голодных по фосфору клетках липидный состав мембран тилакоидов обеспечивает их высокое сродство к тетраоксиду осмия, из-за чего они имеют высокую электронную плотность.

Наблюдаемые в представленной работе значительные различия в ультраструктуре цианобактериальных клеток при фосфорном голодании и при наличии избытка фосфора в среде культивирования определяются известными значительными адаптационными возможностями цианобактерий к изменяющимся условиям среды. Адаптационные возможности цианобактерий, культивируемых при различных условиях (при голодании по макро- или микронутриентам, на ярком свете, в темноте и др.), ярко выражаются в значительных изменениях ультраструктуры клеток, в так называемой ультраструктурной пластичности цианобактерий [Баулина, 2010, с. 12-14], являющейся частью фенотипической пластичности – совокупности гибких систем быстрого адаптивного реагирования цианобактерий.

В отношении изменений в составе АС-включений результаты для *Nostoc* sp. PCC 7118 в представленной работе соотносятся с данными, полученными методом ПЭМ для цианобактерий *Plectonema boryanum* [Jensen, Sicko, 1974] и *Microcystis aeruginosa* [Barlow et al., 1979] (см. табл.1), у которых при культивировании в бесфосфорной среде увеличивается число цианофициновых гранул. Для цианобактерий *Agmenellum quadruplicatum* [Stevens et al., 1981], *Aphanocapsa* sp. [Allen et al., 1980], *Synechocystis* sp. [Stephan et al., 2000], *Anabaena cylindrical* [Lawry, Simon, 1982] также было показано интенсивное формирование цианофициновых АС-включений при голодании по фосфору.

Что касается формирования ФоС-включений, то из литературных данных известно, что у *Microcystis aeruginosa* также при восстановлении фосфорного питания с 4 по 20 день после добавления фосфора происходит образование ФоС-включений [Barlow et al., 1979]. При этом число образовавшихся включений зависит от добавленной концентрации фосфора. При добавлении фосфора до конечной концентрации 8 мг л⁻¹ среднее число образовавшихся ФоС-включений достигает максимума на 12 день после добавления фосфора (19 включений на клеточный срез), тогда как при добавлении до конечной концентрации 2 мг л⁻¹ — максимум (12,2 включений на срез) достигается на 8 день. Принципиально, что в указанной работе [Barlow et al., 1979] не учитывался размер ФоС-включений на клеточных срезах, а только их число. В случае различий в размере включений только по числу включений невозможно достоверно оценить различия в содержании резервов фосфора в клетках при различных условиях. Стоит отметить, что сравнение результатов, полученных в нашей работе, с данными для *Microcystis aeruginosa* в работе [Barlow et al., 1979] не является корректным, так как в указанной работе культивирование цианобактерии *Microcystis aeruginosa* в бесфосфорной среде проводили в течение всего 24 ч, после чего осуществляли добавление фосфора. Скорее всего, за такой небольшой период времени клетки еще не успели стать голодными по фосфору, то есть израсходовать все внутриклеточные запасы фосфора до остановки деления клеток. Это подтверждается тем, что в работе [Barlow et al., 1979] в культивируемых в бесфосфорной среде контрольных клетках, к которым через 24 ч после начала голодания так и не добавили фосфор, также образуются ФоС-включения (в среднем 2 на клеточный срез к 8 дню культивирования, 7 — к 20 дню).

При исследовании возобновления фосфорного питания *Nostoc* sp. PCC 7118 встал о вопрос о том, происходит ли в указанной цианобактерии формирование ФоС-включений в первые часы после добавления фосфора, как это происходит у микроводорослей (рис. 17) и некоторых других цианобактерий (см. табл. 1). Для ответа на этот вопрос анализировали клетки *Nostoc* sp. PCC 7118 через 4 часа после добавления фосфора в среду.

Анализ методом аналитической ПЭМ показал, что при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде через 4 часа после добавления фосфора в клетках цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 в цитозоле происходит формирование ФоС-включений (рис. 24 а,в,д). При этом в клетках также сохранялись АС-включения (рис. 24 а,б,г, приложение 11).

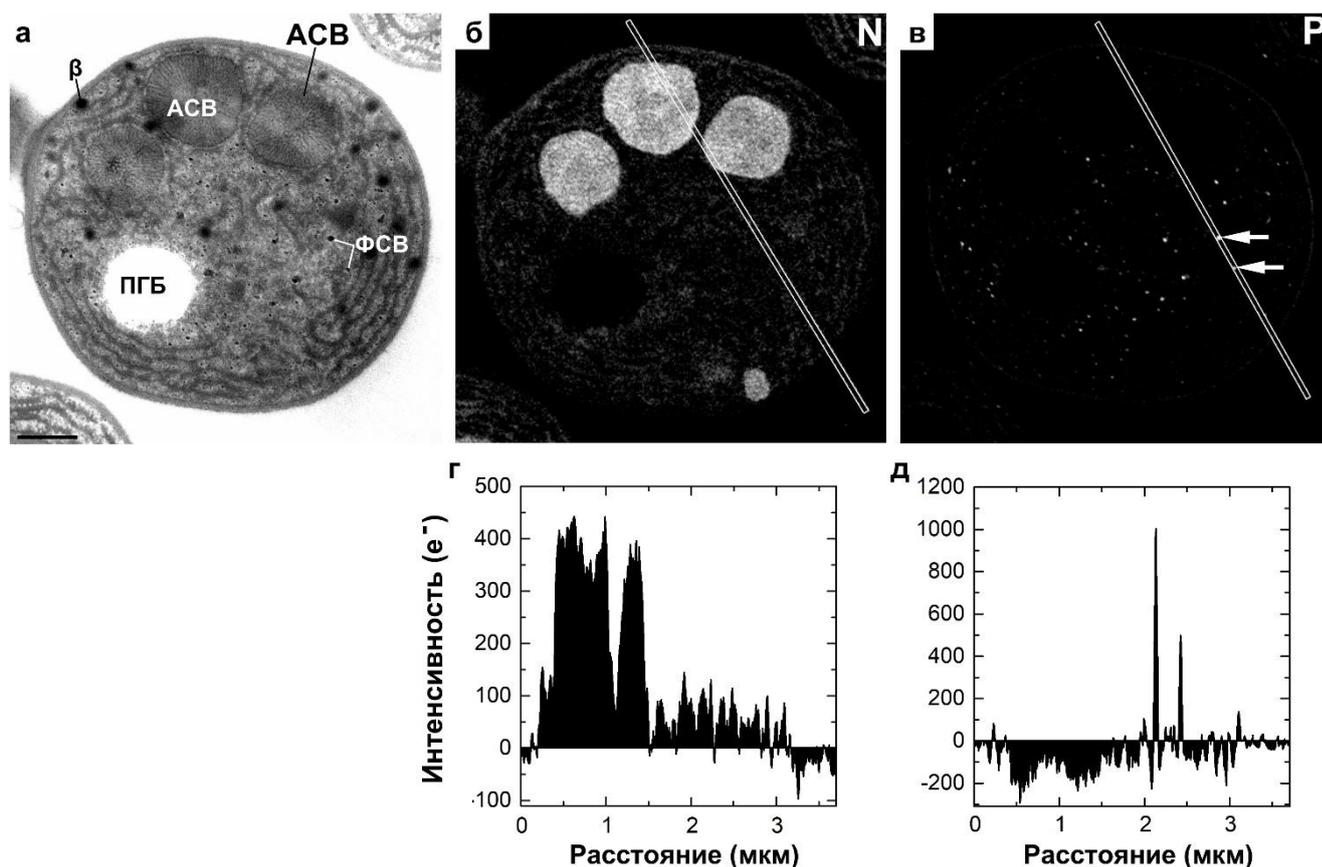


Рис. 24 Формирование фосфорсодержащих включений у недiazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде через 4 ч после добавления фосфора в среду. (а) Энергофильтрованные в пике нулевых потерь ПЭМ-изображение типичной клетки с включениями азота и фосфора. (б,в) Элементные карты азота (б) и фосфора (в), полученные методом ЭФПЭМ. (г,д) Усредненные профили интенсивности сигнала с соответствующих карт азота (г) и фосфора (д), проходящие через выявленные включения азота и фосфора. Усредненные профили интенсивности сигнала (г,д) получены вдоль белых линий, показанных на соответствующих картах. На карте фосфора (в) стрелочками показаны выявленные фосфорсодержащие включения. Результаты представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение (цианофициновая гранула), β — липидная β -гранула высокой электронной плотности, ПГБ — гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, ФСВ — фосфорсодержащее включение. Масштабный отрезок: 0,5 мкм

На рис. 24 (б,в) представлены элементные карты фосфора и азота, полученные методом ЭФПЭМ с типичной клетки через 4 часа после добавления фосфора, на которых четко выявляются Фос- и АС-включения, соответственно (см. соответствующие профили интенсивности сигнала на рис. 24 г,д). Размеры АС- и Фос-включений через 4 часа после добавления фосфора составляли 0,25 до 1,55 мкм и 0,01-0,09 мкм, соответственно.

Энергетические окна для проведения элементного картирования выбирали, основываясь на соответствующих спектрах ХПЭЭ (рис. 25). В спектрах ХПЭЭ от ФоС-включений (рис. 25 а) *Nostoc* sp. PCC 7118 выявлялись пики фосфора ($L_2 = 136$ эВ, $L_3 = 135$ эВ) и кальция ($L_2 = 350$ эВ, $L_3 = 347$ эВ), в спектрах от АС-включений (рис. 25 б) — пик азота ($K = 399$ эВ).

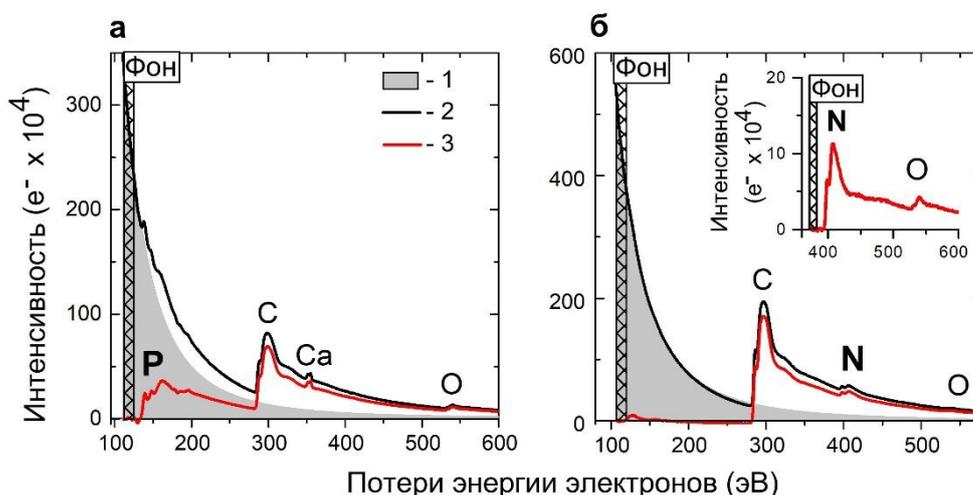


Рис. 25 Типичные спектры потерь энергии электронов, полученные от фосфорсодержащих (а) и азотсодержащих (б) включений недiazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118. В спектрах от фосфорсодержащих включений — пики фосфора ($L_2 = 136$ эВ, $L_3 = 135$ эВ) и кальция ($L_2 = 350$ эВ, $L_3 = 347$ эВ), в спектрах от азотсодержащих включений — пик азота ($K = 399$ эВ). 1 — фон, аппроксимированный степенной функцией, 2 — спектр до вычитания фона, 3 — спектр после вычитания фона. Заштрихованный прямоугольник в спектрах указывает диапазон, по которому рассчитывалась степенная функция для вычитания фона. Вставка в (б) - увеличенная часть того же спектра после вычитания фона, в котором диапазон для расчета степенной функции при вычитании фона выбран непосредственно перед пиком азота. Спектры представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11)

Кроме формирования ФоС-включений, ультраструктурные особенности клеток цианобактерии не изменились по сравнению с голодными по фосфору клетками: в клетках через 4 часа также выявлялись липидные β -гранулы (рис. 24 а, приложение 11). Таким образом, в первые часы после восстановления фосфорного питания у недiazотрофной цианобактерии еще не происходят резкие изменения ультраструктуры клеток (за исключением формирования ФоС-включений).

Представленные результаты в отношении формирования ФоС-включений согласуются с данными, полученными для цианобактерий *Plectonema boryanum* [Jensen, Sicko, 1974], *Synechococcus* sp. [Grillo, Gibson, 1979] и *Microcystis aeruginosa* [Jacobson, Halmann, 1982], не способных к образованию гетероцист, у которых также происходит образование полифосфатных

ФоС-включений при восстановлении фосфорного питания в первые часы после добавления фосфора (см. табл.1).

В работах [Jensen, Sicko, 1974; Baxter, Jensen, 1980a, b] культивирование *Plectonema boryanum* в бесфосфорной среде проводили в течение 5 дней, после чего добавляли к клеткам фосфор. При этом по истечении 5 дней голодания по фосфору в клетках методом ПЭМ продолжали выявляться ФоС-включения в большом количестве. Выявляемые включения имели размер 10-200 нм. Таким образом, в указанных работах клетки *Plectonema boryanum* не могли считаться голодными по фосфору, так как они еще не израсходовали внутриклеточный запас фосфора. Однако через 2 часа после добавления фосфора в клетках начинали выявляться сравнительно крупные ФоС-включения с размером от 200 нм до 1,5 мкм. Судя по всему, при восстановлении фосфорного питания даже не израсходовавшие все внутриклеточные запасы фосфора клетки подвержены избыточному образованию полифосфатов. В нашей работе у цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 размер образовавшихся ФоС-включений после восстановления фосфорного питания был намного меньше, чем у *Plectonema boryanum* [Jensen, Sicko, 1974], и не превышал 90 нм. Различия в размерах включений можно объяснить особенностями исследуемых штаммов цианобактерий.

В работе [Grillo, Gibson, 1979] штамм *Synechococcus* sp. культивировали в бесфосфорной среде в течение всего лишь 24 ч. Скорее всего, в указанной работе также не была получена голодная по фосфору культура. В нашей работе для получения голодной по фосфору культуры *Nostoc* sp. PCC 7118, у которой прекратились деления клеток, клетки культивировали в бесфосфорной среде целых 11 дней (см. раздел 4.1.4). Стоит отметить, что в работе [Grillo, Gibson, 1979] исследователи добавляли источник фосфора с радиоактивной меткой ^{32}P . При этом определяли, какая доля добавленного фосфора ^{32}P идет на синтез полифосфатов. Оказалось, что в клетках *Synechococcus* sp. после добавления фосфора уже через 1 час атомы ^{32}P выявляются в составе полифосфатов, а через 3–7 ч более 60% нового добавленного фосфора (с сигналом ^{32}P) находится в составе полифосфатов.

В исследовании восстановления фосфорного питания цианобактерии *Microcystis aeruginosa* также использовали радиоактивное мечение ^{32}P добавляемых фосфатов для подтверждения того, что выявляемые в клетках полифосфаты действительно образовались из добавленного нового фосфора [Jacobson, Halmann, 1982]. В указанной работе образование полифосфатов у *Microcystis aeruginosa* начинается уже через 20 мин после добавления фосфора. В следующие 6–10 ч (в зависимости от концентрации добавленного фосфата) содержание полифосфатов увеличивается и затем выходит на плато.

Итак, в нашей работе показали, что при переходе от фосфорного голодания к избытку в среде неорганического фосфора в первые часы после добавления в среду фосфора в недiazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 так же, как и в микроводорослях, происходит формирование ФоС-включений. При этом голодные по фосфору клетки цианобактерии характеризуются наличием липидных β -гранул и АС-включений. АС-включения метаболизируются к стационарной фазе роста после восстановления фосфорного питания.

5.4.2. Формирование фосфорсодержащих включений diaзотрофными цианобактериями при наличии и при отсутствии связанного азота в среде

Для определения изменений в составе включений *Nostoc* sp. PCC 7120 методом аналитической ПЭМ исследовали голодные по фосфору клетки (рис. 26 а,г) и через 7 дней после добавления фосфора к голодным клеткам (рис. 26 б,д) при наличии (рис. 26 а,б) и при отсутствии (рис. 26 г,д) источников связанного азота в среде.

При наличии азота в среде изменения в составе включений у цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 при возобновлении фосфорного питания были такими же, как у *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 23): АС-включения в цитозоле, заполняющие голодные по фосфору клетки, полностью сменились на ФоС-включения в цитозоле к 7 дню после добавления фосфора (рис. 26 а-в,е).

Голодные по фосфору клетки цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 при наличии азота в среде (рис. 26 а, приложение 12) имели схожие ультраструктурные особенности, что и голодные по фосфору клетки *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 23 а), среди которых наличие липидных β -гранул и АС-включений в цитозоле и немногочисленные электронноплотные тилакоиды, далеко отстоящие друг от друга. Размер выявляемых АС-включений составлял 0,2 до 1,4 мкм. На ПЭМ-изображениях клеток через 7 дней после добавления фосфора при наличии азота в среде четко не выявлялись никакие клеточные структуры, кроме ФоС-включений в цитозоле, размер которых составлял 0,01-0,08 мкм (рис. 23 б).

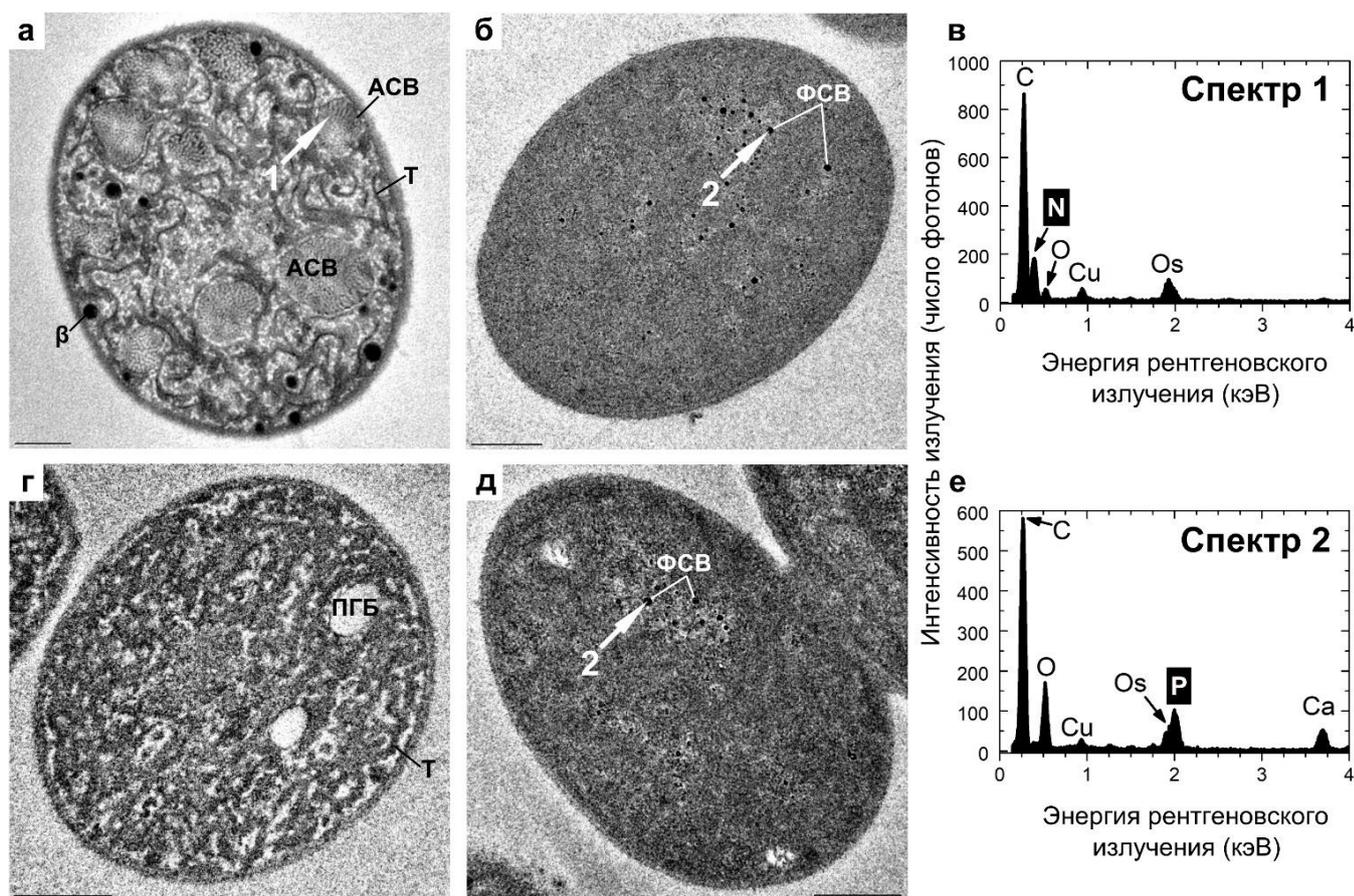


Рис. 26 Изменения в составе включений диазотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 при восстановлении фосфорного питания: (а,г) — голодная по фосфору культура при наличии (а) и при отсутствии (г) источников связанного азота в среде, (б,д) — 7 дней после добавления фосфора к голодным клеткам при наличии (б) и при отсутствии (д) источников связанного азота в среде. (а,б,г,д) ПЭМ-изображения клеток, типичных для соответствующих стадий эксперимента. (в,е) Типичные энергодисперсионные спектры выявляемых азотсодержащих (в) и фосфорсодержащих (е) включений. На рисунке представлены типичные энергодисперсионные спектры (спектры 1,2) соответствующих включений, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Точечные области азотсодержащих (спектр 1) и фосфорсодержащих (спектр 2) включений, с которых снимали спектры 1-2, отмечены стрелочками с соответствующей цифрой. ПЭМ-изображения и спектры представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение (цианофициновая гранула), β — липидная β -гранула высокой электронной плотности, ПГБ — гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, Т — тилакоиды, ФСВ — фосфорсодержащее включение. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

В отсутствие азота в среде в голодных по фосфору клетках *Nostoc* sp. PCC 7120 выявлялись ПГБ-содержащие гранулы и в некоторых областях среза очертания тилакоидов (рис. 26 г). Клеточные структуры в других участках среза не были различимы. Через 7 дней после

восстановления фосфорного питания из клеточных структур на ПЭМ-изображениях четко различимы были только ФоС-включения в цитозоле с размерами 0,01-0,07 мкм (рис. 26 д).

Невозможность различить клеточные структуры в цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 на представленных изображениях (рис. 26 б,г,д) при анализе методами аналитической ПЭМ связана с отсутствием контрастирования исследуемого образца уранилацетатом и цитратом свинца, поскольку в контрастированных этими соединениями образцах *Nostoc* sp. PCC 7120 (см. приложения 12 и 13) выявлялись те же клеточные структуры, что и в цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 23, приложение 11).

В отсутствие азота в среде как в голодных по фосфору клетках, так и в клетках через 7 дней после добавления фосфора АС-включения не выявлялись (рис. 26 г, приложение 13). При этом аккумуляция ФоС-включений в клетках через 7 дней после добавления фосфора происходила также, как и при наличии азота в среде (рис. 26 д,е, приложение 13). Вероятнее всего, при отсутствии связанного азота в среде процесс азотфиксации обеспечивает клетки азотом лишь для поддержания жизнедеятельности, а также для деления и роста после добавления фосфора, и не позволяет клеткам направлять азот на синтез запасующих АС-включений — цианофициновых гранул.

Таким образом, при наличии азота в среде реакция diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 на отсутствие фосфора и на последующее его добавление схожа с реакцией *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 23) и микроводорослей (рис. 15) — при голодании по фосфору в клетках выявляются АС-включения и не детектируются ФоС-включения, а при возобновлении фосфорного питания АС-включений расходуются, а избыток фосфора накапливается в виде ФоС-включений. При отсутствии азота в среде аккумуляция ФоС-включений в клетках при возобновлении фосфорного питания также происходит, однако, в клетках не формируются АС-включения.

Чтобы ответить на вопрос, как diaзотрофия влияет на формирование ФоС-включений далее анализировали клетки *Nostoc* sp. PCC 7120 через 4 часа после добавления фосфора в среду как при наличии, так и при отсутствии азота в среде. Элементное картирование показало, что при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде через 4 часа после добавления фосфора в клетках цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 происходит формирование ФоС-включений в цитозоле с размерами 0,01-0,07 мкм независимо от наличия азота в среде (рис. 27 а,в,д,е,з,к). При этом в клетках при наличии азота в среде также сохранялись АС-включения в цитозоле с размерами 0,2-1,4 мкм (рис. 27 а,б,г), тогда как при отсутствии азота в среде АС-включения не выявлялись (рис. 27 е,ж,и).

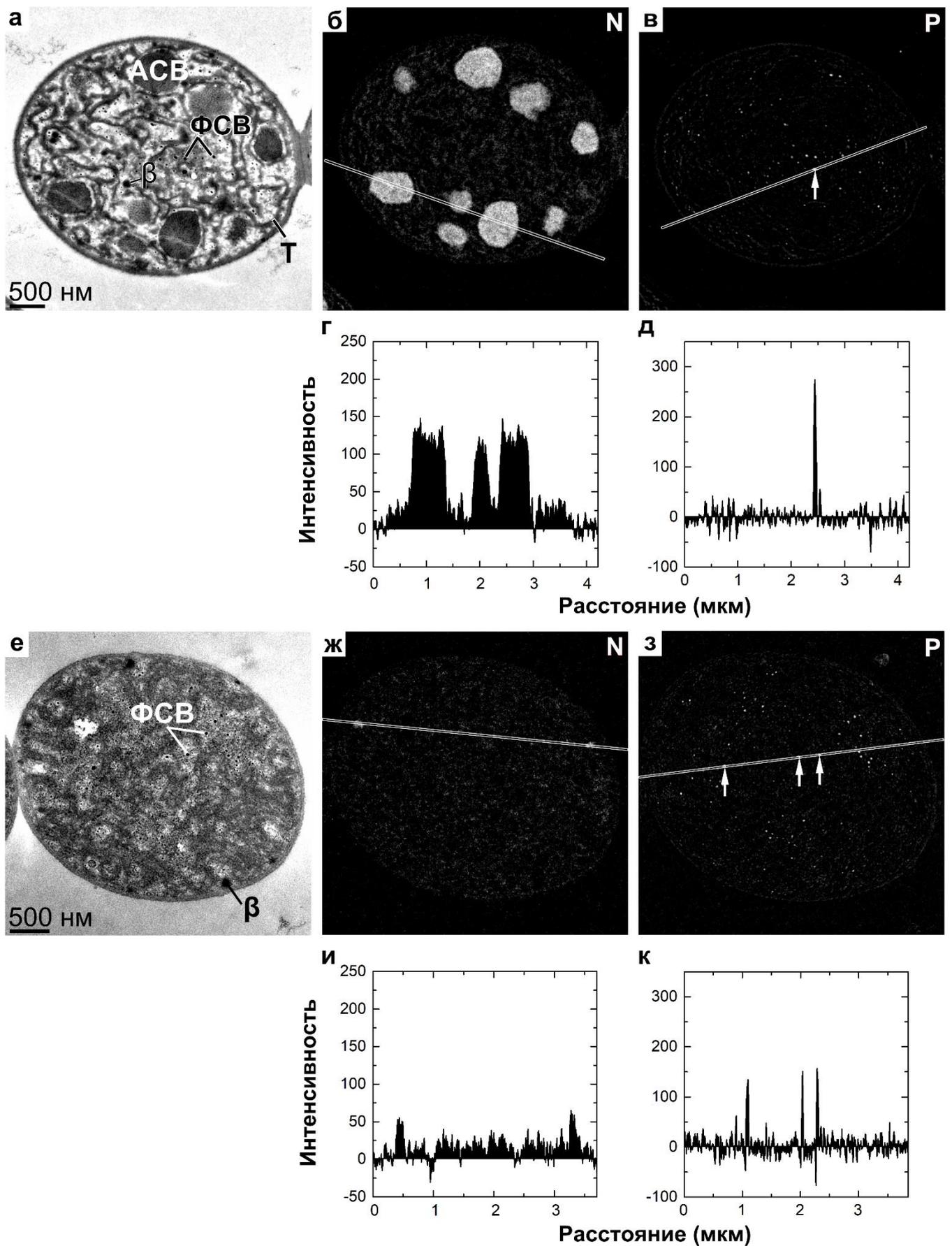


Рис. 27 Формирование фосфорсодержащих включений у diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 при наличии (а-д) и при отсутствии (е-к) азота в среде при переходе от

фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде через 4 ч после добавления фосфора в среду. (а,е) Энергофильтрованные в пике нулевых потерь ПЭМ-изображения типичных клеток с включениями азота и фосфора (а) и только включениями фосфора (е). (б,в,ж,з) Элементные карты азота (б,ж) и фосфора (в,з), полученные методом ЭФПЭМ. (г,д,и,к) Усредненные профили интенсивности сигнала с соответствующих карт азота (г,и) и фосфора (д,к), проходящие через выявленные включения азота (г) и фосфора (д,к). Усредненные профили интенсивности сигнала (г,д,и,к) получены вдоль белых линий, показанных на соответствующих картах. На картах фосфора (в,з) стрелочками показаны выявленные фосфорсодержащие включения. Результаты представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение (цианофициновая гранула), β — липидная β -гранула высокой электронной плотности, Т — тилакоиды, ФСВ — фосфорсодержащее включение

Спектры ХПЭЭ от ФоС-включений и АС-включений *Nostoc* sp. PCC 7120, используемые при выборе энергетических окон для элементного картирования, были аналогичны спектрам для *Nostoc* sp. PCC 7118 (приложение 14, рис. 25).

Кроме формирования ФоС-включений, ультраструктурные особенности клеток цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 не изменились по сравнению с голодными по фосфору клетками при наличии и при отсутствии азота в среде (рис. 27 а,е). Таким образом, в первые часы после восстановления фосфорного питания у diaзотрофной цианобактерии еще не происходят резкие изменения ультраструктуры клеток (за исключением формирования ФоС-включений).

На настоящий момент в доступной нам литературе оказалось только одно исследование избыточного накопления полифосфатов у diaзотрофных гетероцист-образующих цианобактерий при восстановлении фосфорного питания [Livingstone, Whitton, 1983].

В данной работе показано, что в diaзотрофной цианобактерии *Calothrix parietina* происходит образование полифосфатных ФоС-включений уже через 15 мин после добавления фосфора к голодным клеткам [Livingstone, Whitton, 1983] (см. табл.1). В данной работе действительно были получены голодные по фосфору клетки, поскольку на момент добавления фосфора деления их клеток уже прекратились. Стоит отметить, что оценка образования ФоС-включений *Calothrix parietina* проводилась с использованием световой микроскопии, сопряженной с контрастированием полифосфатов основными красителями. Таким образом, в цианобактерии *Calothrix parietina* уже через 15 мин после добавления фосфора образуются достаточно крупные полифосфатные ФоС-включения, различимые в световой микроскоп (более 200 нм диаметром). В нашей работе у diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 размер образовавшихся через 4 ч ФоС-включений не превышал 90 нм. В работе [Livingstone, Whitton, 1983] все этапы эксперимента по восстановлению фосфорного питания *Calothrix parietina*

проводили при отсутствии источников азота в среде, то есть в условиях, при которых *Calothrix parietina* образует гетероцисты и осуществляет фиксацию атмосферного азота. Данные по избыточному образованию полифосфатов в diaзотрофной *Calothrix parietina* при отсутствии источников азота в среде согласуются с результатами, полученными в нашей работе для diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120: при осуществлении diaзотрофии в первые часы после добавления фосфора к голодным клеткам происходит формирование ФоС-включений. Однако ни в работе [Livingstone, Whitton, 1983], ни в других исследованиях не оценивали избыточное образование полифосфатных ФоС-включений diaзотрофными бактериями при наличии азота в среде.

Итак, полученные в представленной работе результаты позволяют сделать вывод о том, что при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде в первые часы после добавления фосфора клетки diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 формируют ФоС-включения так же, как и клетки родственной ей недiaзотрофной бактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 и клетки микроводорослей. При этом при наличии связанного азота в среде в голодных по фосфору клетках *Nostoc* sp. PCC 7120 выявляются АС-включения, тогда как при отсутствии связанного азота в среде такие включения не выявляются. В представленной работе впервые показано, что наличие связанного азота в среде не влияет на способность diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 формировать ФоС-включения в первые часы после добавления фосфора. Таким образом, голодающие по фосфору культуры как diaзотрофных, так и недiaзотрофных цианобактерий являются перспективными для разработки биотехнологических систем, обеспечивающих быстрое изъятие фосфора из сточных вод. Кроме того, применение методов аналитической ПЭМ позволило получить важную информацию о представленности включений азота и фосфора у цианобактерий, дополняющую общую картину ультраструктурной реорганизации клетки при акклимации к дефициту и избытку фосфора в среде.

5.5. Расходование и формирование азотсодержащих включений микроводорослей при азотном голодании и при переходе от азотного голодания к избытку неорганического азота в среде

5.5.1. Формирование азотсодержащих включений — общее свойство представителей различных групп микроводорослей

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

(1) Shebanova, A. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy / A. Shebanova, T. Ismagulova, A. Solovchenko, O. Baulina, E. Lobakova, A. Ivanova, A. Moiseenko, K. Shaitan, V. Polshakov, L. Nedbal, O. Gorelova // *Protoplasma*. – 2017. – V. 254. – P. 1323–1340;

(2) Kokabi, K. Metabolomic foundation for differential responses of lipid metabolism to nitrogen and phosphorus deprivation in an arachidonic acid-producing green microalga / K. Kokabi, O. Gorelova, T. Ismagulova, M. Itkin, S. Malitsky, S. Boussiba, A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg // *Plant Science*. – 2019. – V. 283. – P. 95–115;

(3) Ismagulova, T. A new subarctic strain of *Tetradesmus obliquus*—part I: identification and fatty acid profiling / T. Ismagulova, K. Chekanov, O. Gorelova, O. Baulina, L. Semenova, I. Selyakh, O. Chivkunova, E. Lobakova, O. Karpova, A. Solovchenko // *Journal of Applied Phycology*. – 2017. – <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1313-1>.

В настоящее время в научной литературе присутствует не так много упоминаний о выявлении АС-включений в микроводорослях, для которых подтвержден их элементный состав (см. раздел 3.4.3). В ходе проведения нашей работы мы обнаружили, что аккумуляция АС-включений в вакуолях присуща представителям различных групп микроводорослей при определенных условиях культивирования (рис. 28, рис. 15 а,г).

Помимо свободноживущей динофитовой микроводоросли (рис. 28 д,е) способностью к формированию АС-включений также обладали зеленые свободноживущие микроводоросли *L. incisa* 2468 из семейства Trebouxiaceae (клетки через 24 ч после возобновления азотного питания) (рис. 28 г, приложение 15) и *C. vulgaris* IPPAS C-1 из семейства Chlorellaceae (голодные по фосфору клетки) (рис. 15 а,г).

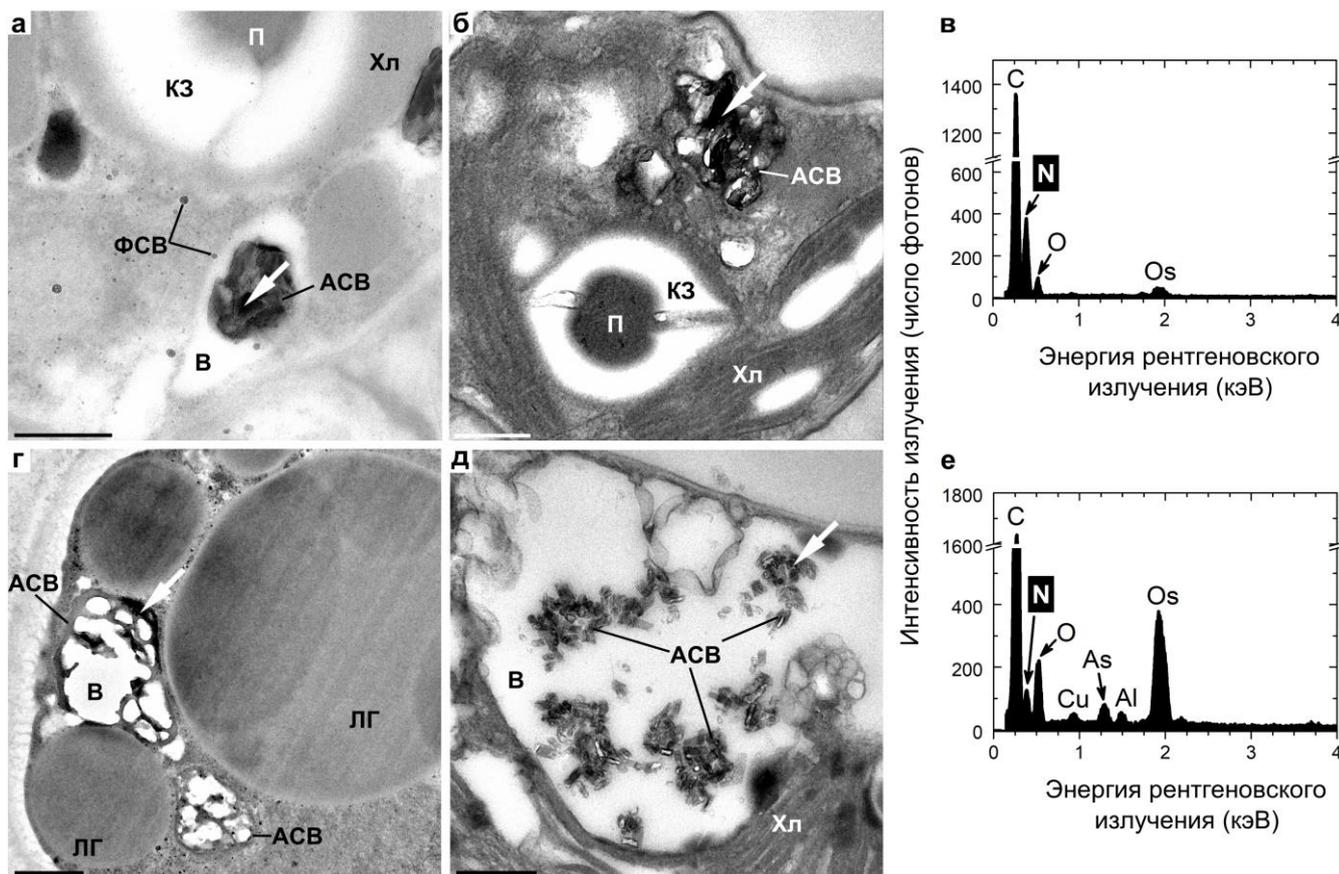


Рис. 28 Формирование азотсодержащих включений представителями различных групп микроводорослей: (а) — зеленая свободноживущая микроводоросль *Tetradismus obliquus* IPPAS S-2023 из семейства Scenedesmaceae, культура на экспоненциальной фазе роста; (б,в) — зеленая симбиотическая микроводоросль *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 из семейства Scenedesmaceae, 9 день культивирования на среде с азотом; (г) — зеленая свободноживущая микроводоросль *Lobosphaera incisa* SAG 2468 из семейства Trebouxiaceae, 24 ч после возобновления азотного питания; (д,е) — динофитовая свободноживущая микроводоросль *Amphidinium carterae* NCMA CCMR1314 из семейства Gymnodiniaceae, 26 ч после возобновления азотного питания. (а,б,г,д) ПЭМ-изображения клеток микроводорослей: а,б,д — толстые срезы без контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца; г - ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). (в,е) Типичные энергодисперсионные спектры выявляемых азотсодержащих включений *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (в) и *Amphidinium carterae* NCMA CCMR1314 (е). На рисунке представлены энергодисперсионные спектры, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Спектры азотсодержащих включений *Tetradismus obliquus* IPPAS S-2023 и *Lobosphaera incisa* SAG 2468 были аналогичны (см. приложение 15). Точечные области азотсодержащих включений, с которых снимали спектры, отмечены белыми стрелочками. АСВ — азотсодержащее включение, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, ЛГ — липидная глобула, П — пиреноид, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Хл — хлоропласт. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

Кроме того, близкородственные представители зеленых микроводорослей из семейства Scenedesmaceae, а именно свободноживущая микроводоросль *T. obliquus* S-2023 (рис. 28 а, приложение 15) и симбиотическая микроводоросль *Desmodesmus* sp. S-2014 (рис. 28 б,в), также обладали способностью аккумулировать в вакуолях АС-включения при наличии азота в среде. Штаммы микроводорослей *T. obliquus* S-2023 и *Desmodesmus* sp. S-2014 относятся к одной географической группе (беломорские штаммы, см. разделы 4.1.3 и 4.1.6), но к контрастным экологическим группам: *T. obliquus* S-2023 является свободноживущей, а *Desmodesmus* sp. S-2014 — симбиотической микроводорослью.

Таким образом, полученные в представленной работе результаты позволяют дополнить уже известный из литературных данных список микроводорослей, для которых подтверждено аккумулирование АС-включений в клетках (см. табл.6).

В совокупности, опубликованные другими исследователями и полученные в нашей работе (табл. 6) данные позволяют заключить, что формирование АС-включений в вакуолях является общим свойством различных — как экологически (свободноживущих и симбиотических), так и таксономически (разных семейств динофитовых и зеленых микроводорослей) — групп микроводорослей.

5.5.2. Химическая природа азотсодержащих включений микроводорослей *Desmodesmus* sp. и *Amphidinium carterae*

На настоящий момент известно, что АС-включения микроводорослей содержат химические соединения, относящиеся к пуринам, а именно мочевую кислоту либо гуанин (см. раздел 3.4.3). Использование аналитической ПЭМ позволяет подтвердить наличие азота в АС-включениях микроводорослей и получить информацию о субклеточном распределении этих включений, однако, указанный метод не предоставляет информацию о точном химическом составе этих включений. С помощью метода лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР можно определить химическую природу АС-включений микроводорослей [Moudříková et al., 2017a]. Этот метод использовали для определения химического состава АС-включений микроводорослей *Desmodesmus* sp. S-2014 и *A. carterae* CCMP1314, исследуемых в нашей работе.

Табл. 6 Штаммы микроводорослей, в которых выявлены АС-включения с подтверждением их элементного состава

Штамм	Семейство	Симбионт/свободноживущий	Ссылка на работу
Динофитовые микроводоросли			
<i>Symbiodinium</i> sp.	<i>Symbiodiniaceae</i>	Симбионт кораллового полипа <i>Aiptasia</i> sp.	[Clode et al., 2009]
<i>Symbiodinium</i> sp.		Симбионт кораллового полипа <i>Pocillopora damicornis</i>	[Kopp et al., 2013]
<i>Gonyaulax polyedra</i>	<i>Gonyaulacaceae</i>	Свободноживущий	[DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972]
<i>Amphidinium carterae</i> NCMA CCMР1314	<i>Gymnodiniaceae</i>	Свободноживущий	Эта работа
Зеленые микроводоросли			
<i>Tetraselmis suecica</i> CCALA	<i>Chlorodendraceae</i>	Свободноживущий	[Nassiri et al., 1997]
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	<i>Chlorellaceae</i>	Свободноживущий	Эта работа
<i>Lobosphaera incisa</i> SAG 2468	<i>Trebouxiaceae</i>	Свободноживущий	Эта работа
<i>Desmodesmus quadricauda</i> CCALA	<i>Scenedesmaceae</i>	Свободноживущий	[Moudřiková et al., 2017a]
<i>Tetradesmus obliquus</i> IPPAS S-2023		Свободноживущий	Эта работа
<i>Desmodesmus</i> sp. IPPAS S-2014		Симбионт гидроидного полипа <i>Dynamena pumila</i>	[Шебанова, 2017, С. 106-111], эта работа
Охрофитовые микроводоросли			
<i>Trachydiscus minutus</i>	<i>Pleurochloridaceae</i>	Свободноживущий	[Moudřiková et al., 2017a]

Проведенный анализ показал, что АС-включения исследуемых микроводорослей состоят из гуанина (рис. 29). На картах внутрисклеточного распределения гуанина для исследуемых микроводорослей отчетливо видны яркие включения (рис. 29 в,е), спектры КР (рис. 29 ж, приложение 16) от которых соответствуют спектру КР гуанина в микроводорослях [Moudříková et al., 2017a]. АС-включения на картах распределения гуанина (рис. 29 в,е) совпадают с более темными областями на картах распределения биомолекул с большим количеством СН-связей (липиды, белки, углеводы) (рис. 29 б,д), поскольку гуанин имеет незначительное количество СН-связей в его структуре (см. рис. 9) и поэтому вносит незначительный вклад в появление полосы 2934 см^{-1} в спектре КР (рис. 29 ж, приложение 16). К характеристическим полосам КР в спектре гуанина относятся полосы 649 , 938 , 1235 и 1264 см^{-1} (рис. 29 ж, приложение 16, приложение 17). Для получения карт распределения гуанина (рис. 29 в,е) использовали полосу 649 см^{-1} , поскольку указанная полоса обладает высокой интенсивностью и не перекрывается с сигналами от других биомолекул в клетках микроводорослей [Moudříková et al., 2017a].

Таким образом, методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР показали, что АС-включения симбиотической зеленой микроводоросли *Desmodesmus* sp. S-2014 и свободноживущей динофитовой микроводоросли *A. carterae* ССМР1314 являются пуринами, а именно включениями гуанина.

По данным из литературы на настоящий момент все симбиотические микроводоросли, у которых идентифицирован химический состав АС-включений, содержат АС-включения мочевой кислоты [Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013]. Примечательно, что все симбиотические микроводоросли, у которых идентифицирован химический состав АС-включений, относятся к динофитовым микроводорослям [Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013]. В связи с вышеизложенным, исследуемая в нашей работе микроводоросль *Desmodesmus* sp. S-2014 является первой известной симбиотической микроводорослью, аккумулирующей азот в виде гуанина, а не мочевой кислоты. При этом данные, полученные в нашей работе для указанной симбиотической микроводоросли, согласуются с результатами для родственной ей свободноживущей зеленой микроводоросли *Desmodesmus quadricauda*, для которой также было показано наличие гуанина в АС-включениях [Moudříková et al., 2017a].

Накопление АС-включений в форме гуанина было показано для динофитовой свободноживущей микроводоросли *Gonyaulax polyedra* [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972]. Таким образом, результаты, полученные в нашей работе для *A. carterae* ССМР1314, согласуются с данными для микроводоросли *Gonyaulax polyedra* [DeSa, Hastings, 1968; Fogel et al., 1972], которая также принадлежит к группе свободноживущих динофитовых микроводорослей.

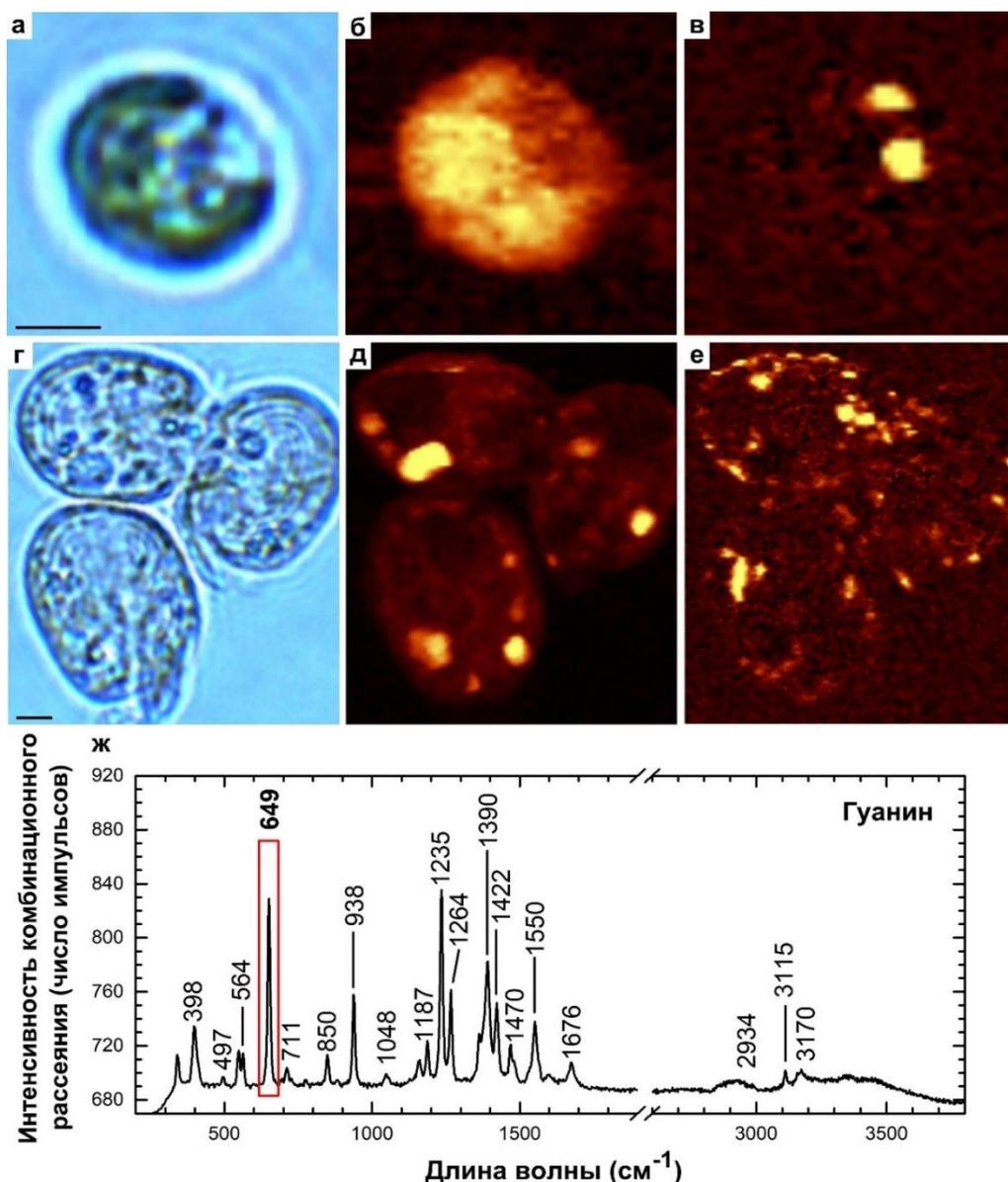


Рис. 29 Химическая природа азотсодержащих включений *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (а,в,ж) и *Amphidinium carterae* NCMA CCMP1314 (г,е), представляющих гранулы гуанина, выявленные методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР. (а,г) Светлопольные изображения клеток *Desmodesmus* sp. S-2014 (а) и *A. carterae* CCMP1314 (г). (б,д) Внутриклеточное распределение всех биомолекул, имеющих значительное количество СН-связей в их структуре и вносящих вклад в появление полосы 2934 см^{-1} в спектре комбинационного рассеяния (липиды, белки, углеводы), в *Desmodesmus* sp. S-2014 (б) и *A. carterae* CCMP1314 (д). (в,е) Внутриклеточное распределение гуанина в *Desmodesmus* sp. S-2014 (в) и *A. carterae* CCMP1314 (е). (ж) Типичный спектр комбинационного рассеяния (КР) от внутриклеточных включений *Desmodesmus* sp. S-2014, соответствующий спектру КР гуанина в микроводорослях. Спектр от включений *A. carterae* CCMP1314 был аналогичен (см. приложение 16). Полоса 649 см^{-1} (диапазон с шириной 60 см^{-1} , центрированный на полосу 649 см^{-1}) в спектре (ж) была использована для картирования по гуанину (в,е). Карты распределения (б,в,д,е) представлены в псевдоцветах. Результаты представлены для *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 на стационарной фазе роста и для *Amphidinium carterae* NCMA CCMP1314 через 3 дня после возобновления азотного питания. Масштабные отрезки: 2 мкм

5.5.3. Расходование азотсодержащих включений при азотном голодании

При работе над данным разделом диссертации использованы следующая публикация автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shebanova, A. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy / A. Shebanova, T. Ismagulova, A. Solovchenko, O. Baulina, E. Lobakova, A. Ivanova, A. Moiseenko, K. Shaitan, V. Polshakov, L. Nedbal, O. Gorelova // *Protoplasma*. – 2017. – V. 254. – P. 1323–1340.

Исследование расходования азотсодержащих включений при азотном голодании проводили на модельной зеленой микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014. Для определения изменений в составе клеточных включений *Desmodesmus* sp. S-2014 при азотном голодании методом аналитической ПЭМ исследовали клетки через 2 дня (рис. 30 а-в) и через 9 дней (рис. 30 г,д) после начала культивирования в безазотной среде.

При азотном голодании на 2 сутки культивирования в большей части клеток выявлялись ФоС-включения (рис. 30 а,е), которые локализовались в цитозоле или в вакуолях и имели размер 0,02-0,2 мкм, и только единичные клетки содержали остатки АС-включений в вакуолях с размером 0,1-2 мкм (рис. 30 б,в). Вакуоли подавляющего большинства клеток на этой стадии АС-включений уже не содержали (рис. 30 а). На 9 сутки при азотном голодании АС-включения полностью исчезали из клеток, при этом в клетках оставались только ФоС-включения в вакуолях и цитозоле с размерами 0,01-0,25 (рис. 30 г-е).

Отличительной особенностью ультраструктуры голодных по азоту клеток было наличие липидных глобул (рис. 30 г), в то время как клетки этой микроводоросли в оптимальных условиях культивирования не содержали липидных глобул (рис. 13 б). По-видимому, в микроводорослях как при фосфорном, так и при азотном голодании происходит образование липидных глобул (см. раздел 5.2.1). Полученные результаты согласуются с данными из литературы, согласно которым биосинтез углерод-содержащих запасных соединений, в том числе, нейтральных липидов, – это характерный ответ микроводорослей на голодание по азоту [Přibyl et al., 2014].

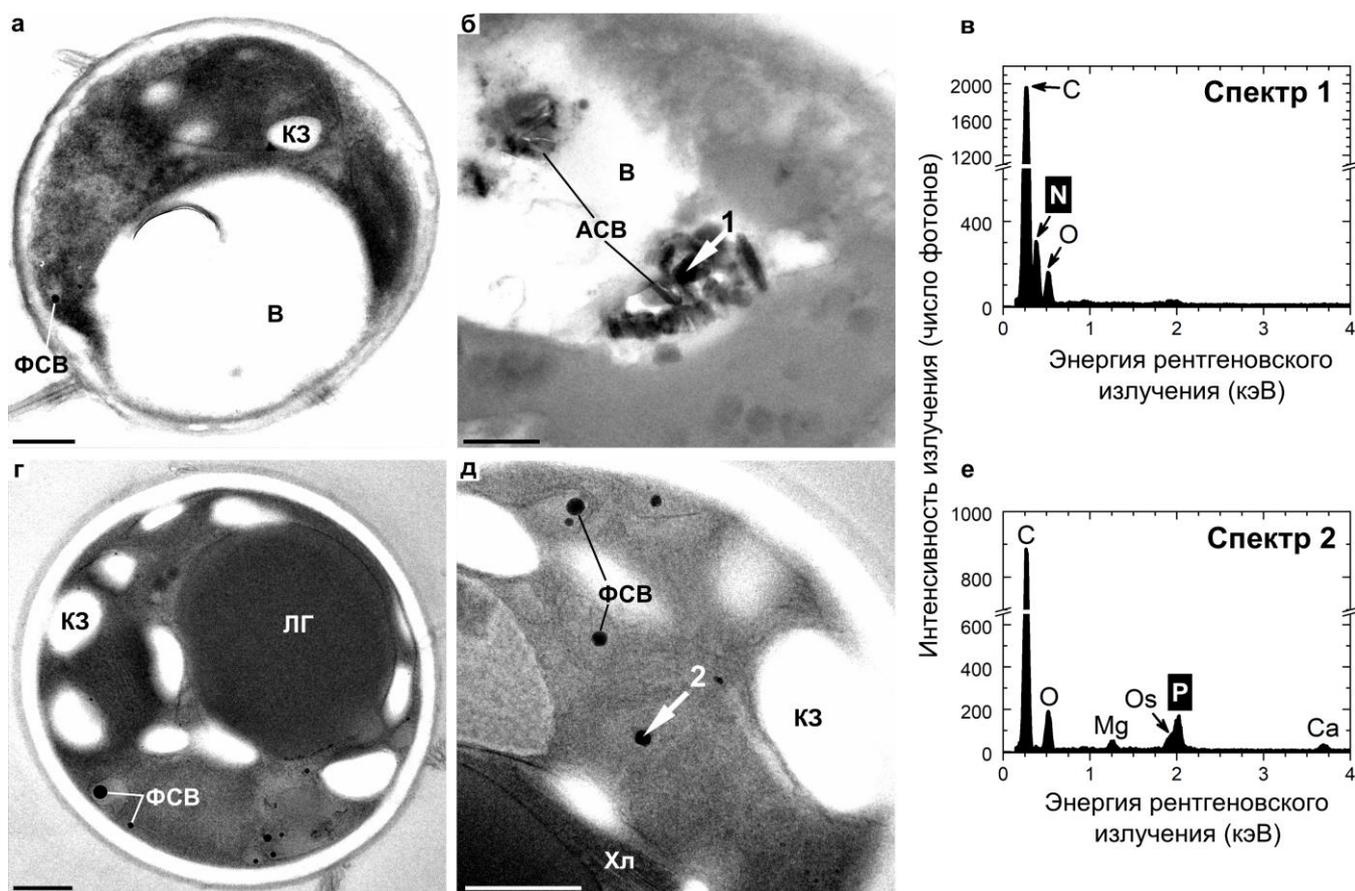


Рис. 30 Изменения в составе внутриклеточных включений при азотном голодании у *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 через 2 дня (а-в) и через 9 дней (г-е) после начала культивирования в безазотной среде. (а) ПЭМ-изображение клетки, типичной для культуры через 2 дня голодания по азоту, не содержащей азотсодержащие включения, но содержащей фосфорсодержащие включения. (б) ПЭМ-изображение нетипичной клетки в культуре через 2 дня голодания по азоту, содержащей азотсодержащие включения. (г,д) ПЭМ-изображения клеток, типичных для культуры через 9 дней голодания по азоту и содержащих только фосфорсодержащие включения. (в,е) Типичные энергодисперсионные спектры выявляемых азот- (в) и фосфорсодержащих (е) включений. На рисунке представлены энергодисперсионные спектры (спектры 1,2) соответствующих включений, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Точечные области азотсодержащих (спектр 1) и фосфорсодержащих (спектр 2) включений, с которых снимали спектры 1-2, отмечены стрелочками с соответствующей цифрой. Результаты представлены для толстых срезов образцов, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, ЛГ — липидная глобула, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Хл — хлоропласт. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

Полученные данные в отношении ФоС-включений в клетках *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 при азотном голодании согласуются с результатами для диатомовой микроводоросли *Thalassiosira pseudonana*, для которой было продемонстрировано интенсивное накопление

внутриклеточных полифосфатов при недостатке азота в среде [Perry, 1976]. Для некоторых цианобактерий также было показано, что голодание по азоту индуцирует образование полифосфатов в их клетках [Stewart et al., 1978; Grillo, Gibson, 1979]. Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что в условиях, когда фосфат в среде находится в избытке по сравнению с азотом, в микроводорослях и некоторых цианобактериях происходит формирование полифосфатных ФоС-включений для будущего использования. Не исключено, что верно и обратное: в условиях, когда источники азота в среде находятся в избытке по сравнению с фосфором, в микроводорослях и цианобактериях происходит формирование АС-включений для будущего использования. Это подтверждается нашими результатами для голодных по фосфору клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 (см. рис. 15), цианобактерий *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 20) и *Nostoc* sp. PCC 7120 (рис. 26 а,в), а также данными из литературы для микроводоросли *Symbiodinium* sp., для которой было показано, что при одновременном избытке азота и недостатке фосфора в среде происходит заметное увеличение содержания АС-включений мочево́й кислоты в клетках [Rosset et al., 2017]. В доступной нам литературе отсутствовали данные о расходовании АС-включений микроводорослей при голодании по азоту. Таким образом, в нашей работе впервые показано, что АС-включения действительно являются клеточными резервами азота у микроводорослей, которые при недостатке азота во внешней среде достаточно быстро (в большинстве клеток ко 2 дню голодания) расходуются, вероятнее всего, на поддержание клеточного метаболизма. Кроме того, применение метода аналитической ПЭМ позволило получить важную информацию о представленности включений азота и фосфора у микроводорослей, дополняющую общую картину ультраструктурной реорганизации клетки при акклимации к дефициту азота в среде.

5.5.4. Формирование азотсодержащих включений при переходе от азотного голодания к избытку неорганического связанного азота в среде

Формирование АС-включений при переходе от азотного голодания к избытку неорганического азота в среде исследовали на модельной динофитовой микроводоросли *A. carterae* ССМР1314 методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР. Микроводоросль *A. carterae* ССМР1314 была выбрана для этого исследования, поскольку она обладает способностью формировать внутриклеточные АС-включения гуанина в большом количестве (рис. 29 г,е), а ее клетки сравнительно крупного размера (более 10 мкм). Ультраструктурные особенности динофитовой микроводоросли *A. carterae* ССМР1314, включающие аккумуляцию АС-включений в вакуолях, представлены на ПЭМ-изображениях ультратонких срезов в приложении 18.

Метод лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР был выбран для проведения этого исследования, поскольку его возможности позволяют исследовать АС-включения в интактных клетках микроводорослей *in situ* без проведения фиксации, контрастирования или мечения клеток [Moudříková et al., 2017a], то есть непосредственно во время эксперимента. Кроме того, указанный метод позволяет различить соединения, содержащие изотопы ^{15}N и ^{14}N . В культивируемых в безазотной среде клетках микроводорослей атомы азота находятся в форме изотопа ^{14}N . Для того, чтобы определить источник атомов азота (внешний или внутренний) в составе образующихся в клетках АС-включений при переходе от азотного голодания к избытку неорганического азота в среде, к голодным по азоту клеткам, содержащим только ^{14}N , добавляли источник азота нитрат натрия (NaNO_3), содержащий изотоп ^{15}N (см. раздел 4.1.7).

Анализ методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР показал, что в голодных по азоту клетках АС-включений гуанина нет (рис. 31 а-в, рис. 32 а), при этом уже через 4 ч после добавления азота к голодным клеткам в микроводорослях начинают появляться гранулы гуанина (рис. 31 г-е), которые продолжают аккумулироваться и через 24 ч (рис. 31 ж-и). На ПЭМ-изображениях микроводоросли видно, что АС-включения локализуются в вакуолях (приложение 18). В спектре КР (рис. 32 а) от наиболее ярких точек на карте гуанина (рис. 31 в) с голодной по азоту клетки характеристические полосы гуанина не выявляются. Согласно спектрам КР, полученным для клеток после добавления азота, в клетках при переходе от азотного голодания к избытку неорганического азота в среде формируются гранулы гуанина, в которых атомы азота находятся в форме либо изотопа ^{15}N (рис. 32 в), либо изотопа ^{14}N (рис. 32 б), либо одновременно и в форме ^{15}N , и ^{14}N (рис. 32 г).

Спектры от гранул ^{15}N -гуанина и гранул ^{14}N -гуанина различаются характеристическими полосами: в спектре от ^{14}N -гуанина выявляются полосы 649, 938, 1235 и 1264 cm^{-1} (рис. 32 б, приложение 17), в спектре от ^{15}N -гуанина — полосы 640, 917, 1218 и 1247 cm^{-1} (рис. 32 б, приложение 17). В спектрах от смешанных включений гуанина, содержащих атомы азота как в форме ^{15}N , так и ^{14}N , выявляются одновременно оба этих набора характеристических полос (рис. 32 г). Поскольку при картировании по гуанину использовали диапазон с шириной 60 cm^{-1} , центрированный на полосу 649 cm^{-1} (характеристическая полоса ^{14}N -гуанина), то в данный диапазон также попала полоса 640 cm^{-1} — характеристическая полоса ^{15}N -гуанина. Таким образом, полученные карты распределения гуанина (рис. 31 е,и) отражают распределение как гранул ^{15}N -гуанина, гранул ^{14}N -гуанина, так и смешанных гранул. Гранулы гуанина на картах (рис. 31 е,и) совпадают с более темными областями на картах распределения биомолекул с большим количеством СН-связей (липиды, белки, углеводы) (рис. 31 б,д,з), поскольку гуанин вносит незначительный вклад в появление полосы 2934 cm^{-1} в спектре КР (рис. 32 б-г).

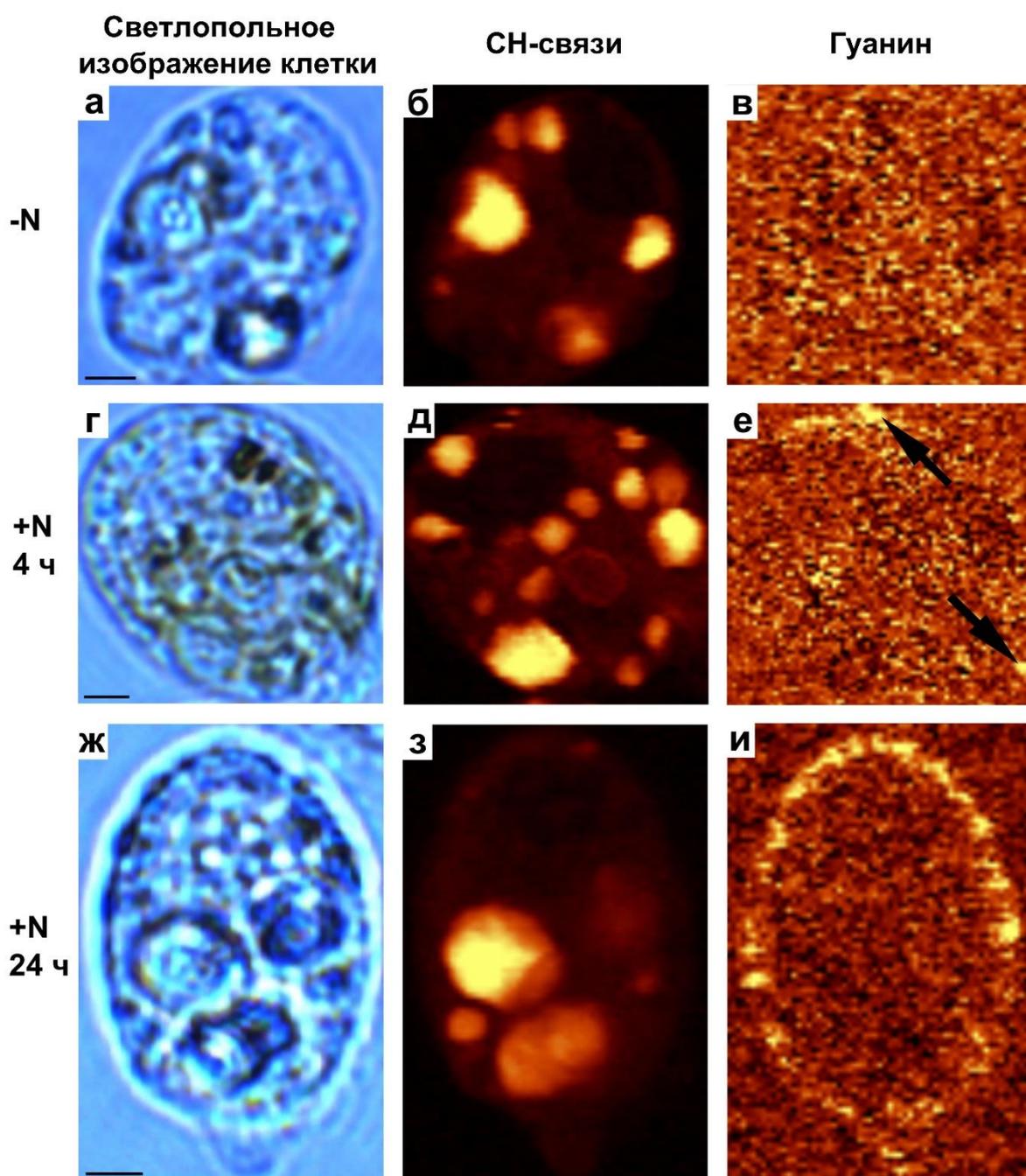


Рис. 31 Формирование азотсодержащих включений, представляющих гранулы гуанина, в клетках *Amphidinium carterae* NCMA CCMР1314 при переходе от азотного голодания к избытку азота в среде: (а-в) — голодная по азоту культура (-N), (г-е) — 4 ч после добавления азота (+N), (ж-и) — 24 ч после добавления азота (+N). (а,г,ж) Светлопольные изображения клеток с соответствующих стадий эксперимента. (б,д,з) Внутриклеточное распределение всех биомолекул, имеющих значительное количество CН-связей в их структуре и вносящих вклад в появление полосы 2934 см^{-1} в спектре комбинационного рассеяния (липиды, белки, углеводы). (в,е,и) Внутриклеточное распределение гуанина в соответствующих клетках. Стрелочками на карте распределения гуанина (е) отмечены гранулы гуанина, появляющиеся в клетках через 4 ч после добавления азота. Карты CН-связей и гуанина получены методом лазерной сканирующей

микро-спектроскопии КР. Картирование по гуанину проводили с использованием диапазона с шириной 60 см^{-1} , центрированного на полосе 649 см^{-1} . Карты распределения (б,в,д,е,з,и) представлены в псевдоцветах. Масштабные отрезки: 2 мкм

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что образование гранул гуанина в клетках при переходе от азотного голодания к избытку азота происходит как из азота, добавленного в среду и поступившего в клетки извне (синтез *de novo*), так и из эндогенного азота, мобилизованного из клеточных структур при акклимации к азотному голоданию. При этом синтез АС-включений *de novo* происходит достаточно быстро — гранулы гуанина с азотом ^{15}N детектируются уже через 4 ч после добавления азота к голодным клеткам.

Полученные в нашей работе данные в отношении скорости синтеза АС-включений *de novo* в микроводорослях согласуются с результатами для динофитовых микроводорослей в составе симбиозов с коралловыми полипами, для которых было показано быстрое (через 45 мин) включение добавленного в среду азота ^{15}N в состав кристаллов мочевой кислоты при кратковременном увеличении содержания азота в среде [Kopp et al., 2013]. То есть включения мочевой кислоты в указанных микроводорослях начинали синтезироваться *de novo* уже через 45 мин после кратковременного увеличения содержания азота в среде [Kopp et al., 2013]. В указанной работе для детекции азота ^{15}N в составе АС-включений мочевой кислоты использовали метод нано-МСВИ, обладающий нанометровым разрешением. В нашей работе мы использовали метод лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР, разрешение которого не превышает 180 нм [Heintzmann, Ficz, 2006]. Возможно, различием в разрешающей способности используемых методов можно объяснить разницу во времени начала детекции АС-включений, содержащих азот ^{15}N , в нашей работе (4 ч) и в работе [Kopp et al., 2013] (45 мин).

В доступной на момент написания диссертации литературе не было сведений об исследованиях формирования АС-включений микроводорослей при переходе от голодания по азоту к избытку азота в среде. Таким образом, в нашей работе методом лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР на примере микроводоросли *A. carterae* ССМР1314 впервые показано, что при переходе от азотного голодания к избытку в среде азота уже через 4 часа после добавления азота происходит формирование АС-включений, представляющих гранулы гуанина. При этом в состав включений гуанина, образующихся после добавления азота в среду, входят как атомы азота ^{15}N , добавленных в среду, так и атомы азота ^{14}N , присутствующие в клетках до добавления азота.

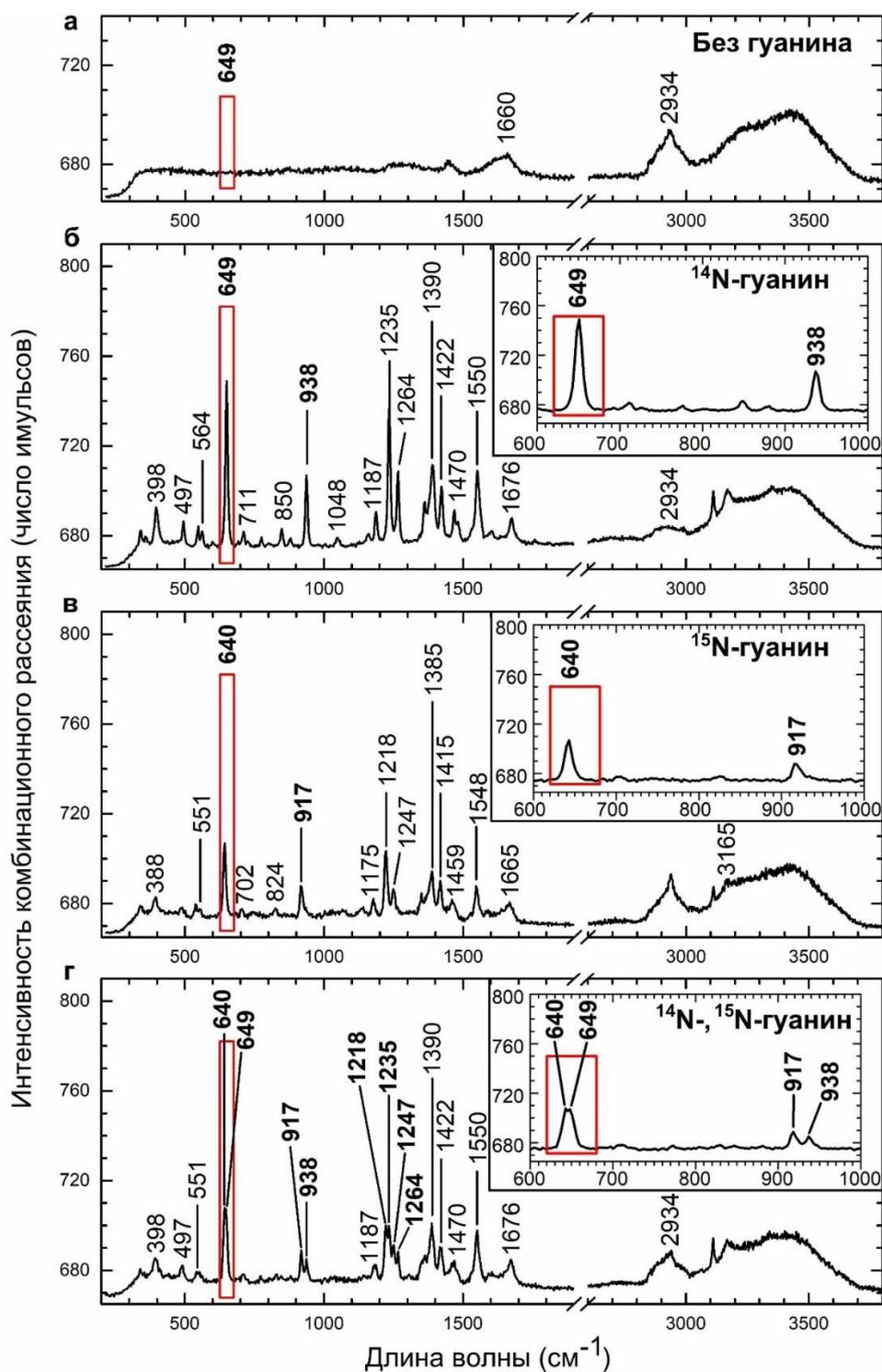


Рис. 32 Выявление азотсодержащих включений ^{14}N -гуанина (б), ^{15}N -гуанина (в) и смешанных включений ^{14}N - и ^{15}N -гуанина (г) в клетках *Amphidinium carterae* NCMA ССМР1314 при переходе от азотного голодания (а) к избытку азота в среде: (а) типичный спектр комбинационного рассеяния (КР) от наиболее ярких точек на карте гуанина с голодной по азоту клетки (рис. 31 в), в котором полосы гуанина не выявляются; (б,в,г) типичные спектры КР гуанина от включений ^{14}N -гуанина (б), ^{15}N -гуанина (в) и смешанных включений ^{14}N - и ^{15}N -гуанина (г). Полоса 649 см^{-1} (выделена красной рамкой) была использована для картирования по гуанину клеток *Amphidinium carterae* NCMA ССМР1314 на рис. 31 в,е,и. Вставки в (б,в,г):

увеличенные части тех же спектров, содержащие характеристические полосы ^{14}N -гуанина (649 и 938 см^{-1}) и ^{15}N -гуанина (640 и 917 см^{-1})

Полученные результаты позволяют заключить, что микроводоросли способны к избыточному поглощению не только фосфора [Jensen, Sicko, 1974; Powell et al., 2008; 2009; Dyhrman, 2016, P. 158], но и азота из среды. Другими словами, микроводоросли способны поглощать больше азота, чем необходимо для поддержания метаболизма, активного роста и деления их клеток. При этом избыточно поглощенный азот запасается в клетках в виде АС-включений для использования клетками в будущем при необходимости, например, при недостатке азота в среде (рис. 30). Полученные результаты в совокупности доказывают, что АС-включения микроводорослей являются внутриклеточными резервами азота. При этом по аналогии с феноменом «избыточного образования полифосфатов» [Jensen, Sicko, 1974; Allen, 1984; Dyhrman, 2016, P. 158] для микроводорослей также характерно «избыточное образование АС-включений» в первые часы после восстановления азотного питания, то есть при добавлении азота к клеткам, культивируемых в безазотной среде (рис. 31). Представленные результаты свидетельствуют, что голодные по азоту культуры микроводорослей являются перспективными компонентами биотехнологических систем для быстрого изъятия связанного азота из сточных вод.

5.6. Метод количественной оценки содержания и внутриклеточной локализации резервов фосфора и азота на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ

При работе над данным разделом диссертации использована следующая публикация автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Ismagulova, T. A new simple method for quantification and locating P and N reserves in microalgal cells based on energy-filtered transmission electron microscopy (EFTEM) elemental maps / T. Ismagulova, A. Shebanova, O. Gorelova, O. Baulina, A. Solovchenko // PloS one. – 2018. – V. 13. – № 12. – P. e0208830.

5.6.1. Разработка метода

Элементное картирование методом ЭФПЭМ для выявления ФоС- и АС-включений в микроводорослях и цианобактериях имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, среди которых высокая чувствительность обнаружения и возможность визуализации включений на субклеточном уровне. Однако в доступной нам литературе отсутствовали сообщения о методах, позволяющих проводить количественную оценку содержания и внутриклеточной локализации резервов фосфора и азота на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ. Разработка количественного подхода, основанного на этом методе, осложняется наличием шума в картах, в том числе от клеточных структур, не связанных с целевыми включениями.

Для разработки такого количественного подхода мы предложили использовать измерение относительной энтропии полученной элементной карты с последующей трансформацией ее в бинарное черно-белое изображение (см. раздел 4.3.4), что позволило различить сигналы от интересующих нас включений и других сигналов на картах ЭФПЭМ. Предлагаемый метод облегчил оценку относительной площади и локализации включений в клетке.

Бинаризация изображений — это хорошо известный подход извлечения полезной информации из пикселей изображения при минимизации фонового шума, который используется в различных методах обработки изображений [Pun, 1980; 1981; Sahoo et al., 1988; 1997; Pal, Pal, 1991]. Среди них особенно интересны методы, основанные на концепции энтропии. В указанных методах используются два типа энтропии: энтропия Шеннона (Shannon's entropy) [Pun, 1980; 1981; Karur et al., 1985] и относительная энтропия [Chang et al., 1994; Lee et al., 1999]. Измерение относительной энтропии используется при обработке посткраевого и предкраевых ЭФПЭМ-изображений для расчета элементных карт. Такой подход относится к нетрадиционному методу расчета элементных карт, полученных методом ЭФПЭМ. Такой метод обработки ЭФПЭМ-изображений был впервые предложен в работах Trebbia, Bonnet [1990] и Trebbia, Mory [1990]. В указанных работах продемонстрировано, что анализ ЭФПЭМ-изображений с помощью измерения относительной энтропии может быть полезен для построения качественных карт из шумных ЭФПЭМ-изображений.

Новизна метода анализа ЭФПЭМ-карт, разработанного в этой работе, заключается в: (i) простом разделении полезного сигнала от нерелевантных сигналов и шума на картах посредством бинаризации карты согласно расчету относительной энтропии и (ii) простой оценки относительной площади и локализации целевых включений в клетке. Данный метод, включающий анализ элементных карт фосфора и азота, был разработан для оценки численности и локализации резервов P и N в микроводорослях и цианобактериях на субклеточном уровне.

5.6.2. Применение метода к элементным картам азота и фосфора клеток микроводорослей и цианобактерий

Разработанный метод применили к нескольким модельным микроорганизмам, способным формировать внутриклеточные ФоС- и АС-включения: к эукариотическим зеленым микроводорослям *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 и цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118. В качестве культур, аккумулирующих АС- и ФоС-включения, использовали голодные по фосфору клетки и клетки на стационарной фазе роста после добавления фосфора к голодным клеткам, соответственно. Для указанных культур *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Nostoc* sp. PCC 7118 ранее с помощью методов аналитической ПЭМ показали их способность к формированию указанных включений (рис. 15 а,в,г,е, рис. 23). Для *Desmodesmus* sp. S-2014 результаты предварительных экспериментов по возобновлению фосфорного питания в отношении изменений в составе внутриклеточных включений были аналогичными с *C. vulgaris* IPPAS C-1.

У голодных по фосфору клеток цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 выявлялись АС-включения, которые были локализованы в цитозоле между немногочисленными тилакоидами, разделенными друг от друга значительным пространством цитозоля и распределенными по клетке (см. рис. 33 а, приложение 11). Размеры АС-включений при этом составляли от 0,15 до 1,5 мкм. Ультраструктура клеток на этой стадии имела характерные черты для голодных по фосфору клеток (раздел 5.4.1): область цитозоля в голодных клетках обладала низкой электронной плотностью и имела высокую степень однородности, а тилакоиды были разделены друг от друга значительными пространствами и обладали высокой электронной плотностью. На стационарной фазе роста культуры после добавления фосфора к голодным клеткам в исследуемой цианобактерии АС-включения не обнаруживались – вместо них выявлялись ФоС-включения, расположенные в цитозоле (рис. 33 б-г). Размер ФоС-включений варьировал от 0,01-0,09 мкм.

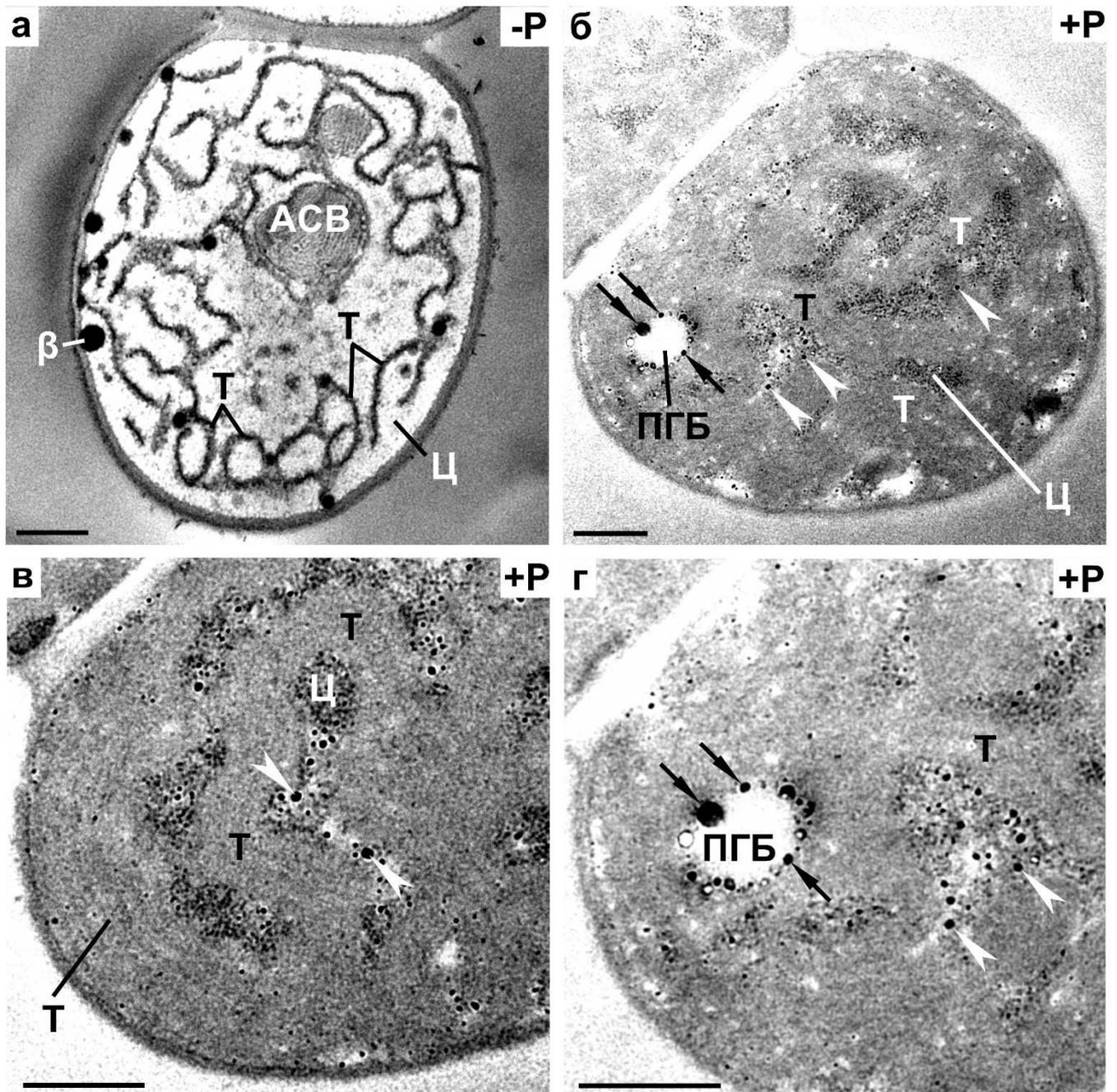


Рис. 33 Локализация азотсодержащих (АС-) и фосфорсодержащих (ФoC-) включений в цитозоле цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 при голодании по фосфору (а) и при восстановлении фосфорного питания на стационарной фазе роста (б-г). Представлены энергофильтрованные в пике нулевых потерь ПЭМ-изображения типичных клеток с включениями азота (а) и фосфора (б-г). (г) – увеличенный фрагмент клетки из (а), демонстрирующий ассоциированные и не ассоциированные с ПГБ ФoC-включения. Черными стрелочками отмечены ФoC-включения, ассоциированные с гранулами поли-(R)-3-гидроксибутирата (ПГБ), белыми указателями – не ассоциированные с ПГБ ФoC-включений. ПЭМ-изображения представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — АС-включение (цианофициновая гранула), β — липидная β-гранула высокой электронной плотности, Т — тилакоиды, Ц — цитозоль. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

Значительную часть клеточного среза занимали лентообразные группы близкорасположенных друг к другу тилакоидов (рис. 33 в), которые имели среднюю электронную плотность. Область цитозоля обладала высокой электронной плотностью и «зернистой» структурой из-за большого количества рибосом и ФоС-включений (рис. 33 б,в, приложение 11). Часть выявленных ФоС-включений в клетках были ассоциированы с гранулами ПГБ (рис. 33 б,г, приложение 11), а оставшиеся – не ассоциированы с указанными гранулами.

В голодных по фосфору клетках исследованных эукариотических микроводорослей *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus* sp. S-2014 АС-включения были локализованы в вакуолях (рис. 34).

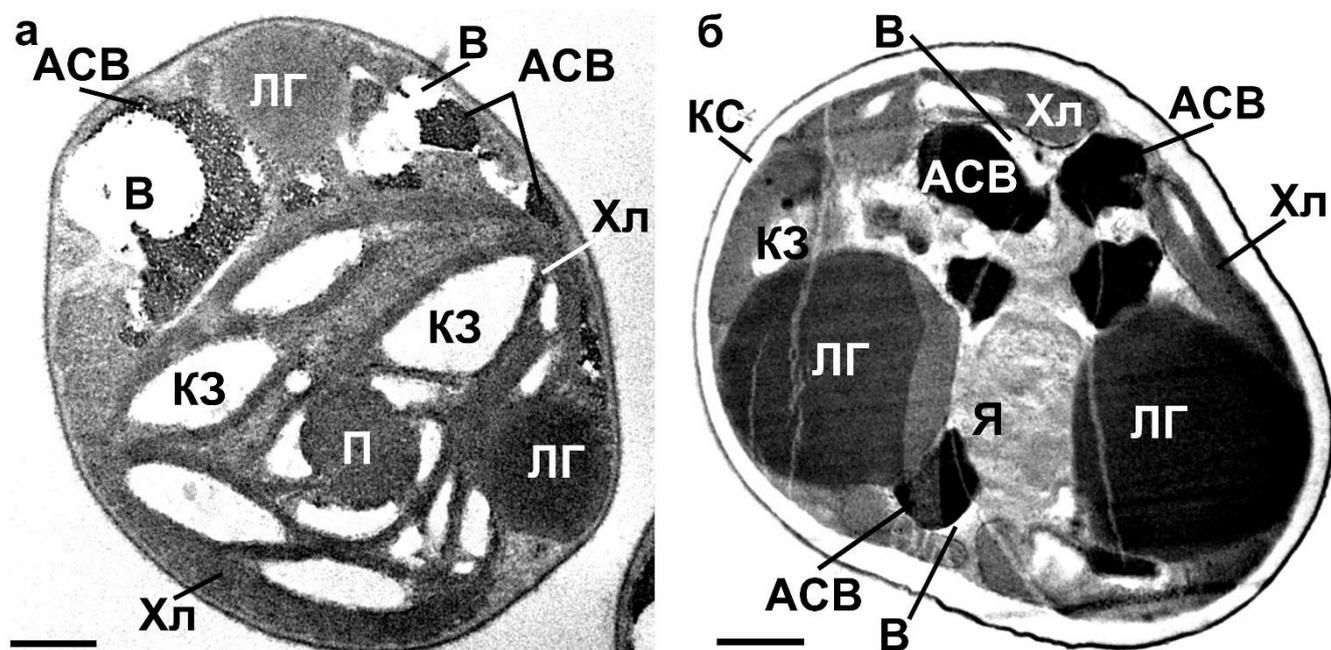


Рис. 34 Локализация азотсодержащих включений в вакуолях микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (а) и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (б) при голодании по фосфору. Представлены энергофильтрованные в пике нулевых потерь ПЭМ-изображения типичных клеток с включениями азота. ПЭМ-изображения представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, КС – клеточная стенка (полисахаридный слой), ЛГ — липидная глобула, П – пиреноид, Хл — хлоропласт, Я — ядро. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

Голодные по фосфору клетки обеих микроводорослей имели ультраструктурные признаки, типичные для фосфорного голодания (см. раздел 5.2.1): отсутствие ФоС-включений, наличие АС-включений в вакуолях, наличие углерод-аккумулирующего компартмента – липидных глобул в цитозоле (см. рис. 34). Размеры АС-включений при этом составляли 0,1-2,5 мкм. При этом плотность материала АС-включений у *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus* sp. S-

2014 различалась: АС-включения *C. vulgaris* IPPAS С-1 на ПЭМ-изображениях выглядели «губчатыми», то есть имели множество участков со средней и низкой электронной плотностью (рис. 34 а), тогда как АС-включения *Desmodesmus* sp. S-2014 обладали высокой электронной плотностью по всей площади включений (рис. 34 б).

На стационарной фазе роста культур после добавления фосфора к голодным клеткам в исследуемых микроводорослях выявлялись ФоС-включения и не детектировались АС-включения и липидные глобулы (рис. 35).

ФоС-включения в клетках исследованных микроводорослей выявлялись в цитозоле (отмечены цифрой 1 на рис. 35) и в вакуолях (цифра 2 на рис. 35). В некоторых клетках обеих микроводорослей также выявлялись ФоС-включения в хлоропластах (цифра 3 на рис. 35 б,в,г) и в ядре (цифра 4 на рис. 35 д,е), а также включения, достоверное определение локализации которых затруднено (цифра 5 на рис. 35 в,г). Размеры ФоС-включений в исследуемых микроводорослях составляли 0,01-0,8 мкм.

Клетки микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 отличались от клеток *Chlorella vulgaris* IPPAS С-1 наличием утолщенного полисахаридного слоя клеточной стенки, который был отчетливо виден на малых увеличениях (рис. 34 б, рис. 35 б,г,е).

Для того, чтобы определить количественное содержание АС- и ФоС-включений в исследуемых микроорганизмах с помощью предлагаемого в работе метода обработки элементных карт проводили элементное картирование методом ЭФПЭМ для 18 клеточных срезов каждой культуры каждого микроорганизма (см. раздел 4.3.3).

Для элементного картирования клеток указанных микроорганизмов энергетические окна выбирали по соответствующим спектрам ХПЭЭ (рис. 25, рис. 36): для картирования по фосфору — по спектрам от ФоС-включений (рис. 25 а, рис. 36 а,в), содержащих пики фосфора ($L_2 = 136$ эВ, $L_3 = 135$ эВ), для картирования по азоту — на основе спектров от АС-включений (рис. 25 б, рис. 36 б,г), содержащих пик азота ($K = 399$ эВ). Стоит отметить, что сигнал в спектрах ХПЭЭ, полученный от АС-включений *C. vulgaris* IPPAS С-1, был значительно ниже сигналов, полученных от АС-включений *Desmodesmus* sp. S-2014 и *Nostoc* sp. PCC 7118.

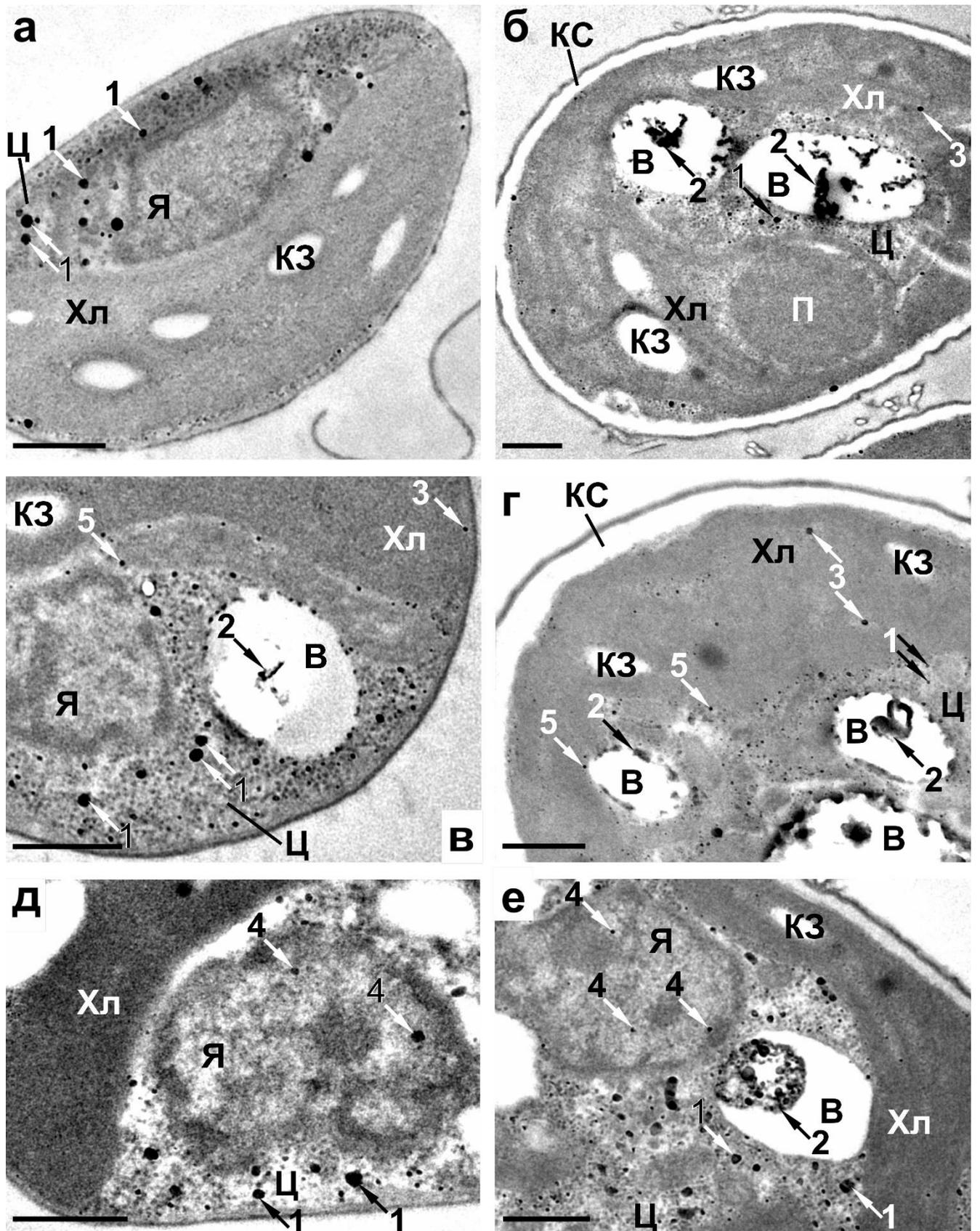


Рис. 35 Локализация фосфорсодержащих (Фос-) включений в микроводорослях *Chlorella vulgaris* IPPAS С-1 (а,в,д) и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (б,г,е) на стационарной фазе роста культур после добавления фосфора к голодным клеткам. Представлены энергофильтрованные в пике нулевых потерь ПЭМ-изображения типичных клеток с включениями фосфора. Цифрами со

стрелочками отмечена локализация ФоС-включений в клетках: 1 – включения в цитозоле, 2 – в вакуоли, 3 – в хлоропласте, 4 – в ядре, 5 – включения, достоверное определение локализации которых затруднено (с неопределенной локализацией). ПЭМ-изображения представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, КС – клеточная стенка (полисахаридный слой), П – пиреноид, Хл — хлоропласт, Ц – цитозоль, Я — ядро. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

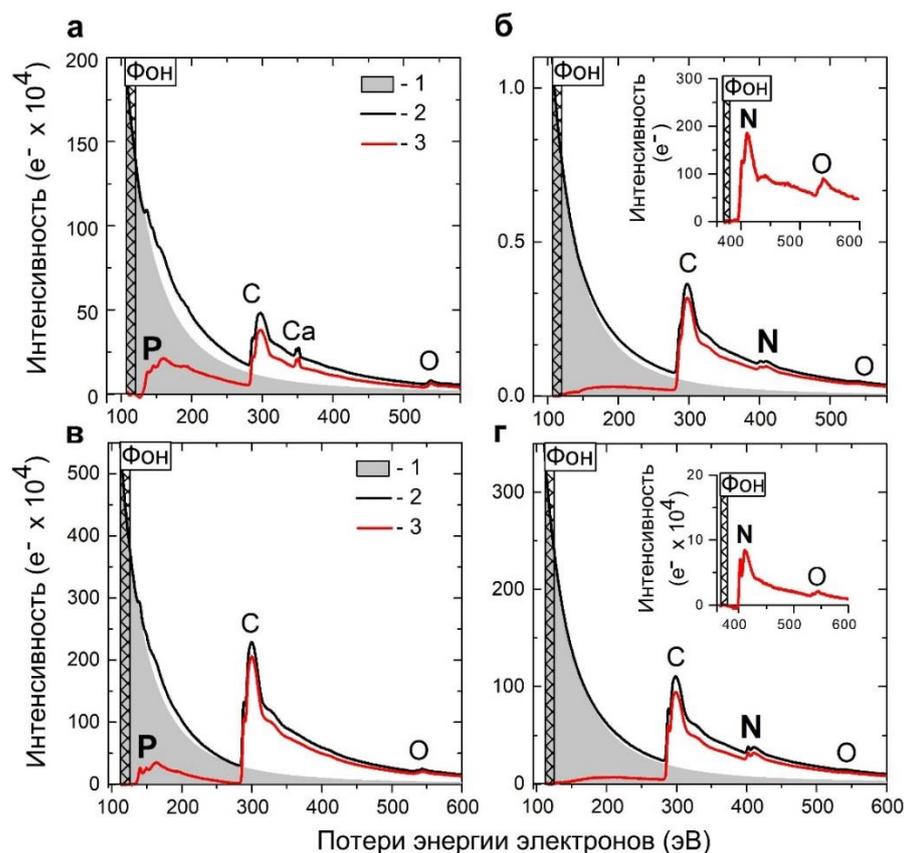


Рис. 36 Типичные спектры потерь энергии электронов, полученные от фосфорсодержащих (а,в) и азотсодержащих (б,г) включений *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (а,б) и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (в,г). В спектрах от фосфорсодержащих включений — пики фосфора ($L_2 = 136$ эВ, $L_3 = 135$ эВ), в спектрах от азотсодержащих включений — пик азота ($K = 399$ эВ). 1 — фон, аппроксимированный степенной функцией, 2 — спектр до вычитания фона, 3 — спектр после вычитания фона. Заштрихованный прямоугольник в спектрах указывает диапазон, по которому рассчитывалась степенная функция для вычитания фона. Вставки в (б,г) - увеличенные части тех же спектров после вычитания фона, в которых диапазон для расчета степенной функции при вычитании фона выбран непосредственно перед пиком азота. Спектры представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11)

На рис. 37-39 представлены типичные результаты анализа полученных карт фосфора и азота согласно алгоритмам обработки “А” и “Б” (см. раздел 4.3.4 и рис. 12). С помощью данного метода могли анализировать даже крошечные включения с размером менее 180 нм в диаметре (рис. 37-39).

Как в клетках микроводорослей, так и в клетках цианобактерии количество АС-включений не превышало 10 на клеточный срез. Для анализа АС-включений был выбран алгоритм обработки “А” (рис. 37 а-д, рис. 38 а-д, рис. 39 а-д). В случае применения к картам с указанными включениями алгоритма обработки “Б” на кривой относительной энтропии выявлялся один ярко выраженный пик (рис. 40), соответствующий азотсодержащим структурам, в том числе АС-включениям. В данном случае разделить сигнал от АС-включений и других азотсодержащих клеточных структур не представлялось возможным.

Количество ФоС-включений в исследуемых микроорганизмах чаще всего превышало 10 на клеточный срез, поэтому для их анализа использовали алгоритм обработки “Б” (рис. 37 е-к, рис. 38 е-к, рис. 39 е-к). В случае применения к картам с указанными включениями алгоритма обработки “А” на обработанных картах ФоС-включения были окружены большим количеством пикселей от других клеточных структур (рис. 41), что делало измерение площади многочисленных ФоС-включений вручную долгим и трудоемким. Однако обнуление отрицательных значений на исходных элементных картах перед обработкой (алгоритм обработки “Б”, см. рис. 12) привело к образованию дополнительного пика на кривой относительной энтропии, соответствующего структурам, отличным от представляющих интерес ФоС-включений (правый столбец на рис. 12, рис. 37 к, рис. 38 к, рис. 39 к). В данном случае можно было отделить сигнал от многочисленных ФоС-включений и сигнал от нерелевантных структур.

Интересующие включения были легко различимы на обработанных элементных картах фосфора и азота (рис. 37 в,з, рис. 38 в,з, рис. 39 в,з), а их площадь, представленная количеством белых пикселей, была легко подсчитана путем выбора области, содержащей эти включения (красный контур на соответствующих обработанных картах).

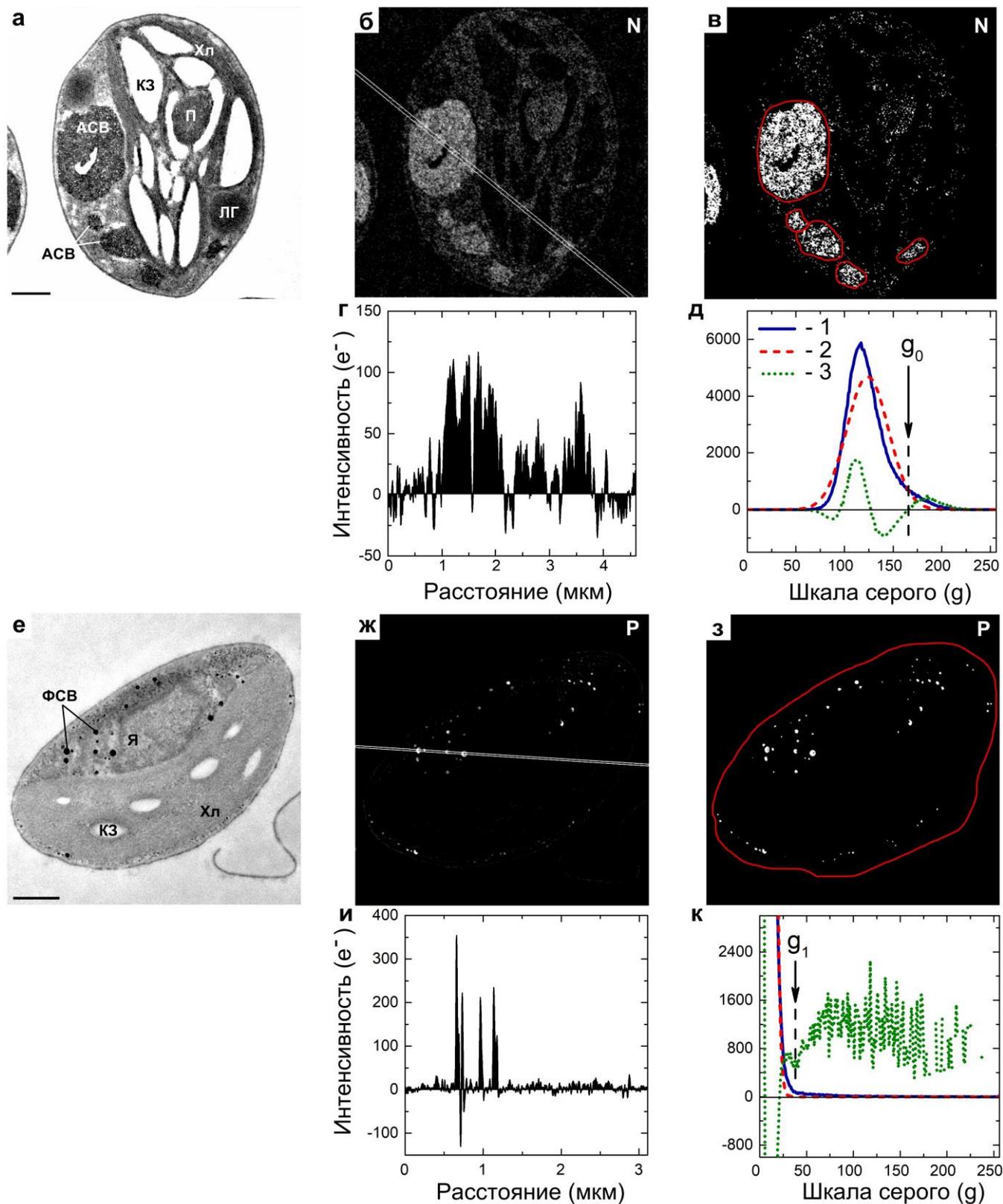


Рис. 37 Применение предложенного метода количественного анализа резервов фосфора и азота к клеткам микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1: (а-д) - применение к карте азота клетки из голодной по фосфору культуры, (е-к) - применение к карте фосфора клетки со стационарной фазы роста после добавления фосфора к голодным клеткам. (а,е) Энергофильтрованные в пике нулевых потерь ПЭМ-изображения типичных клеток с включениями азота (а) и фосфора (е). (б,ж) Элементные карты азота (б) и фосфора (ж),

полученные методом ЭФПЭМ с соответствующих клеток. (г,и) Усредненные профили интенсивности сигнала с соответствующих карт азота (г) и фосфора (и), проходящие через выявленные включения азота (б) и фосфора (ж). (в,з) Соответствующие элементные карты азота (в) и фосфора (з), обработанные согласно алгоритмам обработки “А” (в) и “Б” (з) (см. текст и рис. 12). (д,к) Относительная энтропия для соответствующих карт азота (д,б) и фосфора (к,ж). Красный контур на обработанных элементных картах (в,з) указывает область, выбранную для измерения площади клеточных включений. Усредненные профили интенсивности сигнала (г,и) получены вдоль белых линий, показанных на соответствующих картах (б,ж). На графиках (д,к) отмечены пороговые пиксели g_0 и g_1 , используемые при обработке элементных карт (б,ж) для их бинаризации. Кривые на графиках (д,к): 1 — гистограмма, 2 — Гауссова кривая, 3 — относительная энтропия. Результаты представлены для ультратонких срезов клеток, не контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (см. рис. 11). АСВ — азотсодержащее включение, КЗ — крахмальное зерно, ЛГ — липидная глобула, П — пиреноид, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Хл — хлоропласт, Я — ядро. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

Таким образом, разделение метода на два рабочих алгоритма обработки карт дало нам возможность анализировать как клеточные срезы с небольшим числом включений (алгоритм обработки “А”), так и с большим числом включений (алгоритм обработки “Б”). Алгоритм обработки “А”, включающий в анализ все пиксели с положительными значениями относительной энтропии, проблематичен при применении к клеточным срезам с большим количеством включений (рис. 41). В качестве порогового значения для выбора между этими двумя рабочими алгоритмами обработки приняли 10 включений на клеточный срез, поскольку до 10 включений на клеточный срез можно быстро идентифицировать на картах, обработанных согласно рабочему алгоритму “А”. В рабочем алгоритме “Б” отрицательные значения пикселей на исходных картах обнуляли, в результате чего на кривой относительной энтропии карт с большим числом (> 10) включений появлялся дополнительный пик, соответствующий структурам, отличным от представляющих интерес включений. Данный феномен, который, вероятно, возник в результате обнуления пикселей, использовался для разделения сигнала от интересующих включений и сигнала от нерелевантных структур. Интересно, что при применении алгоритма обработки “А” к указанным картам такой дополнительный пик не появляется (рис. 41). Этот пик также не появляется при применении алгоритма “Б” к картам с небольшим количеством включений (≤ 10) (рис. 40). Мы полагаем, что это связано с более низкими значениями относительной площади включений, типичными для карт с многочисленными включениями (> 10), но редкими для карт с небольшим числом включений (≤ 10). Для карт с многочисленными включениями (> 10) и более низкими значениями относительной площади включений в кривой относительной энтропии нет четко определенного пика, соответствующего включениям, поэтому пик, соответствующий нерелевантным структурам, становится видимым.

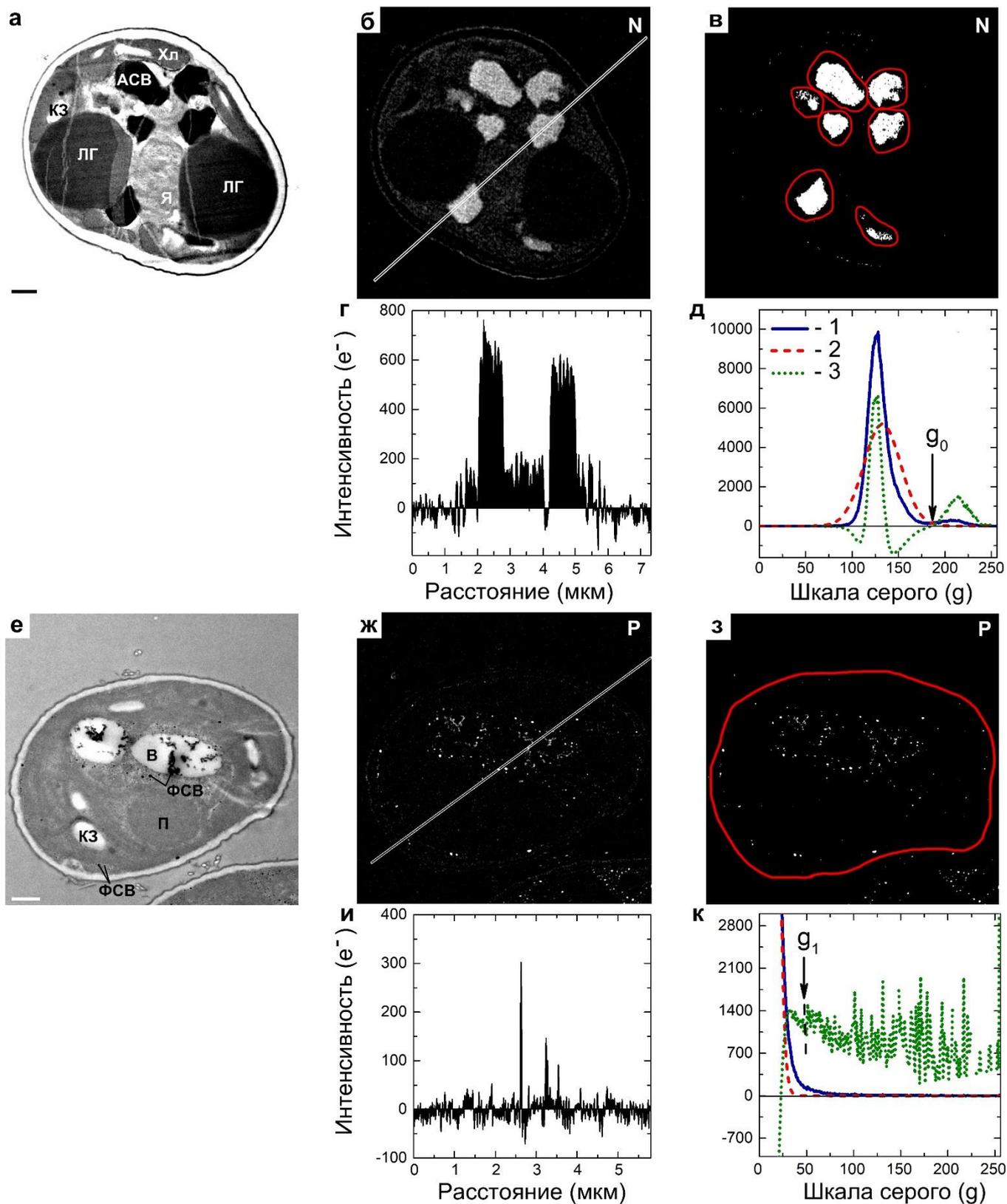


Рис. 38 Применение предложенного метода количественного анализа резервов фосфора и азота к клеткам микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 без контрастирования (см. рис. 11). Подробное описание к рисунку см. в описании к рис. 37. АСВ — азотсодержащее включение, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, ЛГ — липидная глобула, П — пиреноид, ФСВ — фосфорсодержащее включение, Хл — хлоропласт, Я — ядро. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

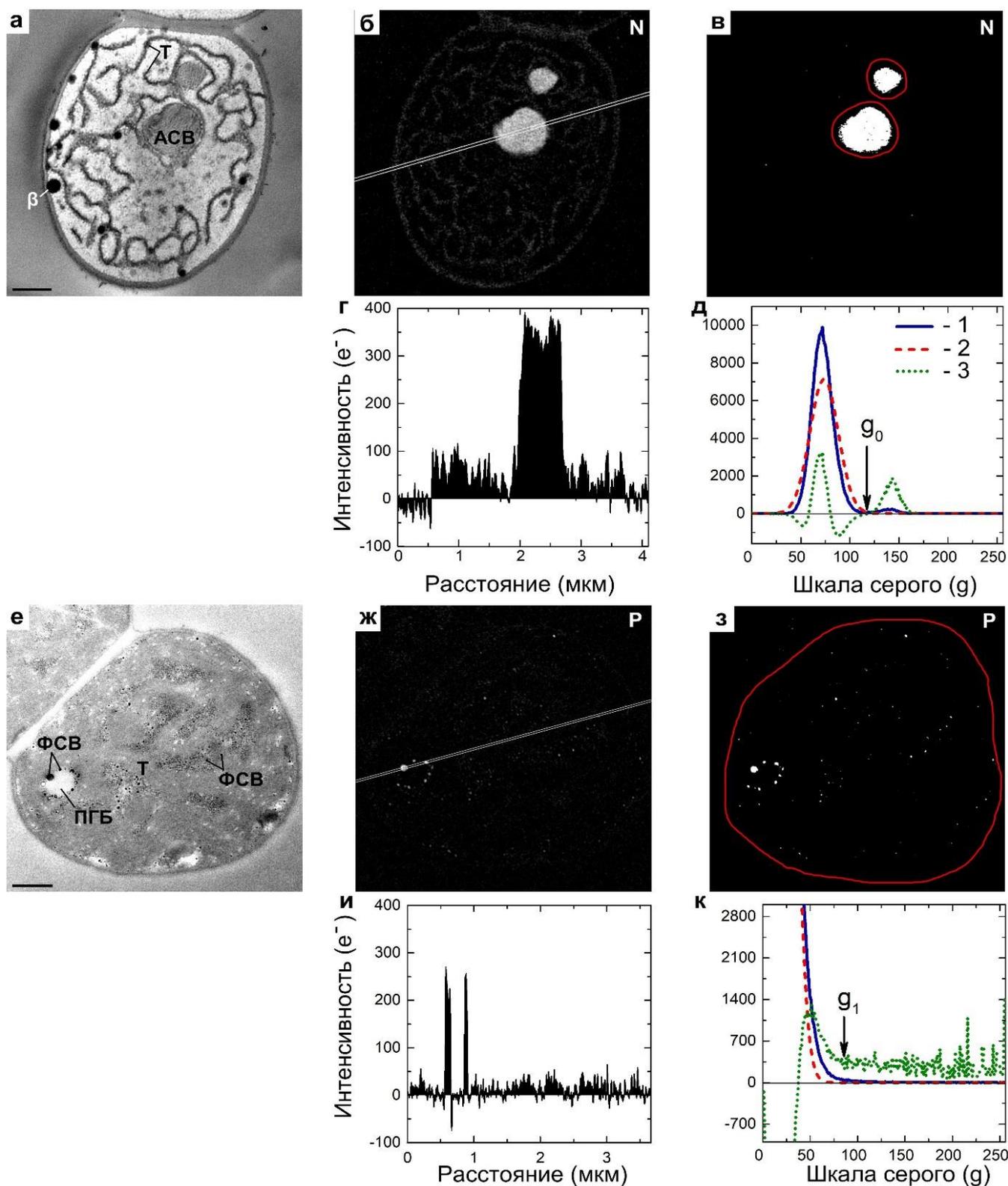


Рис. 39 Применение предложенного метода количественного анализа резервов фосфора и азота к клеткам цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 без контрастирования (см. рис. 11). Подробное описание к рисунку см. в описании к рис. 37. ACB — азотсодержащее включение (цианофициновая гранула), β — липидная β -гранула высокой электронной плотности, ПГБ — гранула, содержащая поли-(R)-3-гидроксибутират, Т — тилакоиды, ФСВ — фосфорсодержащее включение. Масштабные отрезки: 0,5 μm

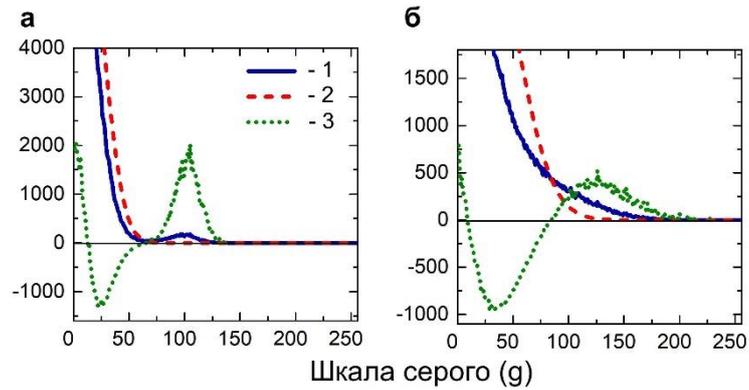


Рис. 40 Применение алгоритма обработки “Б” к ЭФПЭМ-картам азота: (а) — применение к карте азота клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS С-1 из голодной по фосфору культуры, (б) — применение к карте азота клетки цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 из голодной по фосфору культуры. (а,б) Относительная энтропия, рассчитанная согласно алгоритму обработки “Б”, для соответствующих карт азота (рис. 37 б, рис. 39 б). Кривые на графиках: 1 — гистограмма, 2 — Гауссова кривая, 3 — относительная энтропия. На кривых относительной энтропии — один ярко выраженный пик, соответствующий азотсодержащим структурам, в том числе азотсодержащим включениям. Результаты применения алгоритма “Б” к ЭФПЭМ-картам азота *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 были аналогичными

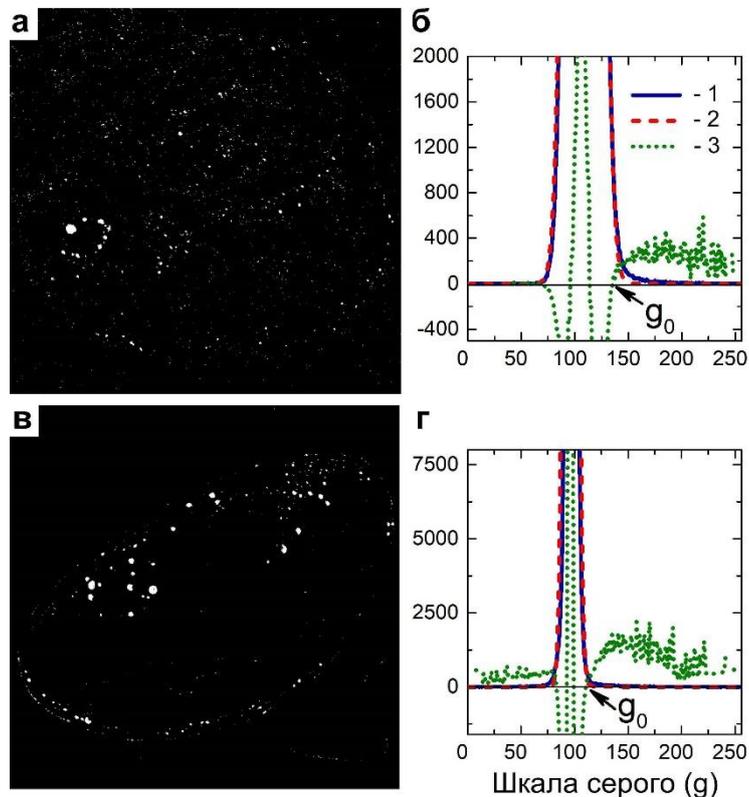


Рис. 41 Применение алгоритма обработки “А” к ЭФПЭМ-картам фосфора: (а,б) — применение к карте фосфора клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS С-1 на стационарной фазе роста после добавления фосфора к голодным клеткам, (в) — применение к карте фосфора клетки цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 на стационарной фазе роста после

добавления фосфора к голодным клеткам. (а,в) Соответствующие карты фосфора (рис. 37 ж, рис. 39 ж), обработанные согласно алгоритму обработки “А”. (б,г) Относительная энтропия, рассчитанная согласно алгоритму обработки “А”, для соответствующих карт фосфора (рис. 37 ж, рис. 39 ж). Кривые на графиках (б,г): 1 — гистограмма, 2 — Гауссова кривая, 3 — относительная энтропия. На графиках (б,г) отмечены пороговые пиксели g_0 , используемые при обработке элементных карт (рис. 37 ж, рис. 39 ж) для их бинаризации согласно алгоритму “А”. На обработанных картах фосфора (а,в) фосфорсодержащие включения окружены большим количеством пикселей от других клеточных структур. Результаты применения алгоритма “А” к ЭФПЭМ-картам фосфора *Desmodium* sp. IPPAS S-2014 были аналогичными

Измеренная площадь включений в результате осуществления алгоритмов обработки карт “А” и “Б” была использована для расчета относительной площади, занимаемой включениями в клеточном срезе (см. раздел 4.3.4 и рис. 12). Полученные относительные площади включений клеточных срезов использовали для оценки гетерогенности клеток в исследуемых культурах в отношении аккумуляции ими резервов фосфора и азота.

5.6.3. Оценка гетерогенности клеток в исследуемых культурах в отношении аккумуляции ими резервов фосфора и азота

Относительные площади включений всех анализируемых клеточных срезов *C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodium* sp. S-2014 и *Nostoc* sp. PCC 7118 приведены на рис. 42. Относительные площади АС-включений для *Nostoc* sp. PCC 7118, *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodium* sp. S-2014 находились в диапазоне от 4,4% до 18,5% (рис. 42 а), 0-7,9% (рис. 42 в) и 0,9-17,2% (рис. 42 д), соответственно. Содержание АС-включений в клетках *C. vulgaris* IPPAS C-1 было самым низким среди изученных микроорганизмов: их относительная площадь не превышала 8%, два из 18 исследованных клеточных срезов АС-включений совсем не содержали (рис. 42 в). Содержание АС-включений в клетках *Nostoc* sp. PCC 7118 было больше, чем в клетках *Desmodium* sp. S-2014: 11 из 18 клеточных срезов *Nostoc* sp. PCC 7118 содержали АС-включения, занимающие более 8% площади среза (рис. 42 а), тогда как только 5 из 18 клеток *Desmodium* sp. S-2014 отличались наличием АС-включений, занимающих более 8% площади среза (рис. 42 д).

В основном, для всех изученных микроорганизмов относительная площадь ФоС-включений была ниже, чем относительная площадь АС-включений: относительная площадь ФоС-включений не превышала 0,8% для *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 42 б) и 1,4% для *C. vulgaris* IPPAS C-1 (рис. 42 г) и *Desmodium* sp. S-2014 (рис. 42 е). Более низкие значения относительной площади ФоС-включений означают меньшее количество пикселей на карте, относящихся к этому типу включений, по сравнению с АС-включениями; это может быть одной из возможных причин

отсутствия на кривой относительной энтропии четко определенного пика, соответствующего ФоС-включениям (рис. 37 к, рис. 38 к, рис. 39 к).

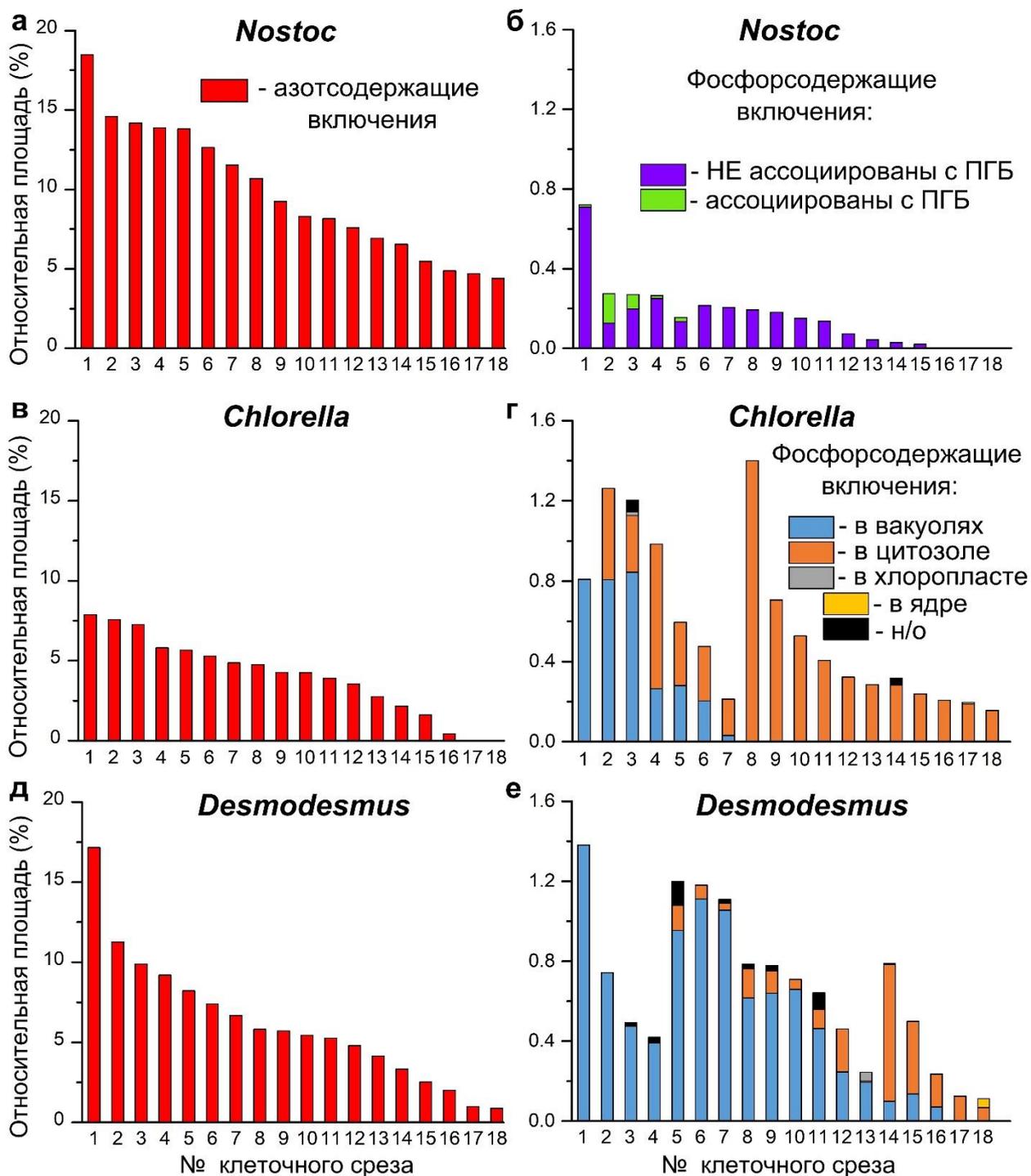


Рис. 42 Количественная оценка содержания и внутриклеточной локализации резервов фосфора и азота в анализируемых клетках: (а,б) - оценка резервов цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118, (в,г) - оценка резервов микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, (д,е) - оценка резервов микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014. (а,в,д) Оценка резервов азота в голодных по фосфору клетках. (б,г,е) Оценка резервов фосфора клеток на стационарной фазе роста после добавления фосфора к голодным клеткам. Результаты, выраженные в относительной площади азот- и фосфорсодержащих включений, представлены для каждого анализируемого клеточного

среза ($n = 18$). Клеточные срезы на гистограммах отсортированы в порядке убывания относительной площади их включений (а,в,д) или в порядке убывания относительной площади их включений в следующих группах: в (б) — (1) клеточные срезы, в которых есть резервы фосфора как ассоциированные с ПГБ, так и не ассоциированные с ПГБ; (2) клеточные срезы, содержащие только резервы фосфора, не ассоциированные с ПГБ; в (г,е) — (1) клеточные срезы, основные резервы фосфора которых локализованы в вакуолях, при этом запасов фосфора в цитозоле нет; (2) клеточные срезы, в которых резервы фосфора локализованы как в вакуолях, так и в цитозоле, при этом основные запасы находятся в вакуолях; (3) клеточные срезы, в которых резервы фосфора локализованы как в вакуолях, так и в цитозоле, при этом основные запасы находятся в цитозоле; (4) клеточные срезы, основные резервы фосфора которых локализованы в цитозоле, при этом запасов фосфора в вакуолях нет. На графиках (б,г,е) указана клеточная локализация фосфорсодержащих включений. ПГБ — гранула, содержащая поли-(R)-3-гидроксипутират, н/о — локализация включений не может быть достоверно определена

Содержание ФоС-включений в клетках *Nostoc sp.* PCC 7118 было ниже по сравнению с другими изученными микроорганизмами: три из 18 исследованных клеточных среза не содержали ФоС-включения (рис. 42 б). Предложенный нами метод позволил классифицировать ФоС-включения клеток *Nostoc sp.* PCC 7118 как ассоциированные с ПГБ или как не ассоциированные с ПГБ (рис. 33 б, г, рис. 42 б): пять из 18 исследованных клеточных срезов имели ФоС-включения, ассоциированные с ПГБ, только в одном из клеточных срезов основные резервы фосфора представляли собой ФоС-включения, ассоциированные с ПГБ, в других клеточных срезах основные резервы фосфора представляли собой ФоС-включения, не ассоциированные с ПГБ. Полученные данные свидетельствуют о том, что основные резервы фосфора у цианобактерий локализуются в ФоС-включениях, не ассоциированных с ПГБ в цитозоле (рис. 42 б).

Основные запасы фосфора в клетках микроводорослей *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus sp.* S-2014 представляли собой ФоС-включения, локализованные в вакуолях или цитозоле (рис. 35, рис. 42 г,е). ФоС-включения, расположенные в хлоропласте и ядре (рис. 35 в-е), а также включения с неопределенной локализацией (рис. 35 в,г) имели значительно меньшую относительную площадь (<0,06% и 0,13% для *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus sp.* S-2014, соответственно).

Мы также сравнили локализацию основных и общих резервов фосфора в клетках *C. vulgaris* IPPAS C-1 и *Desmodesmus sp.* S-2014 (рис. 43). В большинстве клеточных срезов *C. vulgaris* IPPAS C-1 основные резервы фосфора были локализованы в цитозоле (рис. 43 а), тогда как основные резервы фосфора в большей части клеточных срезов *Desmodesmus sp.* S-2014 были локализованы в вакуолях (рис. 43 б).

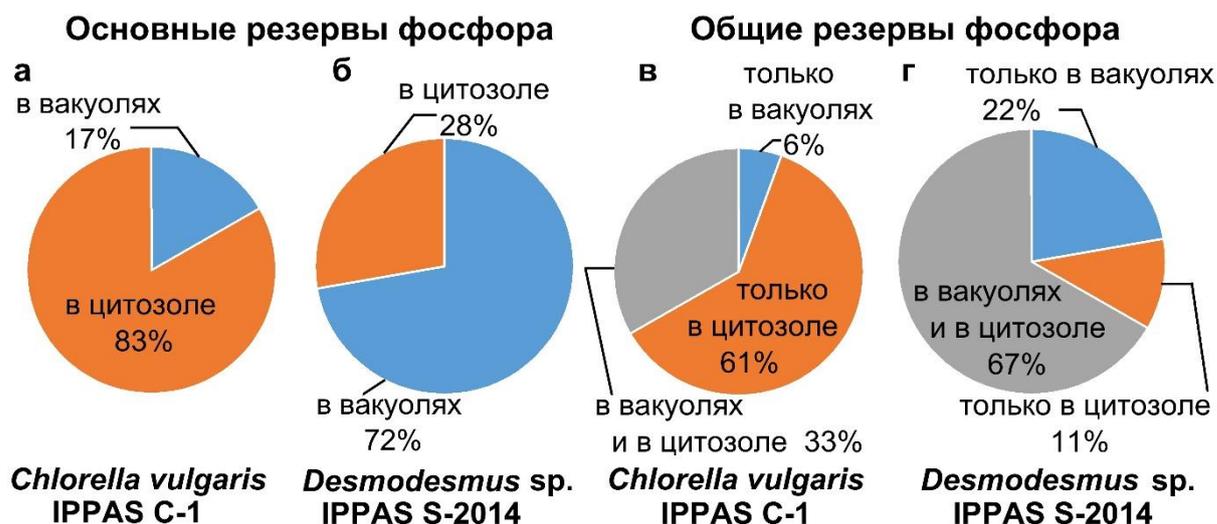


Рис. 43 Локализация основных (а,б) и общих (в,г) резервов фосфора в клетках микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (а,в) и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (б,г). Результаты представлены для клеток на стационарной фазе роста после добавления фосфора к голодным клеткам. На диаграммах показаны процентные доли числа клеточных срезов, содержащих резервы фосфора с указанной на рисунке локализацией, от общего числа исследованных клеточных срезов для этой культуры клеток. При построении диаграмм, отражающих распределение общих резервов фосфора (в,г), фосфорсодержащие включения, локализованные в хлоропластах и ядре, а также включения с неопределенной локализацией не учитывались

Внутриклеточная локализация общих запасов фосфора в клетках изученных эукариотических микроводорослей также различалась (см. рис. 43 в,г): большая часть клеточных срезов *C. vulgaris* IPPAS C-1 имела ФоС-включения только в цитозоле (рис. 43 в), тогда как большая часть клеточных срезов *Desmodesmus* sp. S-2014 имела включения как в вакуолях, так и в цитозоле (рис. 43 г).

Традиционный подход к оценке ультраструктурных изменений эукариотических микроводорослей и цианобактерий, в том числе к изменениям в содержании ФоС- и АС-включений, представляет собой прямую морфометрию ПЭМ-изображений клеточных срезов [Sicko-Goad, 1982; Sicko-Goad, Lazinsky, 1986; Lazinsky, Sicko-Goad, 1990; Korzhenevskaya et al., 1999; Gorelova, Korzhenevskaya, 2002; Gorelova, Kleimenov, 2003; Rosset et al., 2017]. Данный подход к количественной оценке выполняется вручную, поэтому он является трудоемким и подвержен ошибкам. Еще более серьезной является проблема надежной идентификации клеточных структур, которой трудно достичь при анализе только ПЭМ-изображений без объективной информации об элементном составе исследуемых структур. Метод же, предложенный в этом исследовании для количественной оценки содержания ФоС- и АС-включений, основывается на анализе ЭФПЭМ-карт в соответствии с четко определенными

критериями с учетом объективных данных об элементном составе представляющих интерес включений. Стоит отметить, что для реализации этого метода не требуется столько времени, сколько необходимо для проведения традиционной морфометрии на основе ПЭМ-изображений, поскольку предложенный метод основан на преобразовании ЭФПЭМ-карт в бинарные черно-белые изображения. Такая обработка позволяет упростить количественную оценку анализируемых структур на основе площадей (например, ФоС- или АС-включений) путем суммирования белых пикселей, относящихся к этим структурам, в выбранной области карты.

В работе Коор et al. [2007] проводили обработку ЭФПЭМ-карт путем их преобразования в бинарные черно-белые изображения для идентификации и локализации гранул цианофицина в рекомбинантных штаммах *Ralstonia eutropha*. В данном исследовании для каждого пикселя карты по азоту рассчитывали отношение сигнал/шум (signal-to-noise ratio, SNR), по которому устанавливали границу для бинаризации изображения: если заранее было известно, что образец содержит АС-включения, то пиксели с отношением сигнал/шум ≥ 3 считались азотсодержащими (белыми), если заранее не известно о содержании АС-включений, то только пиксели с отношением сигнал/шум ≥ 5 считались азотсодержащими. При этом отношение сигнал/шум для каждого пикселя вычислялось с помощью стандартных процедур [Pun et al., 1985] с использованием посткраевого ЭФПЭМ-изображения и предкраевых ЭФПЭМ-изображений. Эти подходы основаны на достаточно сложных расчетах, практическая реализация которых затруднительна для биологов, не имеющих профессионального опыта в математике и статистике. В нашей работе, напротив, мы предлагаем для обработки ЭФПЭМ-карт простые вычисления, основанные на относительной энтропии, которые не требуют расширенного знания статистики. Дополнительным преимуществом предлагаемого нами подхода является возможность его осуществления в стандартных программных пакетах, таких как Excel. Мы также предлагаем проводить расчет относительной энтропии непосредственно для ЭФПЭМ-карт после традиционного вычитания фона. Это устраняет необходимость расчетов для исходных ЭФПЭМ-изображений (предкраевых и посткраевого), что еще больше облегчает обработку ЭФПЭМ-карт по сравнению с методом на основе расчета отношения сигнал/шум [Коор et al., 2007].

Для проверки возможностей предлагаемого нами метода мы использовали его для количественной оценки содержания ФоС- и АС-включений в клетках микроводорослей и цианобактерии. Количественная оценка клеточных резервов фосфора, существующих в биологических образцах в основном в виде полифосфатов, может быть выполнена с использованием различных подходов, таких как химический анализ, хромогенные тесты, ферментативные методы, флуориметрические методы с использованием 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), спектроскопия ^{31}P -ЯМР и лазерная

сканирующая микро-спектроскопия КР (подробный обзор методов см. в работах [Hupfer et al., 2008; Majed et al., 2012]). Все эти методы, за исключением лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР, позволяют анализировать только образцы суспензий клеток, что дает среднее содержание полифосфатов в популяции клеток или на уровне отдельных клеток в случае использования проточного цитометра. Ключевым преимуществом предлагаемого нами метода является его способность предоставления информации о распределении азот- и фосфорсодержащих структурах в пределах одной клетки, то есть на субклеточном уровне. Недавно описанный метод количественной оценки полифосфатов в микроводорослях с помощью лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР [Moudříková et al., 2017b] также дает информацию о внутриклеточном распределении полифосфатов. Так же, как и предлагаемый нами метод, он позволяет оценить гетерогенность между отдельными клетками в культуре микроводорослей. Однако использование светового конфокального микроскопа в этом методе ограничивает его пространственное разрешение приблизительно до 180 нм [Heintzmann, Ficz, 2006], поэтому визуализация ФоС-включений размером менее 180 нм с помощью этого метода чрезвычайно затруднительна. Кроме того, его разрешение является недостаточным для определения внутриклеточной локализации включений (в цитозоле, в вакуолях, в хлоропластах, в ядре). Метод, предложенный в этой работе, таких ограничений не имеет.

Для количественного определения цианофицина в цианобактериях известно намного меньше методов, чем для полифосфатов. Стандартным методом является химический анализ аргинина, входящего в состав цианофицина [Simon, 1973]. Более быстрым и чувствительным является метод, основанный на ^1H -ЯМР спектроскопии [Erickson et al., 2001]. Оба эти метода анализируют выделенные из цианобактерий гранулы цианофицина и дают информацию о его усредненном содержании для популяции клеток, тогда как наш метод позволяет количественно определить цианофицин с субклеточным разрешением. Кроме того, стоит отметить, что после гибели клеток цианофициновые гранулы сохраняют свою целостность [Gorelova, Kleimenov, 2003], поэтому эти гранулы из мертвых и разрушенных клеток вносят погрешности в измерения содержания цианофицина в цианобактериях методом, основанном на анализе аргинина [Simon, 1973], и ^1H -ЯМР спектроскопией [Erickson et al., 2001]. Метод же, предложенный в представленной работе, позволяет оценивать содержание гранул цианофицина только в клетках, которые были живы в момент фиксации для ПЭМ и сохраняли свою целостность, судя по их морфологическим признакам на клеточных срезах.

В научной литературе нет сообщений о количественном анализе АС-включений в эукариотических микроводорослях, как представленных гуанином, так и мочевой кислотой. Вероятнее всего, в ближайшее время такой метод количественного определения гуаниновых

гранул с использованием лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР будет разработан [Moudříková et al., 2017a], как это было сделано ранее для количественной оценки полифосфатов в микроводорослях [Moudříková et al., 2017b], но пространственное разрешение лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР сильно ограничено по сравнению с ПЭМ (см. выше). Таким образом, разработанный метод является первым методом количественной оценки АС- и ФоС-включений на ЭФПЭМ-картах с субклеточным разрешением.

Ограничения метода, предложенного в настоящем исследовании, связаны с требованием использовать ультратонкие клеточные срезы для ЭФПЭМ-анализа. Во-первых, следует помнить, что клеточный срез не равен объему целой клетки, а одна ЭФПЭМ-карта визуализирует содержимое только одного клеточного среза. Во-вторых, этот метод предоставляет информацию только об области, занятой включениями, которые содержат достаточно атомов фосфора или азота, достаточных для обнаружения с помощью ЭФПЭМ. Метод не учитывает разницу в плотности включений или в величине сигнала от них. Ввиду вышеизложенного, этот метод наиболее подходит для сравнительного анализа содержания резервов фосфора и азота. Для абсолютной количественной оценки следует использовать другие доступные количественные методы [Simon, 1973; Lorenz, Schröder, 1999; Erickson et al., 2001; Hupfer et al., 2008; Ohtomo et al., 2008; Kulakova et al., 2011; Moudříková et al., 2017b]. При этом подтверждение химической природы включений независимыми методами (ЯМР-спектроскопия, микро-спектроскопия КР и т.д.) является весьма целесообразным. В-третьих, чрезвычайно мелкие включения (в основном ФоС-включения) могут не детектироваться с помощью ЭФПЭМ. В-четвертых, следует осторожно относиться к вопросу о выкрашивании содержимого включений из срезов во время их приготовления (особенно часто это происходит с вакуолярными включениями). И, наконец, иногда трудно достоверно определить локализацию крошечных ФоС-включений (например, определить находятся они в цитозоле или в небольшой вакуоли). Чаще всего эта трудность возникает из-за низкого контраста мембран вследствие исключения контрастирования образцов уранилацетатом для проведения ЭФПЭМ-картирования по фосфору. Это необходимо для того, чтобы избежать проблем, связанных с перекрытием пика урана в спектре ХПЭЭ с диапазоном, находящимся перед пиком фосфора, который используется для аппроксимации фона при ЭФПЭМ-картировании по фосфору [Shebanova et al., 2017]. Мы полагаем, что большинство вышеупомянутых ограничений можно преодолеть, работая с достаточно большим набором ЭФПЭМ-карт клеточных срезов.

В представленной работе оценка относительной площади ФоС- и АС-включений проводилась при анализе ЭФПЭМ-карт клеточных срезов. Поскольку клеточный срез не равен объему целой клетки, а одна ЭФПЭМ-карта визуализирует содержимое только одного

клеточного среза, то полученные нами результаты корректно сравнивать с данными, также полученными для клеточных срезов. Среди всех известных методов, используемых для количественного анализа ФоС- и АС-включений, только в морфометрии ПЭМ-изображений клеток анализируются клеточные срезы. В научной литературе отсутствуют работы, в которых с помощью морфометрии ПЭМ-изображений оценивали бы относительную площадь ФоС-включений в микроводорослях и цианобактериях или относительную площадь АС-включений в цианобактериях. В отношении АС-включений эукариотических микроводорослей известно, что относительная площадь АС-включений (обозначенных как кристаллы мочевой кислоты) в микроводоросли *Symbiodium* sp. при недостатке фосфора в среде не превышает 4% (для 100 анализируемых клеточных срезов) [Rosset et al., 2017]. Голодные по фосфору *C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus* sp. S-2014 и *Nostoc* sp. PCC 7118, исследованные в представленной работе, способны к более интенсивному аккумулярованию АС-включений, чем *Symbiodium* sp. в работе Rosset с соавторами [2017]: относительная площадь АС-включений в клетках *C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus* sp. S-2014 и *Nostoc* sp. PCC 7118 может достигать 7,9%, 17,2% и 18,5%, соответственно (см. рис. 42 а,в,д).

Предлагаемый упрощенный метод обработки ЭФПЭМ-карт должен быть полезен для цитологических и микробиологических исследований, а также во всех областях, где необходимы (сравнительные) оценки субклеточного распределения цианофидина, полифосфатов и других включений, богатых фосфором и/или азотом. Одним из ярких примеров его применения является исследование влияния условий культивирования на субклеточное распределение гуанина и полифосфатов в микроводорослях. Количественная информация о субклеточном распределении резервов азота и фосфора в клеточных срезах является уникальным результатом разработанного метода. Такая информация может иметь решающее значение для более глубокого понимания механизмов избыточного поглощения фосфора и азота микроводорослями и для исследования эффектов нокаута и (или) сверхэкспрессии генов, участвующих в регуляции и хранении фосфора и азота в клетке. Мы также полагаем, что предложенный нами метод потенциально применим к другим типам микроорганизмов или клеток, способных формировать внутриклеточные ФоС-включения и/или АС-включения. Основными условиями для успешного применения разработанного метода являются: (1) достаточное для детекции методом ЭФПЭМ количество атомов фосфора и азота в этих включениях, и (2) возможность получить ЭФПЭМ-карту с целого клеточного среза для оценки его площади.

Важно отметить, что практически все этапы осуществления разработанного метода (кроме выбора области включений в рабочем алгоритме “А” и вычисления площади клеток в обоих алгоритмах обработки, см. рис. 12), могут быть автоматизированы. В связи с этим предложенный

метод является первым подходом, предполагающим полуавтоматическую обработку ЭФПЭМ-карт для оценки содержания АС- и ФоС-включений. После внедрения этой возможности наш подход значительно увеличит скорость анализа ЭФПЭМ-карт.

В нашей работе с помощью разработанного метода мы оценили гетерогенность популяций клеток микроводорослей и цианобактерии по содержанию резервов фосфора и азота. Мы также выявили особенности накопления резервов фосфора и азота у двух штаммов зеленых микроводорослей, выращенных в аналогичных условиях, и цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118. Мы показали, что внутриклеточные резервы азота у микроводорослей и цианобактерий занимают до 18,5% от площади клеток, а резервы фосфора – до 1,4%.

В отношении АС-включений, мы выяснили, что сигнал, полученный от АС-включений *C. vulgaris* IPPAS C-1, значительно ниже сигналов, полученных от АС-включений *Desmodesmus* sp. S-2014 и *Nostoc* sp. PCC 7118 (рис. 36 б,г, рис. 25 б), скорее всего, из-за различий в их плотности и тонкой структуре, что подтверждается различиями в плотности материала включений микроорганизмов на ПЭМ-изображениях (рис. 34). Кроме того, мы показали, что основные резервы азота у микроводорослей локализируются в вакуолях, у цианобактерий – в цитозоле.

Мы также определили внутриклеточную локализацию резервов фосфора как в цианобактерии, так и в микроводорослях. Мы смогли разделить контрастные по локализации типы ФоС-включений в клетках *Nostoc* sp. PCC 7118 (ассоциированные с ПГБ или не ассоциированные с ПГБ). Изучение солокализация полифосфатных гранул с ПГБ может быть важно для исследований биосинтеза и метаболизма полифосфатов в клетках, поскольку, вероятнее всего, ПГБ участвует в упаковке полифосфатных цепей в вакуолях микроводорослей (см. раздел 5.2.3). Поэтому, вероятнее всего, солокализация части ФоС-включений и ПГБ в клетках цианобактерий указывает на существование потенциально различных путей биосинтеза полифосфатов в цианобактериальных клетках. В результате работы мы показали, что основные резервы фосфора у цианобактерий локализируются в ФоС-включениях в цитозоле.

Мы также показали, что в изученных штаммах микроводорослей основные резервы фосфора представляют собой вакуолярные и (или) цитозольные ФоС-включения, тогда как ФоС-включения, расположенные в хлоропластах, ядре, а также включения с неопределенной локализацией, по-видимому, вносят незначительный вклад в общие клеточные запасы фосфора (рис. 42 г,е). Мы также обнаружили разницу в локализации основных и общих резервов фосфора в двух штаммах зеленых микроводорослей, выращенных в аналогичных условиях. Наблюдаемые различия могут быть связаны с тем, что указанные микроводоросли относятся к контрастным

экологическим группам: *Desmodesmus* sp. S-2014 является симбиотическим штаммом, а *C. vulgaris* IPPAS C-1 – свободноживущим.

Итак, разработанный метод позволяет проводить количественную оценку обилия и внутриклеточной локализации резервов фосфора и азота в микроводорослях и цианобактериях на элементных картах, полученных методом ЭФПЭМ. Таким образом, с помощью предложенного метода мы показали, что аналитическая ПЭМ предоставляет ценную информацию о субклеточном распределении резервов фосфора и азота у фотоавтотрофных микроорганизмов.

6. Заключение

Процессы образования и контролируемой деградации внутриклеточных включений, содержащих резервы ключевых биогенных элементов, фосфора и азота, отражают важные аспекты клеточной биологии одноклеточных кислородных фототрофных организмов. Анализ механизмов, лежащих в основе этих процессов и их регуляции, — ключ к пониманию фундаментальной картины клеточной биологии этих микроорганизмов.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось изучение влияния присутствия в среде фосфора и азота на внутриклеточное распределение, формирование и структуру фосфор- и азотсодержащих включений у микроводорослей и цианобактерий с помощью аналитической ПЭМ — мощного инструментального метода, способного давать информацию о распределении элементов с субклеточным разрешением.

Данные традиционной ПЭМ показали, что в голодных по фосфору либо азоту клетках исследуемых микроорганизмов происходит формирование углерод-запасающих компартментов — липидных глобул. Применяя методы аналитической ПЭМ, мы выяснили, что в клетках микроводорослей и цианобактерий при отсутствии фосфора или азота в среде также происходит (а) исчезновение клеточных резервных включений, обогащенных элементом, отсутствующим в среде, и (б) формирование включений, обогащенных присутствующим в среде элементом. При восполнении дефицита фосфора либо азота происходит ресинтез клеточных включений, обогащенных соответствующим элементом. Полученные результаты мы суммировали в обобщенной схеме формирования и расходования резервов азота и фосфора в клетках кислородных фототрофных микроорганизмов на рис. 44.

В работе мы предложили простой метод анализа элементных карт фосфора и азота, полученных методом ЭФПЭМ — одним из методов аналитической ПЭМ, для количественной оценки содержания и локализации резервов фосфора и азота в клетках микроводорослей и цианобактерий. Мы предложили простой подход для разделения сигнала, полученного от азот- и фосфорсодержащих структур, и сигнала от нерелевантных структур на ЭФПЭМ-картах посредством (i) измерения относительной энтропии и определения порогового значения для бинаризации, (ii) преобразования ЭФПЭМ-карт в бинарные черно-белые изображения и (iii) сегментации изображения для оценки относительной площади включений и локализации в клетке.

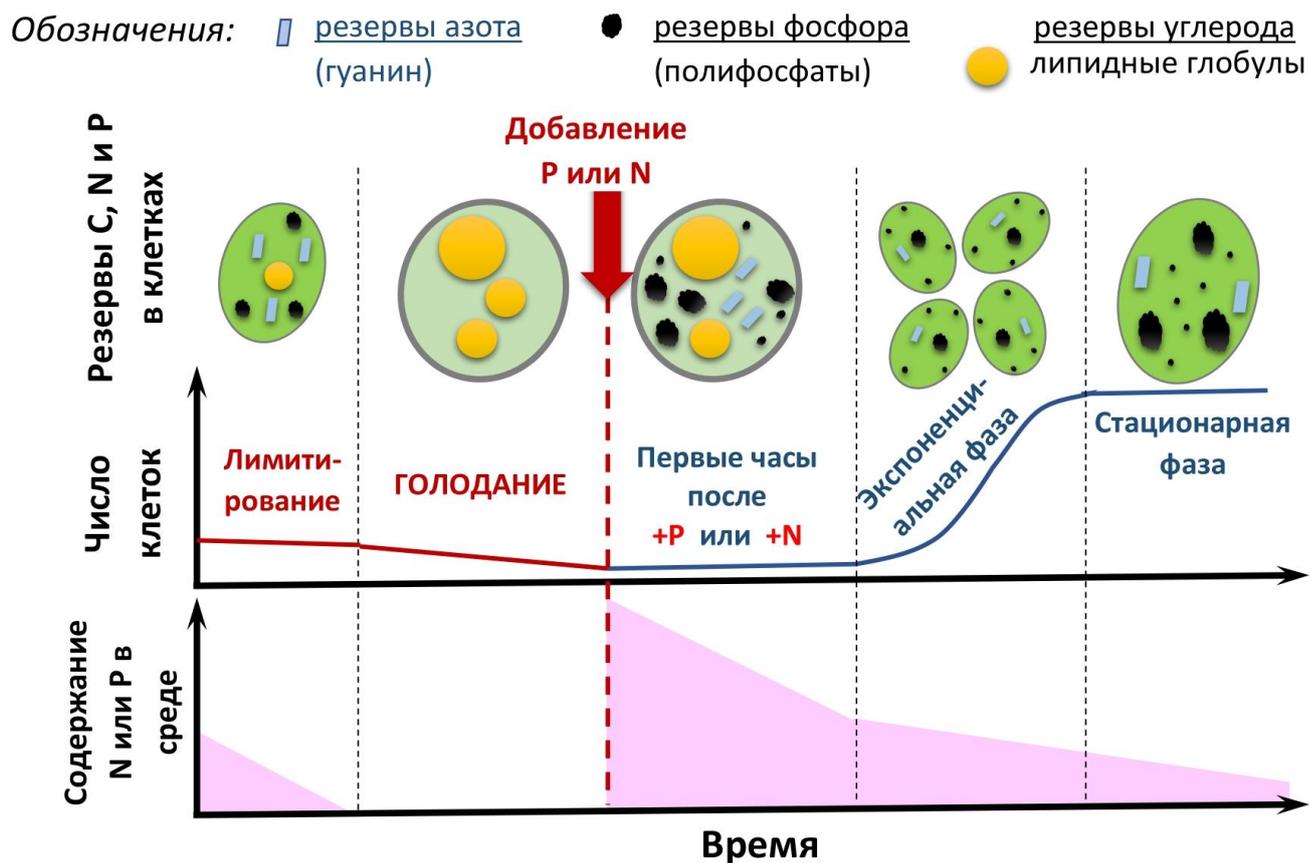


Рис. 44 Обобщенная схема формирования и расходования резервов азота и фосфора в клетках окислительных фототрофных микроорганизмов в зависимости от доступности этих элементов в среде культивирования

Разработанный метод позволяет анализировать ФоС- и АС-включения на субклеточном уровне, в том числе включения с размером менее 180 нм. Мы продемонстрировали применимость данного метода к различным микроорганизмам, включая эукариотические микроводоросли и цианобактерии. С помощью разработанного подхода охарактеризовали гетерогенность клеток в исследуемых культурах в отношении аккумуляции ими резервов фосфора и азота. Выяснили, что внутриклеточные резервы азота у исследуемых микроводорослей и цианобактерий занимают до 18,5% от площади клеток, а резервы фосфора – до 1,4%. Мы показали, что основные резервы фосфора в клетках исследуемых микроводорослей локализованы в вакуолях и (или) цитозоле. Предложенный нами метод является первым известным подходом к количественной оценке содержания и локализации АС- и ФоС-включений на ЭФПЭМ-картах с субклеточным разрешением. Таким образом, в представленной работе мы показали, что применение аналитической ПЭМ позволяет получать важную информацию о субклеточном распределении резервов азота и фосфора у фототрофных микроорганизмов.

Не менее важным этапом является стандартизация экспериментальных протоколов и обеспечение воспроизводимости наблюдаемых в отношении внутриклеточных включений эффектов. Это необходимо для понимания основных закономерностей, связывающих синтез и катаболизм резервов азота и фосфора с кинетическими и физиологическими параметрами роста культур и статусом их минерального питания. Значительное внимание этому уделялось и в нашей работе, а именно к стандартизации определения голодной по фосфору или азоту культуры клеток. Исследования формирования ФоС-включений в клетках микроводорослей при переходе от фосфорного голодания к избытку в среде неорганического фосфора, в том числе методом аналитической ПЭМ и независимыми методами, выявили, что в первые часы после добавления в среду фосфора в зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* происходит формирование полифосфатных ФоС-включений в результате избыточного поглощения фосфора. Выявленный феномен формирования ФоС-включений при восстановлении фосфорного питания обозначили в обобщенной схеме на рис. 44.

При этом анализ экспрессии генов *C. vulgaris* свидетельствовал о потенциальной вовлеченности в этот процесс гена, кодирующего VTC-подобный белок (полифосфат-полимераза, расположенную в мембране вакуоли), и дифференциального ответа транспортеров неорганического фосфата. При этом наблюдали снижение экспрессии типичного представителя секретируемых фосфатаз (пурпурной кислой фосфатазы).

Интересным фактом, впервые выявленным при анализе резервов фосфора в клетке микроводорослей, является наличие у вакуолярных ФоС-включений этих организмов характерной ультраструктурной организации («многожильный кабель»). Наряду с данными о дифференциальной экспрессии генов, упорядоченная структура ФоС-включений может свидетельствовать об участии в их биосинтезе регулируемых мультиферментных комплексов, а не только процессов спонтанной полимеризации и (или) кристаллизации. Полученные результаты также указывают на то, что формирование и структура ФоС-включений отражают функционирование механизмов акклимации микроводорослей к доступности фосфора в среде культивирования.

Анализ ФоС-включений в клетках цианобактерий методом аналитической ПЭМ при переходе от голодания к избытку фосфора в среде показал, что в первые часы после возобновления фосфорного питания в недiazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 и родственной ей diazотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 так же, как и в микроводорослях, происходит формирование ФоС-включений (обобщено на рис. 44). При этом мы впервые показали, что наличие/отсутствие экзогенного связанного азота в среде не влияет на

способность diaзотрофной цианобактерии формировать ФоС-включения в первые часы после добавления фосфора.

При исследовании АС-включений различных микроводорослей мы показали, что формирование АС-включений является общим свойством представителей различных групп микроводорослей, в том числе свободноживущих и симбиотических микроводорослей, а также различных семейств динофитовых и зеленых микроводорослей. С помощью метода микро-спектроскопии КР выяснили, что АС-включения микроводорослей *Desmodesmus* sp. и *Amphidinium carterae* являются пуриновыми кристаллами, а именно включениями гуанина. С использованием комбинированного подхода на основе аналитической ПЭМ и микро-спектроскопии КР, в настоящей работе впервые показано, что АС-включения микроводорослей действительно являются формой внутриклеточных резервов азота. В частности, установлено, что (i) при азотном голодании АС-включения метаболизируются клеткой; (ii) при переходе от азотного голодания к избытку неорганического азота в среде происходит быстрое формирование АС-включений; (iii) с помощью изотопной метки ^{15}N показан постепенный катаболизм и ресинтез АС-включений в процессе восстановления клетки после азотного голодания. Полученные результаты в отношении расходования и ресинтеза АС-включений микроводорослей также нашли свое отражение в обобщенной схеме на рис. 44. Важным результатом настоящей работы является вывод о потенциальном участии АС-включений в избыточном накоплении и запасании азота в клетках микроводорослей по аналогии с феноменом избыточного поглощения фосфора.

Таким образом, полученные результаты позволяют усовершенствовать методические подходы к исследованию внутриклеточных включений, обогащенных азотом и фосфором, в фототавтотрофной клетке методами аналитической ПЭМ. Результатом практического использования новых и усовершенствованных методических подходов стало углубленное понимание клеточной биологии фототрофных микроорганизмов в отношении роли внутриклеточных включений в процессах акклимации клеток микроводорослей к недостатку и избытку азота и фосфора в среде, а также уточнение механизмов избыточного поглощения и запасания этих элементов в клетках. Дальнейший прогресс в области микроскопии и понимание механизмов регуляции синтеза и катаболизма внутриклеточных включений дает надежду на расшифровку биологической роли этих структур в поддержании клеточного гомеостаза, а в перспективе — и на использование этих знаний в управлении метаболизмом клетки.

7. Выводы

1) Разработан метод, позволяющий оценивать субклеточное распределение и обилие резервов фосфора и азота в микроводорослях и цианобактериях на элементных ЭФПЭМ-картах.

2) Основные резервы азота у микроводорослей локализуются в вакуолях, у цианобактерий – в цитозоле. Основные резервы фосфора у микроводорослей локализуются в вакуолях и (или) цитозоле, а у цианобактерий – в цитозоле.

3) При восстановлении фосфорного питания в микроводоросли *Chlorella vulgaris* наблюдается формирование полифосфатных фосфорсодержащих включений, при этом вакуолярные фосфорсодержащие включения имеют характерную ультраструктурную организацию типа «многожильный кабель».

4) При восстановлении фосфорного питания у микроводоросли *Chlorella vulgaris* происходит временное увеличение экспрессии гена VTC-подобного белка, совпадающее по времени с формированием внутриклеточных фосфорсодержащих включений.

5) При восстановлении фосфорного питания у цианобактерий *Nostoc* sp. PCC 7118 и 7120 наблюдается формирование фосфорсодержащих включений. Наличие либо отсутствие связанного азота в среде не влияет на их формирование у diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120.

6) Азотсодержащие включения микроводорослей *Desmodesmus* sp. и *Amphidinium carterae* представляют собой включения гуанина, которые исчезают при инкубации клеток в отсутствие связанного азота и накапливаются при восстановлении азотного питания. Это свидетельствует о функционировании азотсодержащих включений микроводорослей в качестве внутриклеточных резервов азота.

8. Благодарности

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю профессору кафедры биоинженерии Алексею Евгеньевичу Соловченко за неоценимую помощь и содействие на всех этапах выполнения работы, за терпение и поддержку. Также выражаю искреннюю благодарность моим научным наставникам — сотрудникам кафедры биоинженерии Ольге Андреевне Гореловой и Ольге Ивановне Баулиной за всестороннюю помощь в учебе и в проведении исследований, за понимание, ценные советы и поддержку.

За приобретение первых навыков работы в лаборатории, за неоценимую помощь в освоении методов ПЭМ и аналитической ПЭМ выражаю огромную благодарность научному сотруднику кафедры биоинженерии Анастасии Сергеевне Шебановой.

Большую благодарность выражаю сотрудникам межкафедральной лаборатории электронной микроскопии — заведующему лабораторией Георгию Натановичу Давидовичу, ведущим инженерам Анатолию Георгиевичу Богданову и Андрею Владимировичу Моисеенко за возможность плодотворной работы на современном аналитическом просвечивающем электронном микроскопе.

Хотелось бы выразить особую признательность профессору кафедры биоинженерии Елене Сергеевне Лобаковой, сотрудникам кафедры биоинженерии Ирине Олеговне Селях, Ларисе Ратмировне Семеновой и Павлу Николаевичу Щербакову за возможность работы со штаммами микроводорослей и цианобактерий, культивируемых в лаборатории фотобиотехнологии кафедры биоинженерии. Огромную благодарность выражаю сотруднику юлихского исследовательского центра в Германии Ладиславу Недбалу за возможность работы со штаммом микроводоросли *Chlorella vulgaris* CCALA 256; сотруднику Карлова университета в Чехии Петеру Мойжешу за возможность работы со штаммом *Amphidinium carterae* NCMA CCMР1314; сотрудникам Университета Бен-Гуриона в Израиле Камиле Кокаби и Инне Хозин-Голдберг за возможность работы со штаммом *Lobosphaera incisa* SAG 2468.

Выражаю искреннюю благодарность сотруднику Института биоорганической химии Ильгару Зияддиновичу Мамедову, а также научным сотрудникам биологического факультета МГУ Ольге Валентиновне Карповой и Елизавете Николаевне Виноградовой за всестороннюю помощь и содействие при освоении мною методов молекулярной биологии. За помощь в освоении метода лазерной сканирующей микро-спектроскопии КР хочу поблагодарить сотрудника Карлова университета в Чехии Петера Мойжеша и аспирантку юлихского исследовательского центра в Германии Лу Гао.

За совместную работу выражаю огромную благодарность: сотруднику факультета фундаментальной медицины МГУ Польшакову Владимиру Ивановичу за проведение анализа образцов методом ЯМР; сотруднику университета Масарика (Чехия) Андрею Николаевичу Давыдову и сотруднику Института биоорганической химии Ивану Владимировичу Звягину за проведение секвенирования и сборку транскриптома *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1; сотруднику геологического факультета МГУ Андрею Юрьевичу Бычкову за проведение анализа образцов методом ИСП-МС.

Искренне благодарю коллектив кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ за поддержку в проведении исследований и дружеское участие.

В завершение благодарю свою семью и друзей за поддержку и терпение.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEFI61617X0080) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова, и уникальной научной установки "Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия" центра коллективного пользования МГУ.

9. Список литературы

- 1) Баулина, О.И. Ультраструктурная пластичность цианобактерий / О.И. Баулина. – М: Научный мир, 2010. – 239 с.
- 2) Буравков, С.В. Применение метода рентгеноспектрального локального микроанализа в биологии и медицине / С.В. Буравков, В.А. Шахмалов // Архив анат., гистол. и эмбриол. – 1983. – Т. 84. – № 4. – С. 95–107.
- 3) Горбунова, Н.П. Альгология / Н.П. Горбунова. – М.: Высш. шк., 1991. – 256 с.
- 4) Горелова, О.А. Зеленые микроводоросли, изолированные из ассоциаций с беспозвоночными Белого моря / О.А. Горелова, О.И. Баулина, А.Е. Соловченко, Т.А. Федоренко, Т.Р. Кравцова, О.Б. Чивкунова, О.А. Кокшарова, Е.С. Лобакова // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 4. – С. 546–548.
- 5) Кузнецов, Е.Д. Железо как фактор, лимитирующий рост *Chlorella* на среде Тамия / Е.Д. Кузнецов, М.Г. Владимирова // Физиология растений. – 1964. – Т. 11. – № 4. – С. 615–619.
- 6) Синдо, Д. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия / Д. Синдо, Т. Оикава. – М. : Техносфера, 2006. – 256 с.
- 7) Шебанова, А.С. Исследование нано- и биообъектов методами аналитической просвечивающей электронной микроскопии: дисс. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Шебанова Анастасия Сергеевна. – М., 2017. – 145 с.
- 8) Эгертон, Р. Физические принципы электронной микроскопии / Р. Эгертон. – М. : Техносфера, 2010. – 300 с.
- 9) Abeliovich, A.H. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds / A.H. Abeliovich, Y. Azov // Applied and Environmental Microbiology. – 1976. – V. 31. – № 6. – P. 801–806.
- 10) Adamec, J. Potassium in polyphosphate bodies of *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyceae) as determined by X-ray microanalysis / J. Adamec, J.H. Peverly, M.V. Parthasarathy // Journal of Phycology. – 1979. – V. 15. – P. 466–468.
- 11) Aitchison, P.A. The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris* / P.A. Aitchison, V.S. Butt // Journal of Experimental Botany. – 1973. – V. 24. – № 3. – P. 497–510.
- 12) Aksoy, M. Critical function of a *Chlamydomonas reinhardtii* putative polyphosphate polymerase subunit during nutrient deprivation / M. Aksoy, W. Pootakham, A.R. Grossman // Plant Cell. – 2014. – V. 26. – P. 4214–4229.
- 13) Albertano, P. Sub-cellular distribution of nitrogen compounds in *Azolla* and *Anabaena* by ESI and EELS analysis / P. Albertano, A. Canini, M.G. Caiola // Protoplasma. – 1993. – V. 173. – P. 158–169.
- 14) Alexander, H. Identifying reference genes with stable expression from high throughput sequence data / H. Alexander, B.D. Jenkins, T.A. Rynearson, M.A. Saito, M.L. Mercier, S.T. Dyhrman // Frontiers in microbiology. – 2012. – V. 3. – P. 385.

- 15) Allen, M.M. Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308 / M.M. Allen, F. Hutchison // Archives of microbiology. – 1980. – V. 128. – P. 1–7.
- 16) Allen, M.M. Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308 / M.M. Allen, F.R. Hutchison, P.J. Weathers // Journal of bacteriology. – 1980. – V. 141. – № 2. – P. 687–693.
- 17) Allen, M.M. Cyanobacterial cell inclusions / M.M. Allen // Annual Reviews in Microbiology. – 1984. – V. 38. – P. 1–25.
- 18) Altschul, S. Basic local alignment search tool / S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. Myers, D. Lipman // Journal of molecular biology. – 1990. – V. 215. – № 3. – P. 403–410.
- 19) Arriola, M.B. Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga / M.B. Arriola, N. Velmurugan, Y. Zhang, M.H. Plunkett, H. Hondzo, B.M. Barney // The Plant Journal. – 2018. – V. 3. – P. 566–586.
- 20) Aronova, M.A. Development of electron energy-loss spectroscopy in the biological sciences / M.A. Aronova, R.D. Leapman // MRS bulletin. – 2012. – V. 37. – № 1. – P. 53–62.
- 21) Ashihara, H. Purine salvage in plants / H. Ashihara, C. Stasolla, T. Fujimura, A. Crozier // Phytochemistry. – 2018. – V. 147. – P. 89–124.
- 22) Aslan, S. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae / S. Aslan, I.K. Kapdan // Ecological engineering. – 2006. – V. 28. – № 1. – P. 64–70.
- 23) Atlas, E. Phosphate association with Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ in seawater / E. Atlas, C. Culbertson, R. Pytkowicz // Mar. Chem. – 1976. – V. 4. – P. 243–254.
- 24) Barlow, D.J. Effect of phosphate concentration on the fine structure of the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin / D.J. Barlow, W.L. van Rensburg, A.J. Pieterse, J.N. Eloff // Journal of the Limnological Society of southern Africa. – 1979. – V. 5. – № 2. – P. 79–83.
- 25) Barsanti, L. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology / L. Barsanti, P. Gualtieri. – Boca Raton : CRC Press, 2006. – 361 p.
- 26) Baxter, M. A study of methods for in situ X-ray energy dispersive analysis of polyphosphate bodies in *Plectonema boryanum* / M. Baxter, T. Jensen // Archives of microbiology. – 1980a. – V. 126. – № 3. – P. 213–215.
- 27) Baxter, M. Uptake of magnesium, strontium, barium, and manganese by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) with special reference to polyphosphate bodies / M. Baxter, T. Jensen // Protoplasma. – 1980b. – V. 104. – P. 81–89.
- 28) Bennett, E. A broken biogeochemical cycle / E. Bennett, J. Elser // Nature. – 2011. – V. 478. – P. 29–31.
- 29) Berner, T. Ultrastructure of microalgae / T. Berner. – Boca Raton: CRC Press, 1993. – 320 p.

- 30) Blanc, G. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex / G. Blanc, G. Duncan, I. Agarkova, M. Borodovsky, J. Gurnon, A. Kuo, E. Lindquist, S. Lucas, J. Pangilinan, J. Polle, A. Salamov // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22. – № 9. – P. 2943–2455.
- 31) Bogen, C. Reconstruction of the lipid metabolism for the microalga *Monoraphidium neglectum* from its genome sequence reveals characteristics suitable for biofuel production / C. Bogen, A. Al-Dilaimi, A. Albersmeier, J. Wichmann, M. Grundmann, O. Rupp, K.J. Lauersen, O. Blifernez-Klassen, J. Kalinowski, A. Goesmann, J.H. Mussnug // *BMC genomics*. – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 926.
- 32) Bothe, H. Nitrogen Fixation / H. Bothe // *The Biology of Cyanobacteria*. / N.G. Carr, B.A. Whitton. – Los Angeles, CA : University of California Press, 1982. – P. 87–105.
- 33) Boussiba, S. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* / S. Boussiba, A. Vonshak // *Plant and cell Physiology*. – 1991. – V. 32. – № 7. – P. 1077–1082.
- 34) Bozzo, G.G. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures / G.G. Bozzo, K.G. Raghothama, W.C. Plaxton // *European Journal of Biochemistry*. – 2002. – V. 269. – № 24. – P. 6278–6286.
- 35) Bozzo, G.G. Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures / G.G. Bozzo, K.G. Raghothama, W.C. Plaxton // *Biochemical Journal*. – 2004. – V. 377. – № 2. – P. 419–428.
- 36) Brydson, R. Analytical transmission electron microscopy / R. Brydson, A. Brown, L.G. Benning, K. Livi // *Rev Mineral Geochem*. – 2014. – V. 78. – P. 219–269.
- 37) Cai, T. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects / T. Cai, S.Y. Park, Y. Li // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2013. – V. 19. – P. 360–369.
- 38) Carpenter, S.R. Eutrophication of aquatic ecosystems: bistability and soil phosphorus / S.R. Carpenter // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – № 29. – P. 10002–10005.
- 39) Cassman, K.G. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management / K.G. Cassman, A. Dobermann, D.T. Walters // *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. – 2002. – V. 31. – № 2. – P. 132–140.
- 40) Cembella, A.D. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 2 / A.D. Cembella, N.J. Antia, P.J. Harrison, G.Y. Rhee // *CRC Critical Reviews in Microbiology*. – 1984. – V. 11. – № 1. – P. 13–81.
- 41) Chang, C.I. A relative entropy-based approach to image thresholding / C.I. Chang, K. Chen, J. Wang, M.L. Althouse // *Pattern recognition*. – 1994. – V. 27. – P. 1275–1289.
- 42) Chang, C.W. The LPB1 gene is important for acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to phosphorus and sulfur deprivation / C.W. Chang, J.L. Moseley, D. Wykoff, A.R. Grossman // *Plant physiology*. – 2005. – V. 138. – № 1. – P. 319–329.

- 43) Chi, Z. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process / Z. Chi, Y. Zheng, A. Jiang, S. Chen // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2011. – V. 165. – № 2. – P. 442–453.
- 44) Chinnasamy, S. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications / S. Chinnasamy, A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das // *Bioresource technology*. – 2010. – V. 101. – № 9. – P. 3097–3105.
- 45) Chisholm, S.W. Phosphate uptake kinetics in *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) grown on light/dark cycles. I. Synchronized batch cultures / S.W. Chisholm, R.G. Stross // *Journal of Phycology*. – 1976. – V. 12. – № 2. – P. 210–207.
- 46) Chokshi, K. Microalgal biomass generation by phycoremediation of dairy industry wastewater: an integrated approach towards sustainable biofuel production / K. Chokshi, I. Pancha, A. Ghosh, S. Mishra // *Bioresource technology*. – 2016. – V. 221. – P. 455–460.
- 47) Choudhury, A.T. Nitrogen fertilizer losses from rice soils and control of environmental pollution problems / A.T. Choudhury, I.R. Kennedy // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. – 2005. – V. 36. – P. 1625–1639.
- 48) Clode, P.L. Uric acid deposits in symbiotic marine algae / P.L. Clode, M. Saunders, G. Maker, M. Ludwig, C.A. Atkins // *Plant, cell & environment*. – 2009. – V. 32. – P. 170–177.
- 49) Cordell, D. The story of phosphorus: global food security and food for thought / D. Cordell, J.O. Drangert, S. White // *Global environmental change*. – 2009. – V. 19. – № 2. – P. 292–305.
- 50) Craggs, R.J. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway / R.J. Craggs, P.J. McAuley, V.J. Smith // *Water Research*. – 1997. – V. 31. – № 7. – P. 1701–1707.
- 51) De-Bashan, L.E. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003) / L.E. De-Bashan, Y. Bashan // *Water research*. – 2004. – V. 38. – № 19. – P. 4222–4246.
- 52) De Mazancourt, C. Starve a competitor: evolution of luxury consumption as a competitive strategy / C. De Mazancourt, M.W. Schwartz // *Theor. Ecol.* – 2012. – V. 5. – P. 37–49.
- 53) Del Pozo, J.C. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions / J.C. Del Pozo, I. Allona, V. Rubio, A. Leyva, A. De La Peña, C. Aragoncillo, J. Paz-Ares // *The Plant Journal*. – 1999. – V. 19. – № 5. – P. 579–589.
- 54) DeSa, R. The characterization of scintillons: Bioluminescent particles from the marine dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* / R. DeSa, J.W. Hastings // *The Journal of general physiology*. – 1968. – V. 51. – № 1. – P. 105–122.
- 55) Desfougères, Y. Vtc5, a novel subunit of the vacuolar transporter chaperone complex, regulates polyphosphate synthesis and phosphate homeostasis in yeast / Y. Desfougères, R. Gerasimaitė, H.J. Jessen, A. Mayer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V. 291. – № 42. – P. 22262–22275.

- 56) Diaz, R.J. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems / R.J. Diaz, R. Rosenberg // *Science*. – 2008. – V. 321. – № 5891. – P. 926–929.
- 57) Dignum, M. Nutrient limitation of freshwater cyanobacteria / M. Dignum, H.C. Matthijs, R. Pel, H.J. Laanbroek, L.R. Mur // *Harmful cyanobacteria* / J. Huisman, H.C.P. Matthijs, P.M. Visser. – Dordrecht : Springer, 2005. – P. 65–86.
- 58) Dincer, I. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability / I. Dincer, C. Acar // *International journal of hydrogen energy*. – 2015. – V. 40. – № 34. – P. 11094–11111.
- 59) Donald, K.M. Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* / K.M. Donald, D.J. Scanlan, N.G. Carr, N.H. Mann, I. Joint // *Journal of plankton research*. – 1997. – V. 19. – № 12. – P. 1793–1813.
- 60) Dresselhaus, M.S. Alternative energy technologies / M.S. Dresselhaus, I.L. Thomas // *Nature*. – 2001. – V. 414. – № 6861. – P. 332–337.
- 61) Dyhrman, S.T. The identification and purification of a cell-surface alkaline phosphatase from the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) / S.T. Dyhrman, B.P. Palenik // *J Phycol*. – 1997. – V. 33. – P. 602–612.
- 62) Dyhrman, S.T. Long serial analysis of gene expression for gene discovery and transcriptome profiling in the widespread marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* / S.T. Dyhrman, S.T. Haley, S.R. Birkeland, L.L. Wurch, M.J. Cipriano, A.G. McArthur // *Appl Environ Microbiol*. – 2006. – V. 72. – P. 252–260.
- 63) Dyhrman, S.T. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response / S.T. Dyhrman, B.D. Jenkins, T.A. Rynearson, M.A. Saito, M.L. Mercier, H. Alexander, L.P. Whitney, A. Drzewianowski, V.V. Bulygin, E.M. Bertrand, Z.J. Wu, C. Benitez-Nelson, A. Heithoff // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – P. e33768.
- 64) Dyhrman, S.T. Nutrients and their acquisition: phosphorus physiology in microalgae / S.T. Dyhrman // *The physiology of microalgae. Developments in Applied Phycology*, vol 6. / M. Borowitzka, J. Beardall, J. Raven. – Cham : Springer, 2016. – P. 155–183.
- 65) Egerton, R.F. Electron energy-loss spectroscopy in the TEM / R.F. Egerton // *Reports on Progress in Physics*. – 2009. – V. 72. – № 1. – P. 016502.
- 66) Erickson, N.A. A rapid and sensitive method for the analysis of cyanophycin / N.A. Erickson, N.H. Kolodny, M.M. Allen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2001. – V. 1526. – P. 5–9.
- 67) Erisman, J.W. How a century of ammonia synthesis changed the world / J.W. Erisman, M.A. Sutton, J. Galloway, Z. Klimont, W. Winiwarter // *Nature Geoscience*. – 2008. – V. 1. – № 10. – P. 636–639.
- 68) Fay, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria / P. Fay // *Microbiological reviews*. – 1992. – V. 56. – № 2. – P. 340–373.

- 69) Fogel, M. On the physical identity of scintillons: bioluminescent particles in *Gonyaulax polyedra* / M. Fogel, R.E. Schmitter, J.W. Hastings // Journal of Cell Science. – 1972. – V. 11. – № 1. – P. 305–317.
- 70) Gao, C. Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes / C. Gao, Y. Wang, Y. Shen, D. Yan, X. He, J. Dai, Q. Wu // BMC genomics. – 2014. – V. 15. – № 1. – P. 582.
- 71) Garcia-Gonzalez, J. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus* / J. Garcia-Gonzalez, M. Sommerfeld // Journal of applied phycology. – 2016. – V. 28. – № 2. – P. 1051–1061.
- 72) Gomes, F.M. New insights into the in situ microscopic visualization and quantification of inorganic polyphosphate stores by 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-staining / F.M. Gomes, I.B. Ramos, C. Wendt, W. Girard-Dias, W. De Souza, E.A. Machado, E.A. Miranda // European journal of histochemistry: EJH. – 2013. – V. 57. – № 4. – P. e34.
- 73) Gómez-García, M.R. Concurrent transcriptional activation of *ppa* and *ppx* genes by phosphate deprivation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 / M.R. Gómez-García, M. Losada, A. Serrano // Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – V. 302. – № 3. – P. 601–609.
- 74) Gómez-García, M.R. The role of polyphosphate in thermophilic *Synechococcus* sp. from microbial mats / M.R. Gómez-García, F. Fazeli, A. Grote, A.R. Grossman, D. Bhaya // Journal of bacteriology. – 2013. – V. 195. – № 15. – P. 3309–3319.
- 75) Gerasimaitė, R. Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity / R. Gerasimaitė, S. Sharma, Y. Desfougeres, A. Schmidt, A. Mayer // J Cell Sci. – 2014. – V. 127. – P. 5093–5104.
- 76) Gerasimaitė, R. Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles / R. Gerasimaitė, A. Mayer // Biochemical Society Transactions. – 2016. – V. 44. – № 1. – P. 234–239.
- 77) Gerland, P. World population stabilization unlikely this century / P. Gerland, A.E. Raftery, H. Ševčíková, N. Li, D. Gu, T. Spoorenberg, L. Alkema, B.K. Fosdick, J. Chunn, N. Lalic, G. Bay // Science. – 2014. – V. 10. – № 6206. – P. 234–237.
- 78) Götz, S. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite / S. Götz, J. García-Gómez, J. Terol, T. Williams, S. Nagaraj, M. Nueda, M. Robles, M. Talón, J. Dopazo, A. Conesa // Nucleic acids research. – 2008. – V. 36. – № 10. – P. 3420–3435.
- 79) Gobler, C.J. Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics / C.J. Gobler, D.L. Berry, S.T. Dyhrman, S.W. Wilhelm, A. Salamov, A.V. Lobanov, Y. Zhang, J.L. Collier, L.L. Wurch, A.B. Kustka, B.D. Dill // Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – V. 108. – P. 4352–4357.
- 80) Golecki, J.R. Ultrastructural and electron spectroscopic analyses of cyanobacteria and bacteria / J.R. Golecki, U.R. Heinrich // Journal of microscopy. – 1991. – V. 162. – № 1. – P. 147–154.

- 81) Goldberg, J. Quantitative analysis of the elemental composition and the mass of bacterial polyphosphate bodies using STEM EDX / J. Goldberg, H. Gonzalez, T.E. Jensen, W.A. Corpe // *Microbios.* – 2001. – V. 106. – P. 177–188.
- 82) González, L.E. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* / L.E. González, R.O. Cañizares, S. Baena // *Bioresource Technology.* – 1997. – V. 60. – № 3. – P. 259–262.
- 83) Gopalakrishnan, S. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities / S. Gopalakrishnan, A. Sathya, R. Vijayabharathi, R.K. Varshney, C.L. Gowda, L. Krishnamurthy // *Biotech.* – 2015. – V. 5. – № 4. – P. 355–377.
- 84) Gorelova, O.A. Formation of giant and ultramicroscopic forms of *Nostoc muscorum* CALU 304 during cocultivation with *Rauwolfia* tissues / O.A. Gorelova, T.G. Korzhenevskaya // *Microbiology.* – 2002. – V. 71. – P. 563–569.
- 85) Gorelova, O.A. The accumulation and degradation dynamics of cyanophycin in cyanobacterial cells grown in symbiotic associations with plant tissues and cells / O.A. Gorelova, S.Y. Kleimenov // *Microbiology.* – 2003. – V. 72. – P. 318–326.
- 86) Gorelova, O. Coordinated rearrangements of assimilatory and storage cell compartments in a nitrogen-starving symbiotic chlorophyte cultivated under high light / O. Gorelova, O. Baulina, A. Solovchenko, I. Selyakh, O. Chivkunova, L. Semenova, P. Scherbakov, O. Burakova, E. Lobakova // *Arch Microbiol.* – 2015. – V. 197. – P. 181–195.
- 87) Gorelova, O. Stress-induced changes in the ultrastructure of the photosynthetic apparatus of green microalgae / O. Gorelova, O. Baulina, T. Ismagulova, K. Kokabi, E. Lobakova, I. Selyakh, L. Semenova, O. Chivkunova, O. Karpova, P. Scherbakov, I. Khozin-Goldberg, A. Solovchenko // *Protoplasma.* – 2018. – V. 256. – №1. – P. 261–277.
- 88) Grillo, J.F. Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* / J.F. Grillo, J. Gibson // *Journal of bacteriology.* – 1979. – V. 140. – № 2. – P. 508–517.
- 89) Grobbelaar, J.U. Algal nutrition — mineral nutrition / J.U. Grobbelaar // *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* / ed A. Richmond. – Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd, 2004. – P. 97–115.
- 90) Grobbelaar, J.U. Inorganic algal nutrition / J.U. Grobbelaar // *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2 ed. / A. Richmond, Q. Hu. – Chichester, UK : John Wiley and Sons, 2013. – P. 123–133.
- 91) Grossman, A.R. Algae in a phosphorus-limited landscape / A.R. Grossman, M. Aksoy // *Annu. Plant Rev.* – 2015. – V. 20. – № 48. – P. 337–374.
- 92) Grossman, A. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions / A. Grossman, H. Takahashi // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 163–210.

- 93) Guillard, R. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran / R. Guillard, J. Ryther // Canadian journal of microbiology. – 1962. – V. 8. – № 2. – P. 229–239.
- 94) Hafez, R.M. Uric acid in plants and microorganisms: Biological applications and genetics-A review / R.M. Hafez, T.M. Abdel-Rahman, R.M. Naguib // Journal of advanced research. – 2017. – V. 8. – № 5. – P. 475–486.
- 95) Hase, S. A preliminary note on the phosphorus compounds in chloroplasts and volutin granules isolated from *Chlorella* cells / S. Hase, S. Miyachi, S. Mihara // Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. – Tokyo : University of Tokyo Press, 1963. – P. 619.
- 96) Heintzmann, R. Breaking the resolution limit in light microscopy / R. Heintzmann, G. Ficz // Briefings in Functional Genomics. – 2006. – V. 5. – P. 289–301.
- 97) Hoiczyk, E. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope / E. Hoiczyk, A. Hansel // Journal of bacteriology. – 2000. – V. 182. – № 5. – P. 1191–1199.
- 98) Hothorn, M. Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase / M. Hothorn, H. Neumann, E.D. Lenherr, M. Wehner, V. Rybin, P.O. Hassa, A. Uttenweiler, M. Reinhardt, A. Schmidt, J. Seiler, A.G. Ladurner, C. Herrmann, K. Scheffzek, A. Mayer // Science. – 2009. – V. 324. – P. 513–516.
- 99) Hejazi, M. Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases / M. Hejazi, K. Piotukh, J. Mattow, R. Deutzmann, R. Volkmer-Engert, W. Lockau // Biochem J. – 2002. – V. 364. – P. 129–136.
- 100) Hernandez, J.P. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense* / J.P. Hernandez, L.E. de-Bashan, Y. Bashan // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – V. 38. – P. 190–198.
- 101) Hongyang, S. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater / S. Hongyang, Z. Yalei, Z. Chunmin, Z. Xuefei, L. Jinpeng // Bioresource Technology. – 2011. – V. 102. – № 21. – P. 9884–9890.
- 102) Howarth, R.W. Molybdenum availability, nitrogen limitation, and phytoplankton growth in natural waters / R.W. Howarth, J.J. Cole // Science. – 1985. – V. 229. – P. 653–655.
- 103) Hupfer, M. Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments / M. Hupfer, S. Glöss, P. Schmieder, H.P. Grossart // International Review of Hydrobiology. – 2008. – V. 93. – P. 1–30.
- 104) Ismagulova, T. A new subarctic strain of *Tetrademus obliquus*—part I: identification and fatty acid profiling / T. Ismagulova, K. Chekanov, O. Gorelova, O. Baulina, L. Semenova, I. Selyakh, O. Chivkunova, E. Lobakova, O. Karpova, A. Solovchenko // Journal of Applied Phycology. – 2017. – <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1313-1>.
- 105) Ismagulova, T. A new simple method for quantification and locating P and N reserves in microalgal cells based on energy-filtered transmission electron microscopy (EFTEM) elemental maps / T. Ismagulova, A. Shebanova, O. Gorelova, O. Baulina, A. Solovchenko // PloS one. – 2018. – V. 13. – № 12. – P. e0208830.

- 106) Jacobson, L. Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* / L. Jacobson, M. Halmann // Journal of Plankton Research. – 1982. – V. 4. – № 3. – P. 481–488.
- 107) Jäger, K.M. Sub-cellular element analysis of a Cyanobacterium (*Nostoc* sp.) in symbiosis with *Gunnera manicata* by ESI and EELS / K.M. Jäger, C. Johansson, U. Kunz, H. Lehmann // Plant Biology. – 1997. – V. 110. – P. 151–157.
- 108) Jansson, M. Uptake, exchange and excretion of orthophosphate in phosphate-starved *Scenedesmus quadricauda* and *Pseudomonas* K7 / M. Jansson // Limnology and Oceanography. – 1993. – V. 38. – № 6. – P. 1162–1178.
- 109) Jensen, T.E. Phosphate metabolism in blue-green algae. I. Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum* / T.E. Jensen, L.M. Sicko // Canadian journal of microbiology. – 1974. – V. 20. – № 9. – P. 1235–1239.
- 110) Jensen, T.E. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study / T.E. Jensen, M. Baxter, J.W. Rachlin, V. Jani // Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological. – 1982a. – V. 27. – № 2. – P. 119–127.
- 111) Jensen, T.E. An X-ray energy dispersive study of cellular compartmentalization of lead and zinc in *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta), *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* (Bacillariophyta) / T.E. Jensen, J.W. Rachlin, V. Jani, B. Warkentine // Environmental and Experimental Botany. – 1982b. – V. 22. – № 3. – P. 319–328.
- 112) Ji, N. Screening for suitable reference genes for quantitative real-time PCR in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) / N. Ji, L. Li, L. Lin, S. Lin // PloS one. – 2015. – V. 10. – № 7. – P. e0132183.
- 113) Joentgen, W. Polyaspartic acid homopolymers and copolymers, biotechnical production and use thereof / W. Joentgen, T. Groth, A. Steinbüchel, T. Hai, F.B. Oppermann // International Patent Application WO 98/39090. – 1998.
- 114) Jones, P. InterProScan 5: genome-scale protein function classification / P. Jones, D. Binns, H. Chang, M. Fraser, W. Li, C. McAnulla, H. McWilliam, J. Maslen, A. Mitchell, G. Nuka, S. Pesseat // Bioinformatics. – 2014. – V. 30. – № 9. – P. 1236–1240.
- 115) Kapur, J.N. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram / J.N. Kapur, P.K. Sahoo, A.K. Wong // Computer vision, graphics, and image processing. – 1985. – V. 29. – P. 273–285.
- 116) Kessel, M. Identification of a phosphorus-containing storage granule in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* by electron microscope x-ray microanalysis / M. Kessel // Journal of bacteriology. – 1977. – V. 129. – № 3. – P. 1502–1505.
- 117) Khan, M. Effect of L-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06 / M. Khan, N. Yoshida // Bioresource technology. – 2008. – V. 99. – № 3. – P. 575–582.
- 118) Khudyakov, I. Unicellular mutant of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7118 / I. Khudyakov, A. Pinevich // Mikrobiologiya. – 1991. – V. 60. – P. 704–708.

- 119) Kobayashi, I. Insertional mutagenesis in a homologue of a P_i transporter gene confers arsenate resistance on *Chlamydomonas* / I. Kobayashi, S. Fujiwara, K. Shimogawara, T. Kaise, H. Usuda, M. Tsuzuki // Plant and cell physiology. – 2003. – V. 44. – № 6. – P. 597–606.
- 120) Kokabi, K. Metabolomic foundation for differential responses of lipid metabolism to nitrogen and phosphorus deprivation in an arachidonic acid-producing green microalga / K. Kokabi, O. Gorelova, T. Ismagulova, M. Itkin, S. Malitsky, S. Boussiba, A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg // Plant Science. – 2019. – V. 283. – P. 95–115.
- 121) Komine, Y. Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components / Y. Komine, L.L. Eggink, H. Park, J.K. Hooper // Planta. – 2000. – V. 210. – № 6. – P. 897–905.
- 122) Kong, Q.X. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production / Q.X. Kong, L. Li, B. Martinez, P. Chen, R. Ruan // Applied biochemistry and Biotechnology. – 2010. – V. 160. – № 1. – P. 9–18.
- 123) Koop, A. Identification and localization of cyanophycin in bacteria cells via imaging of the nitrogen distribution using energy-filtering transmission electron microscopy / A. Koop, I. Voss, A. Thesing, H. Kohl, R. Reichelt, A. Steinbüchel // Biomacromolecules. – 2007. – V. 8. – P. 2675–2683.
- 124) Kopp, C. Highly dynamic cellular-level response of symbiotic coral to a sudden increase in environmental nitrogen / C. Kopp, M. Pernice, I. Domart-Coulon, C. Djediat, J.E. Spangenberg, D.T. Alexander, M. Hignette, T. Meziane, A. Meibom // MBio. – 2013. – V. 4. – № 3. – P. e00052–13.
- 125) Korzhenevskaya, T.G. Accumulation of reserve polymers by *Nostoc muscorum* CALU 304 cells grown in mixed culture with plant tissue / T.G. Korzhenevskaya, O.A. Gorelova, O.I. Baulina, M.V. Gusev // Microbiology. – 1999. – V. 68. – P. 158–163.
- 126) Kuhl, A. Phosphorus / A. Kuhl // Algal Physiology and Biochemistry / W.D.P. Stewart. – Oxford : Blackwell Scientific, 1974. – P. 636–654.
- 127) Kulaev, I.S. The biochemistry of inorganic polyphosphates / I.S. Kulaev, V. Vagabov, T. Kulakovskaya. – Chichester, England : John Wiley & Sons, 2004. – 277 p.
- 128) Kulakova, A.N. Direct quantification of inorganic polyphosphate in microbial cells using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) / A.N. Kulakova, D. Hobbs, M. Smithen, E. Pavlov, J.A. Gilbert, J.P. Quinn, J.W. McGrath // Environmental science & technology. – 2011. – V. 45. – P. 7799–7803.
- 129) Kumar, K. Cyanobacterial heterocysts / K. Kumar, R.A. Mella-Herrera, J.W. Golden // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2010. – V. 24. – P. a000315.
- 130) Kunasundari, B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // Express Polymer Letters. – 2011. – V. 5. – № 7. – P. 620–634.
- 131) Lawry, N.H. The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae / N.H. Lawry, R.D. Simon // J Phycol. – 1982. – V. 18. – P. 391–399.

- 132) Lazinsky, D. Morphometric analysis of phosphate and chromium interactions in *Cyclotella meneghiniana* / D. Lazinsky, L. Sicko-Goad // Aquatic toxicology. – 1990. – V. 16. – P. 127–139.
- 133) Lee, S.S. Entropy thresholding and its parallel algorithm on the reconfigurable array of processors with wider bus networks / S.S. Lee, S.J. Horng, H.R. Tsai // IEEE Transactions on Image Processing. – 1999. – V. 8. – P. 1229–1242.
- 134) Lee, K. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae / K. Lee, C.G. Lee // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2001. – V. 6. – № 3. – P. 194–199.
- 135) Lehninger, A. Lehninger principles of biochemistry / A. Lehninger, L. Nelson, M. Cox. – New York : Worth Publishers, 2000. – 1119 p.
- 136) Lewis, B.A. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles / B.A. Lewis, D.M. Engelman // Journal of molecular biology. – 1983. – V. 166. – № 2. – P. 211–217.
- 137) Lewis, J. A study of newly excysted cells of *Gonyaulax polyedra* (Dinophyceae) by electron microscopy / J. Lewis, P. Burton // British Phycological Journal. – 1988. – V. 23. – № 1. – P. 49–60.
- 138) Li, Y. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production / Y. Li, Y.F. Chen, P. Chen, M. Min, W. Zhou, B. Martinez, J. Zhu, R. Ruan // Bioresource technology. – 2011. – V. 102. – № 8. – P. 5138–5144.
- 139) Livingstone, D. Influence of phosphorus on morphology of *Calothrix parietina* (Cyanophyta) in culture / D. Livingstone, B.A. Whitton // British Phycological Journal. – 1983. – V. 18. – № 1. – P. 29–38.
- 140) López-Gomollón, S. Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons / S. López-Gomollón, J.A. Hernandez, S. Pellicer, V.E. Angarica, M.L. Peleato, M.F. Fillat // Journal of molecular biology. – 2007. – V. 374. – № 1. – P. 267–281.
- 141) Lorenz, B. Methods for investigation of inorganic polyphosphates and polyphosphate-metabolizing enzymes / B. Lorenz, H.C. Schröder // Inorganic polyphosphates / H.C. Schröder, W.E.G. Müller. – Berlin, Heidelberg : Springer, 1999. – P. 217–239.
- 142) Luo, L.Z. Nutrient removal from piggery wastewater by *Desmodesmus* sp. CHX1 and its cultivation conditions optimization / L.Z. Luo, Y. Shao, S. Luo, F.J. Zeng, G.M. Tian // Environmental technology. – 2018. – <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1449903>.
- 143) Lv, J. Nutrients removal from undiluted cattle farm wastewater by the two-stage process of microalgae-based wastewater treatment / J. Lv, Y. Liu, J. Feng, Q. Liu, F. Nan, S. Xie // Bioresource technology. – 2018. – V. 264. – P. 311–318.
- 144) Maestrini, S.Y. Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae / S.Y. Maestrini, J.M. Robert, J.W. Leftley, Y. Collos // Journal of experimental marine Biology and Ecology. – 1986. – V. 102. – № 1. – P. 75–98.

- 145) Mahanty, T. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development / T. Mahanty, S. Bhattacharjee, M. Goswami, P. Bhattacharyya, B. Das, A. Ghosh, P. Tribedi // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2017. – V. 24. – № 4. – P. 3315–3335.
- 146) Majed, N. Advances in techniques for phosphorus analysis in biological sources / N. Majed, Y. Li, A.Z. Gu // *Current opinion in biotechnology*. – 2012. – V. 23. – P. 852–859.
- 147) Mackerras, A.H. Transient accumulation of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308 / A.H. Mackerras, N.M. de Chazal, G.D. Smith // *J Gen Microbiol*. – 1990. – V. 136. – P. 2057–2065.
- 148) Markou, G. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review / G. Markou, D. Georgakakis // *Applied Energy*. – 2011. – V. 88. – № 10. – P. 3389–4301.
- 149) McGrath, J.W. Microbial phosphate removal and polyphosphate production from wastewaters / J.W. McGrath, J.P. Quinn // *Adv. Appl. Microbiol*. – 2003. – V. 52. – P. 75–100.
- 150) Miller, S.S. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin / S.S. Miller, J. Liu, D.L. Allan, C.J. Menzhuber, M. Fedorova, C.P. Vance // *Plant Physiology*. – 2001. – V. 127. – № 2. – P. 594–606.
- 151) Miyachi, S. Modes of formation of phosphate compounds and their turnover in *Chlorella* cells during the process of life cycle as studied by the technique of synchronous culture / S. Miyachi, S. Miyachi // *Plant Cell Physiol*. – 1961. – V. 2. – P. 415–424.
- 152) Miyachi, S. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells / S. Miyachi, H. Tamiya // *Plant Cell Physiol*. – 1961a. – V. 2. – P. 405–414.
- 153) Miyachi, S. Some observations on the phosphorus metabolism in growing *Chlorella* cells / S. Miyachi, H. Tamiya // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1961b. – V. 46. – P. 200–202.
- 154) Miyachi, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells / S. Miyachi, R. Kanai, S. Mihara, S. Miyachi, S. Aoki // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1964. – V. 93. – P. 625–634.
- 155) Moseley, J.L. Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii* / J.L. Moseley, C.W. Chang, A.R. Grossman // *Eukaryotic cell*. – 2006. – V. 5. – № 1. – P. 26–44.
- 156) Moudříková, Š. Raman and fluorescence microscopy sensing energy-transducing and energy-storing structures in microalgae / Š. Moudříková, P. Mojžeš, V. Zachleder, C. Pfaff, D. Behrendt, L. Nedbal // *Algal Research*. – 2016. – V. 16. – P. 224–232.
- 157) Moudříková, Š. Raman microscopy shows that nitrogen-rich cellular inclusions in microalgae are microcrystalline guanine / Š. Moudříková, L. Nedbal, A. Solovchenko, P. Mojžeš // *Algal Research*. – 2017a. – V. 23. – P. 216–222.
- 158) Moudříková, S. Quantification of polyphosphate in microalgae by Raman microscopy and by a reference enzymatic assay / S. Moudříková, A. Sadowsky, S. Metzger, L. Nedbal, T. Mettler-Altmann, P. Mojžeš // *Analytical Chemistry*. – 2017b. – V. 89. – P. 12006–12013.

- 159) Müller, O. The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V_0 trans-complex formation / O. Müller, M.J. Bayer, C. Peters, J.S. Andersen, M. Mann, A. Mayer // *The EMBO Journal*. – 2002. – V. 21. – P. 259–269.
- 160) Müller, O. Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking / O. Müller, H. Neumann, M.J. Bayer, A. Mayer // *Journal of Cell Science*. – 2003. – V. 116. – P. 1107–1115.
- 161) Mujtaba, G. Removal of nutrients and COD through co-culturing activated sludge and immobilized *Chlorella vulgaris* / G. Mujtaba, M. Rizwan, G. Kim, K. Lee // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – V. 343. – P. 155–162.
- 162) Mulbry, W. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer / W. Mulbry, E.K. Westhead, C. Pizarro, L. Sikora // *Bioresource technology*. – 2005. – V. 96. – № 4. – P. 451–458.
- 163) Mulbry, W. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers / W. Mulbry, S. Kondrad, C. Pizarro, E. Kebede-Westhead // *Bioresource technology*. – 2008. – V. 99. – № 17. – P. 8137–8142.
- 164) Mulbry, W. Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent / W. Mulbry, S. Kondrad, J. Buyer, D.L. Luthria // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2009. – V. 86. – № 9. – P. 909–915.
- 165) Nassiri, Y. Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: an electron energy loss spectroscopy (EELS) study / Y. Nassiri, J. Wery, J.L. Mansot, T. Ginsburger-Vogel // *Archives of environmental contamination and toxicology*. – 1997. – V. 33. – № 2. – P. 156–161.
- 166) Nishikawa, K. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism / K. Nishikawa, Y. Yamakoshi, I. Uemura, N. Tominaga // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2003. – V. 44. – № 2. – P. 253–259.
- 167) Nishikawa, K. Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress / K. Nishikawa, H. Machida, Y. Yamakoshi, R. Ohtomo, K. Saito, M. Saito, N. Tominaga // *Plant Science*. – 2006. – V. 170. – P. 307–313.
- 168) Obst, M. Cyanophycin—an ideal bacterial nitrogen storage material with unique chemical properties / M. Obst, A. Steinbüchel // *Inclusions in prokaryotes* / A. Steinbüchel, J.M. Shively. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2006. – P. 167–193.
- 169) Ohtomo, R. Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods / R. Ohtomo, Y. Sekiguchi, T. Kojima, M. Saito // *Analytical biochemistry*. – 2008. – V. 383. – P. 210–206.
- 170) Olguín, E.J. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions / E.J. Olguín, S. Galicia, G. Mercado, T. Pérez // *Journal of Applied Phycology*. – 2003. – V. 15. – P. 249–257.

- 171) Oppermann-Sanio, F.B. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production / F.B. Oppermann-Sanio, A. Steinbüchel // *Naturwissenschaften*. – 2002. – V. 89. – № 1. – P. 11–22.
- 172) Ota, S. Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri* / S. Ota, M. Yoshihara, T. Yamazaki, T. Takeshita, A. Hirata, M. Konomi, K. Oshima, M. Hattori, K. Bišová, V. Zachleder, S. Kawano // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 25731.
- 173) Pal, N.R. Entropy: A new definition and its applications / N.R. Pal, S.K. Pal // *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*. – 1991. – V. 21. – P. 1260–1270.
- 174) Parmar, A. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels / A. Parmar, N.K. Singh, A. Pandey, E. Gnansounou, D. Madamwar // *Bioresource technology*. – 2011. – V. 102. – № 22. – P. 10163–10172.
- 175) Perry, M.J. Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus limited chemostat culture and in oligotrophic waters of central North-Pacific / M.J. Perry // *Limnol Oceanogr*. – 1976. – V. 21. – P. 88–107.
- 176) Pettersson, A. Accumulation of aluminium by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study / A. Pettersson, L. Kunst, B. Bergman, G.M. Roomans // *Microbiology*. – 1985. – V. 131. – № 10. – P. 2545–2548.
- 177) Phang, S.M. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater / S.M. Phang, M.S. Miah, B.G. Yeoh, M.A. Hashim // *Journal of Applied Phycology*. – 2000. – V. 12. – P. 395–400.
- 178) Pitt, F.D. Functional characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 *pst1* and *pst2* gene clusters reveals a novel strategy for phosphate uptake in a freshwater cyanobacterium / F.D. Pitt, S. Mazard, L. Humphreys, D.J. Scanlan // *Journal of bacteriology*. – 2010. – V. 192. – № 13. – P. 3512–3523.
- 179) Pittman, J.K. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources / J.K. Pittman, A.P. Dean, O. Osundeko // *Bioresource technology*. – 2011. – V. 102. – № 1. – P. 17–25.
- 180) Powell, N. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds / N. Powell, A.N. Shilton, S. Pratt, Y. Chisti // *Environmental science & technology*. – 2008. – V. 42. – № 16. – P. 5958–5962.
- 181) Powell, N. Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics / N. Powell, A. Shilton, Y. Chisti, S. Pratt // *Water research*. – 2009. – V. 43. – № 17. – P. 4207–4213.
- 182) Příbyl, P. Oil Overproduction by Means of Microalgae / P. Příbyl, V. Cepák, V. Zachleder // *Algal Biorefineries* / R. Bajpai, A. Prokop, M. Zappi. – Heidelberg: Springer, 2014. – Vol. 1. – p. 241–273.
- 183) Pun, T. A new method for grey-level picture thresholding using the entropy of the histogram / T. Pun // *Signal processing*. – 1980. – V. 2. – P. 223–237.

- 184) Pun, T. Entropic thresholding, a new approach / T. Pun // *Computer Graphics and Image Processing*. – 1981. – V. 16. – P. 210–239.
- 185) Pun, T. Weighted least squares estimation of background in EELS imaging / T. Pun, J.R. Ellis, M. Eden // *Journal of microscopy*. – 1985. – V. 137. – P. 93–100.
- 186) Quisel, J.D. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* / J.D. Quisel, D.D. Wykoff, A.R. Grossman // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 111. – P. 839–848.
- 187) Raina, J.B. Subcellular tracking reveals the location of dimethylsulfoniopropionate in microalgae and visualises its uptake by marine bacteria / J.B. Raina, P.L. Clode, S. Cheong, J. Bougoure, M.R. Kilburn, A. Reeder, S. Foret, M. Stat, V. Beltran, P. Thomas-Hall, D. Tapiolas // *eLife*. – 2017. – V. 6. – P. e23008.
- 188) Rawicz, W. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers / W. Rawicz, K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, E. Evans // *Biophysical journal*. – 2000. – V. 79. – P. 328–339.
- 189) Ray, K. A way to curb phosphorus toxicity in the environment: use of polyphosphate reservoir of cyanobacteria and microalga as a safe alternative phosphorus biofertilizer for Indian agriculture / K. Ray, C. Mukherjee, A.N. Ghosh // *Environ. Sci. Technol.* – 2013. – V. 47. – P. 11378–11379.
- 190) Read, B.A. Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution / B.A. Read, J. Kegel, M.J. Klute, A. Kuo, S.C. Lefebvre, F. Maumus, C. Mayer, J. Miller, A. Monier, A. Salamov, J. Young, M. Aguilar, J.M. Claverie, S. Frickenhaus, K. Gonzalez, E.K. Herman, Y.C. Lin, J. Napier, H. Ogata, A.F. Sarno, J. Shmutz, D. Schroeder, C. de Vargas, F. Verret, P. von Dassow, K. Valentin, Y. Van de Peer, G. Wheeler, J.B. Dacks, C.F. Delwiche, S.T. Dyrman, G. Glockner, U. John, T. Richards, A.Z. Worden, X.Y. Zhang, I.V. Grigoriev // *Nature*. – 2013. – V. 499. – P. 209–213.
- 191) Reistetter, E.N. Effects of phosphorus starvation versus limitation on the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* MED4 II: gene expression / E.N. Reistetter, K. Krumhardt, K. Callnan, K. Roache-Johnson, J.K. Saunders, L.R. Moore, G. Rocop // *Environmental microbiology*. – 2013. – V. 15. – № 7. – P. 2129–2143.
- 192) Reusch, R.N. Transmembrane ion transport by polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes / R.N. Reusch // *Biochemistry Moscow*. – 2000. – V. 65. – P. 280–295.
- 193) Reynolds, E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. Reynolds // *The Journal of Cell Biology*. – 1963. – V. 17. – P. 208–212.
- 194) Rippka, R. The synthesis of nitrogenase in nonheterocystous cyanobacteria / R. Rippka, J.B. Waterbury // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1977. – V. 2. – P. 83–86.
- 195) Rippka, R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria / R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier // *Microbiology*. – 1979. – V. 111. – № 1. – P. 1–61.

- 196) Rosset, S. Phosphate deficiency promotes coral bleaching and is reflected by the ultrastructure of symbiotic dinoflagellates / S. Rosset, J. Wiedenmann, A.J. Reed, C. D'Angelo // Marine pollution bulletin. – 2017. – V. 118. – P. 180–187.
- 197) Ruiz, F.A. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes / F.A. Ruiz, N. Marchesini, M. Seufferheld, R. Docampo // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. – № 49. – P. 46196–46203.
- 198) Ruiz-Marin, A. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater / A. Ruiz-Marin, L.G. Mendoza-Espinosa, T. Stephenson // Bioresource Technology. – 2010. – V. 101. – № 1. – P. 58–64.
- 199) Sahoo, P.K. A survey of thresholding techniques / P.K. Sahoo, S.A. Soltani, A.K. Wong // Computer vision, graphics, and image processing. – 1988. – V. 41. – P. 233–260.
- 200) Sahoo, P.K. Threshold selection using a minimal histogram entropy difference / P.K. Sahoo, D.W. Slaaf, T.A. Albert // Optical Engineering. – 1997. – V. 36. – P. 1976–1982.
- 201) Santos, F.M. Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char / F.M. Santos, J.C. Pires // Bioresource technology. – 2018. – V. 267. – P. 725–731.
- 202) Scanlan, D.J. Ecological genomics of marine picocyanobacteria / D.J. Scanlan, M. Ostrowski, S. Mazard, A. Dufresne, L. Garczarek, W.R. Hess, A.F. Post, M. Hagemann, I. Paulsen, F. Partensky // Microbiol Mol Biol Rev. – 2009. – V. 73. – P. 249–299.
- 203) Schenk, G. Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe–Mn in sweet potato and Fe–Zn in soybean / G. Schenk, Y. Ge, L.E. Carrington, C.J. Wynne, I.R. Searle, B.J. Carroll, S. Hamilton, J. de Jersey // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. – V. 370. – P. 183–189.
- 204) Schenk, G. Purple acid phosphatases from bacteria: similarities to mammalian and plant enzymes / G. Schenk, M.L. Korsinczky, D.A. Hume, S. Hamilton, J. DeJersey // Gene. – 2000. – V. 255. – № 2. – P. 419–424.
- 205) Schenk, G. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme / G. Schenk, N. Mitić, G.R. Hanson, P. Comba // Coordination Chemistry Reviews. – 2013. – V. 257. – № 2. – P. 473–482.
- 206) Schmitter, R.E. The fine structure of *Gonyaulax polyedra*, a bioluminescent marine dinoflagellate / R.E. Schmitter // Journal of cell science. – 1971. – V. 9. – № 1. – P. 147–173.
- 207) Schwamborn, M. Chemical synthesis of polyaspartates: a biodegradable alternative to currently used polycarboxylate homo- and copolymers / M. Schwamborn // Polym Degrad Stab. – 1998. – V. 59. – P. 39–45.
- 208) Schwarz, R. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses / R. Schwarz, K. Forchhammer // Microbiology. – 2005. – V. 151. – № 8. – P. 2503–2514.

- 209) Shebanova, A. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy / A. Shebanova, T. Ismagulova, A. Solovchenko, O. Baulina, E. Lobakova, A. Ivanova, A. Moiseenko, K. Shaitan, V. Polshakov, L. Nedbal, O. Gorelova // *Protoplasma*. – 2017. – V. 254. – P. 1323–1340.
- 210) Sicko-Goad, L. Phosphate metabolism in blue–green algae. IV. In situ analysis of polyphosphate bodies by X-ray energy dispersive analysis / L. Sicko-Goad, R.E. Crang, T. Jensen // *Cytobiology*. – 1975. – V. 11. – P. 430–437.
- 211) Sicko-Goad, L. A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal exposure / L. Sicko-Goad // *Protoplasma*. – 1982. – V. 110. – P. 75–86.
- 212) Sicko-Goad, L. Phosphate metabolism in blue-green bacteria. V. Factors affecting phosphate uptake in *Plectonema boryanum* / L. Sicko-Goad, T.E. Jensen, R.P. Ayala // *Canadian journal of microbiology*. – 1978. – V. 24. – № 2. – P. 105–108.
- 213) Sicko-Goad, L. Quantitative ultrastructural changes associated with lead-coupled luxury phosphate uptake and polyphosphate utilization / L. Sicko-Goad, D. Lazinsky // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1986. – V. 15. – P. 617–627.
- 214) Siderius, M. *Chlamydomonas eugametos* (Chlorophyta) stores phosphate in polyphosphate bodies together with calcium / M. Siderius, A. Musgrave, H. Ende, H. Koerten, P. Cambier, P. Meer // *Journal of phycology*. – 1996. – V. 32. – № 3. – P. 402–409.
- 215) Simon, R.D. Measurement of the cyanophycin granule polypeptide contained in the blue-green alga *Anabaena cylindrica* / R.D. Simon // *Journal of bacteriology*. – 1973. – V. 114. – P. 1213–1216.
- 216) Simon, R.D. Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies / R.D. Simon // *The cyanobacteria* / P. Fay, C. van Baalen. – Amsterdam : Elsevier, 1987. – P. 199–225.
- 217) Singh, J.S. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability / J.S. Singh, A. Kumar, A.N. Rai, D.P. Singh // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 529.
- 218) Smil, V. Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences / V. Smil // *Annual review of energy and the environment*. – 2000. – V. 25. – № 1. – P. 53–88.
- 219) Smith, V.H. Eutrophication science: where do we go from here? / V.H. Smith, D.W. Schindler // *Trends in ecology & evolution*. – 2009. – V. 24. – №4. – P. 201–207.
- 220) Smith, A.R. A review of air separation technologies and their integration with energy conversion processes / A.R. Smith, J. Klosek // *Fuel processing technology*. – 2001. – V. 70. – № 2. – P. 115–134.
- 221) Snyder, C.S. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects / C.S. Snyder, T.W. Bruulsema, T.L. Jensen, P.E. Fixen // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. – 2009. – V. 133. – P. 247–266.

- 222) Solovchenko, A. Phosphorus from wastewater to crops: an alternative path involving microalgae / A. Solovchenko, A.M. Verschoor, N.D. Jablonowski, L. Nedbal // *Biotechnology advances*. – 2016. – V. 34. – № 5. – P. 550–564.
- 223) Solovchenko, A. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, L. Semenova, T. Ismagulova, A. Lukyanov, I. Mamedov, E. Vinogradova, O. Karpova, I. Konyukhov, S. Vasilieva, P. Mojzeš, C. Dijkema, M. Vecherskaya, I. Zvyagin, L. Nedbal, O. Gorelova // *Algal Research*. – 2019a. – <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>.
- 224) Solovchenko, A. Luxury phosphorus uptake in microalgae / A. Solovchenko, T. Ismagulova, A. Lukyanov, S. Vasilieva, I. Konyukhov, S. Pogosyan, E. Lobakova, O. Gorelova // *Journal of Applied Phycology*. – 2019b. – <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>.
- 225) Steen, I. Phosphorus availability in the 21st century: management of a non-renewable resource / I. Steen // *Phosphorus and Potassium*. – 1998. – V. 217. – P. 25–31.
- 226) Stephan, D.P. Interrelation between cyanophycin synthesis, L-arginine catabolism and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 / D.P. Stephan, H.G. Ruppel, E.K. Pistorius // *Z Naturforsch.* – 2000. – V. 55. – P. 927–942.
- 227) Stevens, S.E. Accumulation of cyanophycin granules as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum* / S.E. Stevens, D.A. Paone, D.L. Balkwill // *Plant physiology*. – 1981. – V. 67. – № 4. – P. 716–719.
- 228) Stewart, W.D.P. Nitrogenase activity in the blue-green alga *Plectonema boryanum* strain 594 / W.D.P. Stewart, M. Lex // *Arch. Microbiol.* – 1970. – V. 73. – P. 250–260.
- 229) Stewart, W.D.P. Nitrogen and phosphorus storage and utilization in blue-green algae / W.D.P. Stewart, M. Pemble, L. Al-Ugaily // *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen*. – 1978. – V. 21. – № 1. – P. 224–247.
- 230) Su, Y. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture / Y. Su, A. Mennerich, B. Urban // *Water research*. – 2011. – V. 45. – № 11. – P. 3351–3358.
- 231) Suzuki, S. *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchneriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales / S. Suzuki, H. Yamaguchi, N. Nakajima, M. Kawachi // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 8058.
- 232) Tian, J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy / J. Tian, A.J. Sinskey, J. Stubbe // *Journal of bacteriology*. – 2005. – V. 187. – № 11. – P. 3814–3824.
- 233) Tillberg, J.E. X-ray microanalysis of phosphorus in *Scenedesmus obtusiusculus* / J.E. Tillberg, T. Barnard, J. Rowley // *Physiologia Plantarum*. – 1979. – V. 47. – № 1. – P. 34–38.
- 234) Tillberg, J.E. Phosphorus status and cytoplasmic structures in *Scenedesmus* (Chlorophyceae) under different metabolic regimes / J.E. Tillberg, T. Barnard, J.R. Rowley // *J Phycol.* – 1984. – V. 20. – P. 124–136.

- 235) Tilman, D. Agricultural sustainability and intensive production practices / D. Tilman, K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor, S. Polasky // *Nature*. – 2002. – V. 418. – № 6898. – P. 671–677.
- 236) Trebbia, P. EELS elemental mapping with unconventional methods I. Theoretical basis: Image analysis with multivariate statistics and entropy concepts / P. Trebbia, N. Bonnet // *Ultramicroscopy*. – 1990. – V. 34. – P. 165–178.
- 237) Trebbia, P. EELS elemental mapping with unconventional methods II. Applications to biological specimens / P. Trebbia, C. Mory // *Ultramicroscopy*. – 1990. – V. 34. – P. 179–203.
- 238) Valenzuela-Espinoza, E. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium / E. Valenzuela-Espinoza, R. Millán-Núñez, F. Núñez-Cebrero // *Aquacultural engineering*. – 1999. – V. 20. – № 3. – P. 135–147.
- 239) Voříšek, J. Redistribution of phosphate deposits in the alga *Scenedesmus quadricauda* deprived of exogenous phosphate—an ultra-cytochemical study / J. Voříšek, V. Zachleder // *Protoplasma*. – 1984. – V. 119. – № 3. – P. 168–177.
- 240) Vitova, M. Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications / M. Vitova, K. Bisova, S. Kawano, V. Zachleder // *Biotechnology advances*. – 2015. – V. 33. – № 6. – P. 1204–1218.
- 241) Walsby, A.E. Gas vesicles / A.E. Walsby // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1994. – V. 58 – № 1. – P. 94–144.
- 242) Warley, A. Development and comparison of the methods for quantitative electron probe X-ray microanalysis analysis of thin specimens and their application to biological material / A. Warley // *Journal of microscopy*. – 2016. – V. 261. – № 2. – P. 177–184.
- 243) Watanabe, M. ³¹P nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* Hada (Raphidophyceae) / M. Watanabe, K. Kohata, M. Kunugi // *J. Phycol.* – 1987. – V. 23. – P. 54–62.
- 244) Watanabe, M. Phosphate accumulation and metabolism by *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) during diel vertical migration in a stratified microcosm / M. Watanabe, K. Kohata, M. Kunugi // *J. Phycol.* – 1988. – V. 24. – P. 22–28.
- 245) Watanabe, M. Luxury phosphate uptake and variation of intracellular metal concentrations in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) / M. Watanabe, T. Takamatsu, K. Kohata, M. Kunugi, M. Kawashima, M. Koyama // *Journal of phycology*. – 1989. – V. 25. – № 3. – P. 428–436.
- 246) Watanabe, S. *Parietochloris incisa* comb. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) / S. Watanabe, S. Hirabayashi, S. Boussiba, Z. Cohen, A. Vonshak, A. Richmond // *Phycological Research*. – 1996. – V. 44. – № 2. – P. 107–108.
- 247) Whitehead, M.P. Horizontal transfer of bacterial polyphosphate kinases to eukaryotes: implications for the ice age and land colonization / M.P. Whitehead, P. Hooley, M.R. Brown // *BMC research notes*. – 2013. – V. 6. – № 1. – P. 221.

- 248) Wilfert, P. The relevance of phosphorus and iron chemistry to the recovery of phosphorus from wastewater: a review / P. Wilfert, P.S. Kumar, L. Korving, G.J. Witkamp, M.C. van Loosdrecht // *Environmental Science & Technology*. – 2015. – V. 49. – № 16. – P. 9400–9414.
- 249) Wurch, L.L. Nutrient-regulated transcriptional responses in the brown tide forming alga *Aureococcus anophagefferens* / L.L. Wurch, S.T. Haley, E.D. Orchard, C.J. Gobler, S.T. Dyhrman // *Environ Microbiol.* – 2011. – V. 13. – P. 468–481.
- 250) Xiao, K. Cloning and characterization of a novel purple acid phosphatase gene (MtPAP1) from *Medicago truncatula* Barrel Medic / K. Xiao, M. Harrison, Z.Y. Wang // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2006. – V. 48. – № 2. – P. 204–211.
- 251) Xu, Y. A novel alkaline phosphatase in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) and its regulation by phosphorus / Y. Xu, T.M. Wahlund, L. Feng, Y. Shaked, F.M.M. Morel // *J Phycol.* – 2006. – V. 42. – P. 835–844.
- 252) Yadavalli, R. Two stage treatment of dairy effluent using immobilized *Chlorella pyrenoidosa* / R. Yadavalli, G.R. Heggers // *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. – 2013. – V. 11. – № 1. – P. 36.
- 253) Yagisawa, F. Intracellular structure of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* in response to phosphate depletion and resupplementation / F. Yagisawa, H. Kuroiwa, T. Fujiwara, T. Kuroiwa // *Cytologia*. – 2016. – V. 81. – № 3. – P. 341–347.
- 254) Yamashita, H. Do uric acid deposits in zooxanthellae function as eye-spots? / H. Yamashita, A. Kobiyama, K. Koike // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – № 7. – P. e6303.
- 255) Yeung, S.L. Purple acid phosphatase-like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315 / S.L. Yeung, C. Cheng, T.K. Lui, J.S. Tsang, W.T. Chan, B.L. Lim // *Gene*. – 2009. – V. 440. – № 1. – P. 1–8.
- 256) Zachleder, V. Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda* / V. Zachleder, I. Šetlík // *Biologia Plantarum*. – 1982. – V. 24. – № 5. – P. 341–353.
- 257) Zhang, H. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria / H. Zhang, K. Ishige, A. Kornberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99. – V. 26. – P. 16678–16683.
- 258) Zhang, E. Ammonia–nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment / E. Zhang, B. Wang, Q. Wang, S. Zhang, B. Zhao // *Bioresource technology*. – 2008. – V. 99. – № 9. – P. 3787–3793.
- 259) Zhang, Q. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signaling / Q. Zhang, C. Wang, J. Tian, K. Li, H. Shou // *Plant Biology*. – 2011. – V. 13. – № 1. – P. 7–15.
- 260) Zimmermann, P. Differential expression of three purple acid phosphatases from potato / P. Zimmermann, B. Regierer, J. Kossmann, E. Frossard, N. Amrhein, M. Bucher // *Plant Biology*. – 2004. – V. 6. – № 5. – P. 519–528.

261) Zorin, B. Development of a nuclear transformation system for oleaginous green alga *Lobosphaera (Parietochloris) incisa* and genetic complementation of a mutant strain, deficient in arachidonic acid biosynthesis / B. Zorin, O. Grundman, I. Khozin-Goldberg, S. Leu, M. Shapira, Y. Kaye, N. Tourasse, O. Vallon, S. Boussiba // PloS one. – 2014. – V. 9. – № 8. – P. e105223.

Приложение 1

Табл. 1. Значения энергий характеристического рентгеновского излучения (кэВ), соответствующие наиболее интенсивным пикам биологически значимых элементов, элементов используемых контрастирующих веществ и элементов аппаратного фона в диапазоне 0-10 кэВ. Данные приведены из монографии по аналитической просвечивающей электронной микроскопии [Синдо, Оикава, 2006, С. 252 — 253]

Тип пика	Биологически значимые элементы									
	C	O	N	P	Ca	K	Mg	Na	Cl	S
K _α	0,28	0,53	0,39	2,01	3,69	3,31	1,25	1,04	2,62	2,31
K _β				2,14	4,01	3,59				
Тип пика	Контрастирующие элементы			Элементы аппаратного фона						
	Os	U	Pb	Fe	Co	Si	Al	Cu		
K _α				6,40	6,93	1,74	1,49	8,05		
K _β				7,06	7,65			8,90		
L _α	8,91							0,93		
M _α		3,17	2,35							
M _β	1,98	3,34	2,44							

Синдо, Д. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия / Д. Синдо, Т. Оикава. – М. : Техносфера, 2006. – 256 с.

Приложение 2

Табл. 1. Значения энергий (эВ) наиболее интенсивных пиков биологически значимых элементов и элементов контрастирующих веществ, выявляемых в спектрах потерь энергии электронов в диапазоне 100-600 эВ. Данные приведены из монографии по аналитической просвечивающей электронной микроскопии [Синдо, Оикава, 2006, С. 250 — 251]

Тип пика	Элементы					
	C	O	N	P	Ca	U
K	284	532	399			
L ₂				136	350	
L ₃				135	347	
O ₄						105

Синдо, Д. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия / Д. Синдо, Т. Оикава. – М. : Техносфера, 2006. – 256 с.

Приложение 3

Cvu	32	ED	SE	DI	CPT	CLD	P	Y	TE	D	N	P	K	V	L	T	R	C	N	H	H	F	H	L	P	C	L	Y	E	W	L	E	R	S	S	T	C	P	V	C	G	E	A	M	H	F	E	E	L	L							
Cs	168	ED	SE	DI	CPT	CLD	P	Y	TE	D	N	P	K	V	L	T	R	C	N	H	H	F	H	L	P	C	L	Y	E	W	L	E	R	S	S	T	C	P	V	C	G	E	T	M	H	F	E	E	L	L							
Mc	147	EE	DE	EV	CPT	CLD	P	Y	TE	D	N	P	K	V	L	T	R	C	A	H	H	F	H	L	P	C	L	Y	E	W	L	E	R	S	E	T	C	P	V	C	A	S	P	M	H	F	E	E	V	V							
Cva	2	VE	DE	DI	CPT	CLD	P	Y	TE	D	N	P	K	V	L	T	R	C	N	H	H	F	H	L	P	C	L	Y	E	W	L	E	R	S	E	T	C	P	V	C	S	K	P	M	A	F	E	E	E								
La	136	EE	E	-	D	V	C	P	T	C	L	E	E	Y	T	E	E	N	P	K	I	V	T	K	C	S	H	H	F	H	L	G	C	I	Y	E	W	M	E	R	S	D	T	C	P	V	C	G	K	V	M	V	E	D	E	T	T
Th	167	DE	E	-	D	I	C	P	T	C	L	D	E	Y	T	P	E	N	P	K	I	L	T	R	C	S	H	H	F	H	L	S	C	I	Y	E	W	M	E	R	S	E	T	C	P	V	C	G	K	V	M	A	F	D	E	T	S
At	166	DDE	E	-	D	I	C	P	T	C	L	DD	Y	T	L	E	N	P	K	I	L	T	R	C	S	H	H	F	H	L	S	C	I	Y	E	W	M	E	R	S	E	T	C	P	V	C	G	K	V	M	A	F	D	E	N	E	
Rs	160	DDE	D	-	D	I	C	P	T	C	L	DD	Y	T	P	E	N	P	K	I	L	T	R	C	S	H	H	F	H	L	S	C	I	Y	E	W	M	E	R	S	E	T	C	P	V	C	G	K	V	M	A	F	D	E	T	G	
Pe	131	ADE	E	-	D	V	C	P	T	C	L	D	E	Y	T	P	E	N	P	K	I	M	T	R	C	S	H	H	F	H	L	G	C	I	Y	E	W	L	E	R	S	E	S	C	P	I	C	G	K	E	M	E	F	C	E	S	P
Br	160	DDE	E	-	D	I	C	P	T	C	L	DD	Y	T	P	E	N	P	K	I	L	T	R	C	S	H	H	F	H	L	S	C	I	Y	E	W	M	E	R	S	E	T	C	P	V	C	G	K	V	M	A	F	D	E	T	G	

Организм	Обозначение	Номер последовательности в базе GenBank	Порядковые номера аминокислотных остатков в последовательности	Идентичность с Cvu, %
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	Cvu	MK334250	32 — 88	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cs	PRW57997.1	168 — 224	98
<i>Micractinium conductrix</i>	Mc	PSC75162.1	147 — 203	81
<i>Chlorella variabilis</i>	Cva	XP_005847649.1	2 — 56	86
<i>Lupinus angustifolius</i>	La	XP_019452145.1	136 — 191	63
<i>Tarenaya hassleriana</i>	Th	XP_010553953.1	167 — 222	67
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At	BAB08646.1	166 — 221	65
<i>Raphanus sativus</i>	Rs	XP_018478334.1	160 — 216	65
<i>Populus euphratica</i>	Pe	XP_011020909.1	131 — 186	63
<i>Brassica rapa</i>	Br	XP_009139814.1	160 — 215	65

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности участка предполагаемой убиквитинлигазы E3 *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (участка транслированной последовательности контига МК334250) с последовательностями убиквитинлигаз E3 родственных микроводорослей и растений. Выделенные черным цветом аминокислотные остатки консервативны (идентичны или взаимозаменяемы) в указанном положении у всех представленных последовательностей, темно-серым — консервативны у от 80% до 100% представленных последовательностей, светло-серым — консервативны у от 60% до 80% представленных последовательностей, белым — консервативны у менее чем 60% представленных последовательностей. На рисунке представлен участок транслированной последовательности контига *C. vulgaris* IPPAS C-1 - МК334250, с 32 по 88 аминокислотный остаток, к которому проводили дизайн праймеров для ПЦР в реальном времени (см. табл.5)

Приложение 4

```

Cvu 245 RFPYAVAEIKLQ----SEPPAWWVGLLQTGMLLPVPKFSKFLHGTALL
Cva 234 YFPYAVVEIKLQ----AAPPDWVQGLLETGMLLPVPKFSKFLHGTALLF
Mc 225 YFPYAVVEIKLQ----QEPPAWVAGLLDMGVLLPVPKFSKFLHGTAMLY
Mn 585 RFPYSVLEIKL---ASDIKPAWINELASGLLVEVPRFSKFLHGSALLF
Ap 453 NFSFVVVEVKLQ----RKAPEWLTPLKSGKLLAVPKFSKHITHGTAVLF
Rs 991 RFPYAVLEIKL--AAGR-RPRWVKELASGLLVEVMAAFSKFLHGSALLF
Sc 419 RFPYAVLEVKLQQTQLGQEPPEWVRELVGSHLVEVAVPKFSKFLHGVATLL
Tc 425 RFPYAVLEVKLQQTQLGQEPPEWVRQLSSHLEAVPKFSKFLHGTACL F
Pa 475 RFPYAVLEVKLQQTQHGEPPDWVRQLSSHLEAVPKFSKFLHGTATL F
Ph 442 RFPYAILLEVKLQQTQAGQEPSPSWVRELASHLVEAVPKFSKFLHGTATL F
    
```

Организм	Обозначение	Номер последовательности в базе GenBank, аннотация	Порядковые номера аминокислотных остатков в последовательности	Идентичность с Cvu, %
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	Cvu	МК334249	245 — 289	-
<i>Chlorella variabilis</i>	Cva	XP_005849213.1 белок Vtc1	234 — 279	84
<i>Micractinium conductrix</i>	Mc	PSC69098.1 белок Vtc4	225 — 270	82
<i>Monoraphidium neglectum</i>	Mn	XP_013900046.1 белок Vtc2	585 — 631	61
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	Ap	XP_011396433.1 белок Vtc4	453 — 498	55
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Rs	GBF99690.1 белок Vtc	991 — 1037	60
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc	EDV12743.1 белок Vtc4	419 — 468	58
<i>Tolypocladium capitatum</i>	Tc	PNY20637.1 белок Vtc4	425 — 474	58
<i>Podospora anserina</i>	Pa	XP_001912897.1 белок Vtc4	475 — 524	58
<i>Phialophora hyalina</i>	Ph	RDL29963.1 белок Vtc	442 — 491	56

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности участка предполагаемого VTC-подобного белка *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (участка транслированной последовательности контига МК334249) с последовательностями белков из семейства VTC зеленых микроводорослей и грибов. Выделенные черным цветом аминокислотные остатки консервативны в указанном положении (идентичны или взаимозаменяемы) у всех представленных последовательностей, темно-серым — консервативны у от 80% до 100% представленных последовательностей, светло-серым — консервативны у от 60% до 80% представленных последовательностей, белым — консервативны у менее чем 60% представленных последовательностей. На рисунке представлен участок транслированной последовательности контига *C. vulgaris* IPPAS C-1 - МК334249, с 245 по 289 аминокислотный остаток, к которому проводили дизайн праймеров для ПЦР в реальном времени (см. табл.5)

Приложение 5

```

Cvu 30 DVANAFGSSVGAKALIMKOALVVAACEFEGGSV----LMGAGVVGITVRKGLADLNYYEVNDPDIIFAYG
Cs 28 DVANAFGSSVGAKALIMKOALVVAACEFEGGSV----LMGAGVVGITVRKGLADLNYYYS SPDIIFAYG
Mc 136 DVANAFGTSVGAKALIMKOAVVVAACEFEGGSV----LMGAGVVGITMRKGLAKLSAFENDPDIIFAYG
Cva 51 DVANAFGSSVGAKALIMKOALVVAACEFEGGAV----LLGAGVITDITIRKGLADLNYYKKNKPDLYMYG
Pk 45 DVANAFGSSVGAKALIMKOALVVAACEFAGAGKFDMLMGASVITSTIRSGIANLNYYIINKPDVLAYG
Tc 27 DVANAFGSSVGSKALITIKOALVVAACEFEGGAV----LLGSNVTDTIVRKGLANYYEVFLDAPELYMYG
Vc 4 DVANAFGSSVAARTLISMRQALLAAVCEFEFGGSV----LLGGEVITRIVASGLASITSTFERHPPEMYMYG
Cr 29 DVANAFGSSVAARTLITLRQALLAAVCEFEFGGSV----LLGGQVITRIVAGGLARLSTFERVPELYMFG
Ol 27 DVANAFATSVGSGALKVKQAVPLAAVCEFEFGSL----FMGSHVVKITIRKGLSDQECFVDDPGLLMYG
Es 66 DVANAFATSVGAKALITIKOAVVLAGVFEFEFGAV----FLGSHVTKITIRKGLADLIECFQDNPGILLMYG
  
```

Организм	Обозначение	Номер последовательности в базе GenBank, аннотация	Порядковые номера аминокислотных остатков в последовательности	Идентичность с Cvu, %
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	Cvu	MK334251	30 — 92	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cs	PRW32920.1 транспортер фосфата	28 — 91	91
<i>Micractinium conductrix</i>	Mc	PSC76970.1 натрий-фосфатный симпортер	136 — 199	86
<i>Chlorella variabilis</i>	Cva	XP_005843014.1 транспортер фосфата высокой аффинности	51 — 114	78
<i>Parachlorella kessleri</i>	Pk	BAU71130.1 натрий-фосфатный симпортер	45 — 112	77
<i>Tetraselmis chuii</i>	Tc	AAO47330.1 транспортер фосфата высокой аффинности	27 — 90	63
<i>Volvox carteri</i>	Vc	XP_002958976.1 транспортер фосфата	4 — 67	61
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cr	XP_001695776.1 натрий-фосфатный симпортер	27 — 93	60
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Es	SVJ33891.1 транспортер фосфата высокой аффинности	66 — 129	57

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности участка предполагаемого натрий-фосфатного симпортера *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (участка транслированной последовательности контига MK334251) с последовательностями белков

транспортеров фосфата микроводорослей. Выделенные черным цветом аминокислотные остатки консервативны в указанном положении (идентичны или взаимозаменяемы) у всех представленных последовательностей, темно-серым — консервативны у от 80% до 100% представленных последовательностей, светло-серым — консервативны у от 60% до 80% представленных последовательностей, белым — консервативны у менее чем 60% представленных последовательностей. На рисунке представлен участок транслированной последовательности контига *C. vulgaris* IPPAS C-1 - МК334251, с 30 по 92 аминокислотный остаток, к которому проводили дизайн праймеров для ПЦР в реальном времени (см. табл.5)

Приложение 6

```

Cvu 65  FQAQF I K M V V P G A T V L E Q M L Y I L L N N G V A L V G Y Y C A A A L I D R P W C G R M Q M Q A G G F F M L F L I F
Cs 643  FQAQF I K L I V P G A T L L Q Q M L Y I L L N N G V A L V G Y Y C A A F S I D R P W C G R V R M Q A G G F F M L F L I F
Mc 384  FQSKF I A L I S P G A S R Y V Q M Q W T L L N S G V A L T G Y Y F A A Y T I D R Q W M G R K R M Q C M G F L M M E V L F
Cr 316  FQSTF I K I I N P H A S V I Q I L E W T L L N S A V A L V G Y Y F A A F T I D K P W M G R M R M Q I M G F S W M E V L F
Cva 384  FQSQF I A V I S P G A S R F V S M Q W T L L N S G V S L C G Y Y A A A Y T I D K K W M G R K R L Q A M G F L M M E F L F
Vc 323  FQGT F I K I I N P T A S L I Q V L E W T L L N S A V A L V G Y Y F A A F T I D K P W M G R M R M Q M L G F T W M E V L F
Mn 163  FQAEFF T A L Y P T A T P F Q R L Q W T A L N S G I A L L G Y W A A A A L V D K P W Y G R R K M Q A V G F F M V A A L C
  
```

Организм	Обозначение	Номер последовательности в базе GenBank	Порядковые номера аминокислотных остатков в последовательности	Идентичность с Cvu, %
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	Cvu	MK334252	65 — 127	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cs	PRW20802.1	643 — 706	89
<i>Micractinium conductrix</i>	Mc	PSC68539.1	384 — 447	57
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cr	XP_001701833.1	316 — 379	56
<i>Chlorella variabilis</i>	Cva	XP_005843759.1	384 — 447	54
<i>Volvox carteri</i>	Vc	XP_002955497.1	323 — 386	54
<i>Monoraphidium neglectum</i>	Mn	XP_013905031.1	163 — 226	51

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности участка предполагаемого H^+ -фосфатного симпортера *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (участка транслированной последовательности контига МК334252) с последовательностями белков H^+ -фосфатных симпортеров микроводорослей. Выделенные черным цветом аминокислотные остатки консервативны в указанном положении (идентичны или взаимозаменяемы) у всех представленных последовательностей, темно-серым — консервативны у от 80% до 100% представленных последовательностей, светло-серым — консервативны у от 60% до 80% представленных последовательностей, белым — консервативны у менее чем 60% представленных последовательностей. На рисунке представлен участок транслированной последовательности контига *C. vulgaris* IPPAS C-1 - МК334252, с 65 по 127 аминокислотный остаток, к которому проводили дизайн праймеров для ПЦР в реальном времени (см. табл.5)

Приложение 7

Cvu 261 SKPDVVFILGNLSYADLYYSNQITDGNWSYPAVPASPQLRWDAWARLTFPLLATVPAVFVPGNH
 Cs 605 SKPDVVFVLGDL SYADLYYSNQITDGNWSYPAVPTSQQLRWDARLSEPLLATVPAVFVPGNH
 Mc 228 SQPDVVLVLGDL SYADLYYSNDITTSNWFGLTPRSSQQLRWDARLTFPLLATVPAVYIAGNH
 Cva 223 SQPDVVLVLGDL SYADLYYSNDITTSNAWSEFSPSPSTQQLRWDSWARLTFPLLASVPAIYIAGNH

Организм	Обозначение	Номер последовательности в базе GenBank	Порядковые номера аминокислотных остатков в последовательности	Идентичность с Cvu, %
<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1	Cvu	MK334253	261 — 323	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cs	PRW60148.1	605 — 668	92
<i>Micractinium conductrix</i>	Mc	PSC73849.1	228 — 291	71
<i>Chlorella variabilis</i>	Cva	XP_005845616.1	223 — 286	67

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности участка предполагаемой пурпурной кислой фосфатазы *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (участка транслированной последовательности контига МК334253) с последовательностями пурпурных кислых фосфатаз микроводорослей. Выделенные черным цветом аминокислотные остатки консервативны в указанном положении (идентичны или взаимозаменяемы) у всех представленных последовательностей, светло-серым — консервативны у от 60% до 80% представленных последовательностей, белым — консервативны у менее чем 60% представленных последовательностей. На рисунке представлен участок транслированной последовательности контига *C. vulgaris* IPPAS C-1 - МК334253, с 261 по 323 аминокислотный остаток, к которому проводили дизайн праймеров для ПЦР в реальном времени (см. табл.5)

Приложение 8

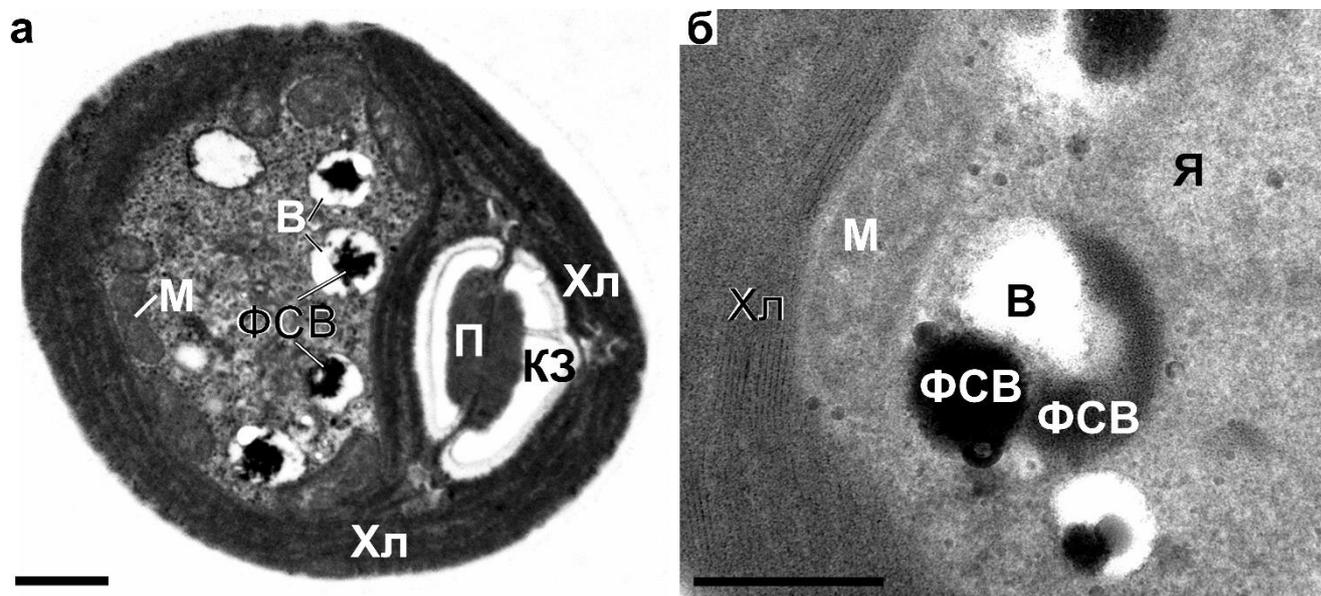


Рис. 1 Ультраструктурные особенности клеток зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* ССАЛА 256. ПЭМ-изображения с ультратонкого (а) и толстого (б) срезов клеток микроводоросли, показывающие клеточные компартменты микроводоросли: митохондрии (М), вакуоли (В), ядро (Я), крахмальные зерна (КЗ) и пиреноид (П) в составе хлоропласта (Хл), а также электронноплотные фосфорсодержащие включения (ФСВ) в вакуолях. ПЭМ-изображения представлены для контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца (а) и не контрастированных этими соединениями (б) срезов клеток микроводоросли на стационарной фазе роста после восстановления фосфорного питания. ПЭМ-изображение (а) получено на микроскопе JEM-1011 совместно с сотрудником биологического факультета МГУ д.б.н. Гореловой О.А. Масштабные отрезки: 0,5 мкм

Приложение 9

Табл. 1 Увеличение массовой доли фосфора в клетках *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 после перехода от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде. В таблице для каждой фазы роста культуры указаны среднее значение, соответствующая стандартная ошибка среднего ($n = 2$) и t-критерий Стьюдента. Согласно рассчитанным значениям t-критерия Стьюдента, значение массовой доли фосфора для голодных клеток (отмечено одной звездочкой (*)) статистически значимо отличалось от значений массовой доли фосфора для клеток после добавления фосфора на всех стадиях роста (отмечены двумя звездочками (**), $p \leq 0,05$). Между собой значения массовой доли фосфора для клеток на стадиях роста после добавления фосфора (отмечены двумя звездочками (**)) не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$, выделены в таблице подчеркиванием и жирным шрифтом)

Массовая доля фосфора в голодных клетках и клетках на разных фазах роста после добавления фосфора						
Фаза роста	Голодные клетки	30 мин	120 мин	240 мин	Экспоненциальная фаза	Стационарная фаза
Массовая доля фосфора, % от сухого веса	0.12±0.02 (*)	2.66±0.03 (**)	4.18±2.02 (**)	3.62±0.58 (**)	2.74±0.01 (**)	1.81±0.18 (**)
t-критерий Стьюдента						
Фаза роста	Голодные клетки	30 мин	120 мин	240 мин	Экспоненциальная фаза	Стационарная фаза
Голодные клетки		p= 0.0002	p=0.0052	p=0.0135	p=0.0006	p=0.0057
30 мин			<u>p=0.3988</u>	<u>p=0.1449</u>	<u>p=0.0796</u>	<u>p=0.0757</u>
120 мин				<u>p=0.7422</u>	<u>p=0.4198</u>	<u>p=0.2401</u>
240 мин					<u>p=0.1657</u>	<u>p=0.052</u>
Экспоненциальная фаза						<u>p=0.0859</u>

Приложение 10

Табл.1 Экспрессия генов, вовлеченных в метаболизм полифосфатов, у микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 при переходе от фосфорного голодания к избытку неорганического фосфора в среде. Данные представлены для следующих стадий: 120 мин (120м), экспоненциальная (ЭФ) и стационарная (СФ) фазы роста после добавления фосфора к голодным по фосфору клеткам. В таблице приведены среднее значение для четырех повторностей ($n = 4$), соответствующая стандартная ошибка среднего, а также значения t-критерия Стьюдента. Согласно рассчитанным значениям t-критерия Стьюдента все изменения являются статистически значимыми ($p \leq 0,05$), кроме выделенных в таблице подчеркиванием и жирным шрифтом ($p > 0,05$)

Ген белка	120 мин (120м)	Экспоненциальная фаза (ЭФ)	Стационарная фаза (СФ)	t-критерий Стьюдента 120м vs. ЭФ	t-критерий Стьюдента ЭФ vs. СФ	t-критерий Стьюдента 120м vs. СФ
VTC-подобный белок	4.042±0.87	1.062±0.175	48.889±7.907	p=0.0152	p=0.0009	p=0.0013
Натрий-фосфатный симпортер	3.521±0.721	<u>0.865±0.146</u>	<u>0.770±0.089</u>	p=0.0007	<u>p=0.1464</u>	p=0.0056
H ⁺ -фосфатный симпортер	0.097±0.011	0.838±0.115	0.338±0.056	p=0.0003	p=0.0051	p=0.0008
Пурпурная кислая фосфатаза	0.052±0.009	<u>0.672±0.072</u>	<u>0.531±0.075</u>	p=0.0001	<u>p=0.2225</u>	p=0.0007

Приложение 11

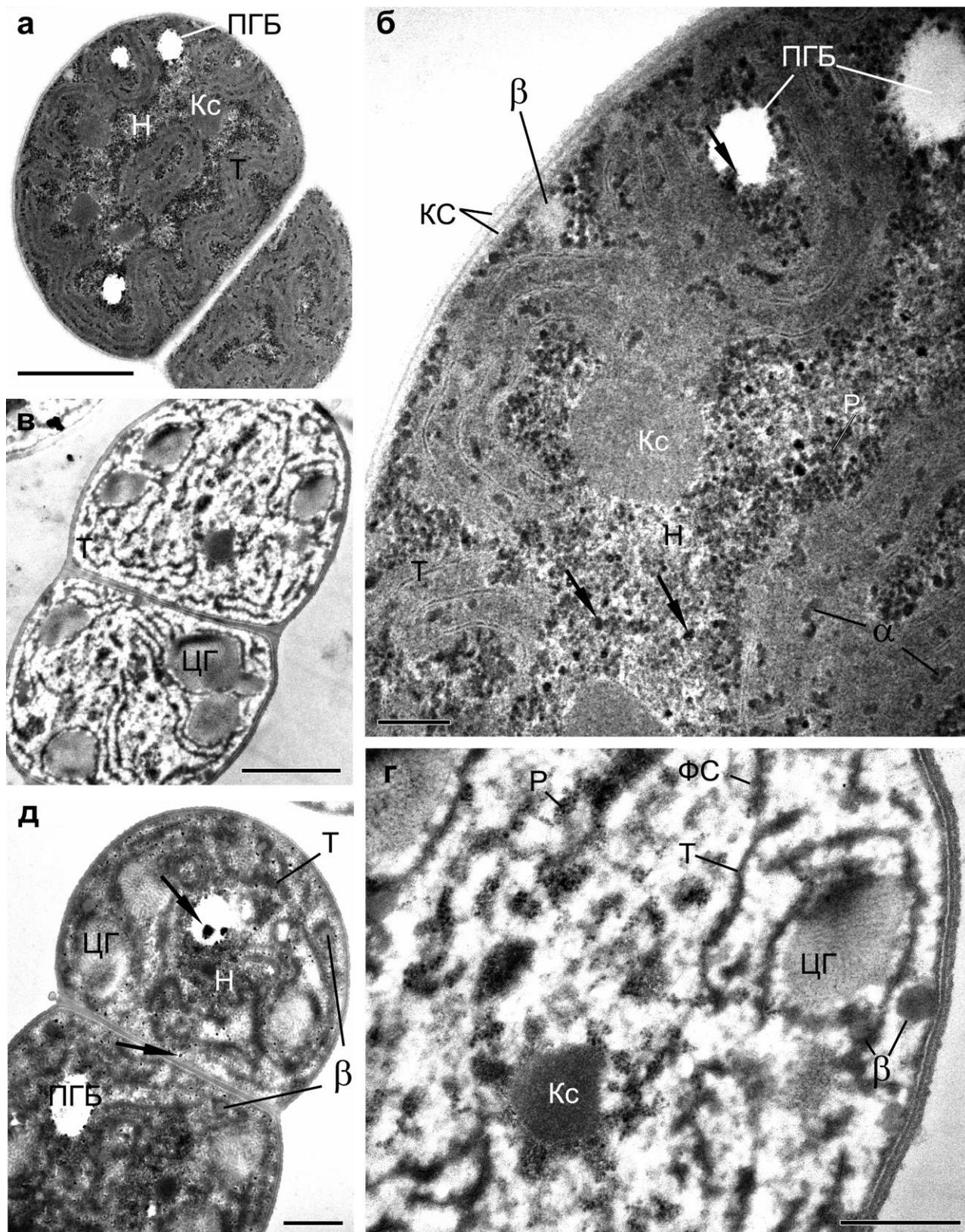


Рис. 1 Ультраструктура вегетативных клеток цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 при культивировании (а, б) на полной среде BG-11 (исходная культура), (в, г) на среде без фосфора и (д) через 4 часа после восстановления фосфорного питания. Представлены ПЭМ-изображения ультратонких срезов клеток, контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца и

полученных на микроскопе JEM-1011. КС – клеточная стенка; Кс – карбоксисома (полиэдральное тело, содержащее рибулозобисфосфаткарбоксилазу); Н – зона нуклеоида; ПГБ – гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, Р – скопления рибосом; Т – тилакоиды; ФС – фикобилисомы; ЦГ – цианофициновые гранулы = АСВ (азотсодержащие включения); α – α -гранула гликогена; β – липидная β -гранула; стрелка указывает на осмиофильные включения, признанные с помощью аналитической ПЭМ как фосфорсодержащие включения (см. рис. 23). Масштабные отрезки: 1 мкм (а, в); 0,5 мкм (г, д); 0,2 мкм (б).

Приложение 12

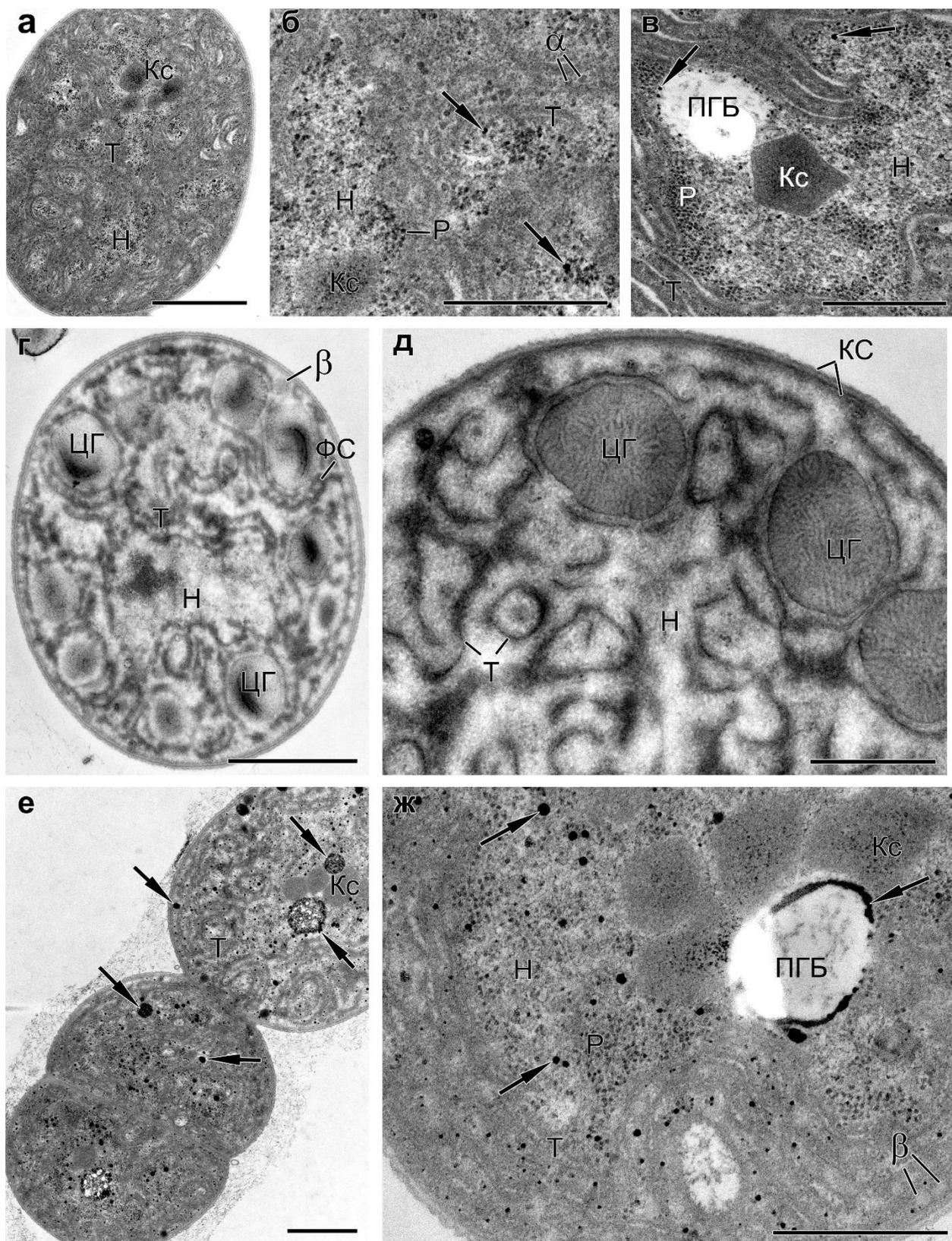


Рис. 1 Ультраструктура вегетативных клеток цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 при культивировании (а, б, в) на полной среде BG-11 (исходная культура), (г, д) на среде без фосфора и (е, ж) через 7 суток после восстановления фосфорного питания. Представлены ПЭМ-изображения ультратонких срезов клеток, контрастированных уранилацетатом и цитратом

свинца и полученных на микроскопе JEM-1011. КС – клеточная стенка; Кс – карбоксисома (тетраэдральное тело, содержащее рибулозобисфосфаткарбоксилазу); Н – зона нуклеоида; ПГБ – гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, Р – скопления рибосом; Т – тилакоиды; ФС – фикобилисомы; ЦГ – цианофициновые гранулы = азотсодержащие включения (АСВ); α – α -гранула гликогена; β – липидная β -гранула; стрелка указывает на осмиофильные включения, признанные с помощью аналитической ПЭМ как фосфорсодержащие включения (см. рис. 26). Масштабные отрезки: 1 мкм (а, г, е); 0,5 мкм (б, в, д, ж).

Приложение 13

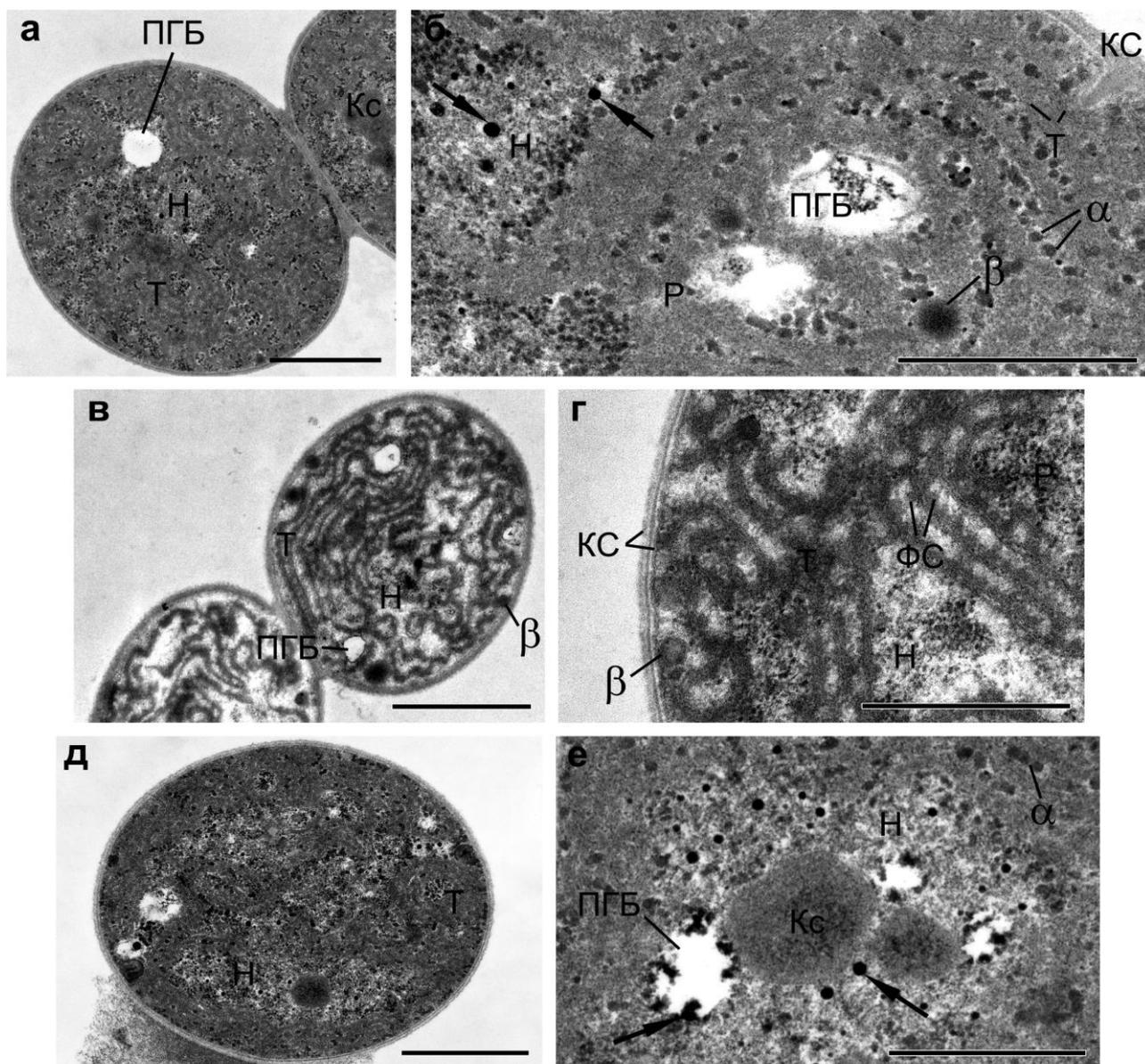


Рис. 1 Ультраструктура вегетативных клеток цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 при культивировании (а, б) на безазотной среде BG-11₀ с фосфором, (в, г,) на той же среде, но без фосфора и после восстановления фосфорного питания (д, е) через 7 суток. Представлены ПЭМ-изображения ультратонких срезов клеток, контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца и полученных на микроскопе JEM-1011. КС – клеточная стенка; Кс – карбоксисома (тетраэдральное тело, содержащее рибулозобисфосфаткарбоксилазу); Н – зона нуклеоида; ПГБ – гранула поли-(R)-3-гидроксибутирата, Р – скопления рибосом; Т – тилакоиды; ФС – фикобилисомы; α – α-гранула гликогена; β – липидная β-гранула; стрелка указывает на осмиофильные включения, признанные с помощью аналитической ПЭМ как фосфорсодержащие (см. рис. 26). Масштабные отрезки: 1 мкм (а, в, д); 0,5 мкм (б, г, е).

Приложение 14

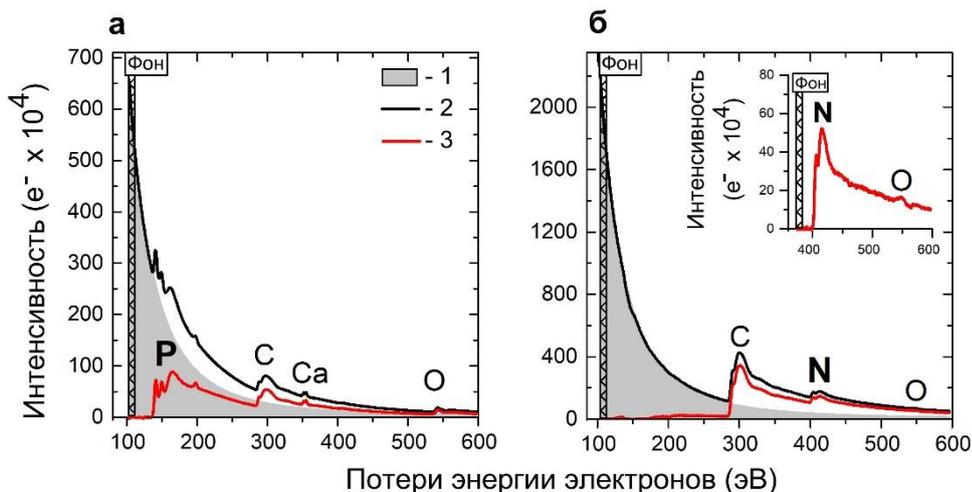


Рис. 1 Типичные спектры потерь энергии электронов, полученные от фосфорсодержащих (а) и азотсодержащих (б) включений диазотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. В спектрах от фосфорсодержащих включений — пики фосфора ($L_2 = 136$ эВ, $L_3 = 135$ эВ) и кальция ($L_2 = 350$ эВ, $L_3 = 347$ эВ), в спектрах от азотсодержащих включений — пик азота ($K = 399$ эВ). 1 — фон, аппроксимированный степенной функцией, 2 — спектр до вычитания фона, 3 — спектр после вычитания фона. Заштрихованный прямоугольник в спектрах указывает диапазон, по которому рассчитывалась степенная функция для вычитания фона. Вставка в (б) - увеличенная часть того же спектра после вычитания фона, в котором диапазон для расчета степенной функции при вычитании фона выбран непосредственно перед пиком азота. Спектры получены от ультратонких срезов без контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца

Приложение 15

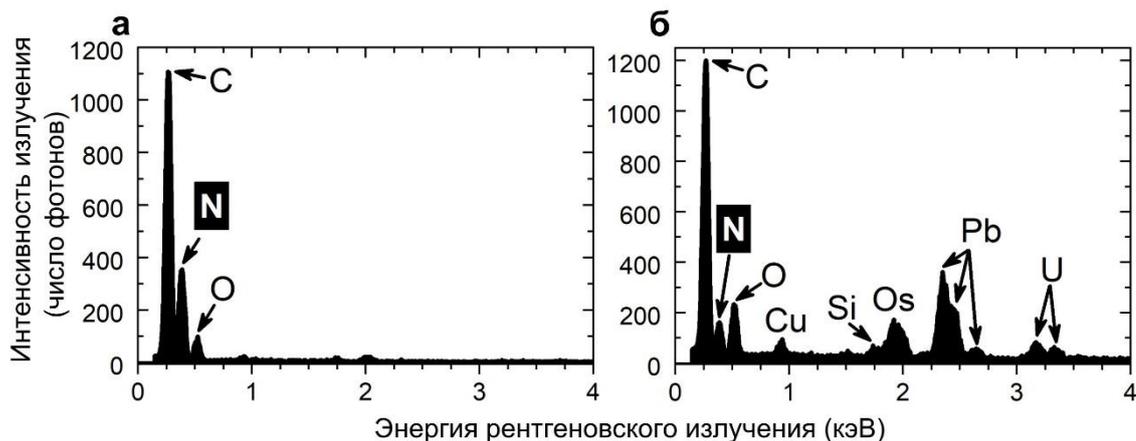


Рис. 1 Типичные энергодисперсионные спектры азотсодержащих включений *Tetrademus obliquus* IPPAS S-2023 (а) и *Lobosphaera incisa* SAG 2468 (б). На рисунке представлены энергодисперсионные спектры, предоставляющие качественную информацию об элементном составе анализируемого точечного участка образца (см. раздел 4.3.2). Результаты представлены для культуры *Tetrademus obliquus* IPPAS S-2023 на экспоненциальной фазе роста и для культуры *Lobosphaera incisa* SAG 2468 через 24 часа после возобновления азотного питания. Спектры получены от толстых срезов без контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца (а) и ультратонких срезов с контрастированием уранилацетатом и цитратом свинца (б)

Приложение 16

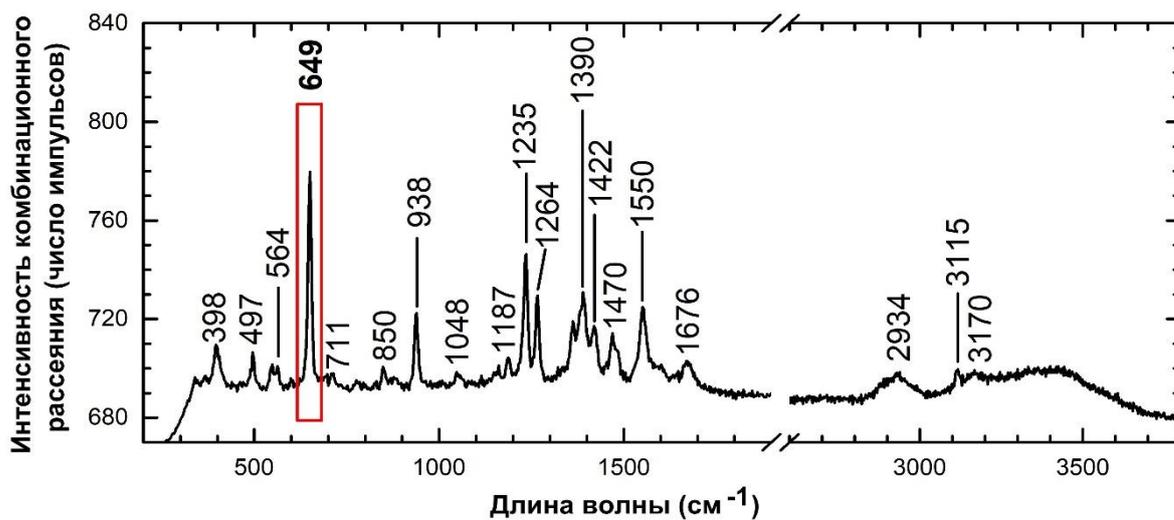


Рис. 1 Типичный спектр комбинационного рассеяния (КР) от внутриклеточных включений *Amphidinium carterae* NCMA CCMP1314, соответствующий спектру КР гуанина в микроводорослях. К характеристическим полосам КР в спектре гуанина относятся полосы 649, 938, 1235 и 1264 см⁻¹. Полоса 649 см⁻¹ (выделена красной рамкой) была использована для картирования по гуанину клеток *Amphidinium carterae* NCMA CCMP1314 на рис. 29 а,е. Результаты представлены для клеток из культуры через 3 дня после возобновления азотного питания

Приложение 17

Табл. 1. Значения длин волн (см⁻¹) полос в спектрах комбинационного рассеяния, которые соответствуют комплекту полос от различных биомолекул и сопровождающих молекул в микроводорослях. Жирным шрифтом выделены полосы, выявление которых является обязательным для однозначной идентификации соответствующей биомолекулы. Данные приведены из работы [Moudříková et al., 2017a]

¹⁴ N-гуанин	¹⁵ N-гуанин	Белки	Каротиноиды	Полифосфаты	Крахмал	Все биомолекулы с СН-связями	Молекулы воды	Целая клетка
398	388	509	1000	649	479	483	3250	487
497	486	852	1154	697	863	942	3400	649
564	551	942	1520	1004	942	1004		785
649	640	1004		1164	1004	1256		1004
711	702	1127		1235	1130	1310		1235
850	824	1208		1310	1256	1452		1264
938	917	1341		1452	1341	1660		1341
1048	1022	1450		1550	1452	2934		1452
1187	1175	1608		1660	1660	3068		1550
1235	1218	1655			2934			1660
1264	1247	2877			3068			2855
1390	1348	2934						2885
1422	1385	3067						2934
1470	1415	3305						3068
1550	1459							
1598	1548							
1676	1590							
3115	1665							
3170	3110							
	3165							
	3338							

Moudříková, Š. Raman microscopy shows that nitrogen-rich cellular inclusions in microalgae are microcrystalline guanine / Š. Moudříková, L. Nedbal, A. Solovchenko, P. Mojzeš // Algal Research. – 2017a. – V. 23. – P. 216–222.

Приложение 18

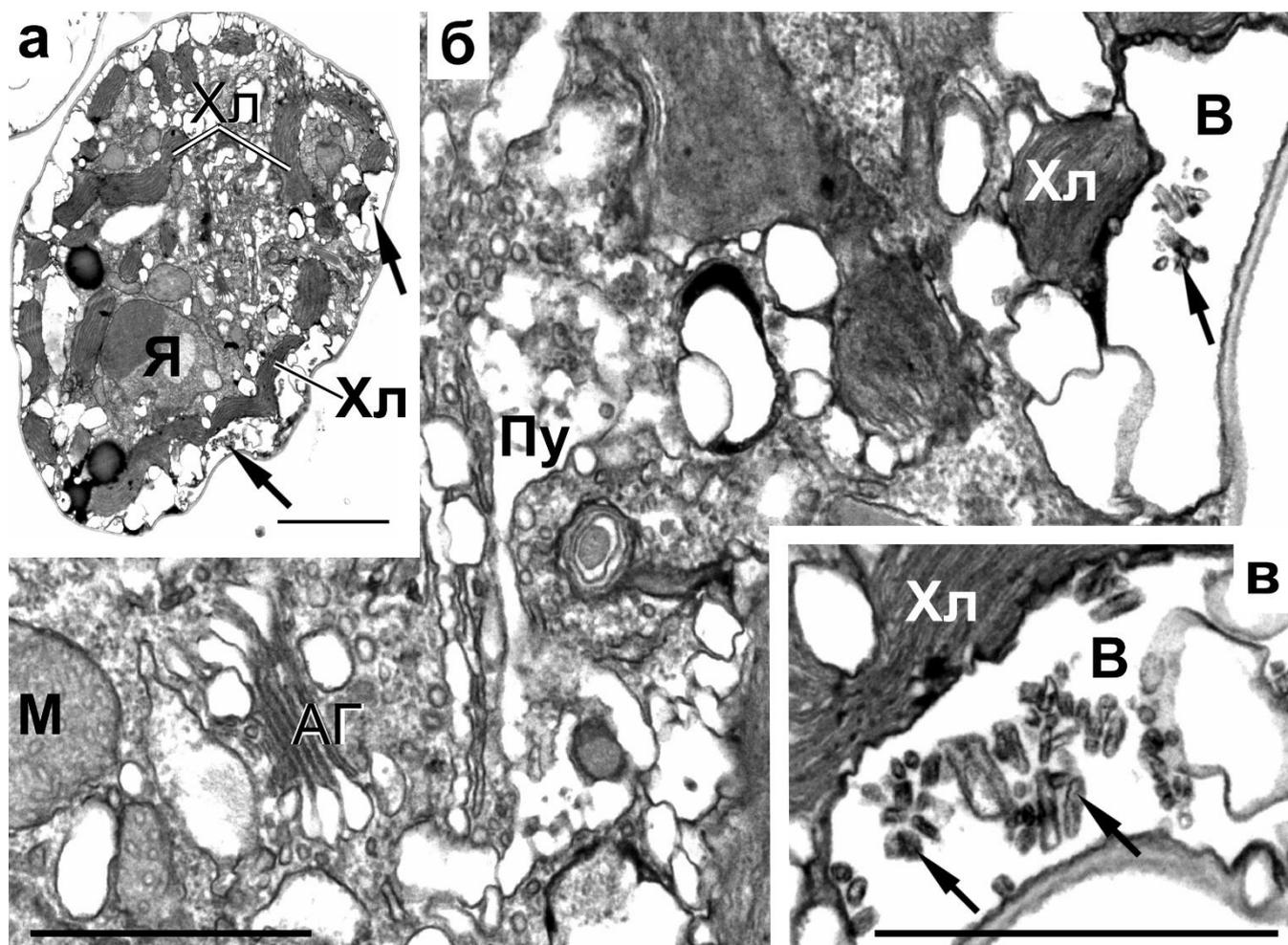


Рис. 1 Ультраструктурные особенности динофитовой микроводоросли *Amphidinium carterae* NSMA CCMR1314. ПЭМ-изображения с ультратонких срезов, контрастированных цитратом свинца без использования уранилацетата, показывают клеточные компартменты микроводоросли: митохондрии (М), вакуоли (В), ядро (Я), пузулу (Пу, вакуоль-подобный компартмент, образующийся в результате инвагинации цитоплазматической мембраны), хлоропласт (Хл), а также электронноплотные азотсодержащие включения (АСВ, гуанин) в вакуолях (отмечены стрелочками). ПЭМ-изображения (б) и (в) – увеличенные фрагменты изображения (а) с АСВ, отмеченными стрелочками. ПЭМ-изображения представлены для клеток микроводоросли через 26 часов после восстановления азотного питания. ПЭМ-изображения получены на микроскопе JEM-1011 совместно с сотрудником биологического факультета МГУ д.б.н. Гореловой О.А. Масштабные отрезки: (а) – 10 мкм, (б,в) – 1 мкм