

ФИТОПЛАНКТОН, ФИТОБЕНТОС,
ФИТОПЕРИФИТОН

УДК 574.522

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОГО ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА
НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ И ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
МЕТАБОЛИЗМА *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta)

© 2020 г. А. Ю. Алябьев^а, И. Н. Андреева^{а, *}, А. А. Пономарева^а, В. В. Сальников^а, М. А. Суслов^а

^аКазанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра
“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

*e-mail: andrejeva@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 14.06.2018 г.

После доработки 06.02.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Проведено сравнение ответной реакции пресноводной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. на количественно одинаковое изменение тоничности ростовой среды, вызванное внесением осмотиков различной природы (NaCl и сахарозы). При увеличении осмотичности ростовой среды (вне зависимости от природы осмотика) первоначально наблюдалось усиление термогенеза и снижение поглощения кислорода культурой хлореллы. В дальнейшем отмечена качественно различная реакция хлореллы на действие экви-осмотичных концентраций NaCl и сахарозы. При повышенном солевом фоне теплопродукция и фотосинтетическая активность, по сравнению с контролем, были снижены, а интенсивность дыхания была близка к контролю, тогда как в присутствии сахарозы культура имела более высокий уровень термогенеза, дыхания и фотосинтеза. Хлористый натрий не вызывал значимых изменений в ультраструктуре хлореллы и не приводил к достоверным изменениям диффузионного затухания намагниченности воды. При действии сахарозы выявлено изменение формы клеток, указывающее на циторриз. Величина среднего эффективного коэффициента диффузии воды (по данным ЯМР) снижалась, что также свидетельствует об уменьшении размеров клеток. Сахароза действовала на хлореллу как непроницающее осмотически активное вещество. Для пресноводной микроводоросли хлореллы токсическое действие NaCl в условиях умеренного солевого стресса, по-видимому, представляет меньшую угрозу, чем частичное обезвоживание, вызываемое сахарозой.

Ключевые слова: гиперосмотический стресс, NaCl, сахароза, циторриз, пресноводная водоросль, *Chlorella vulgaris*

DOI: 10.31857/S0320965220040026

ВВЕДЕНИЕ

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer. широко распространена в природе и представляет собой важный элемент экосистемы пресных водоемов. Будучи полноценным растительным организмом, она может служить моделью для изучения жизнедеятельности отдельной растительной клетки, в том числе приспособительных (адаптивных) возможностей при изменении условий обитания. Хлорелла представляет собой удобный объект как для исследования фундаментальных проблем, так и для решения задач прикладного характера, в частности, экологического контроля состояния пресных водоемов, разработки пищевых добавок и получения биотоплива третьего поколения (Samuel et al., 2017; Chen et al., 2015). В настоящее время хлореллу, на-

ряду с другими микроводорослями, рассматривают в качестве ресурса для пополнения кормовой базы животноводства, для промышленного производства, белков, аминокислот, витаминов, липидов и других физиологически активных соединений (Макарова и др., 2009; Almeida et al., 2017; Skjanes et al., 2013).

Осмотические процессы имеют большое значение во взаимоотношении растений с окружающей средой, а также для отдельных клеток многоклеточного организма, для которых таковой будет внутренняя среда организма. Но, безусловно, основная роль осмотических процессов состоит в поддержании жизнедеятельности одноклеточных водорослей, обитающих в постоянно изменяющихся условиях окружающей водной среды.

Высокое содержание NaCl в окружающей среде неблагоприятно влияет на растение, причем организм испытывает при этом действие как высокого осмотического давления среды, так и ток-

Сокращения: ЯМР – ядерно-магнитный резонанс; $D_{эф}$ – средний эффективный коэффициент диффузии воды.

сичности соли (Веселов и др., 2007; Пронина, 2000). В условиях гиперосмотического солевого стресса проникновение в клетку ионов натрия позволяет ей удерживать воду. Позже, по мере накопления осмопротекторов, уравнивающих осмотичность внутри- и внеклеточной среды, клетка выводит натрий против градиента концентрации (Балнокин, 1993).

Известно, что сахароза действует на клетки растений не только как осмотик, но и является продуктом их собственного метаболизма, энергетическим субстратом дыхательного метаболизма, а также может накапливаться клетками в качестве осмопротектора. Однако действие на растительную клетку экзогенной сахарозы неоднозначно. С одной стороны, в клетке существует механизм трансмембранного переноса сахарозы (Bush, 1993; Sauer, 2007), что позволяет потреблять экзогенную сахарозу через глюкозу, образующуюся после гидролиза сахарозы, связанными с клеточной стенкой инвертазами (Weschke et al., 2003). С другой стороны, сахарозу традиционно используют в экспериментах как непроницающее осмотически активное вещество для создания дефицита влаги (Грязнов, Сиротина, 2000; Полевой и др., 2001). Предполагается также, что сахароза способна выполнять сигнальную функцию (Rolland, 2002).

В ответ на любое внешнее воздействие в клетке включается каскад ранних неспецифических процессов, которые служат основой для главных механизмов адаптации (Колупаев, Карпец, 2012), что определяет особый интерес к изучению реакции организма в начальный период воздействия стрессового фактора. Дальнейшее развитие событий зависит от интенсивности воздействия и адаптивных возможностей организма (Шакирова, 2001; Яковец, 2009).

Цель работы – провести сравнительный анализ влияния, одинакового по силе, но разного по природе гиперосмотического стресса (не выходящего за пределы адаптационных возможностей организма), на ультраструктуру клеток и показатели, характеризующие энергетический метаболизм *Chlorella vulgaris*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила *Chlorella vulgaris* Beijer. (Chlorophyta) из Коллекции института ботаники (Санкт-Петербург). Культуру хлореллы выращивали в жидкой среде Тамия (Tamiya et al., 1953) при pH 7, $T = 28^\circ\text{C}$ и при постоянной продувке воздухом. Интенсивность освещения была 155 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$) в режиме 12/12 ч. Рост культуры оценивали по оптической плотности при 540 нм на фотоколориметре КФК-2МП (Россия).

Осмотический стресс создавали добавлением в культуральную среду NaCl (х.ч., “Экрос”) до конечной концентрации 0.1–0.3 М и сахарозы (х.ч., “Реахим”) до конечной концентрации 0.1–0.6 М.

Клетки хлореллы фиксировали по описанной ранее методике (Loseva et al., 2007) и просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Jeol, Япония). Анализ изменений ультраструктуры клеток проводили на основании трех аналитических повторностей, просматривали 150–200 клеток хлореллы. Размер клеток анализировали с помощью программ Image J и Microsoft Excel 7, рассчитывали среднее значение и ошибку среднего. Достоверность различий данных оценивали, используя t -критерий Стьюдента ($p < 0.05$).

Влияние гиперосмотического стресса на транспорт воды у хлореллы контролировали диффузионным методом ЯМР по величине среднего эффективного коэффициента диффузии воды в биомассе хлореллы; использовали технику спин-эхо с импульсным градиентом магнитного поля (Анисимов, Раткович, 1992). Измерения проводили на ядерно-магнитном релаксометре на частоте протонного резонанса 19.1 МГц с использованием цифрового приемопередающего комплекса “Spin-Track” (Resonance Systems Ltd., Йошкар-Ола) с накоплением сигналов намагниченности и фазовым циклированием. В экспериментах использовали трехимпульсную последовательность стимулированного эхо (Tanner, 1970). Схема эксперимента заключалась в регистрации диффузионных затуханий намагниченности воды от образца (биомассы хлореллы), представляющих зависимость относительной амплитуды сигнала спин-эхо (фактор R) от длительности и амплитуды импульсов градиента магнитного поля, и времени между градиентными импульсами t_d (время диффузии) (Анисимов и др., 2004). $D_{\text{эф}}$ определяли по наклону начального участка диффузионного затухания экстраполируемого экспонентой (Valiulin, Skirda, 2001).

$$R = \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{\text{эф}}),$$

где γ – гиромангнитное отношение для протонов, δ – длительность импульсов градиента, g – амплитуда импульсов градиента, $t_d = \Delta - \delta/3$.

Теплопродукцию (термогенез) хлореллы определяли методом прямой микрокалориметрии (Wadso, 1994) на микрокалориметре LKB Bio Activity Monitor BAM (Thermometric AB Jarfalla, Швеция).

Интенсивность дыхания и фотосинтеза хлореллы оценивали по поглощению/выделению кислорода полярографическим методом с помощью электрода Кларка (Зеленский, 1986).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы OriginPro 7 ($p = 0.05; 0.01$) На графиках представлены сред-

ние значения из пяти и более экспериментов с указанием среднего квадратичного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В условиях проведенных нами экспериментов сахароза не обеспечивала поддержание гетеротрофного роста хлореллы (рис. 1а), что позволило рассмотреть ее по отношению к хлорелле только как осмотически активное вещество.

Присутствие в ростовой среде NaCl оказывало влияние на рост хлореллы в зависимости от концентрации соли (Alyabyev et al., 2007). Повышение осмотичности среды после внесения и NaCl, и сахарозы приводило к снижению суточного прироста хлореллы, которое имело концентрационную зависимость. Причем, как фактор осмотичности, сахароза оказывала большее воздействие на суточный прирост культуры, чем NaCl (рис. 1б). Присутствие в ростовой среде NaCl в концентрации 0.1 и 0.2 М не влияло на рост культуры, тогда как экви-осмотичные концентрации сахарозы (0.2 и 0.4 М) вызывали достоверное снижение суточного прироста.

Далее сравнивали действие NaCl в концентрации 0.2 М (находящейся, согласно ранее полученным нами данным (Alyabyev et al., 2007), в пределах адаптационных возможностей культуры) и сахарозы в экви-осмотичной концентрации 0.4 М.

Внесение исследуемых осмотиков приводило к снижению рН культуральной жидкости (рис. 2) и на протяжении всего времени наблюдения (4 ч) рН в опытных вариантах оставалась ниже, чем в контроле.

На рис. 3 представлены электронно-микроскопические фотографии, иллюстрирующие реакцию хлореллы на гиперосмотический стресс. Клетки хлореллы, выращенные на стандартной жидкой среде Тамийя, были округлой формы размером 3–5 мкм. Оболочка клеток плотно прилегала к плазматической мембране. Основным объемом клетки занимал хроматофор с периноидом. Ламеллы в хроматофоре располагались параллельными рядами плотно друг к другу, между ними находились крахмальные зерна. Хроматофор часто огибал ядро, в котором выделена зона ядрышка. По периферии клетки располагались мелкие митохондрии. В цитоплазме присутствовали многочисленные метаболические вакуоли, содержимое которых могло быть неоднородным (рис. 3, контроль 1–4 ч). В течение инкубации хлореллы в контрольной среде средний размер клеток (диаметр) не изменялся и составлял от 3.36 ± 0.54 мкм (1 ч) до 3.39 ± 0.34 мкм (4 ч).

При гиперосмотическом стрессе, вызванном внесением в растущую культуру водоросли сахарозы, наблюдалось изменение формы клетки, указывающее на циторрикс. Контур индивидуаль-

ных клеток становился неровным (рис. 3, сахароза 1–3-й ч), что было следствием уменьшения объема (сжатие) протопласта из-за оттока воды и соответствующего искривления клеточной стенки. Ко 2-му ч происходили изменения в ультраструктуре хроматофора: наблюдали его “разрыхление” из-за увеличения межламеллярного расстояния. Сам хроматофор был более светлым по сравнению с таковым в контроле за счет снижения контрастности его мембран (рис. 3, сахароза 2–3-й ч). К 4-му ч большинство клеток вновь приобретали округлую форму с ровным контуром (рис. 3, 4-й ч), что свидетельствовало об уравнивании осмотичности внутри- и внеклеточной среды. При этом, однако, наблюдалось достоверное ($p < 0.05$) изменение размера клеток. Средний размер клеток при длительной инкубации в среде Тамийя был 3.4 ± 0.34 мкм, в присутствии сахарозы — 3.08 ± 0.56 мкм.

Повышение осмотичности среды культивирования при внесении NaCl не вызывало значительных морфологических изменений клеток хлореллы (рис. 3, NaCl 1–4-й ч).

Влияние гиперосмотического стресса на транспорт воды у хлореллы контролировали диффузионным методом ЯМР по величине $D_{эф}$. При действии сахарозы в концентрации 0.4 М к 4-му ч этот показатель уменьшался в 1.5 раза относительно контроля, в то время как действие NaCl не приводило к достоверным изменениям $D_{эф}$ (рис. 4). В плотном осадке хлореллы основной вклад в сигнал намагниченности дают молекулы внутриклеточной воды, диффузионное движение которых при скорости диффузии 80 м/с ограничено размерами клеток. Таким образом, снижение $D_{эф}$ в варианте опыта с сахарозой также свидетельствует об уменьшении размеров клеток, очевидно, из-за выхода воды из клеток во внешний раствор осмотика.

Изменение осмотичности ростовой среды затрагивало основные энергопродуцирующие процессы хлореллы — дыхание и фотосинтез (рис. 5). Внесение в растущую культуру хлореллы и NaCl, и сахарозы в первые 10–20 мин вызывало снижение поглощения ею кислорода (рис. 5а). Затем в течение 1 ч дыхание хлореллы восстанавливалось. При действии NaCl в течение последующих 3 ч интенсивность поглощения кислорода была близка к контролю, а в варианте с сахарозой повышалась на 20–30% (рис. 5а).

Фотосинтетическая активность хлореллы при действии гиперосмотического стресса проявляла качественно различную реакцию (рис. 5б). Первичная реакция хлореллы на внесение NaCl проявлялась в уменьшении на ~50% выделения кислорода, тогда как на сахарозу культура отвечала столь же существенным увеличением интенсивности фотосинтеза. В дальнейшем разница

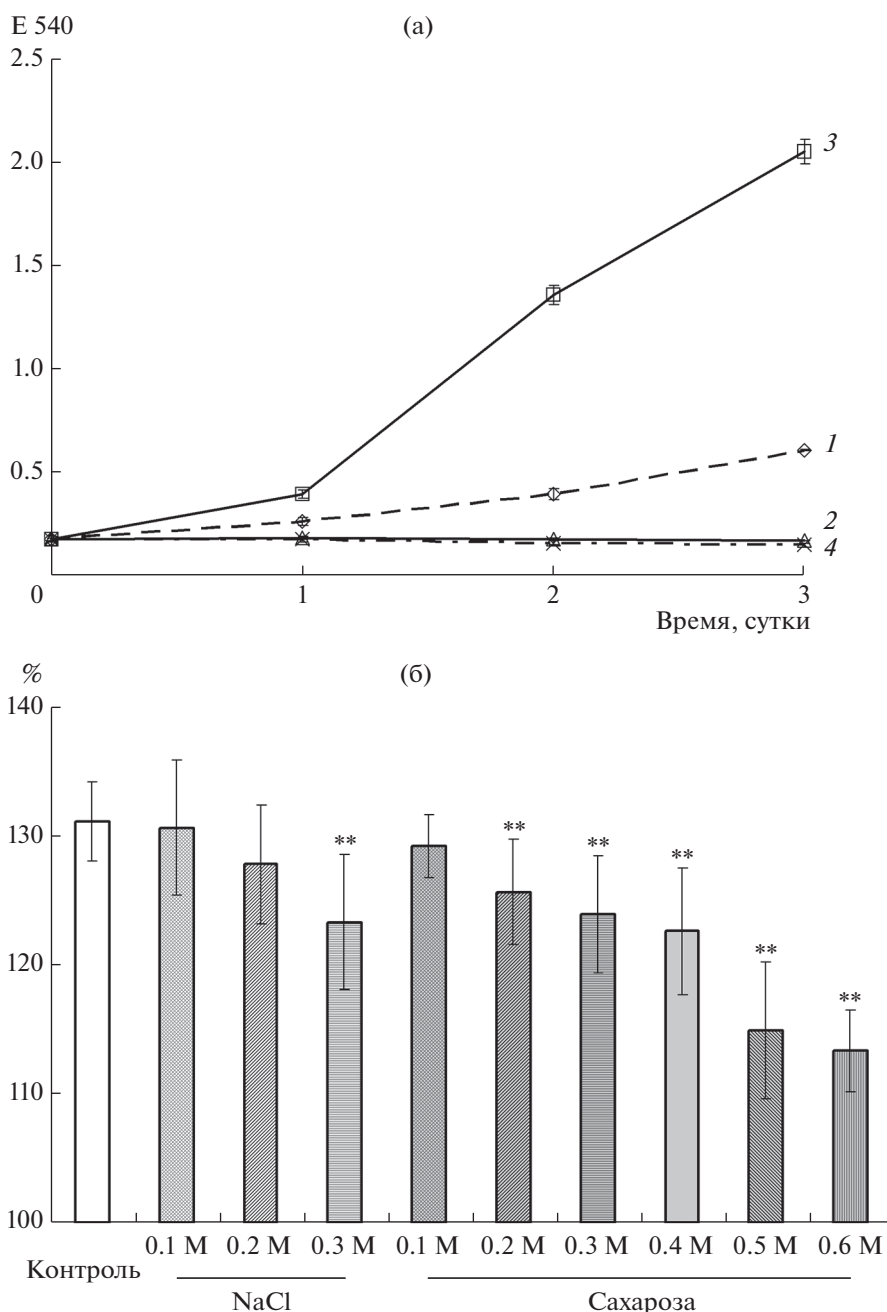


Рис. 1. Влияние условий культивирования на рост хлореллы: а – влияние состава среды и освещенности на гетеротрофный рост хлореллы (по оси ординат – оптическая плотность культуры E540 нм; по оси абсцисс – время эксперимента); б – влияние осмотичности ростовой среды на суточный прирост культуры хлореллы (по оси ординат – % исходной плотности культуры). 1 – контроль (среда Тамийя, при освещении), 2 – среда Тамийя, без освещения, 3 – среда Тамийя с глюкозой (10 г/л), без освещения, 4 – среда Тамийя с сахарозой (10 г/л), без освещения.

** Достоверные отличия от контроля при $p < 0.05$.

между контрольным и опытными вариантами количественно уменьшалась, но качественно оставалась той же. При действии NaCl выделение кислорода было снижено в течение всех четырех часов инкубации на 20–35%, при добавлении сахарозы – превышало контроль на 10–20% (рис. 5б).

Повышение тоничности среды оказывало влияние и на интегральный показатель уровня клеточного метаболизма – термогенез. Первичная реакция хлореллы на внесение осмотиков проявлялась в увеличении теплопродукции в первые 35–45 мин (рис. 6). В дальнейшем наблюдалась качественно различная реакция хлореллы на дей-

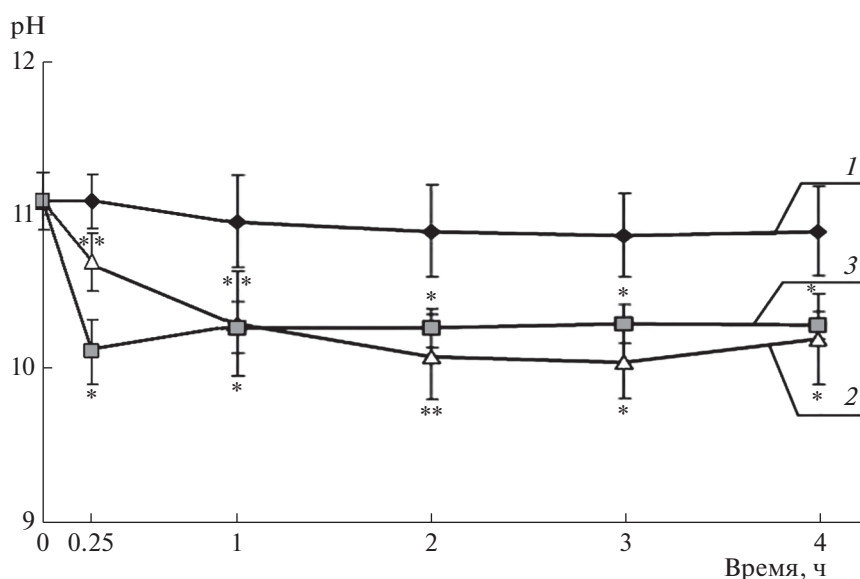


Рис. 2. Влияние осмотиков на pH культуральной среды хлореллы. 1 – контроль, 2 – 0.2 М NaCl, 3 – 0.4 М сахароза.

* Достоверные отличия от контроля при $p < 0.01$.

** $p < 0.05$.

ствии экви-осмотических концентраций NaCl и сахарозы – при повышенном солевом фоне отмечалось снижение термогенеза по сравнению с контролем, тогда как в присутствии сахарозы культура сохраняла более высокий уровень теплопродукции (рис. б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Chlorella vulgaris способна расти автотрофно, осуществляя классический фотосинтез, и гетеротрофно на среде, содержащей экзогенный источник углерода и энергии, в частности, глюкозу (Авилов, 1963; Андреева, 1975). В условиях проведенных нами экспериментов сахароза, в отличие от глюкозы, не обеспечивала поддержание гетеротрофного роста исследуемой культуры хлореллы, что позволило рассматривать ее как осмотический фактор среды.

Повышение осмотичности окружающей среды в тканях многоклеточных растений вызывает плазмолиз – полный или частичный отход протопласта от клеточной стенки, сжимающегося из-за выхода воды. В случае свободноживущих одноклеточных растительных организмов, имеющих, подобно хлорелле, клеточную стенку, картина плазмолиза может быть различной. Поскольку клеточная стенка не фиксирована снаружи, возможен как классический вариант с отхождением от клеточной стенки уменьшившегося в объеме протопласта (плазмолиз), так и сжатие всего объема клетки, включая клеточную стенку (циторриза) (Алехина и др., 2005). Наблюдаемое в первые часы действия сахарозы изменение формы клеток

хлореллы отражает процесс циторриза за счет оттока воды из клеток и полностью согласуется с данными ЯМР-диффузии и подтверждает предположение, что, в отличие от ионного осмотика NaCl, сахароза действует на хлореллу как непроникающее осмотически активное вещество. Последующее восстановление формы клеток свидетельствует об уравнивании осмотичности внутри- и внеклеточной среды, что согласуется с динамикой процесса адаптации к осмотическому стрессу. По данным работы Балнокина (1993), в этот период достигается максимум накопления клеткой осмолитов, уравнивающих осмотичность внутриклеточного содержимого с осмотичностью окружающей среды. Таким образом, NaCl в концентрации 0.2 М не вызывал видимых морфологических изменений в клетках хлореллы и не оказывал влияния на обводненность клеток, тогда как 0.4 М сахароза не проникала в клетки хлореллы, а приводила к оттоку воды, циторризу и изменению ультраструктуры клеток.

Засоление неблагоприятно влияет на многие основные процессы жизнедеятельности растений (Kebeish et al., 2014). В условиях проведенных нами экспериментов NaCl ингибирует фотосинтетическую активность и дыхание хлореллы уже с первых минут воздействия, не вызывая явных изменений в динамике диффузионных параметров водного переноса и ультраструктуре клеток. При засолении растение испытывает влияние как высокого осмотического давления среды, так и токсичности солей. Однако осмотический фактор имеет большое значение при очень сильном засолении. При меньшей степени засоления, когда сохраня-

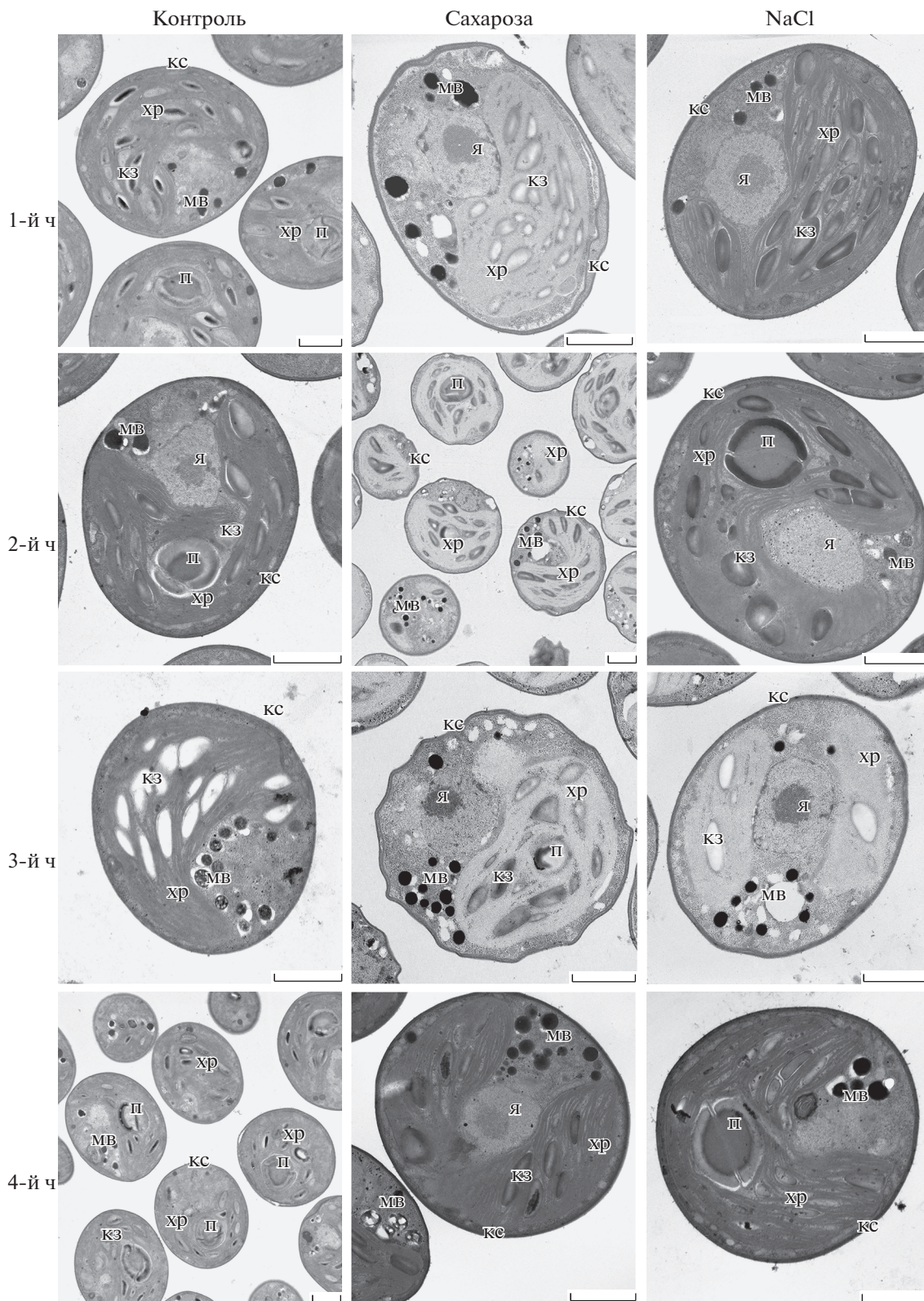


Рис. 3. Изменения ультраструктуры клеток хлореллы в условиях гиперосмотического стресса при действии 0.4 М сахарозы и 0.2 М NaCl в течение 1–4 ч. кз – крахмальные зерна, кс – клеточная стенка, мв – метаболические вакуоли, п – пиреноид, хр – хроматофор, я – ядро. Масштаб – 1 мкм.

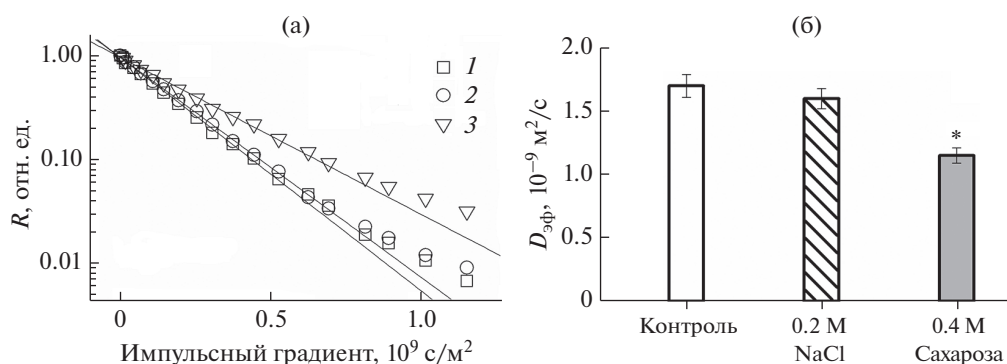


Рис. 4. Влияние осмотиков на диффузионные параметры водного переноса в биомассе хлореллы. а – диффузионное затухание намагниченности воды (R) в биомассе хлореллы после действия осмотика (по оси абсцисс величина импульсного градиента магнитного поля); б – средний эффективный коэффициент диффузии воды ($D_{эф}$) в биомассе хлореллы.

* Достоверные различия при $p < 0.05$.

ется возможность поглощения воды, неблагоприятное действие солей определяется их токсичностью (Пронина, 2000). При повышении тоничности среды вследствие внесения NaCl, растение начинает поглощать Na^+ и Cl^- для поддержания падающего осмотического потенциала. Увеличение концентрации этих ионов в цитоплазме нарушает клеточный метаболизм из-за возникающего ионного дисбаланса и токсичности ионов натрия (Палладина, 1999; Пронина, 2000). Процесс фотосинтеза особенно чувствителен к солевому стрессу, поскольку изолированные хлоропласты даже галофильных организмов обладают невысокой устойчивостью к NaCl (Балнокин и др., 1979). Длительное (в течение всех 4 ч инкубации) сохранение пониженной фотосинтетической активности может быть следствием затруднения вывода Na^+ из клеток хлореллы в условия эксперимента: выведение ионов натрия из растительной клетки осуществляется универсальным Na^+/H^+ -антипортером, функционирующим в мембранах как растительных, так и животных клеток; этот процесс блокируется сочетанием высокой солености и щелочной pH внеклеточной среды (Попова и др., 2000).

В отличие от солевого, сахарозный стресс после кратковременного первичного падения потребления кислорода в дальнейшем повышал уровень дыхания и фотосинтеза изучаемой культуры. Наблюдаемое в эксперименте стимулирование выделения фотосинтетического выделения кислорода могло быть следствием закисления ростовой среды при внесении сахарозы в растущую культуру хлореллы, так как ранее нами было показано временное стимулирующее действие снижения pH на фотосинтез микроводорослей (Alyabyev et al., 2011).

Гиперосмотический стресс, вызванный внесением в ростовую среду сахарозы, нарушает водо-

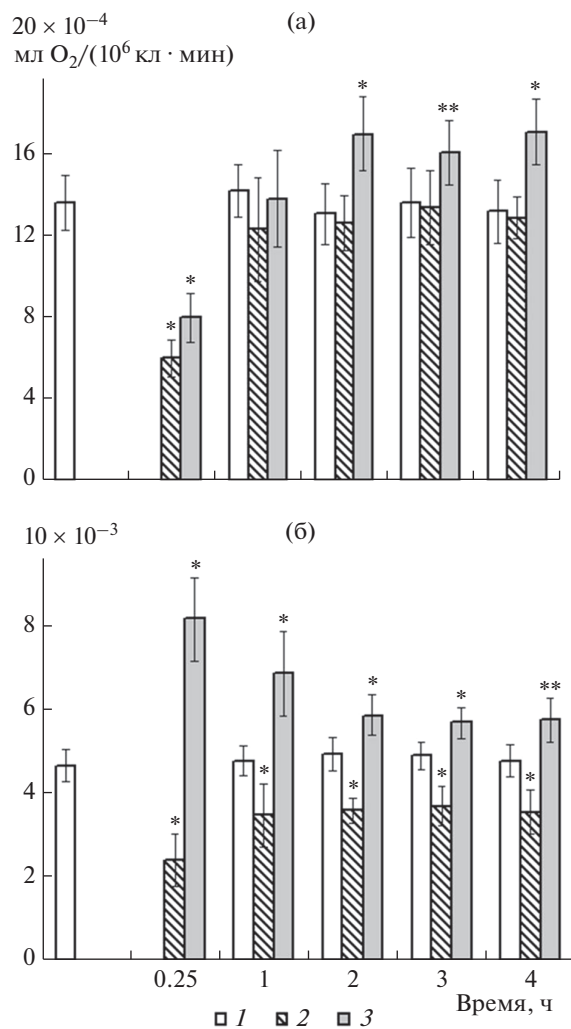


Рис. 5. Влияние гиперосмотического стресса на энергопродуцирующие процессы хлореллы. а – интенсивность поглощения кислорода (дыхание); б – интенсивность выделения кислорода (фотосинтез). 1 – контроль, 2 – 0.2 М NaCl, 3 – 0.4 М сахароза. * – достоверные различия с контролем при $p < 0.01$, ** – при $p < 0.05$.

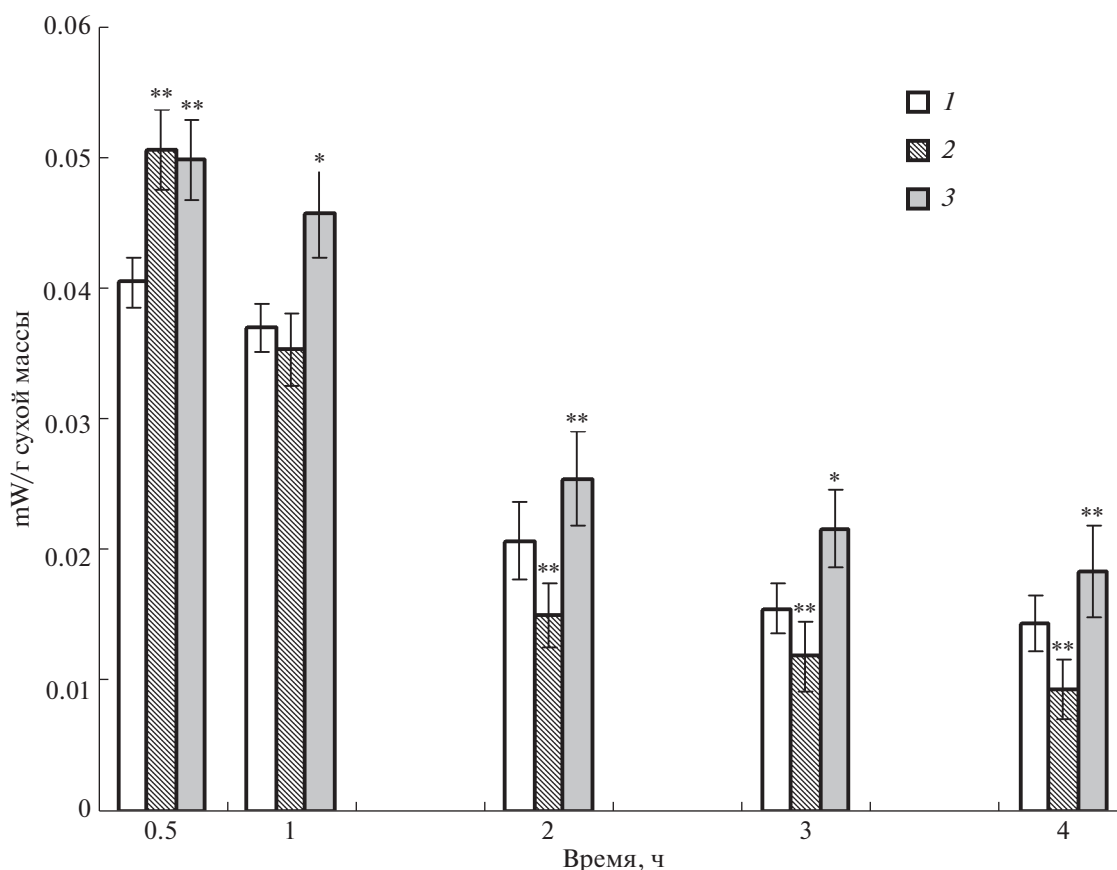


Рис. 6. Влияние гиперосмотического стресса на теплопродукцию хлореллы.
* – достоверные различия с контролем при $p < 0.01$, ** – при $p < 0.05$.

обмен клеток с окружающей средой; хлорелла оказывается в условиях относительного водного дефицита. Следует отметить, что наблюдающаяся в наших экспериментах реакция культуры хлореллы на эту своеобразную “засуху” сходна с таковой высших растений, у которых при неглубокой и/или непродолжительной “засухе” интенсивность фотосинтеза также несколько возрастает (Жолкевич и др., 1989). Отмеченное в наших экспериментах усиление дыхательного обмена и термогенеза хлореллы при сахарозном стрессе может быть следствием общей интенсификации метаболизма, определяемой условиями молекулярного краудинга в клетке, усилением эффекта “исключенного объема” (Чеботарева, 2007), вызванного в данном случае как обезвоживанием протопласта, так и накоплением осмопротектора. Изучение несубстратного действия сахарозы представляет несомненный интерес как один из возможных аспектов влияния на растения водного дефицита.

Проведенное нами ранее (Alyabyev et al., 2007) исследование действия NaCl на культуру клеток хлореллы, показало, что внесение в ростовую среду NaCl в концентрации $>0.4–0.5$ М существенно

снижало термогенез и угнетало рост культуры (вплоть до полного прекращения). Тогда как при длительном культивировании (до 5 сут) на среде, содержащей $0.05–0.2$ М NaCl, наблюдалось некоторое увеличение прироста культуры и усиление ее теплопродукции. Анализ полученных ранее результатов (Alyabyev et al., 2007), а также сравнение реакции хлореллы на действие экви-осмотических концентраций хлористого натрия и сахарозы, позволил рассматривать усиление термогенеза в качестве первичной адаптивной реакции хлореллы на гиперосмотический стресс в условиях, не выходящих за пределы адаптивных возможностей организма. Можно также заключить, что первоначальное увеличение теплопродукции хлореллы на фоне сниженного дыхания в ответ на действие стрессора следует рассматривать как показатель начавшегося адаптационного процесса.

Выводы. Изучение ответной реакции растущей культуры *Chlorella vulgaris* на увеличение осмотичности ростовой среды в начальный период воздействия (до 4 ч) показало, что при адаптации хлореллы к сахарозному стрессу, в отличие от солевого, происходят характерные изменения в ультраструктуре клеток, связанные с процессом

питорриза, и общая интенсификация энергетического метаболизма. Усиление дыхания, фотосинтеза и повышенный термогенез водоросли, отмеченные в условиях сахарозного стресса, указывают на более высокую, по сравнению с условиями солевого стресса, энергетическую “цену адаптации” хлореллы к нарушению водного обмена. Рассматривая суточный прирост культуры и динамику изменения ультраструктуры клеток, как интегральные показатели адаптации хлореллы к изменению окружающей среды, следует отметить более выраженное ингибиторное действие сахарозы по сравнению с NaCl, взятых в эквивалентных концентрациях. По-видимому, для *Chlorella vulgaris* токсическое действие NaCl в условиях умеренного солевого стресса представляет меньшую проблему, чем частичное обезвоживание, вызываемое в условиях эксперимента сахарозой.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Коллективному спектро-аналитическому центру физико-химических исследований строения, свойств и состава веществ и материалов Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр РАН” за возможность использования электронного микроскопа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр РАН”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авилов И.А. 1963. Использование различных источников углерода водорослями рода *Chlorella* в темноте // Вестник Ленинградского государственного университета. Сер. биол. Т. 15. № 3. С. 62.
- Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. 2005. Физиология растений. Москва: Издательский центр “Академия”.
- Андреева В.М. 1975. Род *Chlorella*. Ленинград: Наука.
- Анисимов А.В., Раткович С. 1992. Транспорт воды в растениях. Исследование импульсным методом ЯМР. Москва: Наука.
- Анисимов А.В., Ионенко И.Ф., Романов А.В. 2004. Метод спин-эхо ЯМР в исследованиях трансляционной диффузии воды селективно по апопласту, цитоплазматическому и вакуолярному симпласту растений // Биофизика. Т. 49. № 5. С. 891.
- Балнокин Ю.В. 1993. Ионный гомеостаз и осморегуляция у галотолерантных микроводорослей // Физиол. раст. Т. 40. № 4. С. 567.
- Балнокин Ю.В., Строгонов Б.П., Кукаева Е.А., Медведев А.В. 1979. Защитная функция клеток *Dunaliella* при высоких концентрациях NaCl в среде // Физиол. раст. Т. 26 № 3. С. 552.
- Веселов Д.С., Маркова И.В., Кудоярова Г.Р. 2007. Реакция растений на засоление и формирование солеустойчивости // Усп. совр. биол. Т. 127. № 5. С. 482.
- Грязнов В.П., Сиротина Л.В. 2000. Практикум по физиологии растений. Белгород: Белгородский гос. ун-т.
- Жолкевич В.Н., Гусев Н.А., Капля А.В. и др. 1989. Водный обмен растений. Москва: Наука.
- Зеленский М.И. 1986. Полярографическое определение кислорода в исследовании фотосинтеза и дыхания. Ленинград: Наука.
- Колунаев Ю.Е., Карпец Ю.В. 2012. Ранние реакции растений на действие стрессоров: повреждение, сигналинг, защита? // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. Вып. 2. № 26. С. 6.
- Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. 2009. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем // Экосистем, их оптимиз. охр. Вып. 20. С. 120.
- Палладина Т.А. 1999. Роль протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в устойчивости растений к солевому стрессу // Усп. совр. биол. Т. 119. № 5. С. 451.
- Полевой В.В., Чиркова Т.В., Лутова Л.А. 2001. Практикум по росту и устойчивости растений. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та.
- Попова Л.Г., Шумкова Г.А., Андреев И.М., Балнокин Ю.В. 2000. Na⁺-зависимая электрогенная АТФаза плазматической мембраны галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* // Докл. РАН. Т. 375. № 4. С. 544.
- Пронина Н.Б. 2000. Экологические стрессы. Москва: Изд-во МСХА.
- Чеботарева Н.А. 2007. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза // Усп. биол. хим. Т. 47. С. 233.
- Шакирова Ф.М. 2001. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем.
- Яковец О.Я. 2009. Фитофизиология стресса. Минск: Беларус. гос. ун-т.
- Almeida H.N., Calixto G.Q., Chagas B.M.E. et al. 2017. Characterization and pyrolysis of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*: potential of bio-oil and chemical production by Py-GC/MS analysis // Environ. Sci. Pollut. Res Int. Apr 17. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9009-2>
- Alyabyev A.Ju., Loseva N.L., Gordon L.Kh. et al. 2007. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells // Thermochimica Acta. V. 458. P. 65.
- Alyabyev A., Andreyeva I., Rachimova G. 2011. Influence of pH shift and salting on the energetics of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* // J. Therm. Anal. Calorim. V. 104. P. 201.
- Bush D.R. 1993. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants // Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol. V. 44. P. 513.
- Camuel A., Guieysse B., Alcántara C., Béchet Q. 2017. Fast algal eco-toxicity assessment: Influence of light intensity and exposure time on *Chlorella vulgaris* inhibition

- by atrazine and DCMU // *Ecotoxicol. Environ. Safety*. V. 140. P. 141.
- Chen W.H., Lin B.J., Huang M.Y., Chang J.S. 2015. Thermochemical conversion of microalgal biomass into bio-fuels: a review // *Bioresour Technol*. V. 184. P. 314.
- Kebeish R., El-Ayouty Y., Hussein A. 2014. Effect of salinity on biochemical traits and photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris* // *Egypt. J. Bot*. V. 54. № 2. P. 281.
- Loseva N.L., Alyabyev A.Ju., Gordon L.K. 2007. The effect of AgNO₃ on the bioenergetic processes and the ultra-structure of *Chlorella* and *Dunaliella* cells exposed to different saline conditions // *Thermochimica Acta*. V. 458. P. 71.
- Rolland F., Moore B., Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants // *Plant Cell*. V. 14. P. 185.
- Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters // *FEBS Lett*. V. 581. № 12. P. 2309.
- Skjanes K., Rebours C., Lindblad P. 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process // *Crit. Rev. Biotechnol*. V. 33. № 2. P. 172.
- Tamiya H., Ywamura T., Shibata K. et al. 1953. Correlation between photosynthesis and light-dependent metabolism in the growth of *Chlorella* // *Biochim. Biophys. Acta*. № 1. P. 25.
- Tanner J.E. 1970. Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies // *J. Chem. Phys*. V. 52. P. 2523.
- Valiullin R., Skirda V. 2001. Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media // *J. Chem. Phys*. V. 114. № 1. P. 452.
- Wadso I. 1994. Microcalorimetry of aqueous and biological systems // *Experimental thermodynamics. Solution calorimetry*. IV. London: Blackwell Sci. Publ. P. 267.
- Weschke W., Panitz R., Gubatz S. et al. 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development // *Plant J*. V. 33. P. 395.

Influence of Moderate Hyperosmotic Stress on Ultrastructure and Indicators of Energy Metabolism of *Chlorella vulgaris* Beijer. (Chlorophyta)

A. J. Alyabyev¹, I. N. Andreyeva^{1, *}, A. A. Ponomareva¹, V. V. Salnikov¹, and M. A. Suslov¹

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of FRC Kazan Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

*e-mail: andreyeva@kibb.knc.ru

In the work there was made the comparison of response of fresh-water alga *Chlorella vulgaris* on quantitatively identical change of tonicity of growth medium by different osmotica (NaCl and sucrose). At the rise of growth medium osmotic potential (without dependence by nature of osmotica) it was observed initially increase of *Chlorella* termogenesis and decrease oxygen absorption. Further difference in reaction of *Chlorella* on equiosmotic concentration NaCl and sucrose was marked; at the raised salt background termogenesis and photosynthetic activity in comparison with the control have been lowered, and intensity of respiration was close to the control whereas in presence of sucrose the culture had higher level termogenesis, respiration and photosynthesis. Sodium chloride did not cause significant changes in *Chlorella* ultrastructure and did not lead to authentic changes of diffusional decay of water magnetisation in comparison with the control. Under the sucrose stress it was revealed change of the form of the cells indicating on cytorhysis. Value of effective water diffusion coefficient (according to NMR data) decreased and so also indicated to reduction of cell sizes. Sucrose act on *Chlorella* as not penetrating osmotically active substance. Under moderate hyperosmotic stress toxicity of NaCl is a smaller problem for fresh-water microalga *Chlorella*, than the partial dehydration caused by sucrose.

Keywords: hyperosmotic stress, fresh-water alga, sucrose, cytorhysis, *Chlorella vulgaris*, NaCl