

УДК 581.1.

ДЕЙСТВИЕ ФОРМЫ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА НА РОСТ И ГЕТЕРОТРОФНУЮ ФИКСАЦИЮ ^{14}C -БИКАРБОНАТА У *Chlamydomonas reinhardtii*

© 2019 г. А. П. Смоллов^{а, *}, А. И. Маслов^а, Г. Н. Ширшикова^а, И. А. Найдов^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук, Пуцзино, Россия

*e-mail: smar49@mail.ru

Поступила в редакцию 29.03.2018 г.

После доработки 23.11.2018 г.

Принята к публикации 17.12.2018 г.

Ранее установленное воздействие формы минерального азота питательной среды (аммоний, нитрат) на содержание рибосом в клетках хламидомонады и каллуса сои нуждается в экспериментальном обосновании предполагаемой интерпретации обнаруженного феномена. С целью выяснения механизма действия аммония на формирование белок-синтезирующих структур (рибосом) у клеток зеленой водоросли хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*, штамм *gr 21*), проводились сравнительные исследования по воздействию формы минерального азота (нитрата и аммония) на рост и гетеротрофную фиксацию ^{14}C -бикарбоната. Проведенные исследования показали, что при культивировании клеток на нитратной среде наблюдалось торможение процесса клеточного деления (митоза) в начале цикла выращивания (1–3 день). В дальнейшем, к концу цикла выращивания (7–10 день), число клеток и содержание сухой массы в клетках выравнивалось. Установлено, что клетки, выращенные на аммонийной среде ТАР, фиксировали $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ с большей скоростью, чем клетки, выращенные на нитратной среде ТАР. Анализ полученных результатов показал, что превышение скорости темновой фиксации $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ у клеток, выращенных на аммонийной среде, по сравнению со скоростью темновой фиксации $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ у клеток, выращенных на нитратной среде, сохранялось независимо от параметра относительно которого проводилось сравнение: число клеток или единица сухой массы.

Обсуждается предположение о том, что наличие аммония в питательной среде может активировать синтез дополнительного количества аминокислот, участвующих в образовании белковых компонентов рибосом клеток водоросли хламидомонады.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, аммоний, нитрат, рост, гетеротрофная фиксация ^{14}C -бикарбоната

DOI: 10.1134/S0015330319050191

ВВЕДЕНИЕ

Аммоний и нитрат — две основные формы минерального азота, которые доминируют в почве и которые способны усваиваться фотосинтезирующими организмами. Для большинства растительных культур нитрат является предпочтительной формой минерального азота, тогда как аммонийная форма азота часто используется растительными объектами только в сочетании с нитратом. Использование аммония в качестве единственного источника азота весьма нежелательно, поскольку приводит к гибели растения, если концентрация этого компонента превышает допустимый предел [1, стр. 210].

Минеральный азот необходим клеткам для синтеза азотсодержащих органических соедине-

ний — аминокислот и белков. И если аммонийная форма азота является уже готовой формой для синтеза азотсодержащих органических соединений [2, стр. 188], то для утилизации нитрата растительной клеткой требуется его восстановление до аммония. Для этого в клетках растения существует целый комплекс ферментных систем, способствующих переходу окисленной формы минерального азота в восстановленную [2, стр. 159].

При исследовании влияния формы минерального азота на становление структуры фотосинтетического аппарата у клеток каллусной культуры сои (*Glycine max* L.) [3], было замечено, что отсутствие аммония в составе питательной среды приводило к слабой организации ламеллярной структуры хлоропластов и митохондрий. Более того,

количество рибосом в клетках каллуса резко снижалось (в 5–10 раз), если аммоний отсутствовал в составе питательной среды [3]. Нарушение ламеллярной структуры хлоропластов при отсутствии аммонийного компонента питания наблюдалось и у нативных клеток высшего растения: гороха (*Pisum sativum* L.) [4] и пшеницы (*Triticum vulgare muticum* L.) [5].

Однако среди низших растений (водоросли) существуют организмы, способные расти и размножаться на питательных средах, содержащих исключительно нитратную или аммонийную форму минерального азота. Таким растительным объектом является зеленая одноклеточная водоросль – хламидомонада (*Chlamydomonas reinhardtii*) [6, стр. 286].

Исследования, по воздействию формы минерального азота, проведенные на клеточной суспензии *C. reinhardtii* (штамм *gr 21*), также показали существенное снижение количества рибосом в клетках водоросли, если источником азота служила исключительно его нитратная форма [7]. Однако отметим, что снижение количества рибосом у клеток водоросли на нитратной (т.е. безаммонийной) среде было не столь значительным (в 2 раза).

Поскольку любая мембрана представляет собой белково-липидный, а рибосома – нуклеопротеиновый комплекс, то снижение количества рибосом в клетках сои и слабая организация мембранных структур их органелл, при отсутствии или дефиците аммония в составе питательной среды, наводили на мысль о снижении активности белкового обмена. С другой стороны, ламеллярная структура хлоропластов клеток хламидомонады практически не менялась в зависимости от формы утилизированного азота (нитрат или аммоний) [8] и лишь снижение количества рибосом в клетках, выращенных на безаммонийной среде, указывало на возможное изменение белковой направленности клеточного обмена.

Изменение интенсивности белкового обмена в клетке возможно двумя способами: либо за счет изменения активности уже существующего пути образования белковых макромолекул, либо за счет появления (или исчезновения) дополнительного пути их образования.

При наличии свободного аммония, путь гетеротрофной (темновой) фиксации CO_2 – один из вариантов усиления активности белковой направленности клеточного обмена. Стимуляция активности этого процесса аммонием была установлена на суспензии клеток клена (*Acer pseudoplatanus* L.) [9] и тканях листа кукурузы (*Zea mays* L.) [10].

Предполагая, что и в клетках зеленой водоросли хламидомонады вполне возможна активация аммонием такого пути образования белка, мы провели исследование, целью которого было: 1) обна-

ружение наличия пути гетеротрофной фиксации CO_2 в клетках *C. reinhardtii*; 2) оценка влияния формы минерального азота в питательной среде на этот процесс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила миксотрофная одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* (штамм *gr 21*). Культивирование клеточной суспензии проводилось на питательной среде ТАР [11, стр. 576], в которой, в зависимости от цели эксперимента, присутствовала либо только аммонийная (NH_4Cl – вариант 1), либо только нитратная (KNO_3 – вариант 2) форма минерального азота. Элементное содержание азота в питательной среде с нитратным или аммонийным компонентом выравнивалось до стандартного значения (стандарт – среда ТАР) и соответствовало примерно 7 мМ азота для обоих вариантов среды.

Перед началом эксперимента исходную клеточную суспензию *C. reinhardtii* культивировали при постоянном перемешивании в 300 мл конических колбах со 100 мл питательной среды при температуре 25°C и слабой освещенности (около 1 клк) в течение 10–12 дней на безаммонийной (нитратной) среде (вариант 2). Затем равные количества инокулята клеток (100 мкл) из безаммонийной среды помещали на среды с разным составом минерального азота (варианты 1 и 2) и вновь культивировали при тех же условиях в течение 10–12 дней. Только после такой процедуры (адаптации) клетки могли быть использованы в эксперименте. Для чистоты эксперимента, безаммонийная среда (вариант 2) не должна была содержать даже микроколичества аммонийного компонента, поэтому микрокомпонент $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ заменяли на $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Другие составляющие и параметры среды оставались на уровне стандарта среды ТАР.

Адаптированные к нитратной или аммонийной среде суспензии клеток (вариант 1 и 2) выращивались в 300 мл конических колбах в климатической камере в условиях: 16/8 часов свет/темнота, интенсивность света – около 1 клк, температура $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Перемешивание клеток суспензии проводилось с помощью магнитных мешалок. Частота вращения, установленная опытным путем, позволяла поддерживать клетки во взвешенном состоянии на протяжении всего цикла выращивания клеток.

Гетеротрофную (темновую) фиксацию CO_2 клетками *C. reinhardtii* оценивали по количеству ^{14}C -бикарбоната, включенного в кислотоустойчивые продукты обмена. 2–5 мл суспензии клеток инкубировали в 2 мМ растворе бикарбоната в фосфатном буфере в темноте при комнатной температуре, периодически перемешивая в течение ча-

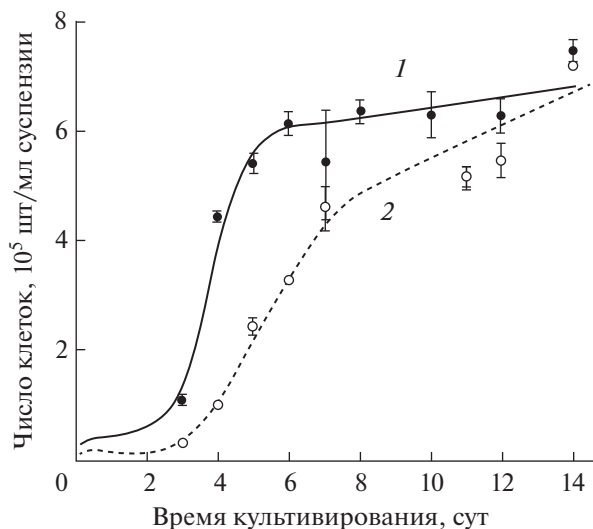


Рис. 1. Рост числа клеток *Chlamydomonas reinhardtii* в цикле культивирования на аммонийной и нитратной питательных средах ТАР. 1 — клетки, выращенные на аммонийной среде; 2 — клетки, выращенные на нитратной среде. Точка 0 — начало культивирования уже адаптированных клеток 10–12 дневного возраста предыдущего пассажа на свежей питательной среде.

са. Затем в суспензию добавляли 2–4 МБК ^{14}C -бикарбоната. Пробы суспензии (по 100 мкл) периодически отбирали в процессе инкубации (в течении 1 часа) и вносили в сцинтилляционные сосудики, содержавшие по 100 мкл муравьиной кислоты. После получаса выдерживания пробы просчитывали на сцинтилляционном счетчике Beckman LS 6500 (США) в коктейле для водных проб Ready Safe (Beckman). Количество фиксированной за первые 15 мин после добавления метки углекислоты рассчитывали, исходя из удельной радиоактивности ^{14}C -бикарбоната в среде инкубации.

Подсчет числа клеток суспензии в цикле выращивания осуществляли с помощью камеры Фукса-Розенталя (ПАО Красногвардеец, Санкт-Петербург, Россия) по стандартной процедуре.

Для сравнительного анализа воздействия окисленной и восстановленной формы азота на распределение клеток в суспензии по размеру производилась обработка микроизображений клеток на микроскопе Leica TCS SPE (Leica, Германия). Величину клеток оценивали по площади их сечения. Обработка изображений производилась в программе ImageJ. Полученные микроскопические изображения преобразовывались в двоичную маску по методу Отса [12]. На полученной маске вручную исправлялись незамкнутые участки клеток и разделялись слишком близко расположенные, «слипшиеся» клетки. Площади клеток вычисляли через функцию анализа частиц (Analyze particles). В каждой пробе представлены средние размеры для 100–1000 клеток в зависимости от количества клеток в поле зрения (у 7–10 снимков).

Определение сухой массы клеток суспензии проводилось после достижения постоянного веса взятой пробы клеток при температуре 90°C .

Полученные данные представляют собой характерные результаты одного из трех-пяти биологических экспериментов в трех повторностях каждый; \pm — стандартное отклонение. Отношение скорости фиксации бикарбоната к параметрам роста (на 10^5 клеток или на мг сухой массы) является средней величиной всех биологических экспериментов, а стандартное отклонение — средней величиной всех отклонений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост числа клеток *C. reinhardtii* в суспензии на средах вариантов 1 и 2 осуществлялся по типичной для подобных растительных объектов зависимости: S-образная кривая роста. Однако, несмотря на идентичный характер увеличения числа клеток в суспензии у вариантов 1 и 2 во время цикла выращивания, скорости прохождения первых фаз роста у них (лаг-фаза, экспоненциальная фаза) сильно различались (рис. 1). Скорость роста числа клеток суспензии, лишенной аммонийного компонента (вариант 2), в экспоненциальной и линейной фазах роста была значительно ниже, чем у клеток суспензии, растущей на экзогенном аммонии (вариант 1). Такая задержка в увеличении числа клеток могла быть вызвана снижением активности митотического процесса клеток, лишенных экзогенного аммония. Подобная интерпретация полученного результата подтверждается при оценке распределения клеток по их размерам (табл. 1).

Поскольку деление одиночной клетки хламидомонады может происходить на более чем две дочерние части [6, стр. 206] (обычно на четыре), то лишь самые мелкие клетки (в наших экспериментах — клетки с площадью поперечного сечения 20 мкм^2) могут достоверно считаться только что разделившимися особями. В связи с этим, за основу анализа была взята самая мелкая клетка суспензии (площадь поперечного сечения 20 мкм^2). Следовательно, клетки площадью поперечного сечения около 80 мкм^2 могут считаться материнскими и готовыми к делению, т.е. закончившими свой ростовой цикл. Имевшиеся в суспензии агрегаты клеток и делящиеся клетки при подсчете числа клеток в суспензии не учитывались, поскольку их присутствие в суспензии было лишь эпизодическим и составляло обычно не более 1–3% от общего количества клеток на сетке камеры Фукса-Розенталя.

Анализ распределения клеток в суспензии по их размерам показал, что количество клеток малого сечения, в начальный период культивирования был существенно выше у клеток, выращен-

Таблица 1. Количество мелких и крупных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* в пробах* суспензий вариантов 1 и 2 в цикле выращивания

Время культивирования, сутки	Вариант 1		Вариант 2	
	20–40 мкм ²	>80 мкм ²	20–40 мкм ²	>80 мкм ²
3	434 ± 21	2 ± 0	86 ± 9	16 ± 3
5	212 ± 12	4 ± 2	173 ± 13	56 ± 7
7	130 ± 15	60 ± 4	126 ± 16	94 ± 10

Примечание. *Размер взятой пробы на указанные в таблице дни культивирования зависел от плотности наименее плотной суспензии.

ных на аммоний-содержащей среде (вариант 1). (см. табл. 1, площадь сечения 20 мкм²). В конце цикла выращивания на безаммонийной среде (вариант 2) существенно увеличивалось число гигантских клеток (см. табл. 1, площадь сечения более 80 мкм²). Таким образом, задержка роста клеточной суспензии на безаммонийной среде в начале цикла выращивания и гигантизм клеток в конце цикла выращивания (вариант 2) могут свидетельствовать в пользу подавления митотического процесса деления клеток дефицитом аммония.

Эксперименты по определению сухой массы клеток в цикле выращивания показали, что различия между вариантами клеток были не столь существенными, по крайней мере, на участках линейной и стационарной стадии роста (табл. 2). Низкая исходная плотность клеточной суспензии в начале цикла выращивания (лаг-фаза) не позволяет уверенно говорить о влиянии формы минерального азота на процесс накопления сухой массы клеток, поскольку использовавшийся нами способ определения сухой массы (взвешивание) не мог достоверно определить различия в накоплении сухой массы клеток у вариантов, выращенных на аммонийном и нитратном компоненте.

Опыты по определению скорости темновой фиксации $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ клетками вариантов 1 и 2 позволили установить, что наличие в питательной среде аммонийной формы азота приводило к усилению процесса гетеротрофной фиксации CO_2 (рис. 2). По-видимому, более высокие значения скорости гетеротрофной фиксации $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ у клеток, выращенных на среде с аммонием, начинаются сразу же после внесения инокулята клеток в соответствующую питательную среду, поскольку повышенные значения активности этого процесса у клеток варианта 1 наблюдали как в начале, так и в конце цикла выращивания водоросли.

Превышение скорости темновой фиксации $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ у клеток, выращенных на аммоний-содержащей среде, по сравнению со скоростью этого процесса у клеток, выращенных на безаммонийной среде, сохранялось независимо от параметра, относительно которого сравнивались эти

два варианта: $\times 10^5$ клеток или $\times 1$ мг сухой массы (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования по влиянию формы минерального азота на рост клеток водоросли хламидомонады штамма *gr 21* показали, что суммарное накопление биомассы клеток вариантов 1 и 2 в конце цикла выращивания практически не различалось (табл. 2), тогда как форма кривой роста числа клеток в суспензии менялась при таком способе воздействия (рис. 1). При анализе распределения клеток по их размерам было обнаружено, что сразу же после внесения инокулята на свежую питательную среду происходило торможение процесса клеточного деления, если в составе питательной среды отсутствовал аммонийный компонент (табл. 1). Т.е. наличие восстановленной формы минерального азота каким-то образом способствует началу процесса клеточного деления. Что является причиной задержки деления клеток, лишенных аммонийного компонента, остается пока неясным. Отсутствие необходимой информации по этому вопросу не позволяет определиться в интерпретации полученного результата. Допускаем, что инициация клеточного деления и ранние этапы развития клеток требуют наличия определенного количества аммонийного фактора, участвующего в обра-

Таблица 2. Действие формы минерального азота на содержание сухой массы (мг/мл суспензии) в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* вариантов 1 и 2 в цикле выращивания

Вариант клеток	Время культивирования, сутки			
	3	5	8	10
1	1.29 ± 0.35	2.76 ± 0.21	3.38 ± 0.28	3.00 ± 0.18
2	2.09 ± 0.30	2.69 ± 0.30	4.14 ± 0.53	2.90 ± 0.21

Примечание. Вариант 1 – клетки, выращенные на аммонийной питательной среде ТАР; вариант 2 – клетки, выращенные на нитратной среде питательной среде ТАР.

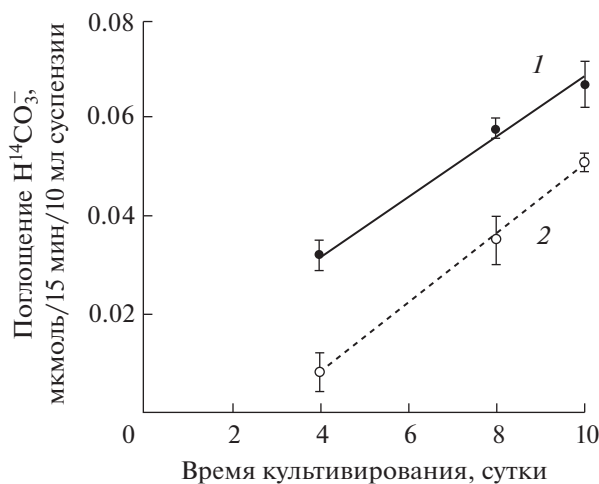


Рис. 2. Скорости гетеротрофной (темновой) фиксации $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ клетками *Chlamydomonas reinhardtii* в цикле культивирования на аммонийной и нитратной питательных средах ТАР. 1 – клетки, выращенные на аммонийной среде; 2 – клетки, выращенные на нитратной среде. Точка 0 – начало культивирования уже адаптированных клеток 10–12 дневного возраста предыдущего пассажа на свежей питательной среде.

зовании “сигнала” или являющимся “сигналом” для деления клетки. Вполне вероятно, что в начале клеточного деления дефицит эндогенного аммония возникает в результате пониженной нитрат-восстанавливающей активности, связанной либо с низким содержанием соответствующих ферментов, либо с их низкой активностью, либо с быстрой утилизацией образующегося свободного аммония в “несигнальные” соединения.

Как было установлено нами ранее, восстановленная форма минерального азота способствовала формированию большего количества белок-синтезирующих структур в растительных клетках, чем окисленная форма минерального азота [3]. Аналогичный результат по отношению к количеству рибосом у клеток *C. reinhardtii* [8] и изменения в структуре фотосинтетического аппарата у клеток каллуса сои под влиянием аммонийного компонента [3] давали основание предположить, что аммонийная форма минерального азота способствует активации белковой направленности метаболического обмена.

Известно, что рибосомы представляют собой рибонуклеопротеиновый комплекс, составленный из нескольких десятков белковых молекул и нескольких молекул р-РНК [13, стр. 133 и 109]. Биогенез белок-синтезирующих структур – многоэтапный процесс, начинающийся с экспрессии соответствующих генов и происходящий в трех компартментах клетки: цитоплазме, нуклеоплазме ядра и ядрышке [14]. Синтез большинства рибосомных белков происходит на рибосомах в ци-

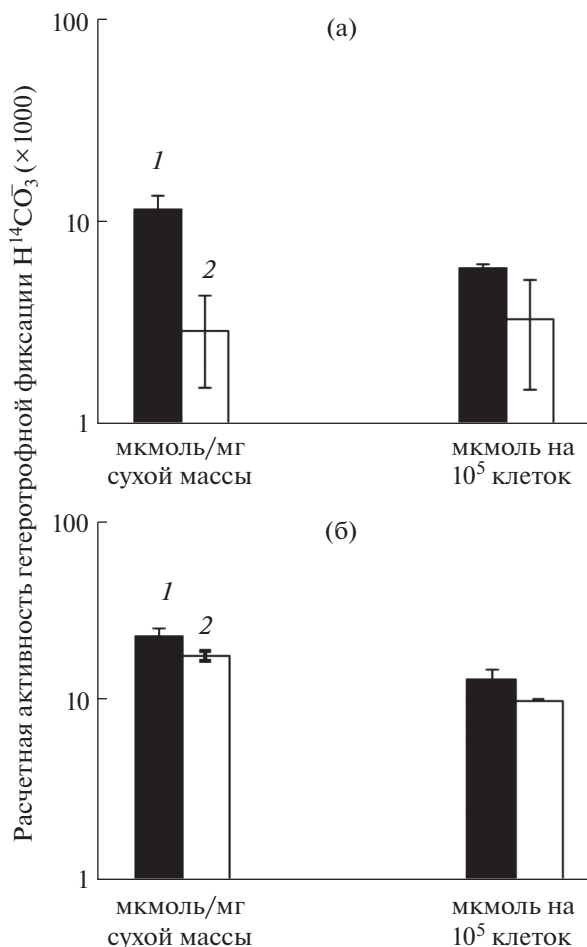


Рис. 3. Расчетные показатели активности гетеротрофной $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -фиксации в темноте у клеток *Chlamydomonas reinhardtii*, выращенных на аммонийной и нитратной питательных средах ТАР относительно ее физиологических параметров на 5 (а) и 10 (б) день культивирования в цикле выращивания. 1 – клетки, выращенные на аммонийной среде; 2 – клетки, выращенные на нитратной среде. Для более удобного представления результаты умножены на 1000 и показаны в логарифмическом масштабе.

топлазме, а два других компартмента являются местом формирования рибонуклеиновой составляющей части рибосомы.

При исследовании влияние формы минерального азота на экспрессию некоторых рибосомных генов, нами было установлено, что уровни экспрессии генов, кодирующих белок малой субъединицы *rpsb* и *18S pPHK* у клеток *C. reinhardtii*, выращенных на аммоний-содержащей и безаммонийной средах, не показали каких-либо существенных различий [7]. Аналогичный результат был получен и с клетками каллуса *G. max* [8]. Как уже упоминалось выше, структура рибосомы – комплекс нескольких десятков молекул белков и нескольких молекул РНК. Поскольку при формировании рибосом компоненты их структуры

должны присутствовать в эквимолярных количествах, то можно предположить, что на этом этапе биогенеза рибосом аммоний не воздействовал и на экспрессию других генов, участвующих в формировании структуры этих органелл в клетках.

Известно, что поглощение катиона (экзогенного аммония) растительной клеткой сопровождается выделением из нее H^+ -ионов, т.е. наблюдается изменение цитоплазматического рН в щелочную сторону [1, стр. 44]. Выход H^+ -ионов из клетки при поглощении аммония, по-видимому, может приводить к повышению активности ФЭП-карбоксилазы, рН-оптимум которой сдвигнут в щелочную сторону [15, стр. 95]. Повышение активности этого фермента должно приводить к усилению гетеротрофной фиксации углекислоты [9] и к увеличению образования органических кислот, последующее превращение которых, при наличии аммония, может быть еще одним источником целого ряда аминокислот [16, стр. 38]. Дополнительно образованные аминокислоты способны обеспечить и дополнительное образование белка. Такое явление наблюдалось на клетках розы плетистой (Paul's Scarlet Rose) [17] и клена белого (*Acer pseudoplatanus*) [18].

Однако процесс гетеротрофного усвоения CO_2 может осуществляться не только с помощью фермента ФЭП-карбоксилазы. Известны по меньшей мере еще несколько ферментов, которые при определенных условиях могут способствовать связыванию неорганического CO_2 в органические соединения, например, малик-энзим и др. [19, стр. 217]. Какой из ферментов участвует в поглощении CO_2 , у клеток хламидомонады исследуемого штамма, нами пока не установлено.

На рис. 4 представлена предполагаемая схема пути ассимиляции поступающего в клетку аммония и нитрата и участия ФЭП-карбоксилазы в гетеротрофной фиксации CO_2 как наиболее вероятного пути образования дополнительного источника предшественников аминокислот при формировании рибосом.

Наши эксперименты с использованием $H^{14}CO_3^-$ показали, что скорости гетеротрофной фиксации бикарбоната клетками *C. reinhardtii* заметно различались в зависимости от утилизируемой формы минерального азота, оставаясь более высокими у клеток водоросли, выращенных на среде, содержащей аммонийную форму азота (рис. 2).

Существенным моментом при оценке влияния того или иного фактора на какой-либо процесс является критерий, относительно которого можно сравнивать полученные результаты. Поскольку продолжительность жизненного цикла клеток хламидомонады намного короче цикла выращивания клеточной суспензии в накопительном режиме, то при анализе воздействия формы мине-

рального азота всегда приходится иметь дело с клетками, находящимися на разных стадиях своего развития (рис. 1). При этом у молодых, только что разделившихся клеток, и у старых клеток метаболические процессы (или их интенсивности) могут существенно различаться. Так, например, у молодых клеток активнее идут процессы, связанные с формированием функциональных структур самой клетки, тогда как у зрелых клеток активнее идут процессы, связанные с накоплением органического вещества, необходимого для предстоящего деления клетки. Таким образом, на один и тот же день культивирования клеток с разными скоростями роста (рис. 1) в единице объема суспензии может содержаться как разное количество клеток, так и разное количество сухой массы. В связи с этим, оценка повышенной активности темновой фиксации ^{14}C -бикарбоната аммонием проводилась относительно вышеназванных параметров: на клетку (рис. 1) и на единицу сухой массы (табл. 2). Представленные на рис. 3 данные показывают, что стимулирующее действие аммония на скорость гетеротрофной фиксации ^{14}C -бикарбоната сохранялась относительно перечисленных выше параметров (на клетку и на единицу сухой массы).

Отсутствие или дефицит аммонийной формы азота в клетке должен приводить к остановке или торможению синтеза аминокислотных компонентов. Аминокислоты и, далее, белки будут образовываться только после восстановления нитратной формы азота в аммонийную. Для осуществления реакции восстановления нитрата в аммоний требуется участие восстанавливающих эквивалентов таких как НАД·Н. Расход восстановителя на получение ассимилируемой формы азота мог бы привести к снижению фотосинтетической ассимиляции углерода и, соответственно, к снижению ростовой функции клеток. Однако в наших экспериментах, где использовалась низкая интенсивность света, фотосинтез, по-видимому, не должен оказывать решающего значения на метаболическую активность клеток водоросли, поэтому только темновые процессы углеродного обмена могут вносить существенный вклад в синтез органического вещества клетки.

В проводившихся экспериментах при культивировании клеток хламидомонады основным источником углерода являлся ацетат. Метаболические превращения этого субстрата установлены и представляют собой одну из вариаций цикла Кребса – глиоксилатный цикл [20, стр. 479]. Образованные в этом процессе органические кислоты являются теми С-скелетами, из которых синтезируются сначала аминокислотные (при наличии аммония – реакции аминирования органических кислот), а затем и белковые молекулы растительной клетки.

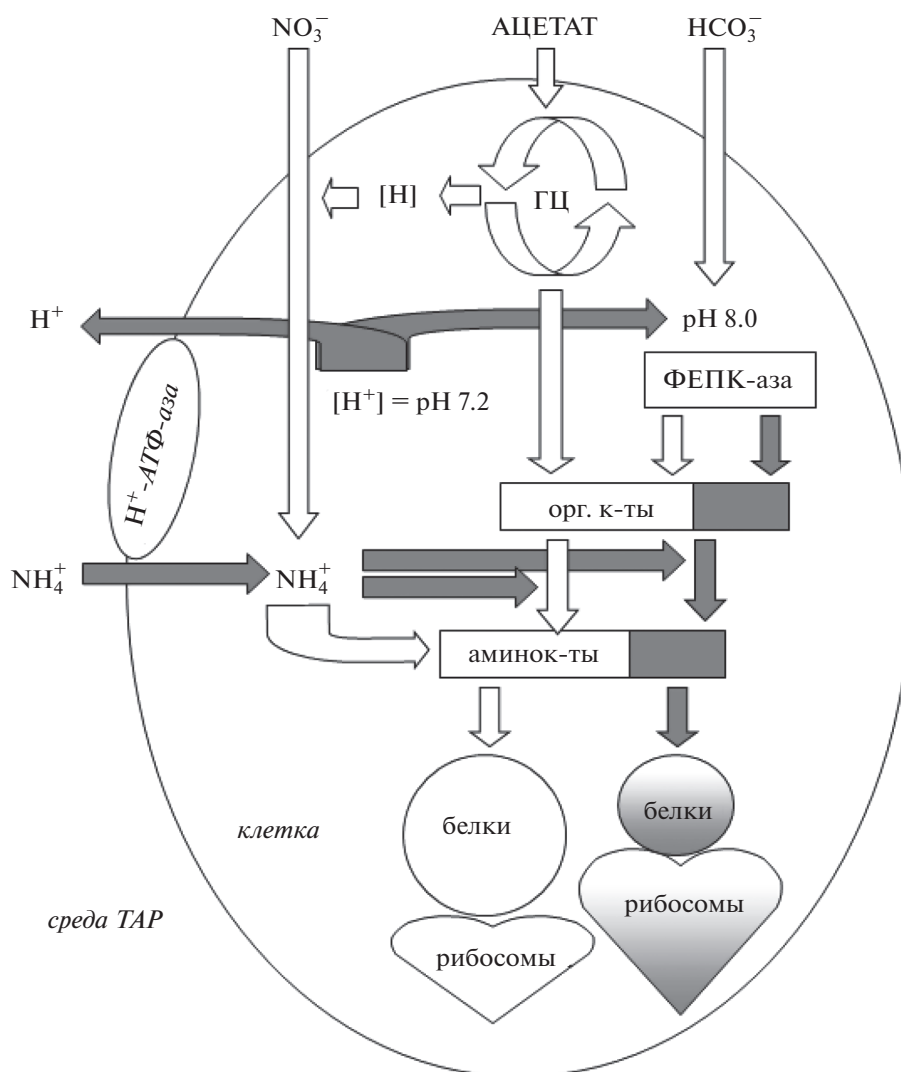


Рис. 4. Возможная схема участия экзогенного аммония в образовании белка при формировании рибосом у клетки *Chlamydomonas reinhardtii*. Темные стрелки – процессы, подверженные влиянию экзогенного аммония.

Если допустить, что основной путь углерода при образовании аминокислотных компонентов клетки проходит через цикл Кребса, то, согласно принципу обратной связи, этот путь может оказаться лимитирующим по отношению к образующимся в цикле восстановительным соединениям (НАД·Н), поскольку при отсутствии аммонийного компонента внесение ацетата может привести к переизбытку молекул органических кислот и к торможению работы глиоксилатного цикла. В результате клетка начинает испытывать дефицит восстановителя, часть из которого должна расходоваться на восстановление нитратного азота. Наоборот, внесение аммония в питательную среду должно приводить к превращению образующихся органических кислот в аминокислоты и к выходу органических кислот из глиоксилатного цикла. Такой процесс позволил бы клетке бес-

препятственно поставлять восстановитель на восстановление поступающего нитрата, а образовавшиеся аминокислоты – на формирование белкового компонента структуры рибосом. Таким образом, усиление процесса гетеротрофной фиксации HCO_3^- под воздействием аммонийного компонента (рис. 2) вполне способно обеспечивать клетку дополнительным количеством аминокислот, которые требуются для синтеза белковой части рибосомы.

Отвлечение восстановителя на процесс восстановления нитрата должно неизбежно приводить к подавлению ростовой функции клеток. Действительно, отсутствие аммония приводило к подавлению прироста числа клеток в начале цикла выращивания (рис. 1), однако к концу ростового цикла их количество на равный объем суспензии примерно выравнивалось. В экспериментах по на-

коплению сухой массы клетками хламидомонады в конце цикла выращивания также не было обнаружено существенных различий в зависимости от использованной формы минерального азота (табл. 2). При этом распределение клеток по размерам указывало на значительное превышение числа гигантских клеток в суспензии, выращенной на нитратной среде (табл. 1). Возникает вопрос: если в конце цикла выращивания форма минерального азота не влияла ни на количество клеток в суспензии, ни на содержание сухой массы клеток, то какова причина резкого снижения количества рибосом у “нитратных” (вариант 2) клеток по сравнению с “аммонийными” (вариант 1)?

Сравнительные исследования, проведенные на клетках каллуса сои и клетках хламидомонады [8], показали, что если аммоний отсутствовал в составе питательной среды, то хлоропласты этих клеток заполнялись большим количеством крупных крахмальных зерен [3], свидетельствуя об усилении углеводной направленности клеточного обмена. В аналогичных условиях у хлоропластов клеток хламидомонады не наблюдалось значительного накопления крахмала [7]. Следовательно, можно предположить либо низкую фотосинтетическую активность клеток в данных условиях роста, либо быстрый выход углеводов из хлоропластов и использование их на процессы, несвязанные с синтезом органического вещества, например, на усиление механической подвижности клеток хламидомонады в пространстве.

В условиях, когда основным источником углерода является ацетат, а не CO_2 воздуха, нельзя исключить и того, что “конечный” продукт метаболического превращения ацетата у клеток водоросли может не иметь углеводной природы, а синтезироваться и накапливаться, например, в виде липидных образований. Исходное отсутствие аммония в составе питательной среды не подразумевает его эндогенного нулевого значения, поскольку существующий в клетках механизм восстановления нитрата постоянно производит эндогенный аммоний, а, следовательно, синтез азотсодержащих соединений (в том числе аминокислот) может иметь место. С другой стороны, какие аминокислоты, в каком количестве синтезируются в клетке, какие белки способны образовываться из этих аминокислот остается пока неясным. Наличие в достаточном количестве той или иной аминокислоты может оказывать прямое влияние на формирование первичной структуры белковых молекул рибосомы и, следовательно, можно предположить, что процесс гетеротрофной фиксации CO_2 является тем механизмом, который и способен обеспечить нужный состав предшественников необходимых аминокислот, т.е. тех органических кислот, которые в недостаточном количестве синтезируются при

утилизации ацетата. Подобная метаболическая вариабельность вполне обоснована и частично показана на клетках хламидомонады [21].

Таким образом, различия в количественном содержании рибосом у клеток хламидомонады, выращенных на аммонийной (вариант 1) и нитратной (вариант 2) средах [7], может быть связано с изменением количественного содержания белковых молекул, формирующих структуру белоксинтезирующих органелл под воздействием той или иной формы минерального азота. В настоящее время, выдвигаемое предположение не следует рассматривать как установленный факт, поскольку не известно количественное соотношение белковых компонентов клетки у вариантов 1 и 2, не известны изменения в содержании аминокислот и органических кислот при воздействии окисленной и восстановленной формы минерального азота. Надеемся, что дальнейшие исследования помогут прояснить суть происходящих изменений при использовании окисленной и восстановленной формы минерального азота.

Авторы выражают свою признательность к.б.н. А.М. Бутанаеву и к.ф.-м.н. Н.Д. Гудкову за активное обсуждение и советы по презентации экспериментального материала.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Marshner H.* Mineral nutrition of higher plants. London—Orlando—San Diego—New York—Austin—Boston—Sydney—Tokyo—Toronto: Academic press, 1986. 674 p.
2. *Кретович В.Л.* Усвоение и метаболизм азота у растений. М.: Наука, 1987. 486 с.
3. *Смолов А.П., Семенова Г.А.* Влияние концентрации аммония на содержание белка, хлорофилла и количество рибосом в клетках миксотрофного каллуса сои // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 397—403.
4. *Зернова О.В.* Влияние окисленной и восстановленной форм азотного питания на ультраструктуру фотосинтетического аппарата у гороха и пшеницы // Физиология растений. 1993. Т. 40. С. 431—437.
5. *Edit T., Laszlo T.* Effect of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsicum annuum* L.) // J. Plant Physiol. 1992. V. 140. P. 298—305.
6. *Сайт Р., Уиттик А.* Основы альгологии. М.: Мир, 1990. 595 с. (South G.R., Whittick A. An Introduction to Phycology. Blackwell Scientific Publications, Oxford—London—Edinburg—Boston—Palo Alto—Melbourne: Blackwell Scientific Publication, 1987. 352 p.)
7. *Смолов А.П., Семенова Г.А., Минакова Н.Ю., Бутанаев А.М., Шишкилова Г.Н.* Влияние экзогенного аммония на содержание белка, хлорофилла и коли-

- чество рибосом в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 781–785.
8. Смолов А.П., Бутанаев А.М., Семенова Г.А., Шуршикова Г.Н. Сравнительный анализ изменений в клетках каллуса сои и зеленой водоросли хламидомонады под действием экзогенного аммония // Цитология. 2013. Т. 55. С. 572–578.
 9. Wright K.M., Givan C.V. Regulation of nonautotrophic carbon dioxide assimilation by ammonia in cultured cell of *Acer pseudoplatanus* L. // Plant Sci. 1988. V. 58. P. 151–158.
 10. Sugiharto B., Sugiyama T. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress // Plant Physiology. 1992. V. 98. P. 1403–1408.
 11. Harris E.H. The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: Academic, 1989. 780 p.
 12. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms // IEEE transactions on systems, man, and cybernetics. 1979. V. 9. P. 62–66.
 13. Спирин А.С. Молекулярная биология: Рибосома и биосинтез белка. М.: Академия, 2011. 496 с.
 14. Leary D.J., Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus // FEBS Letter. 2001. V. 509. P. 145–150.
 15. Романова А.К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука, 1980. 159 с.
 16. Брей С.М. Азотный обмен в растениях. М.: Агропромиздат, 1986. 199 с. (Bray C.M. Nitrogen metabolism in plants. London, New York: Longman Group Limited, 1983. 214 p.)
 17. Mohanty B., Fletcher J.S. Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of *Paul's Scarlet Rose* // Physiol. Plantarum. 1980. V. 48. P. 453–459.
 18. Goodchild J.A., Givan C.V. Influence of ammonium and extracellular pH on the amino and organic acid contents of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus* // Physiol. Plantarum. 1990. V. 78. P. 29–37.
 19. Непрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. М.: Академия. 2009. 350 с.
 20. Мецлер Д. Биохимия. Т. 2. М.: Мир, 1980. 606 с. (Metzler D. Biochemistry, v. 2. The chemical reactions of living cells. New York–San Francisco–London: Academic press, 1977. 606 p.)
 21. Gerin S., Leprince P., Sluse F.E., Frank F., Maty G. New features on the environmental regulation of metabolism revealed by modeling the cellular proteomic adaptations induced by light, carbon and inorganic nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii* // Front. Plant Sci., 2016. V. 7. P. 1158–1186.