

## **ИОНООБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ В СУСПЕНДИРОВАННЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТКАХ *SYRINGA VULGARIS*\***

The influence of immobilization in calcium alginate gel on influx of  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  и  $NO_3^-$  ions into the cells of suspension *Syringa vulgaris* L. by means of ion-selective electrodes was investigated. It was shown that calcium alginate did not have effect on potassium transport into the cells, however modified influx of  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$  ions. Transport modification of nitrate and ammonium into the cells was connected with proton efflux into the medium and growth processes reduction in the immobilized cells. The analysis of the received results has shown that ammonium nitrogen was transported into the cells in the form of ammonia.

Несмотря на широкое использование иммобилизованных клеток многих видов организмов для производства различных веществ, первичные механизмы взаимодействия носителя с плазматическими мембранами и модификации их транспортных свойств остаются по-прежнему малоизученной про-

---

\* Авторы статьи – сотрудники кафедры физиологии и биохимии растений.

блемой. Познание характера и механизмов изменений транспортных свойств плазматических мембран, в частности растительных клеток, под влиянием носителей позволило бы не только понять феномен существенной модификации метаболизма иммобилизованных клеток, но и направленно воздействовать на него с целью увеличения содержания и экскреции промышленно ценных вторичных метаболитов.

### Материал и методика

В качестве объекта исследований использовали суспензионную культуру сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), которую получали из длительно культивируемой рыхлой каллусной культуры ювенильных побегов сирени обыкновенной сорта Жемчужина белорусской селекции. Иммобилизацию проводили методом включения в альгинатный гель [1].

После отделения и отмыва дистиллированной водой от среды культивирования клеточную биомассу высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С до постоянной массы. Для определения сухой массы и жизнеспособности иммобилизованных клеток их предварительно высвобождали из носителя путем обработки 0,1 М раствором цитрата натрия.

Регистрацию концентрации ионов  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{H}^+$  осуществляли одновременно с помощью ионселективных электродов в предварительно отфильтрованной среде культивирования со свободными и иммобилизованными клетками культуры *Syringa vulgaris*.

Жизнеспособность клеток определялась методом окрашивания витальным красителем – нейтральным красным.

В состав среды для культивирования суспендированных (свободных) и иммобилизованных клеток *Syringa vulgaris* входили: минеральная основа среды Мурасиге и Скуга [2]; 3 мг/л ИУК; 0,1 мг/л 2,4-Д; 0,04 мг/л кинитина; 1 мг/л тиамин и 30 г/л сахарозы. Концентрация калия, аммония и нитрата в данной среде изначально составляет 20,05; 20,6 и 39,4 мМ соответственно.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

### Результаты и их обсуждение

Минеральные элементы в растительные клетки поступают, как правило, в виде ионов. Поступление катионов тем или иным образом связано с транспортом протонов. Минеральные элементы выполняют в растениях субстратную и регуляторную роль, поэтому процессы роста растений на всех уровнях развития связаны с их обеспеченностью минеральными элементами.

**Характер роста суспендированных и иммобилизованных клеток.** На основании полученных данных по определению сухой массы свободных и иммобилизованных клеток на протяжении времени культивирования были получены кривые роста стандартной S-образной формы (рис. 1). В варианте со свободными клетками длительность лаг-фазы составляла 3 сут, далее клетки вступали в фазу экспоненциального роста и на 10–11 сут культивирования – в стационарную фазу роста, быстро переходящую в стадию деградации.

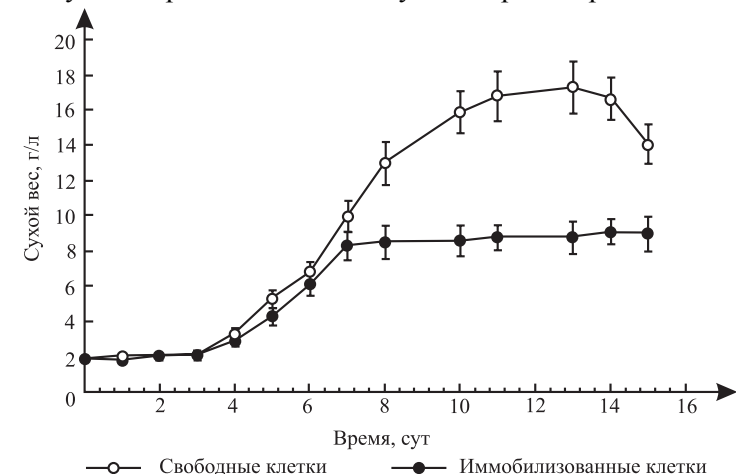


Рис. 1. Кривые роста свободных и иммобилизованных клеток *Syringa vulgaris*

Роста иммобилизованных клеток в первые 3 сут также не наблюдалось (лаг-фаза), затем на 4-е сут клетки вступали в фазу экспоненциального роста, а на 8-е сут – в стационарную фазу. Иммобилизованные клетки достигали стационарной фазы роста раньше, чем свободные. Иммобилизация в Са-альгинатном геле приводила к увеличению продолжительности стационарной фазы роста. Максимальная сухая масса в варианте с иммобилизованными клетками составляла 9,1 г/л, свободными – 17,3 г/л.

Таким образом, хотя общая сухая биомасса иммобилизованных клеток в стационарной фазе была ниже, чем свободных, но для них за время наблюдения фаза деградации не отмечалась, т. е. гибель клеток не происходила (см. рис. 1).

В некоторых исследованиях отмечается, что характер роста иммобилизованных клеток меняется по сравнению с клетками в суспензионной культуре [3]. Предполагается, что торможение роста кле-

ток является причиной, по которой в иммобилизованных клетках происходит более быстрое переключение с первичного метаболизма на вторичный.

Необходимо также учитывать корреляцию ростовых процессов, связанную с потреблением элементов питания, недостаток или избыток которых в среде культивирования может различным образом отражаться на ростовых процессах культуры клеток растений.

**Изменения концентрации протонов в среде.** В процессах минерального питания растений особую роль играет  $H^+$ -АТФазная помпа, определяющая перенос других минеральных элементов через плазматическую мембрану [4]. Для простоты и удобства концентрацию протонов мы будем выражать в единицах рН (отрицательный логарифм концентрации протонов).

Одним из параметров контроля процесса культивирования клеточных культур является рН среды. рН-Профиль среды характеризует метаболическую активность клеток [5]. Для плазматической мембраны растительных клеток характерно функционирование  $H^+$ -АТФазной помпы, создающей электрохимический градиент за счет активного «выброса» протонов в окружающую клетку среду. В этом случае устанавливается более высокий по абсолютной величине электрический потенциал и изменяется разность концентраций по обеим сторонам мембраны протона ( $\Delta pH$ ). В результате положительно заряженный катион по электрическому градиенту, а  $H^+$  по градиенту концентрации входят в клетку. При движении в цитоплазму клетки протон активирует транспортирующий анион переносчик [4]. В связи с этим при изучении ионообменных процессов свободных и иммобилизованных клеток на протяжении времени культивирования проводился мониторинг изменения концентрации протонов среды в единицах рН.

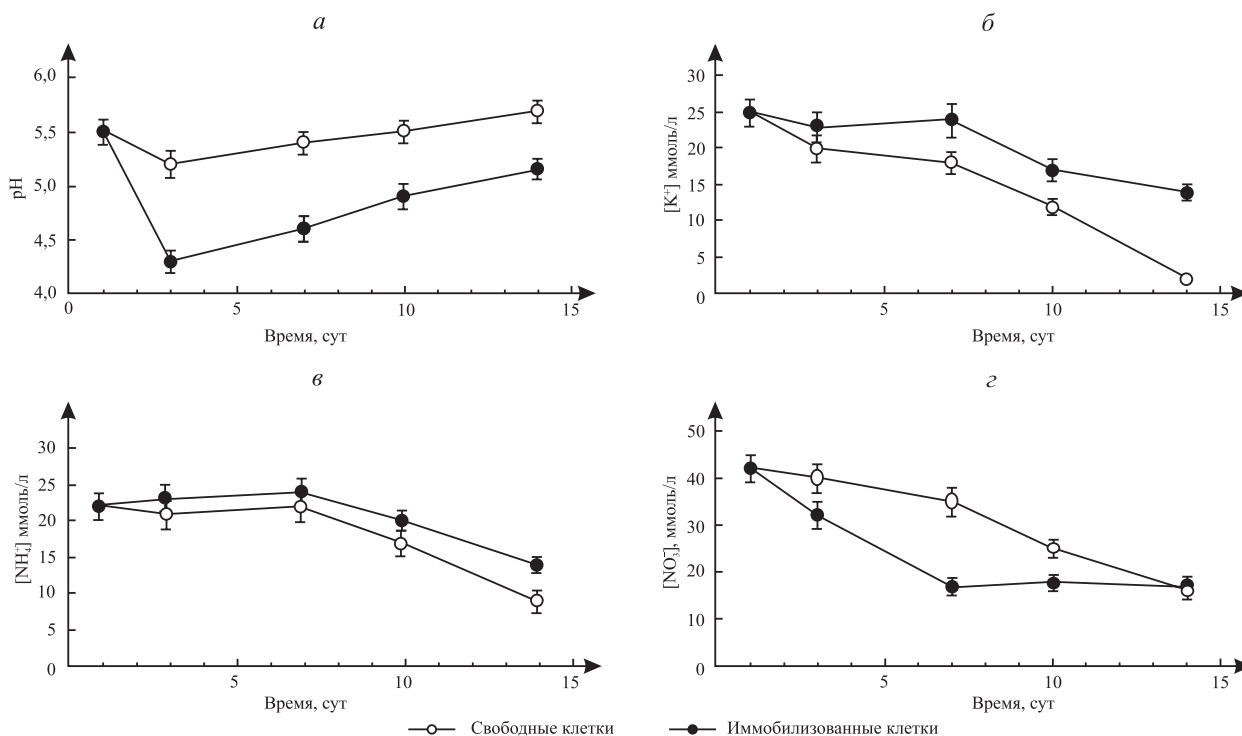


Рис. 2. Изменение рН (а), ионов калия (б), нитратов (в) и аммония (г) в среде культивирования со свободными и иммобилизованными клетками суспензионной культуры *Syringa vulgaris*

В начале культивирования значение рН среды для обоих вариантов было 5,5 (рис. 2). Характер изменения содержания протонов в среде со свободными и иммобилизованными клетками был схожим – к 3-м сут наблюдалось уменьшение рН до 5,2 и 4,3 соответственно, дальнейшее культивирование вызвало увеличение рН. К 14-м сут культивирования кислотность среды в вариантах со свободными и иммобилизованными клетками равнялась 5,7 и 5,2 соответственно. Следует, однако, отметить, что сдвиг рН среды культивирования иммобилизованных клеток в кислую сторону за первые трое суток был большим по сравнению со свободными клетками. Кроме того, значения рН среды клеток суспензионной культуры на протяжении всего исследуемого периода были больше значений рН среды иммобилизованных клеток. Во многих работах (например, [6]) сообщается об уменьшении рН среды в

начале культивирования, частично связанного с поглощением аммония, и увеличении pH в конце роста клеточной культуры.

В целом культивирование растительных клеток возможно в диапазоне pH от 7,5 (*Portulaca grandiflora*, var. JR) до 4 (*Morinda citrifolia*) [7]. Такие элементы, как аммоний, нитрат, фосфат, необходимы не только для минерального питания клеток, но также в качестве буфера экскретируемых (например, лактат, малат, сукцинат) или высвобождаемых соединений кислот и щелочной природы. Таким образом, изменение значения pH среды может происходить из-за поглощения соединений, выступающих в роли питательных веществ, имеющих буферные свойства ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), а также за счет выделения в среду органических кислот (молочной, яблочной, янтарной), которые образуются в большом количестве преимущественно в стационарной фазе роста. Существенный вклад в значение pH среды может вносить лизис клеток вследствие неправильно подобранных условий перемешивания культуры или других условий культивирования [8]. Анализ состояния клеток не показал снижения их жизнеспособности на 3-и сут, следовательно, наблюдаемое уменьшение значения pH среды в обоих вариантах не связано с гибелью клеток.

**Транспорт ионов калия.** Известно, что калий является важным элементом минерального питания растений и основным неорганическим компонентом цитоплазмы растительных клеток. Концентрация калия в цитозоле колеблется от 50 до 500 мМ [8]. Высокий трансмембранный электрохимический градиент, создаваемый ионами  $\text{K}^+$ , служит движущей силой роста клеток растяжением. Кроме того, калий – основной потенциалопределяющий ион плазматической мембраны в покое.

Изучение транспорта калия в суспензионной и иммобилизованной культуре клеток не выявило достоверных отличий между вариантами в поступлении калия в клетки с 1-х по 7-е сут культивирования (см. рис. 2). В период с 7-х по 14-е сут происходило заметное снижение содержания катионов калия в средах: со свободными (с 22 до 9 мМ) и иммобилизованными клетками (с 22 до 14 мМ). Снижение концентрации ионов калия в среде культивирования свободных и иммобилизованных клеток составило 59 и 36 % соответственно, т. е. ионы калия в данный период более интенсивно поступали в свободные клетки, чем в иммобилизованные. Следует отметить, что заметное поступление калия в клетки отмечалось для свободных клеток после логарифмической фазы роста, тогда как в иммобилизованные – в период стационарной фазы. Наблюдаемые закономерности в поступлении, вероятно, обусловлены резким снижением содержания калия в цитозоле только после 7 сут выращивания.

Наблюдаемое повышение поступления ионов калия в суспензионной культуре по сравнению с иммобилизованной связано с более активными ростовыми процессами. В свою очередь, наклон кривых, описывающих поступление калия в свободные и иммобилизованные клетки сирени, свидетельствует о близкой скорости поступления и отсутствии влияния альгината кальция на процессы его транспорта.

**Поступление  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NH}_4^+$ .** Нитрат и аммоний являются основными потребляемыми формами азота, без которого невозможен рост и функционирование клеток растений, причем это единственный элемент, который поступает в растительные клетки в виде анионов и катионов. В большинстве стандартных сред азот присутствует в виде солей аммония и нитратов. Соотношение этих двух компонентов является важным как для клеточных культур, так и для растений в целом и варьирует для разных видов [9].

Во время культивирования суспензионной культуры и иммобилизованных в геле альгината кальция клеток сирени отмечалось значительное снижение содержания в питательной среде как нитратного, так и аммонийного азота (см. рис. 2). Так, за 14 сут культивирования суспензионной культуры сирени концентрация аммония снизилась более чем в 10 раз (с 25 до 2 мМ), а нитрат-ионов – почти в 3 раза (с 42 до 16 мМ); для среды с иммобилизованными клетками сирени характерно уменьшение содержания аммония почти в 2 раза, а нитрата, как и для суспензионной культуры, примерно в 3 раза. Отмеченная закономерность обусловлена поступлением указанных ионов в клетки и демонстрирует их субстратную роль в биосинтезе азотсодержащих органических соединений.

Интенсивное поглощение соединений минерального азота как иммобилизованными, так и свободными клетками согласуется с увеличением их биомассы. Так, за 14 сут масса сухого вещества клеток суспензионной культуры возросла примерно в 8 раз, а иммобилизованных – в 5 раз (см. рис. 1).

Характер поступления ионов аммония и нитрат-ионов в иммобилизованные клетки отличался от этого процесса для свободных клеток. Аммонийный азот поступал в клетки суспензионной культуры сирени и в начальный период культивирования и в последующие фазы роста, тогда как в иммобили-

зованные – только начиная с 7-х сут до конца культивирования, что соответствовало стационарной фазе роста (см. рис. 2). В то же время уменьшение концентрации нитрат-иона (см. рис. 2) в среде культивирования свободных клеток к 7-м сут было незначительным по сравнению с иммобилизованными. При дальнейшем культивировании свободные клетки суспензионной культуры продолжали поглощать нитрат. Напротив, начиная с 7-х сут достоверных изменений концентрации нитрат-иона в среде культивирования иммобилизованных клеток не наблюдалось.

Иммобилизация клеток суспензионной культуры сирени в геле альгината кальция стимулировала поглощение нитрат-иона клетками с начала культивирования и до стационарной фазы роста (7-е сут). Подобная стимуляция нитратного транспорта была установлена для иммобилизованных клеток *Chlorella vulgaris* [10]. Было показано, что максимальная скорость поглощения нитрата иммобилизованными клетками в 3 раза выше таковой в контроле (суспензия хлореллы).

Для объяснения наблюдаемых закономерностей поступления соединений азота в клетки воспользуемся следующими соображениями.

Перенос экзогенного аммонийного азота через плазмалемму растительной клетки может осуществляться либо в виде ионов  $\text{NH}_4^+$  в результате работы специфической транспортной системы аммония, либо путем диффузии через липидный бислой мембраны электрически нейтральных молекул  $\text{NH}_3$  [11]. Иногда рассматривают и вариант поступления  $\text{NH}_4^+$  через калиевые каналы плазмалеммы [12]. Однако в нашем случае последний механизм маловероятен, поскольку при столь высоком содержании ионов  $\text{K}^+$  ( $\sim 10^{-2}$  моль/л) в среде из-за конкуренции ионы аммония не будут поступать через калиевые каналы.

В условиях эксперимента, вероятно, не функционирует и транспортная система аммония, осуществляющая перенос через плазматическую мембрану растительных клеток  $\text{NH}_4^+$  из крайне разбавленных растворов ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М), и ее константа полунасыщения не превышает  $3 \cdot 10^{-6}$  М. При избытке аммонийного азота в среде транспортная система инактивируется [11].

Аммоний – слабая кислота, поэтому в растворах его солей присутствуют как ионы  $\text{NH}_4^+$ , так и молекулы  $\text{NH}_3$ . Причем соотношение между концентрациями указанных компонентов определяется величиной pH среды, так как величина  $\text{pK}_a = -\lg K_a$  ( $K_a$  – константа ионизации) постоянна и равна для аммиака 9,25 (при температуре 25 °С). При увеличении pH свыше 9,25 будут преобладать молекулы  $\text{NH}_3$ , ниже pH 9,25 – ионы  $\text{NH}_4^+$ .

Количественно степень ионизации слабой кислоты (в %) можно рассчитать из следующего выражения:

$$100 / (1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})})$$

В наших условиях показатель кислотности среды не превышал 5,6, следовательно, в среде в соответствии с приведенным выражением содержание  $\text{NH}_3$  мало. На первый взгляд очень низкое содержание  $\text{NH}_3$  не может внести существенный вклад в процесс поглощения аммонийного азота клетками. Но плазматическая мембрана растительных клеток по отношению к молекулам  $\text{NH}_3$  характеризуется высокой проницаемостью [13]. В этом случае диффузионный поток аммиака через мембрану должен быть значительным, что за несколько суток приводит к снижению общего содержания аммонийного азота в среде до наблюдаемых в суспензионной культуре *Syringa vulgaris* уровней.

Для иммобилизованных клеток в период с 1-х по 7-е сут нами показано увеличение биомассы (см. рис. 1), т. е. в них происходит биосинтез белка. Однако обеспечить потребности клетки в минеральных соединениях азота может лишь поступление нитрата в клетку за счет работы нитрат-транспортирующей системы [14], так как диффузия аммиака через липидный бислой мембраны должна быть очень незначительной из-за сильного подкисления среды. Ввиду уменьшения pH на 1,2 единицы (см. рис. 2) концентрация молекул  $\text{NH}_3$  в питательной среде снижается более чем в 15 раз, что приводит к равноценному падению диффузионного потока аммиака внутрь клеток. В последующие 7 сут отмечается рост pH, что обуславливает увеличение содержания молекул  $\text{NH}_3$  в питательной среде и диффузию свободного аммиака в клетки. Резкое снижение в это же время скорости поглощения нитратного азота может происходить как вследствие роста pH среды (поступление  $\text{NO}_3^-$  в клетки происходит в симпорте с ионом  $\text{H}^+$ ), так и из-за активации диффузии  $\text{NH}_3$  (при обеспеченности растений аммонийным азотом нитраттранспортирующая система инактивирована) [14]).

Исходя из качественных и количественных изменений зависимостей, описывающих поступление аммония и нитратов, можно говорить о различных механизмах их переноса через плазматическую мембрану клеток сирени обыкновенной.

Таким образом, для свободных и иммобилизованных клеток суспензионной культуры *Syringa vulgaris* L. характерны значительные отличия во временных интервалах и характере переходов на последовательные стадии ростовых процессов, а также в качественных и количественных показателях механизмов обеспечения этих стадий минеральными элементами.

1. Юрин В. М., Шапчиц М. П., Булатова А. А. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2008. № 1. С. 51.
2. Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473.
3. Premjet D., Tashibana S. // *Pak. J. Biol. Sci.* 2004. Vol. 7. P. 1130.
4. Юрин В. М., Найдун С. Н. Минеральное питание растений. Мн., 2004.
5. Corret N., Kamal bin Rosli K., Oppenheim S. et al. // *J. Biotech.* 2004. Vol. 108. P. 253.
6. Schmitz U., Lörz H. // *Plant Sci.* 1990. Vol. 66. P. 95.
7. Endreb R. // *Plant Cell Biotechnology.* Berlin; Heidelberg, 1994.
8. Bentrup F.-W. // *Physiol. Plant.* 1990. Vol. 79. № 3. P. 705.
9. Смолов А. П., Опанасенко В. К. // *Цитология.* 2009. № 4. С. 358.
10. Рудковская Е. Е., Юрин В. М., Соколик А. И. // Тез. докл. 1-го Респ. съезда БОФБ. Мн., 1994. С. 147.
11. Юрин В. М., Соколик А. И., Кудряшов А. П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн., 1991.
12. Breteltu H. // *Exchanges ioniques. transmembrane veg. coloq.* Rouen; Paris, 1976. P. 185.
13. Barr C. E., Koh M. C., Ryan Th. E. // *Membrane transport in plants.* Berlin, 1974. P. 180.
14. Dean-Drummond C. E. // *Plant Cell Environ.* 1984. Vol. 7. № 2. P. 317.

Поступила в редакцию 01.03.10.

**Мария Павловна Шапчиц** – младший научный сотрудник.

**Владимир Михайлович Юрин** – доктор биологических наук, профессор.