

УДК 577.153

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ВОЛЮТИНОВЫХ ГРАНУЛ В КЛЕТКАХ НИЗШИХ ПОЛИФОСФАТАККУМУЛИРУЮЩИХ ЭУКАРИОТ

Е. Н. Громозова¹С. И. Войчук¹Т. Л. Качур¹В. Ф. Горчев²С. А. Карахим²¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
НАН Украины, Киев²Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: gren@voliacable.com

Установлено, что методы люминесцентной и лазерной конфокальной микроскопии позволяют детектировать полифосфатсодержащие гранулы в различных участках клетки, а также исследовать их структуру, что может быть использовано для мониторинга процессов биологического удаления фосфора. На примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мицелиальных грибов рода *Fusarium* и диатомовых водорослей *Frustulia saxonica* Rabenhorst показано морфологическое сходство волютиновых гранул у представителей разных групп микроорганизмов. Размеры гранул варьировали в широких пределах — от 0,2–0,5 мкм до 4–5 мкм. Объемные 3D-изображения одиночных наименьших из исследованных гранул показали их вытянутую «сигарообразную» форму. В свою очередь крупные образования сложной формы, по-видимому, являются агрегатами более мелких гранул.

Ключевые слова: полифосфатаккумулярующие микроорганизмы, волютиновые гранулы, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, люминесцентная микроскопия, дрожжи, микромицеты, диатомовые водоросли.

В биотехнологических процессах полифосфаты занимают особое место. В первую очередь это касается экологических аспектов. В современной биотехнологии очистки сточных вод особенно актуальны вопросы биологического удаления фосфора (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) [1]. В связи с эффективным связыванием полифосфатами клетки разных катионов предложена технология биоремедиации почв и сточных вод, загрязненных солями тяжелых металлов [2]. Значительное содержание органических веществ в открытых водоемах требует разработки технологических решений по управлению процессами их эвтрофикации [3].

Как правило, в этих процессах задействованы комплексы различных групп микроорганизмов, включающие, кроме бактерий, дрожжевые и мицелиальные микроскопические грибы, микроводоросли, простейшие [4, 5]. Эти микроорганизмы накапливают неорганические полифосфаты (ПФ), в основном в виде волютиновых гранул, что и является ключевым звеном в поглощении избытка фосфора из окружающей среды и местом локализации комплексов ПФ с тяжелыми

металлами [5]. К сожалению, вопрос о метаболизме полифосфатов волютиновых гранул практически не изучен. В литературе эти структуры рассматриваются чаще всего как сферические, иногда гроздьевидные, электронноплотные образования, выполняющие в клетке роль фосфорного депо [6, 7]. Современные цитохимические методы позволяют идентифицировать ПФ-содержащие гранулы, исследовать их форму, расположение в клетке, структуру и даже сделать предположение об их агрегатном состоянии [8].

Таким образом, сравнительное исследование волютиновых гранул разных групп микроорганизмов имеет не только научно-теоретическое, но и практическое значение, в частности для разработки улучшенных вариантов биотехнологической очистки сточных вод.

Материалы и методы

Объектом исследования были микроорганизмы из Украинской коллекции микроорганизмов — дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517, грибы *Fusarium sambucinum* F-50597 и *Fusarium solani* (Mart.)

Sacc. F-50599, а также представитель диатомовых водорослей *Frustulia saxonica* Rabenhorst [син. *Frustulia rhomboides* (Her.) D.T. var. *saxonica* (Rabenh.) D.T.]. Микроорганизмы культивировали на сусло-агаре при 28 °С в течение 1 сут для дрожжевых клеток и 3–5 суток для мицелия *Fusarium sambucinum* [9]. Окрашивание волютиновых гранул проводили при помощи метиленового синего методом Лефлера, жировые включения визуализировали суданом III и IV, гликоген — раствором йодистого калия [10]. Полученные образцы исследовали методом светлой микроскопии.

Для люминесцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии использовали флуоресцентные красители акридинового оранжевый [3,6-бис(диметиламино)-акридин хлорид] (Sigma, USA) в разведении 1:100 тыс. и 4',6'-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид (DAPI, Sigma, USA) в конечной концентрации 5 мг/л. Образцы анализировали при помощи микроскопа МБИ 15 (ЛОМО, Россия), оснащенного цифровой фотокамерой Nikon Coolpix 950, и конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Германия). В случае МБИ 15 образцы исследовали в УФ-свете (источник света — ртутная лампа ДРШ-250) с использованием иммерсионных ахроматических фазово-люминесцентных объективов 90Ч/1,25 и 40Ч/0,65. В канале возбуждения флуоресценции применяли светофильтр УФС 6-3, а в канале регистрации — ЖС-3. При такой спектральной конфигурации светофильтров возбуждение флуоресценции осуществлялось ртутной линией 366 нм и регистрировалось свечение с длинами волн > 400 нм. При конфокальной микроскопии изображения получали с использованием иммерсионного объектива план-ахромат 63х/1,4. Для возбуждения флуоресценции использовали лазерное излучение с длиной волны 405 нм и интенсивностью 0,1–0,3 мВт. Применение двух каналов детектирования флуоресценции (420–480 нм и 505–530 нм) позволило выделить флуоресценцию полифосфатсодержащих структур (максимум эмиссии при 525 нм) на фоне флуоресценции, генерируемой молекулами ДНК, РНК и липидов, максимумы эмиссии которых находятся в диапазоне длин волн до 500 нм [11]. Комплексы DAPI–ДНК и DAPI–РНК характеризуются голубоватой флуоресценцией, а комплексы DAPI–полифосфат и DAPI–липид — ярко-желтой, однако флуоресценция комплекса DAPI–липид быстро (за несколько секунд) исчезает [8]. Примененные режи-

мы позволяют детектировать полифосфаты даже в незначительных количествах (25 нг/мл), минимизировав излучения свободного DAPI и его комплекса с ДНК, РНК и липидами [11]. На представленных рисунках зоны эмиссии, характерные для длин волн 420–480 нм, показаны синим, а для 505–530 нм — зеленым цветом.

Результаты и обсуждение

Волютиновые гранулы *Saccharomyces cerevisiae*

Исследуемые клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 содержат включения, способные к проявлению метахроматических реакций при окрашивании органическим основным тиазиновым красителем метиленовым синим (рис. 1, А). Эти внутриклеточные структуры известны как метахроматические гранулы. В наших исследованиях мы не выявили их взаимодействия с липохромными красителями, в частности такими, как судан III и IV, специфичными для идентификации липидных включений. Они также не окрашивались растворами йодистого калия, специфичными для выявления внутриклеточного гликогена. В то же время гранулы активно взаимодействовали с такими люминофорами, как акридинового оранжевый (АО) и DAPI. При этом первый краситель окрашивал структуры в красный цвет, а второй — в насыщенно желтый (рис. 1, Б, В). Красная флуоресценция гранул, вызванная реакцией с АО, может свидетельствовать о наличии в наблюдаемых гранулах молекул нуклеиновых кислот или просто отрицательно заряженных линейных молекул [12]. Желтая устойчивая к УФ-облучению окраска гранул в присутствии DAPI прямо свидетельствует о присутствии полифосфатов [8].

Прижизненное окрашивание нефиксированных образцов показало, что многие из метахроматических гранул находятся внутри вакуолей в свободном состоянии, не прикреплены и не зафиксированы на внутренней поверхности дрожжевых вакуолей, а пребывают в постоянном движении. Этот феномен легко наблюдать как при фазово-контрастном, так и при люминесцентном микроскопировании объектов. Благодаря своей подвижности гранулы получили название «танцующих телец» (dancing bodies).

Волютиновые гранулы дрожжей могут достигать значительных размеров (до половины длины и ширины клетки — 3–4 мкм), это позволяет с высокой точностью и доста-

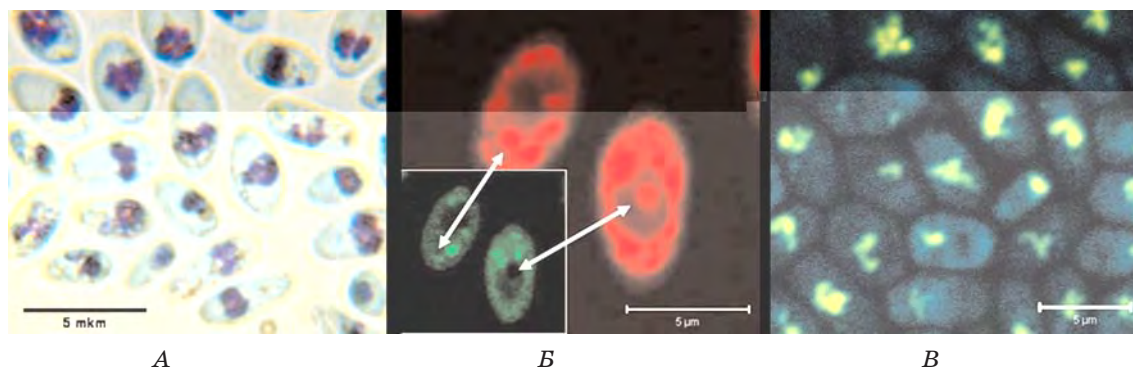


Рис. 1. Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517: окрашенные метиленовым синим (А); акридиновым оранжевым (отдельно показана флуоресценция в зеленой (505–530 нм) и в красной (560–615 нм) зонах видимого спектра) (Б); окрашенные DAPI (В). Изображение А получено при светлопольном микрокопировании, изображения Б и В — методом лазерной конфокальной микроскопии. Шкала соответствует 5 мкм

точно легко исследовать их трехмерную структуру методом конфокальной микроскопии. Детализация строения поверхности объекта невозможна из-за дифракционного предела разрешающей способности оптического микроскопа, однако это никоим образом не сказывается на общей характеристике изображений, полученных от исследуемых объектов (их геометрии и пространственном расположении).

Максимумы флуоресценции, характерные для нуклеиновых и полифосфатсодержащих структур, окрашенных DAPI, не совпадают между собой и отличаются длиной волны [11]. Это позволило дифференцировать полифосфатсодержащие образования, такие как вакуолярные волутиновые гранулы, на фоне остальных внутриклеточных структур, и одновременно проанализировать их пространственное расположение. Кроме того, полифосфатсодержащие образования были выявлены также и в тех участках клетки (за пределами вакуолей), в которых они не могли быть визуальными наблюдаемы при первичном микрокопировании в УФ-свете (рис. 2). Очевидно, при некоторых условиях цитоплазма клеток дрожжей может быть заполнена полифосфатами (рис. 2 и рис. 3), находящимися в комплексе с другими молекулами. Из-за небольших размеров этих образований и экранирования их соединениями другой природы эти гранулы можно зафиксировать только методом конфокальной микроскопии. В свою очередь, этот тип микроскопии не позволяет судить об агрегатном состоянии полифосфата внутри клеток. Согласно данным других исследователей, фракция вакуолярного полифосфата, относящегося к «танцующим

тельцам», представляет собой кристаллические образования, в то время как в цитоплазме полифосфат, вероятнее всего, находится в аморфном состоянии [5, 13]. Данные, полученные нами при сравнении трехмерных изображений гранул с контрольными образцами полифосфатов с длиной цепи $n = 18$ и $n = 200$, окрашенных DAPI и исследованных при тех же параметрах (рис. 3), что и опытные образцы, подтвердили факт их кристаллического сходства. Геометрия кристаллов контрольных полифосфатов соответствовала морфологическим особенностям внутриклеточных полифосфатсодержащих гранул (рис. 4, В, Г). Во всех случаях отмечены либо одиночные вытянутые «сигарообразные» структуры, либо их агломераты. При этом описанная геометрия характерна как для вакуолярных волутиновых гранул, так и для гранул, выявленных вне вакуолей (рис. 4, Б).

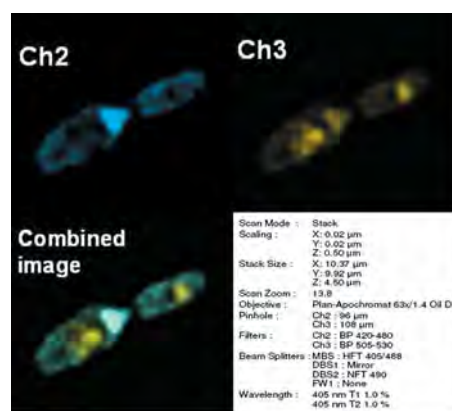


Рис. 2. Изображение клетки *Saccharomyces cerevisiae* Y-517, окрашенной DAPI. Флуоресценция характерных для соединений DAPI-ДНК и DAPI-РНК (Ch2) и DAPI-полифосфат (Ch3) показана соответственно синим и желтым цветом

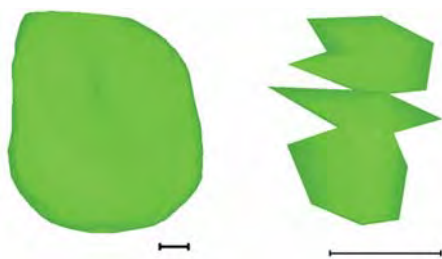


Рис. 3. Гранулы, образованные солями полифосфатов длиной 12 и 200 полифосфатных остатков и окрашенные DAPI.

Изображение получено методом конфокальной микроскопии. Шкала соответствует 1 мкм

Установлено, что размер волютиновых гранул не зависит от фазы клеточного цикла. Помимо материнских клеток наличие вакуолярных полифосфатных включений отмечено также на достаточно ранних этапах формирования почки, которые соответствуют S- и G₂-фазам клеточного цикла (рис. 4, А, В, Г).

Волютиновые гранулы *Fusarium species*

Люминесцентная микроскопия показала наличие волютиновых гранул как в гифах, так и в конидиях мицелиальных грибов *Fusarium sambusicum* и *Fusarium solani*. На рис. 5 видно, что гифы *Fusarium sambusicum* содержат значительное количество гранул, окрашенных DAPI в ярко-желтый цвет. Размеры гранул варьировали от 0,2 мкм до 5,0 мкм. Некоторые из этих гранул были подвижны. Объемные изображения волютиновых гранул этих грибов, полученные методом конфокальной микроскопии, указывают на их морфологическое сходство с аналогичными структурами, описанными нами для дрожжевых клеток. Учитывая

способность гранул исследованных видов мицелиальных грибов связываться с DAPI и их морфологическое сходство, можно предположить, что эти гранулы могут быть полифосфатной природы и соответствовать «танцующим тельцам», выявленным у дрожжей.

Исследование препаратов макроконидий *Fusarium solani* позволило проследить динамику появления в них волютиновых зерен. В исходных образцах макроконидий, окрашенных DAPI, отдельные включения не выявлялись (рис. 6, А): клетки характеризуются равномерной окраской, с четко очерченными перегородками. Через 7 дней в отдельных макроконидиях было отмечено равномерное окрашивание всей цитоплазмы (рис. 6, В). В этих клетках, в отличие от остальных, внешние перегородки не визуализировались, а окрашенная цитоплазма выглядела как плотное внутриклеточное образование. Изображения этих же конидий, полученные на конфокальном микроскопе, не позволяли выявить каких-либо отдельных структур (рис. 6, Г). На 14-е сутки во всех макроконидиях были зафиксированы четко выраженные гранулярные структуры (рис. 6, В), которые в режиме трехмерного изображения (рис. 6, Д) оказались аналогичными выявленным в дрожжевых клетках.

Волютиновые гранулы диатомовой водоросли *Frustulia saxonica* Rabenhorst

Исследование волютиновых гранул в клетках диатомовых водорослей *Frustulia saxonica* Rabenhorst с помощью люминесцентной и конфокальной микроскопии дало возможность не только установить их движение, но и определить структурные особенности. Как следует из рис. 7, волютиновые

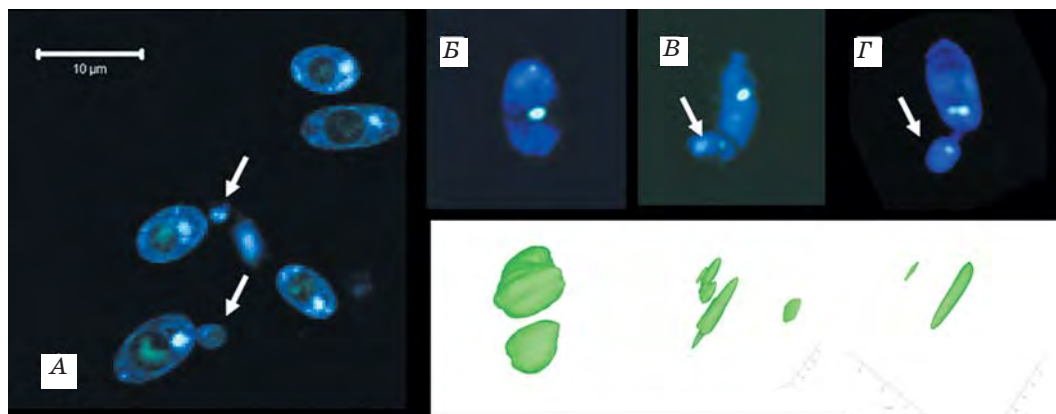


Рис. 4. Морфологические особенности волютиновых гранул дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-517, окрашенных DAPI.

Стрелками показаны почки дрожжей на разных этапах клеточного цикла, в которых визуально видны подвижные полифосфатные гранулы. Шкала соответствует 10 мкм

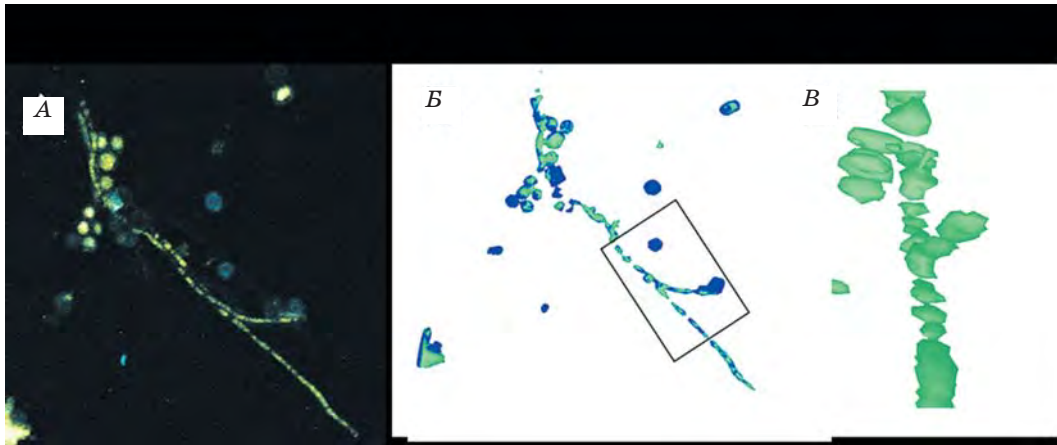


Рис. 5. Гифы *Fusarium sambusicum*, окрашенные DAPI и исследованные методом конфокальной микроскопии:

исходное изображение гифы (А); изображение, сформированное по разности интенсивности флуоресценции при длинах волн 420–480 нм и 505–530 нм (Б); увеличенное изображение участка гифы, выделенного квадратом (Б')

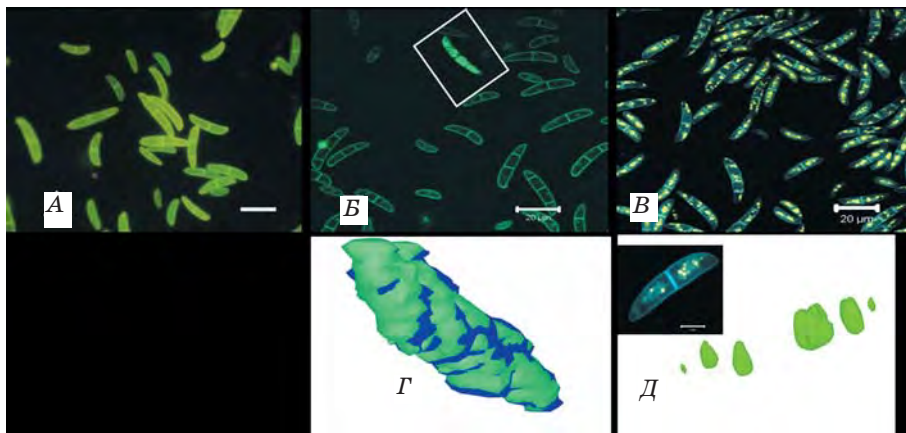


Рис. 6. Макроконидии *Fusarium solani*: исходный образец (А); тот же образец через 7 дней без питательных веществ (квадратом выделена конидия, с которой получено изображение Г) (Б); тот же образец через 14 дней без питательных веществ (Б'); изображения макроконидии методом конфокальной микроскопии соответственно через 7 и 14 дней без питательных веществ (Г, Г').

Изображения А и Б получены методом люминесцентной микроскопии, Б, Г и Г' — методом конфокальной микроскопии. Ув. ×400. Шкала соответствует 20 мкм

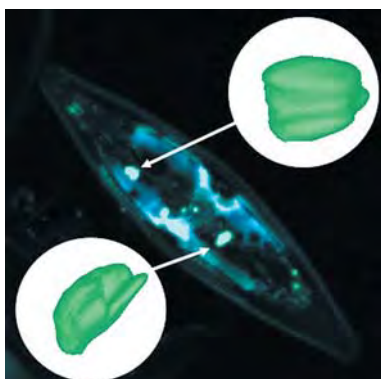


Рис. 7. Изображение клетки диатомовых водорослей *Frustulia saxonica*, полученное методом конфокальной микроскопии. Шкала соответствует 10 мкм

гранулы представлены образованиями, в составе которых четко фиксируются такие же «сигароподобные» составляющие, что и в клетках дрожжей и мицелиальных грибов. Размер гранул может достигать 3 мкм.

Таким образом, как показали наши исследования, волутиновые гранулы низших эукариот представляют собой не сферические образования, которые можно видеть при обычных режимах микроскопирования, а «сигарообразные» структуры. По форме они идентичны как в дрожжевых и гифальных клетках грибов, так и в клетках диатомовых водорослей. Размеры их варьируют в широких пределах — от 0,2–0,5 мкм до 4–5 мкм.

Они могут быть одиночными, а также образовывать скопления со сложной геометрией. Однако во всех случаях полученные трехмерные изображения исследованных гранул указывают на наличие вытянутых «сигарообразных» составляющих. Сравнение 3-мерных изображений гранул с кристаллами неорганических полифосфатов позволяет предположить их кристаллическую структуру, что подтверждают данные, полученные Наито и соавт. [13].

Использование метода конфокальной микроскопии дает возможность детектировать полифосфатные гранулы, не только видимые при обычном микроскопировании, но и находящиеся в глубине клетки и экранированные другими внутриклеточными компонентами. Исследование подтвердило тот факт, что волютиновые гранулы одновременно могут находиться в вакуолях и в цитоплазме дрожжей [5]. Они фиксируются в клетках во всех фазах клеточного цикла и даже на ранних стадиях образования почки. Их движение в клетке носит сложный характер и по нашим наблюдениям требует специального исследования.

Депонирование полимеров играет важную роль в метаболизме полифосфатаккумулирующих организмов [14], участвующих в процессах биологического удаления фосфора.

Факт идентичности структур полифосфатсодержащих волютиновых гранул у разных групп микроорганизмов может свидетельствовать об общих закономерностях их образования и функционирования. Предположение об их агрегативном состоянии (при сравнении с кристаллами препаратов полифосфатов) требует дальнейшего исследования и может быть важным аспектом в изучении механизма аккумуляции фосфора клетками.

Полученные результаты могут быть использованы при визуализации и идентификации волютиновых гранул низших эукариот, а предлагаемые методы рекомендуются для мониторинга процесса биологического удаления фосфора (EBPR).

Авторы выражают благодарность Н. Майстровой за помощь в идентификации диатомовой водоросли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toerien D. F., Gerber A., Lotter L. H., Cloete T. E. Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge // *Adv. Microb. Ecol.* — 1990. — V. 11. — P. 173–230.
2. Кислинг Дж. Д., Вэн Дайен С. Дж., Трелстэд П. и др. Метаболизм полифосфатов и проблемы биотехнологии и защиты окружающей среды // *Биохимия.* — 2000. — Т. 65, Вып. 3. — С. 394–405.
3. Good G. A., Bell S. G. Eutrophication in fresh waters // *J. Water. Pollut. Contr. Fed.* — 1985. — V. 84. — P. 225–232.
4. Мино Т. Селекция полифосфат-аккумулирующих бактерий для усовершенствованного биологического удаления фосфата в активированных илах при технологических процессах удаления сточных вод // *Биохимия.* — 2000. — Т. 65, Вып. 3. — С. 405–414.
5. Кулаев И. С., Вагабов В. М., Кулаковская Т. В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. — М.: Научный мир, 2005. — 216 с.
6. Jones H. E., Chambers L. A. Localized intracellular polyphosphate formation by *Desulfovibrio gigas* // *J. Gen. Microbiol.* — 1975. — V. 89. — P. 67–72.
7. Горбик Л. Т., Элланская И. А. Включения метхроматина в клетках конидий и гиф видов *Fusarium LK. EX FR.* // *Микробиол. журн.* — 1981. — Т. 43, № 3. — С. 342–346.
8. Serafim L. S., Lemos P. C., Levantesi C. et al. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms // *J. Microbiol. Meth.* — 2002. — V. 51, N 1. — P. 1–18.
9. Білай В. Й., Горбик Л. Т. Волютинові і жиrowі включення в конідіях і гіфах фузаріїв // *Микробиол. журн.* — 1970. — Т. 32, № 6. — С. 755–761.
10. Практикум по микробиологии/ Под ред. Н. С. Егорова: Уч. пособие. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. — 307 с.
11. Aschar-Sobbi R., Abramov A. Y., Diao C. et al. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-Based approach // *J. Fluoresc.* — 2008. — V. 18, N 5. — P. 859–866.
12. Буданцев А. Ю. Основы гистохимии: Уч. пособие (электронная версия http://window.edu.ru/window/library?p_rid=59159). — Пущино: Пущинский гос. ун-т, 2008.
13. Naito Y., Tohe A., Hamaguchi H. In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell // *J. Raman Spectrosc.* — 2005. — V. 36. — P. 837–839.
14. Мино Т., Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process // *Water Res.* — 1998. — V. 32. — P. 3193–3207.

**ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ВОЛЮТИНОВИХ
ГРАНУЛ В КЛІТИНАХ НИЖЧИХ
ПОЛІФОСФАТАКУМУЛЮЮЧИХ
ЕВКАРІОТІВ**

*О. М. Громозова¹
С. І. Войчук¹
Т. Л. Качур¹
В. Ф. Горчев²
С. О. Карахім²*

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України, Київ

E-mail: gren@voliacable.com

Показано, що методи люмінесцентної і лазерної конфокальної мікроскопії дозволяють не тільки детектувати поліфосфатвмісні гранули у різних ділянках клітини, але й досліджувати їхню структуру, що може бути використано для моніторингу процесів біологічного видалення фосфору. На прикладі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, міцеліальних грибів роду *Fusarium* та діатомових водоростей *Frustulia saxonica* Rabenhorst показана ідентичність будови волютинових гранул у представників різних груп мікроорганізмів. Хоча їхні розміри варіюють у широких межах — від 0,2–0,5 мкм до 4–5 мкм, в усіх випадках отримані об'ємні (3D) зображення досліджених гранул вказують на наявність видовжених «сигароподібних» складових. Вони можуть бути поодинокими, а також утворювати скупчення складної геометричної форми.

Ключові слова: поліфосфатакумулюючі мікроорганізми, волютинові гранули, конфокальна лазерна скануюча мікроскопія, люмінесцентна мікроскопія, дріжджі, мікрOMICETI, діатомові водорості.

**STRUCTURAL PECULIARITIES
OF VOLUTIN GRAINS IN THE CELLS
OF THE LOWEST POLYPHOSPHATE-
ACCUMULATING EUKARYOTES**

*O. M. Gromozova¹
S. I. Voychuk¹
T. L. Kachur¹
V. F. Gorchev²
S. A. Karakhim²*

¹Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Palladian Institute of Biochemistry of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: gren@voliacable.com

The methods of luminescence and confocal laser scanning microscopy have been shown to allow detection not only polyphosphate containing granules in various sites of a cell, but to investigate their structure as well. They can be used for monitoring of biology phosphorus removal. A morphological identity of volutin granules of representatives of different groups of microorganisms was shown on an example of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mycelial fungi *Fusarium* and diatom alga *Frustulia saxonica* Rabenhorst. Though their sizes vary over a wide range from 0.2–0.5 mkm up to 4–5 mkm, in all cases the received three-dimensional images of the investigated granules denote on presence of the elongated «cigar-like» components. They can be as single grains or form congestions of the complex geometrical form.

Key words: polyphosphate-accumulating microorganisms, volutin granules, confocal laser scanning microscopy, luminescence microscopy, yeast, micromycetes, diatomalga.