

УДК 577.22

## НАРУШЕНИЕ МОРФОГЕНЕЗА ЭЛЕМЕНТОВ КРЕМНИСТОГО ПАНЦИРЯ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Synedra acus* В ПРИСУТСТВИИ ГЕРМАНИЕВОЙ КИСЛОТЫ

© 2007 г. Т.А. Сафонова, В.В. Анненков, Е.П. Чебыкин,  
Е.Н. Даниловцева, Е.В. Лихошвай\*, М.А. Грачев

Лимнологический институт СО РАН, 664033 Иркутск,  
ул. Улан-Баторская, 3; факс: (3952)425-405,  
электронная почта: info@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 10.05.07

После доработки 02.07.07

Установлено, что добавка германиевой кислоты в среду культивирования диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians* (Kutz.) Skabitsch. почти не замедляет рост культуры при мольном отношении Ge/Si 0,01, но полностью останавливает его при отношениях Ge/Si 0,05 и более. По данным масс-спектрометрии установлено, что при Ge/Si 0,01 германий включается и в цитоплазму клетки, и в кремнистые створки; при Ge/Si 0,05 германий включается в цитоплазму, но почти не включается в створки; при Ge/Si 0,1 германий только накапливается в цитоплазме, но включение его в створки прекращается. С помощью результатов исследования морфологии клеток методами световой, эпифлуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии показано, что высокие концентрации германиевой кислоты вызывают нарушения морфогенеза кремнистых панцирей и накопление крупных окрашиваемых родамином и содержащих электронно-плотный материал включений. С помощью модельных химических экспериментов с пересыщенным раствором кремниевой кислоты в присутствии полиаллиламина обнаружено, что при добавлении 5%-ной германиевой кислоты коагуляция кремнезема существенно ускоряется. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что токсическое воздействие германиевой кислоты на диатомею является следствием изменения процесса коагуляции кремнезема.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** диатомеи, кремнезем, германий, полиаллиламин, морфогенез, эпифлуоресцентная и трансмиссионная электронная микроскопия.

Диатомеи – одноклеточные эукариотические водоросли, обеспечивающие до 40% всей первичной продукции органического вещества на Земле. Строя свои клеточные стенки из кремнезема, они ежегодно дегидратируют и удаляют из океана  $10^{10}$  т растворенной кремниевой кислоты [1]. Наиболее загадочной является способность диатомей строить кремнистые панцири с генетически запрограммированными сложными узорами наноструктур [2]. В последнее десятилетие отмечен прогресс в понимании молекулярных механизмов поглощения кремниевой кислоты диатомеями и ее переноса из окружающей водной среды в цитоплазму. В переносе участвуют специальные мембранные белки транспорта кремния (SIT – silicon transporter) [3–6]. Однако, каким образом происходит перенос кремниевой

кислоты из цитоплазмы в везикулы отложения кремнезема (SDV – silica deposition vesicles), где происходит синтез кремнистых створок и каким образом из кремниевой кислоты «отливаются» эти сложно устроенные кремнистые клеточные стенки, пока известно очень мало [7].

Германий – химический аналог кремния – обладает химическими свойствами, близкими к свойствам кремния, и усваивается всеми кремнийаккумулирующими организмами. Установлено, что в малых дозах (~1% содержания кремния в культуральной среде) германиевая кислота усваивается диатомеями аналогично кремниевой и не влияет на их рост и морфологию [8]. Повышение концентрации германиевой кислоты оказывает токсическое действие на развитие диатомей [9, 10]. Механизм токсического действия германиевой кислоты на диатомею не установлен, но известные факты [10, 11] позволяют предположить, что она подавляет не трансмембранный перенос кремниевой кислоты, а ее внутриклеточную трансформацию.

Принятые сокращения: SIT – транспорта кремния, SDV – везикулы отложения кремнезема, ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия.

\* Адресат для корреспонденции и запросов отписок.

Цель работы – изучение влияния германиевой кислоты на динамику роста и механизм синтеза кремнистых структур у пресноводной диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians* (Kutz.) Skabitsch.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение культур.** Выделены две культуры клеток диатомовых водорослей *S. acus* subsp. *radians* из проб фитопланктона озера Байкал: K1 – из залива Лиственничного в июне 2003 г., K2 – из залива Чивыркуйского в июле 2005 г. Выделение, учет численности и культивирование клеток диатомовых водорослей проводили на жидкой среде DM [12], приготовленной на дистиллированной воде и содержащей (мг/л):  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 12,4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 25,  $\text{NaHCO}_3$  – 16,  $\text{Na}_2 \cdot \text{ЭДТА}$  – 2,25,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 2,48,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,39,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 42,6,  $\text{FeCl}_3$  – 1,6, цианокобаламина (витамина B12), тиамин гидрохлорида (витамина B1) и биотина – по 0,04. Накопительные культуры очищенных клеток выращивали в стеклянных колбах объемом 100–1000 мл. Так культуру K1 выращивали при комнатной температуре в условиях периодического перемешивания при естественной смене дня и ночи. Культуру K2 выращивали в инкубаторе («New Brunswick G25», США) при постоянном перемешивании при 7–8° и освещенности 13–16 мкмоль/м<sup>2</sup> · с и при чередовании 12-ч темновой и световой фаз.

**Кремниевое голодание.** Клетки, находившиеся в логарифмической фазе роста, осаждали путем отстаивания в стеклянных пробирках в стерильных условиях и трижды отмывали средой DM без кремния. Отмытые клетки помещали в пластиковые чашки Петри со средой DM без кремния и оставляли на 2 сут при тех же условиях культивирования, что и до синхронизации. Затем клетки помещали на 1 ч в темноту, после чего добавляли силикат и германат натрия.

**Рост клеток.** Опыты по воздействию германия на динамику роста диатомовых водорослей проводили в пластиковых планшетах для микрокультивирования клеток («Linbro Biomedicals, INC», Дания) с плоскодонными лунками объемом 400 мкл. Клетки выращивали в микроинкубаторе при 13° и освещении 16 мкмоль/м<sup>2</sup> · с с чередованием дня и ночи (по 12 ч) [13]. Культуру клеток суспендировали в среде DM без кремния до конечной концентрации 1000–3000 кл/мл, и в каждую лунку помещали по 90 мкл суспензии, к которой затем добавляли по 10 мкл смеси растворов силиката и германата натрия (20 мМ) в мольных отношениях 0, 0,01, 0,05, 0,1 и 1. В суммарной концентрации силиката и германата были

равны содержанию кремния в среде DM (0,2 мМ). Эксперименты для каждой концентрации проводили в 5–6 повторностях. За ростом культуры наблюдали в течение 11 сут, клетки подсчитывали автоматически с помощью инвертируемого микроскопа Axiovert 200 («Zeiss», Германия) и специального программного обеспечения [13].

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и масс-спектрометрии клетки выращивали в стеклянных колбах. К 30 мл суспензии клеток в среде DM без кремния добавляли 300 мкл смеси растворов кремневой и германиевой кислот. Клетки культивировали при 20–25° и естественном освещении.

**Световая и эпифлуоресцентная микроскопия.** К клеткам *S. acus* subsp. *radians*, растущим при различных соотношениях Ge/Si, на третьи сутки после добавления кремневой и германиевой кислот добавляли родамин 6G (Березниковский химический завод, Россия) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Через 3 сут клетки исследовали методом флуоресцентной микроскопии с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 с помощью ультрафиолетовой лампы HBO 50W/AC ASRAM с зеленым фильтром (длина волны 546 нм).

**Трансмиссионная электронная микроскопия.** Для приготовления ультратонких срезов клетки фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом (ГА) в течение 2 ч. Клетки концентрировали путем последовательного центрифугирования (4000 g) в течение 5 мин. После трехкратного отмывания фосфатным буфером (рН 7,4) клетки постфиксировали 1%-ным раствором оксида осмия 2 ч при комнатной температуре. После этого клетки отмывали буфером и заключали в 1,5%-ный агар («Wako», Япония). Образец обезвоживали в серии растворов этанола (10, 30, 50, 70, 80, 96, 100%-ном этаноле по 10 мин в каждом). Затем образцы промывали дважды по 30 мин в обезвоженном над сульфатом меди ацетоне («Реахимкомплект», Ангарск). Эпоксидные смолы Epon 812, DDSA и MNA («Fluka», Швейцария) смешивали в количестве 4,5, 2,2 и 2,2 мл соответственно. После пропитки материал переносили в полипропиленовые капсулы Veem<sup>TM</sup>, а затем в свежую смесь эпоксидных смол с катализатором (5 капель DMP-30 на 10 мл смол) и полимеризовали в термостате с открытыми крышками последовательно при 37° (12 ч), 45° (12 ч) и 60° (48 ч).

Срезы, полученные на микротоме Ultracut R («Leica», Австрия) алмазным ножом ULTRA 35° («Diatom», Австрия), монтировали на палладиевые сетки. Препарат контрастировали цитратом свинца методом Рейнольдса [14] и отмывали сначала в 0,02 М NaOH, а затем в дистиллиро-

ванной воде. Исследование срезов проводили с помощью ТЭМ Leo 906E («Zeiss») при ускоряющем напряжении 80 кВ.

**Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS).** Подготовка проб. Аликвоты среды, в которой росли диатомеи, после центрифугирования (4000 g) разбавляли в 7–8 раз (по весу) 2%-ным раствором азотной кислоты (70,4%, ОСЧ 27-5 ГОСТ 11125-84, ЗАО «Мосреактив», Россия), содержащим 10 мкг/л индия («Fluka», 1000 мкг/л, 0,5 М  $\text{HNO}_3$ ) в качестве внутреннего стандарта. В качестве холостой пробы использовали среду без Si и Ge. Образцы отбирали на 0, 1, 3, 5 и 7-е сут культивирования.

По окончании эксперимента (седьмой день) створки центрифугировали, пятикратно промывали средой без Si и Ge (по 1,5 мл), после чего нагревали на кипящей водяной бане в дистиллированной воде (0,5 мл, 2 раза по 15 мин). Полученные экстракты разбавляли в 2 раза раствором 2%-ной  $\text{HNO}_3$  с 10 мкг/л индия.

После экстракции водой створки водорослей дважды по 30 мин выдерживали при 100° в 2%-ном растворе Ds-Na (0,2 мл), затем обрабатывали концентрированной  $\text{HNO}_3$  (0,5 мл, 80°, 2 ч), и оставляли на ночь при комнатной температуре. Створки промывали пятикратно дистиллированной водой (по 1,5 мл) и переносили в полипропиленовые 15-мл пробирки. В пробирки добавили 0,2 г 50%-ной HF (ОСЧ 27-5 ТУ 6-09-3401-88 ОАО «Галоген», Россия) и подвергали пятикратному микроволновому облучению по 10 с (бытовая микроволновая печь LG MS 1902H, 700 Вт). Объем растворов доводили до 15 мл 2%-ным раствором  $\text{HNO}_3$  с 10 мкг/л индия (по массе).

**ICP-MS-измерение.** Подготовленные растворы измеряли методом ICP-MS на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500se (центр коллективного пользования «Ультрамикроанализ» при Лимнологическом институте СО РАН, Иркутск). Подача проб осуществлялась с помощью микропоточного небулайзера (0,1 мл/мин) и системы ввода агрессивных растворов. Прибор калибровался по стандартному раствору Tune (Li, Co, Y, Tl и U – 10 мкг/л) («Agilent», США). Дрейф прибора отслеживался по внутреннему стандарту индия.

**Изучение влияния германиевой кислоты на конденсацию кремниевой в присутствии полиаллиламина (ПАА).** В качестве источников кремниевой и германиевой кислот использовали  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}_2\text{GeO}_3$  соответственно в виде 0,1 М растворов. Гидрохлорид ПАА («Aldrich», США) с молекулярной массой 15 кДа также предварительно растворяли в воде в концентрации 0,1 М. Эксперименты проводили в присутствии 0,1 М ацетатного буфера. При добавлении к буферно-

му раствору растворов ПАА и силиката натрия (или его смеси с германатом) pH среды повышался до 6. В этой связи в конечных экспериментах перед добавлением силиката натрия в раствор вводили 1 М HCl, объем которой определяли в предварительных экспериментах. Таким образом, pH растворов перед началом конденсации кремниевой кислоты составлял 5,5.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

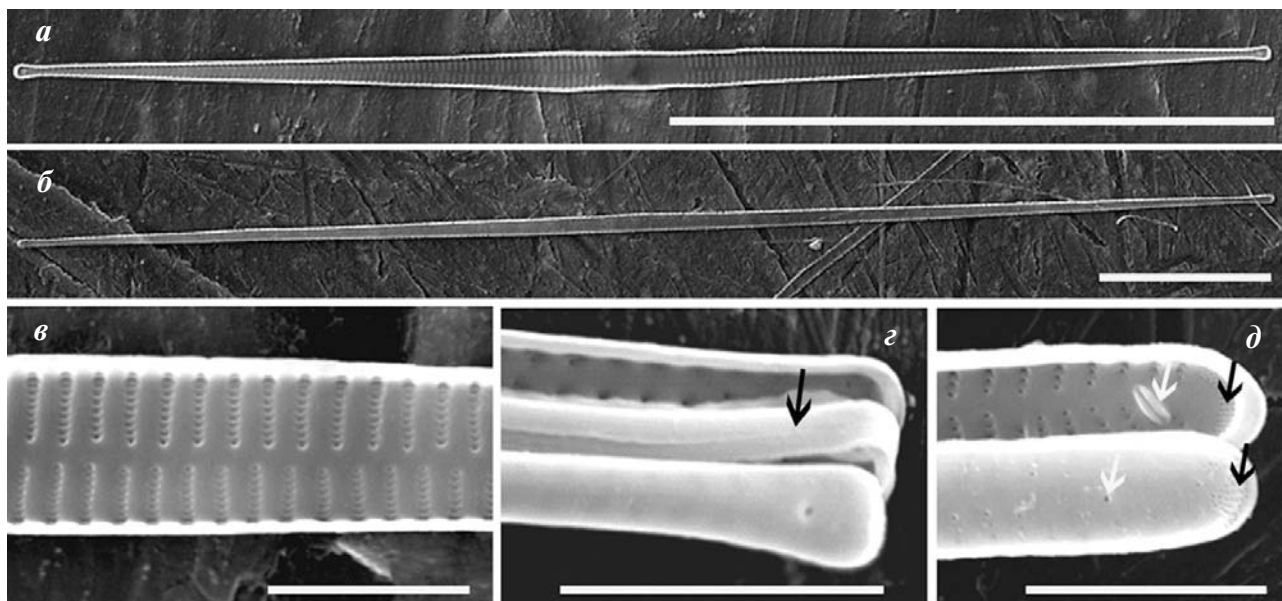
Выделенные культуры *S. acus* subsp. *radians* отличались размером клеток (рис. 1). Клетки культуры K1 были в среднем длиной 150 мкм и шириной 3 мкм (рис. 1, а), а в K2 – 360 и 5 мкм соответственно (рис. 1, б). Створки *S. acus* subsp. *radians* вытянутые, испещренные узорами пор ареол корытца (рис. 1, в).

В зрелой живой клетке ее створки – эпитека и гипотека – соединены одна с другой системой кремнистых поясковых ободков (рис. 1, г и 2 (см. вклейку), стадии 4–8 (по данным Бедошвили [15]); см. цветную вклейку). С обоих концов створки имеются двугубые выросты и краевое поле пор (рис. 1, д). Отверстия в кремнистом панцире обеспечивают взаимодействие клетки с окружающей средой, выделение полисахаридной слизи и других органических веществ.

Исследования влияния Ge на рост диатомовой водоросли *S. acus* subsp. *radians* показали, что при мольном отношении Ge/Si 0,01 рост культур незначительно замедляется по сравнению с контролем, а при Ge/Si 0,05 и выше полностью прекращается (рис. 3).

В следующей серии опытов изучали кинетику убыли Si и Ge из питательной среды в ходе роста культур (K1 и K2) и динамику накопления элементов в цитоплазме и в створках. При Ge/Si 0,01 наблюдалось уменьшение концентраций указанных элементов в среде (рис. 4). При более высоких значениях Ge/Si потребление элементов прекращалось, их концентрации оставались равными исходным в течение всего времени эксперимента (7 сут).

Исследовано включение Si и Ge при различном отношении Ge/Si в цитоплазму клеток двух культур, отличающихся соответственно размерами и объемами (рис. 5). Объемы рассчитывали исходя из геометрической фигуры, соответствующей изучаемому виду водоросли (два конуса) [16]. При всех исследованных соотношениях Ge/Si уровень включения в клетки культуры K1 (рис. 5, а) (средняя длина клеток 150 мкм, объем  $0,35 \cdot 10^{-12}$  л) был в несколько раз ниже, чем у K2 (рис. 5, б) (360 мкм и  $2,36 \cdot 10^{-12}$  л соответственно).



**Рис. 1.** Сканирующая электронная микроскопия. Клетки *S. acus* subsp. *radians*: *a* – культура К1, *б* – культура К2, *в* – ряды ареол, *г* – поясковые ободки между двумя створками (черная стрелка), *д* – концы створок, двугубый вырост на внутренней стороне створки и его наружное отверстие (белые стрелки), краевое поле пор (черные стрелки). Масштаб: *a, б* – 50, *в–д* – 5 мкм

Пересчет полученных значений показал, что концентрации «цитоплазматического» кремния во много раз превышают предел растворимости кремниевой кислоты в воде (2–3 мМ) [17]. В контроле (без добавления Ge) для культуры клеток К1 (рис. 5, *a*) 2,2 мкг кремния на  $10^6$  клеток соответствует концентрации ~220 мМ, а для К2 (рис. 5, *а*) 7,7 мкг на  $10^6$  клеток ~120 мМ. Однако это не значит, что кремний присутствует в цитоплазме в виде свободной кремниевой кислоты. Методика экстракции диатомей горячей водой [11] дает сведения о содержании в цитоплазме не свободной кремниевой кислоты, а неких веществ пока не установленной природы, возможно, олигосиликатов [18], которые во время экстракции переходят в водный раствор. Концентрация Si, в том числе в составе этих веществ, в цитоплазме диатомей согласно опубликованным данным может достигать еще больших значений (например, 340 мМ для вида *Stephanopyxis turris* Greville et Arnott) [11, 19].

Удивителен тот факт, что при добавлении в среду Ge увеличивается внутриклеточная концентрация не только самого Ge, но и Si. В среде при Ge/Si 0,01, в клетках культуры К1 концентрация Si возрастала до 500, а в К2 – до 320 мМ. При Ge/Si 0,05 в культуре К2 концентрация Si возрастала до 720 мМ (рис. 5, *б*). При Ge/Si 0,1 при полном ингибировании роста обеих культур (рис. 3) наблюдалось некоторое увеличение

внутриклеточного содержания как Ge, так и Si по сравнению с контролем (рис. 5, *а, б*).

Для исследования включения Ge в створки диатомей в зависимости от отношения Ge/Si брали культивированные клетки, промытые сначала детергентом, а затем горячей азотной кислотой. При такой обработке зрелые створки диатомей не разрушались. Отмытые створки растворяли в плавиковой кислоте. Затем определяли содержание Ge в растворе методом ICP-MS. Включение Ge при увеличении Ge/Si в среде от 0,01 до 0,1 уменьшалось (рис. 5, *в, г*).

Исследования клеток *S. acus* subsp. *radians* методом световой и эпифлуоресцентной микроскопии (рис. 6, см. вклейку) показали, что при Ge/Si 0,01 клетки имели такие же, как в контроле (рис. 6, *а–г*), четко выраженные автофлуоресцирующие красным светом хлоропласты (рис. 6, *д–з*). Как и в контроле, дочерние створки давали ярко-зеленую флуоресценцию при окраске родамином 6G – прижизненным красителем, который, связываясь с кремниевой кислотой, откладывается в SDV и окрашивает только растущие, но не сформировавшиеся к моменту добавления красителя зрелые створки [20–22]. В контроле окраска наблюдалась в той узкой области, где происходит рост дочерних створок (рис. 6, *а–г*). При Ge/Si 0,05 (рис. 6, *и–м*) и Ge/Si 0,1 (рис. 6, *н–п*) клетки погибали, хлоропласты разрушались, и дочерние створки

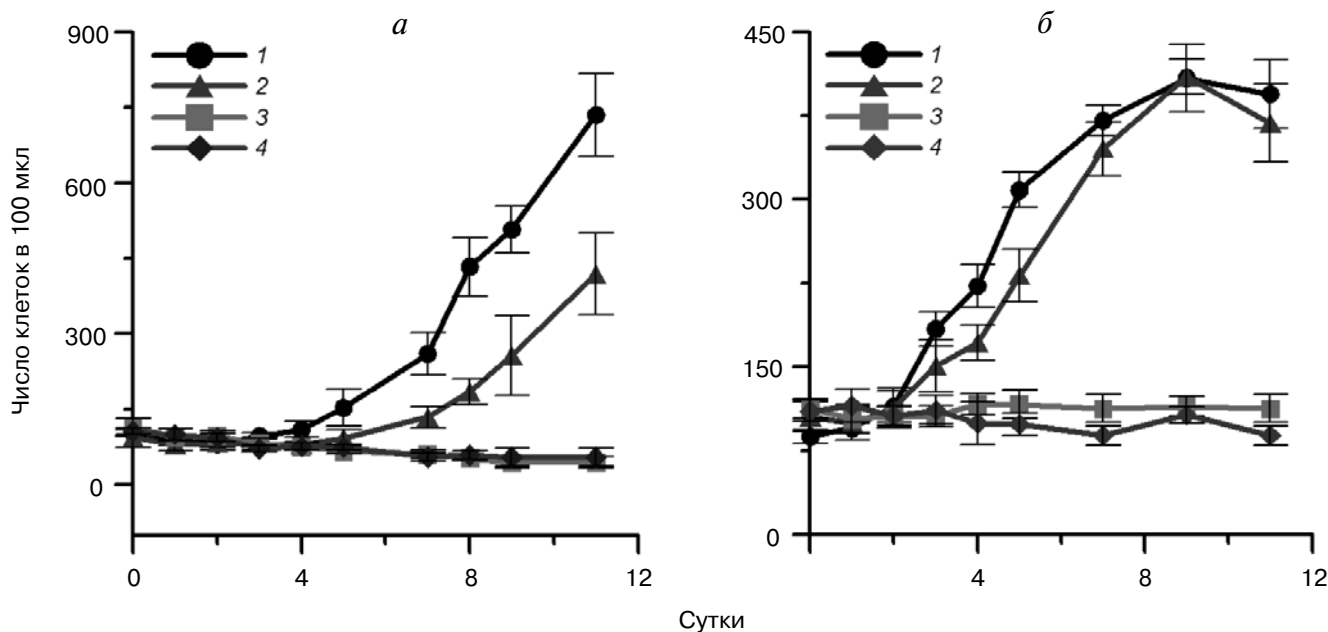


Рис. 3. Динамика роста клеток *Synedra acus* subsp. *radians* при различных мольных отношениях Ge/Si. а – Культура К1, б – культура К2. 1 – Без Ge, 2– 4 – Ge/Si 0,01, 0,05, 0,1 соответственно

не формировались. Зеленая флуоресценция при добавлении родамина 6G наблюдалась не в той области, где у нормальных клеток синтезируются створки, была рассеяна по цитоплазме (флуоресцировали большие округлые включения).

Исследования ультратонких срезов клеток *S. acus* subsp. *radians* в ТЭМ (рис. 7, а–р) показали, что при Ge/Si 0,01 (рис. 7, е) в среде строение клеток практически не отличалось от морфологии клеток в контроле (рис. 7, а, д). При Ge/Si 0,05 (рис. 7, б, ж, з) и выше (рис. 7, в, г, и–м) формирование нормальных кремнистых структур нарушалось, что видно также и на продольном (рис. 7, н), и на диагональном срезах (рис. 7, о).

При закладке первых поясковых ободков наблюдалось отклонение от нормы. Они выглядели на срезе как электронно-плотные круги (рис. 7, б–г). На месте закладки дочерних створок видны либо чрезмерно набухшие створки (рис. 7, ж–и), либо разнообразные по форме округлые вакуоли, заполненные электронно-плотным материалом и находящиеся в одной силикаемме (рис. 7, к, л). При большом увеличении вакуоли, образующиеся как на месте поясковых ободков, так и в месте закладки дочерних створок, выглядели как концентрические окружности с разной электронной плотностью (рис. 7, м). Отметим, что сопоставление поперечных (рис. 7, б–г, з–м) и продольных (рис. 7, н) срезов указывает на цилиндрическую организацию слоев в

этих структурах, ориентированную продольно к концам клетки (рис. 1, д). При ингибирующих отношениях Ge/Si 0,05 и выше в клетках образуется несколько дочерних створок, но клетки не расходятся (рис. 7, н, р).

Полученные данные позволили предположить, что в присутствии Ge нарушается механизм внутриклеточного образования кремнезема. Мы провели эксперимент по определению конденсации кремниевой кислоты в присутствии ПАА  $[-CH_2-CH(CH_2NH_2)-]_n$  – известного ускорителя этой реакции, используемого для моделирования синтеза кремнистых структур *in vitro* [23]. Реакционная смесь содержала 36 мМ кремниевую кислоту (или ее смеси с германиевой) и 18 мМ ПАА (рН 5,5). Можно видеть (рис. 8), что добавление германиевой кислоты до Ge/Si 0,05 приводило к существенному ускорению выпадения осадка, который наблюдался уже через 10 мин, в то время как без нее смесь оставалась гомогенной в течение 1 ч.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование германиевой кислоты как аналога кремниевой рассматривалось ранее в качестве перспективного методического подхода в исследовании морфогенеза кремнистых створок диатомей, позволявшего использовать радиоак-

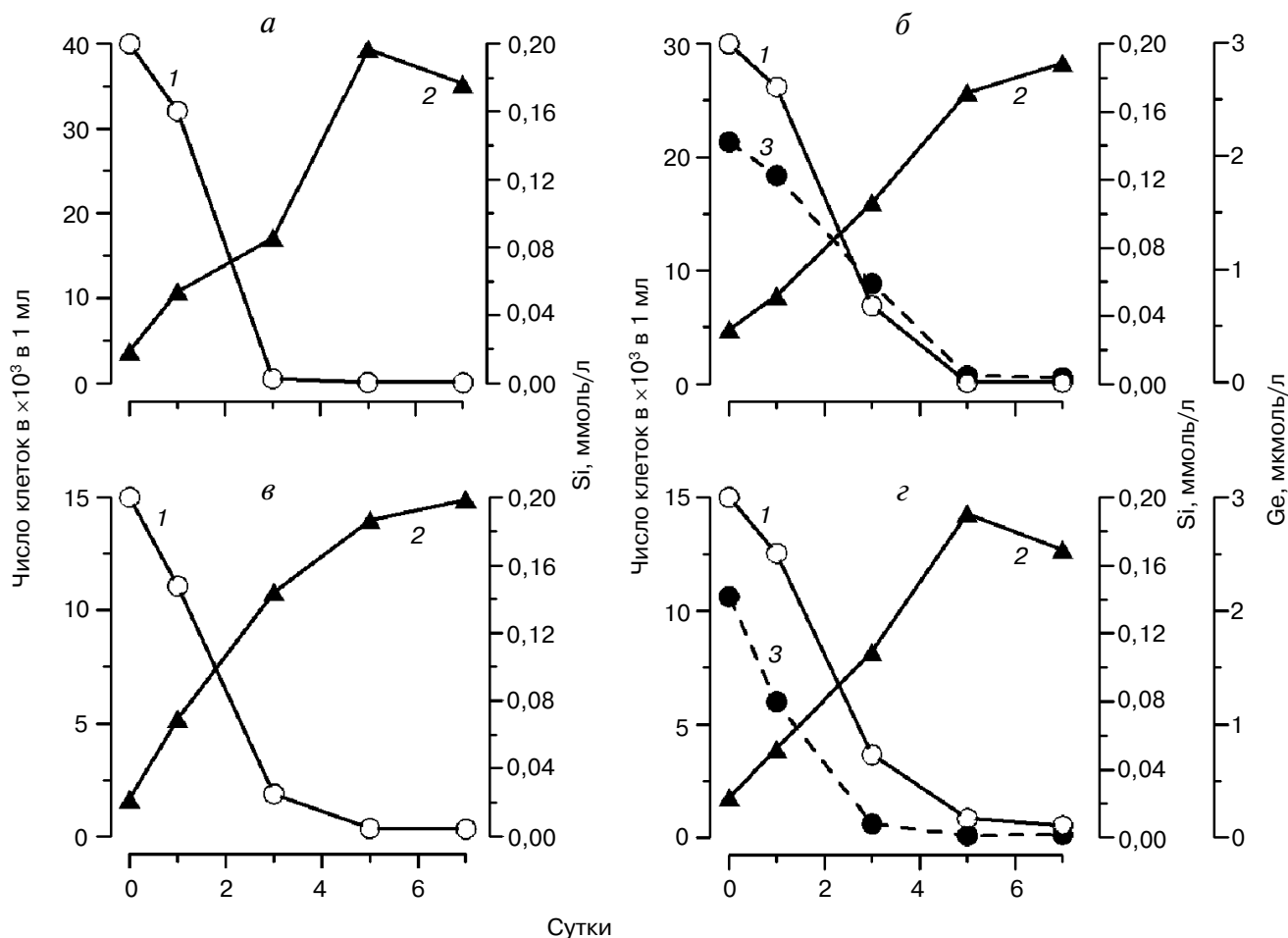


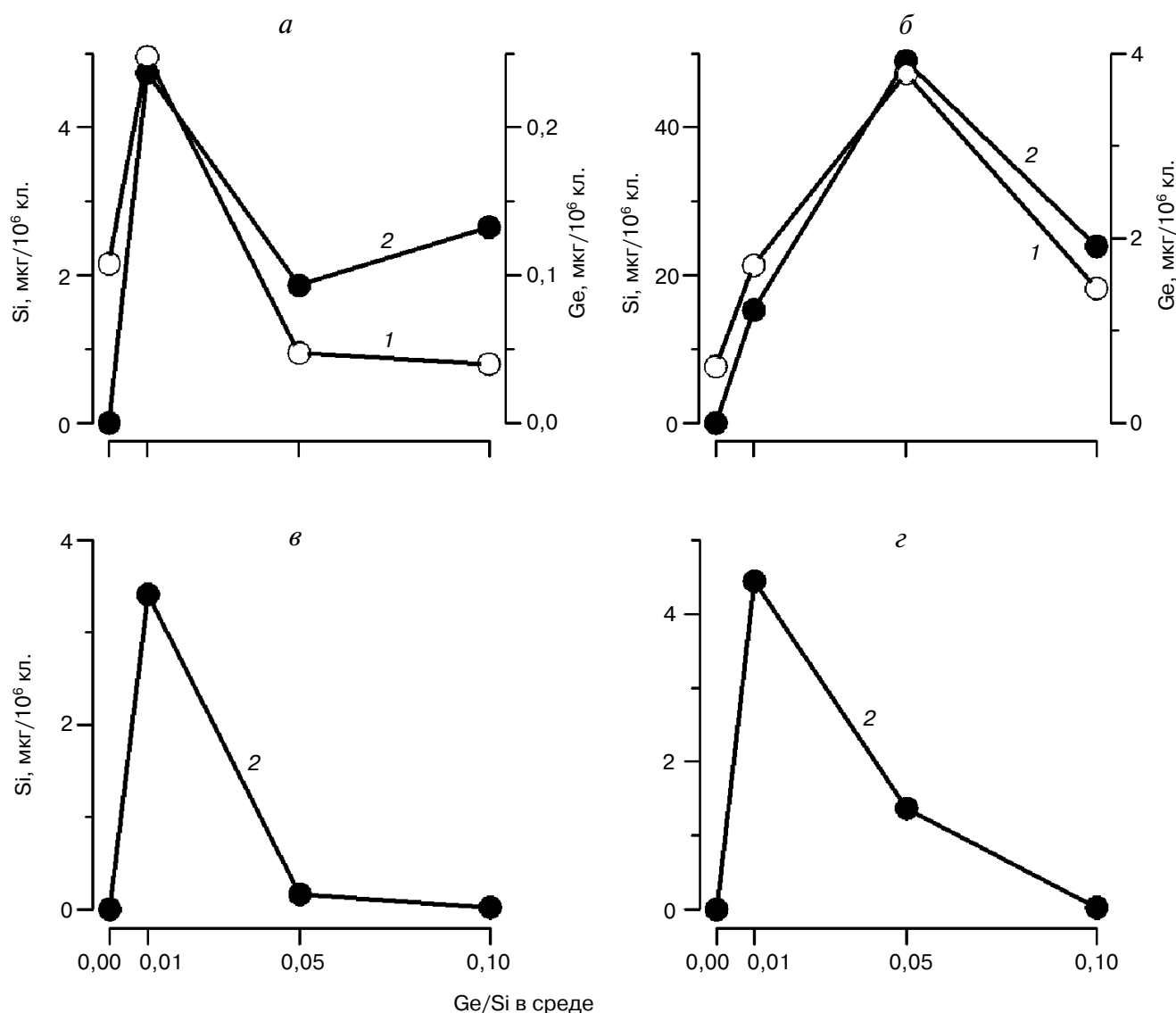
Рис. 4. Поглощение элементов Ge и Si из среды клетками диатомей *S. acus* subsp. *radians* (по результатам ISP-MS-анализа). Культура K1: а – контроль, б – Ge/Si 0,01. Культура K2: в – контроль, г – Ge/Si 0,01. 1 – Концентрация Si, 2 – число клеток в 1 мл, 3 – концентрация Ge

тивные изотопы Ge, более доступные и имеющие приемлемые для биологических экспериментов периоды полураспада по сравнению с радиоактивным изотопом Si. Из ранее известных [3, 10, 11] и приведенных в настоящей работе данных (рис. 4) следует, что германиевая кислота в концентрации 1% кремниевой может использоваться в качестве субстрата SiT и не менее эффективно, чем кремневая кислота, поглощается клетками диатомей. Токсическое действие германиевой кислоты реализуется при больших концентрациях на последующих стадиях после поглощения.

Ранее было показано, что в малых дозах, при Ge/Si 0,01, морфогенез створок диатомовых водорослей не нарушается [8]. В наших экспериментах на двух культурах одного и того же вида, но имеющих разные размеры клеток, показано, что мелкие клетки (K1) более чувствительны к этой «подмене» (рис. 3, а).

Как видно из представленных результатов, в обеих культурах добавление в среду культивирования германиевой кислоты приводит к резкому увеличению содержания в цитоплазме клеток как Ge, так и Si по сравнению с контролем, где клетки выращивали на обычной среде (рис. 5).

**Почему возникает этот «лишний» пул внутриклеточной кремниевой кислоты?** Обычная методика экстракции «свободной» кремниевой кислоты из диатомей путем выдерживания их в горячей воде приводит к вымыванию  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , содержащегося в клетках не только в виде мономера, но и в форме растворенных олигомеров, а также наночастиц кремнезема, не перешедших в состояние кварцевого стекла. Окрашивание родамином 6G клеток, культивированных в среде с добавлением германиевой кислоты, наряду с клетками, в которых морфогенез завершился нормально (рис. 6, е), выявляет при малом со-



**Рис. 5.** Содержание элементов в цитоплазме (а, б) и в створках (в, г) клеток *S. acus* subsp. *radians*, выращенных в среде с различным соотношением Ge/Si (по результатам ISP-MS-анализа). а, в – Культура К1; б, г – культура К2. 1 – Содержание Si, 2 – содержание Ge

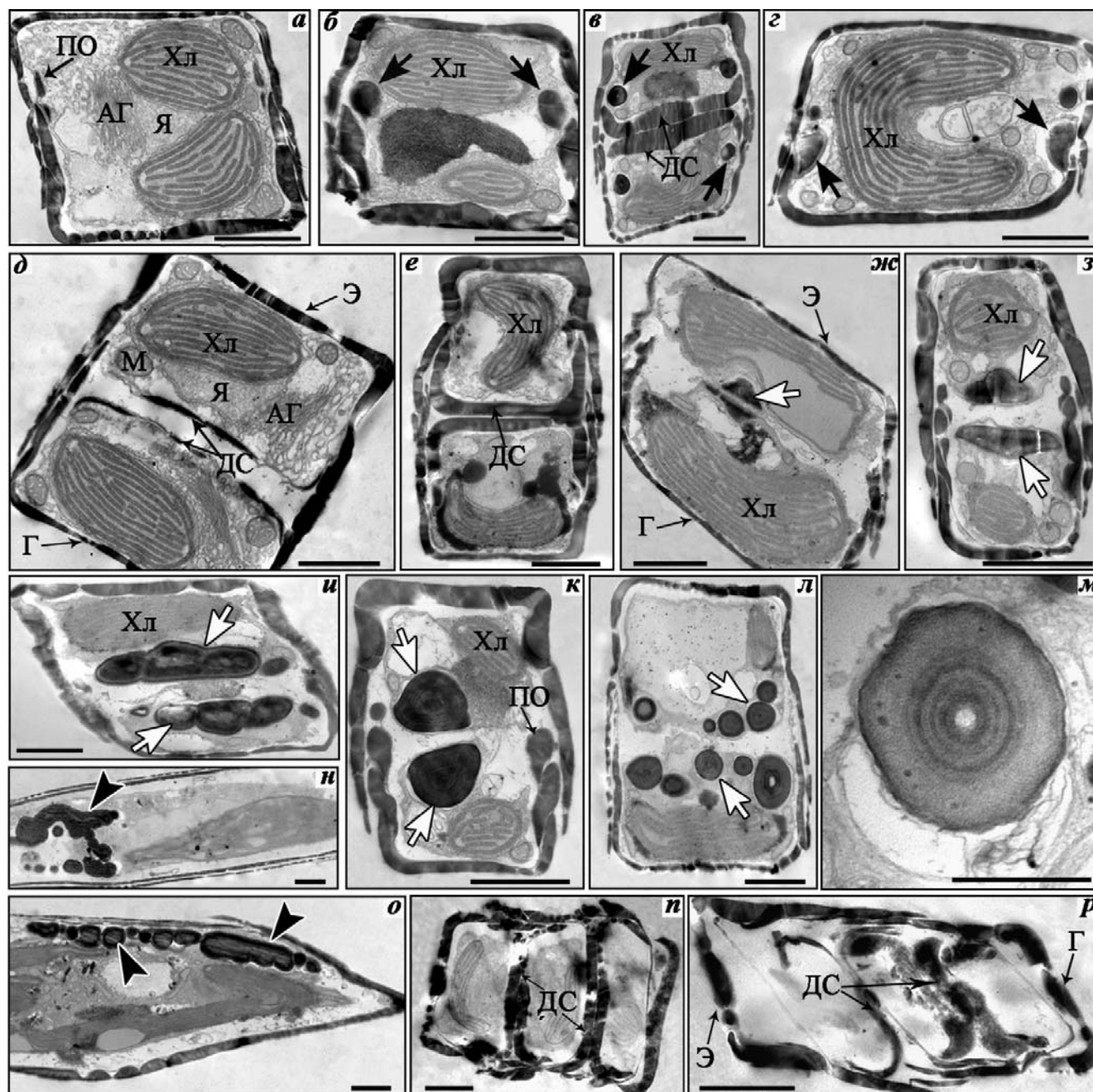
держании германия незначительные нарушения морфогенеза (рис. 6, з). При увеличении доли германия клетка не формирует новые дочерние створки. Вместо этого в ней образуются крупные цитоплазматические включения округлой формы, которые окрашиваются родамином (рис. 6, к, м, о, р). На ультратонких срезах видно, что эти включения электронно-плотные, расположены на месте формирования поясковых ободков (рис. 7, б–г) и дочерних створок (рис. 7, ж–л) или разбросаны в цитоплазме (рис. 7, н, о). Они окружены мембранами, т.е. являются везикулами отложения кремнезема. По-видимому, эти включения с «недозревшим» кремнеземом

разрушаются при экстракции горячей водой и обогащают цитоплазматическую фракцию кремнием (и германием).

**Почему в присутствии Ge формируются «раздутые» объемные структуры?** Как указано ранее, механизмы транспорта и компактизации кремниевой кислоты в клетках диатомовых водорослей после ее переноса через клеточную мембрану пока не расшифрованы. Предполагается, что кремниевая кислота в цитоплазме перемещается в специальных везикулах транспорта кремнезема (*silica transport vesicles*) размером 30–40 нм [24], которые переносят ее от плазмалеммы к SDV, либо в неких полимерно-стабилизирован-

ных формах [25]. В любом случае  $\text{Si}(\text{OH})_4$  не может переноситься по клетке и накапливаться в мономерной форме, поскольку измеряемые ее внутриклеточные концентрации (19–340 мМ [11, 19]) во много раз выше равновесной раство-

римости кремнезема (2–3 мМ [17]). Кроме того, прямое определение кремниевой кислоты в живых диатомеях методом ЯМР [26] указывает на ее нахождение только в полимерной форме. Очевидно, что внутриклеточные механизмы

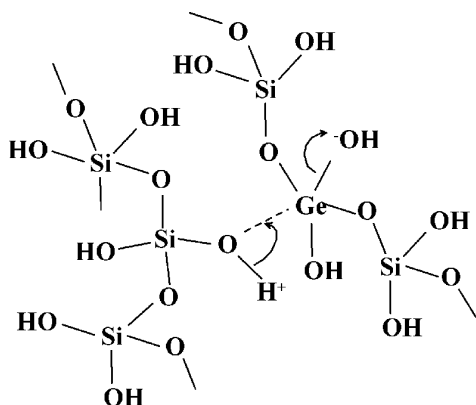


**Рис. 7.** Нарушение морфогенеза кремнистых структур по данным ТЭМ ультратонких срезов клеток *S. acus subsp. radians* (K1), выращенных при различных соотношениях Ge/Si. *a–г* – Влияние на закладку поясковых ободков, *д–л* – влияние на закладку дочерних створок. *a, д* – Контроль; *e* – Ge/Si 0,01; *б, ж, з, п* – Ge/Si 0,05; *в, г, и, к, о, р* – Ge/Si 0,1; *л–н* – Ge/Si 1; *м* – увеличенная электронно-плотная вакуоль дочерней створки; *н* – продольный срез клетки; *о* – срез по косой. Э – Эпитека, Г – гипотека, ДС – образующиеся дочерние створки, ПО – поясковый ободок, Хл – хлоропласт, АГ – аппарат Гольджи, Я – ядро, М – митохондрия. Черные и белые крупные стрелки – нарушения структур пояскового ободка и дочерних створок соответственно. Черные головки стрелок – слоистые включения. Масштаб: *a–л, о–р* – 1 мкм, *м* – 500 нм



транспорта  $\text{Si}(\text{OH})_4$  и ее полной полимеризации в кварцевое стекло с удельной плотностью 2,0 должны быть хорошо согласованы, чтобы не допускать преждевременного образования твердых частиц в «неправильных» местах.

Германий по сравнению с кремнием обладает более сильными металллическими свойствами и, неся частичный положительный заряд, легче атакуется электронной парой кислорода вступающего в реакцию силикатного остатка:

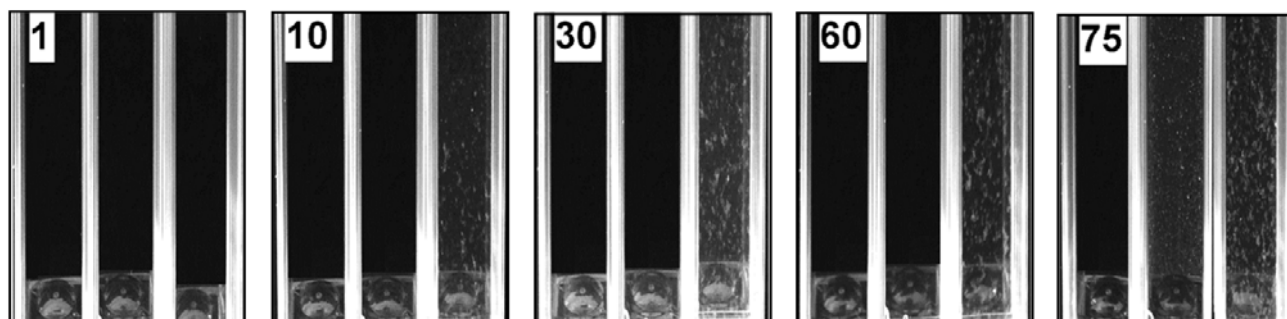


Этим можно объяснить наблюдаемую в эксперименте повышенную скорость коагуляции кремнезема в присутствии германиевой кислоты (рис. 8). По-видимому, высокая электрофильность Ge и обуславливает ускорение процесса выпадения силикагеля, которое происходит внутри SDV. Это приводит к преждевременному образованию геля кремнезема, нарушает нормальный процесс его дегидратации и лишает клетку возможности контролировать правильную форму дочерних створок и поясковых ободков.

**Почему отложения кремнезема, образующиеся в присутствии германиевой кислоты, имеют сло-**

**истую структуру?** Отмеченные аномальные отложения кремнезема имеют слоистое строение (рис. 7, б–г, ж–о) – области плотного кремнезема, близкого к материалу нормальных створок, чередуются с более электронно-прозрачными. Обычно на ультратонких срезах SDV видна электронно-плотная часть уже отложившегося кремнезема, разреженные края которого в направлении к силикалемме переходят в «пустое» пространство [27, рис. 13, d], SDV постепенно расширяется до размеров зрелой структуры (створки или поясковых ободка) [27]. Рассмотрение ранних стадий синтеза створок диатомей в ТЭМ [2, 22, рис. 14, 15] показывает, что кремнезем откладывается в виде плоских структур с округлыми краями, внутри которых встречаются полые «пузырьки» (их наличие может свидетельствовать о том, что в ходе синтеза застывает жидкость [18]). Формирование створок и поясковых ободков в SDV происходит путем последовательного отложения новых порций кремнезема [22, 28], но образующийся при этом материал имеет цельную электронно-плотную структуру. Несмотря на высокую (до 340 мМ) концентрацию растворимых форм кремниевой кислоты в диатомеях, очевидно, что образование твердых кремнеземных частиц должно сопровождаться освобождением большого количества воды, поскольку 340 мМ соответствует 2%  $\text{SiO}_2$  и 98%  $\text{H}_2\text{O}$ . В случае нормального функционирования SDV должен существовать некий механизм удаления этой воды (возможно, посредством аквапоринов [18]). Преждевременное осаждение кремнезема под действием германиевой кислоты, видимо, нарушает этот механизм, вода не успевает удаляться и остается в составе более прозрачного слоя.

Таким образом, германиевая кислота при попадании в клетку диатомей нарушает нормальный механизм формирования новых ство-



**Рис. 8.** Конденсация кремниевой кислоты в присутствии ПАА (центральная кювета). В правой кювете 5%-ная кремниевая кислота заменена на германиевую, левая кювета – контроль (вода). Числа на фотографиях – время от начала опыта в минутах

рок, а при больших концентрациях вызывает гибель клеток, воздействуя, вероятно, на стадию коагуляции кремнезема. По нашему мнению, дегидратация кремнезема, происходящая внутри SDV, является ключевым моментом в определении «правильной» морфологии формирующихся элементов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Лимнологического института Г.И. Поповс-

кой, А.Е. Кузьминой за помощь в определении полученных культур, и Е.Д. Бедошвили за изготовление ультратонких срезов для ТЭМ и полезное обсуждение этой работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 10.3), Фонда содействия отечественной науке (НШ-4738.2006.4) и РФФИ (грант 06-04-08224).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson, D.M., Treguer, P., Brzezinski, M.A., Leynaert, A., and Queguiner, B. (1995) *Global Biogeochem. Cycles*, **9**, 353–365.
2. Pickett-Heaps, J.D., Schmid, A.-M.M., and Edgar, L.A. (1990) *Prog. Phycol. Res.*, **7**, 1–168.
3. Hildebrand, M., Volcani, B.E., Gassmann W., and Schroeder, J.I. (1997) *Nature*, **385**, 688–689.
4. Hildebrand, M., Dahlin, K., and Volcani, B.E. (1998) *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 480–486.
5. Grachev, M.A., Denikina, N.N., Belikov, S.I., Likhoshway, E.V., Usoltseva, M.V., Tikhonova, I.V., Adelshin, R.V., Kler, S.A., and Sherbakova, T.A. (2002) *Mol. Biol.*, **36**, 679–681.
6. Щербакова Т.А., Масюкова Ю.А. Сафонова Т.А., Петрова Д.П., Верещагин А.Л., Минаева Т.В., Адельшин Р.В., Трибой Т.И., Стоник И.В., Айздайчер Н.А., Козлов М.В., Лихошвай Е.В., Грачев М.А. (2005) *Молекуляр. биология*, **39**, 303–316.
7. Zurzolo, C., and Bowler, C. (2001) *Plant Physiol.*, **127**, 1339–1345.
8. Azam, F., Hemmingsen, B.B., and Volcani, B.E. (1973) *Arch. Microbiol.*, **92**, 11–20.
9. Lewin, J.C. (1966) *Phycologia*, **6**, 1–12.
10. Azam, F., and Volcani, B.E. (1981) in *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Simpson, T.L., and Volcani, B.E., eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 43–67.
11. Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., and Brzezinski, M.A. (2000) *J. Phycol.*, **36**, 821–840.
12. *Culture Collections of Algae and Protozoa*, (Thompson, A.S., Rhodes, J.C., and Pettman, I., eds) (1988) Kendal, Titus Wilson & Son, p. 18.
13. Safonova, T.A., Aslamov, I.A., Basharina, T.N., Chenski, A.G., Vereschagin, A.L., Glyzina, O.Yu., and Grachev, M.A. (2007) *Diatom Research*, **22**, 189–195.
14. Reynolds, E.S. (1963) *J. Cell Biol.*, **17**, 208–212.
15. Бедошвили Е.Д., Лихошвай Е.В., Грачев М.А. (2007) *Изв. РАН, Сер. биол. клетки*, **34**, 367–371.
16. Макарова И.В., Пичкилы Л.О. (1970) *Ботан. журн.*, **55**, 1488–1493.
17. Айлер, Р. (1982) *Химия кремнезема*, Мир, Москва.
18. Grachev, M.A., Annenkov, V.V., and Likhoshway, Ye.V. (2006) *19<sup>th</sup> International Diatom Symposium*, Irkutsk, p. 52.
19. Hildebrand, M. (2003) *Progress Organic Coatings*, **47**, 256–266.
20. Li, C.-W., Chu, S., and Lee, M. (1989) *Protoplasma*, **151**, 158–163.
21. Brzezinski, M.A., and Conley, D.J. (1994) *J. Phycol.*, **30**, 45–55.
22. Kaluzhnaya, O.V., and Likhoshway, Ye.V. (2007) *Diatom Res.*, **22**, 81–87.
23. Patwardhan, S.V., and Clarson, S.J. (2002) *J. Inorganic Organometallic Polymers*, **12**, 109–116.
24. Schmid, A.-M. M., and Schulz, D. (1979) *Protoplasma*, **100**, 267–288.
25. Sumper, M. (2004) *Angew. Chem.*, **116**, 2301–2304
26. Bertermann, R., Kroger, N., and Tacke, R. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 630–634.
27. Round, F. E., Crawford, R.M., and Mann, D.G. (1990) *The Diatoms*, Cambridge University Press, N.Y.
28. Hildebrand, M., York, E., Kelz, J.I., Davis, A.K., Frigeri, L.G., Allison, D.P., and Doktycz, M.J. (2006) *J. Mater. Res.*, **21**, 2689–2698.

**ABERRATION OF MORPHOGENESIS  
OF THE ELEMENTS OF SILICEOUS VALVES  
OF A DIATOM *Synedra acus* B IN THE PRESENCE  
OF GERMANIC ACID**

**T. A. Safonova, V. V. Annenkov, E. P. Chebykin,  
E. N. Danilovtseva, Ye. V. Likhoshway, M. A. Grachev**

*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy  
of Sciences, ul. Ulan-Batorskaya 3, Irkutsk 664033,  
Russia; fax: (3952)425-405, E-mail: info@lin.irk.ru*

Received May 10, 2007

Revision received July 2, 2007

Addition of germanic acid to a medium supporting cultures of a freshwater diatom *Synedra acus* subsp. *radians* (Kutz.) Skabitsch. does not significantly inhibit its growth at a mole ratio Ge/Si 0.01, but arrests the growth at Ge/Si 0.05 and more. ICP-MS analysis has shown that at Ge/Si 0.01, germanium accumulates both in the cytoplasm and in siliceous frustules, whereas at Ge/Si 0.05 it is mostly incorporated in the cytoplasm rather than in siliceous frustules. At Ge/Si 0.1, uptake of germanium by frustules ceases. Studies of the morphology of cells by means of light and epifluorescence microscopy, as well as by transmission electron microscopy, revealed that high concentrations of germanic acid induce aberrations of morphogenesis of siliceous frustules and accumulation of large rhodamine-stained inclusions containing electron-dense material. Model chemical experiments with over-saturated solutions of silicic acid revealed that addition of 5% of germanic acid accelerates coagulation of silica. Hence, the toxic effect of germanic acid upon diatoms can be a consequence of irregular coagulation of silica.

*Key words:* diatoms, silica, germanium, polyallylamine, morphogenesis, epifluorescence, transmission electron microscopy