

С.С. Степанов, Е.К. Золотарёва

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина,
тел.: +38 (044) 272 32 31; e-mail: membrana@ukr.net

ФОТОСИНТЕЗ, ДЫХАНИЕ И РОСТ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В ПРИСУТСТВИИ ЭТАНОЛА

Цель. Целью данной работы было изучение влияния этанола на скорость фотосинтеза, дыхания и продуктивность микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. **Методы.** Концентрацию хлорофилла определяли в спиртовых экстрактах клеток спектрофотометрическим методом. Скорость накопления биомассы оценивали по изменению объема уплотненных клеток. Интенсивность фотосинтеза, максимальную интенсивность дыхания и интенсивность темнового дыхания определяли методом инфракрасного газового анализа. **Результаты.** В присутствии этанола рост культуры по показателю изменения объема уплотненных клеток ингибируется, также снижается накопление хлорофилла в клетках культуры и наблюдается гибель клеток и на свету и в темноте. Это сопровождается снижением рН среды культивирования с 7,2 до 3,5. Интенсивность темнового дыхания возрастает вдвое после добавления 50 мМ этанола в среду культивирования. Интенсивность фотосинтеза снижается в присутствии 50 мМ этанола на 25% по сравнению с контролем. **Выводы.** Причина торможения роста *C. reinhardtii* связана с неполным окислением этанола, вследствие чего в клетках накапливались продукты его промежуточного обмена и снижается рН среды культивирования на несколько единиц.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, фотосинтез, дыхание, этанол.

Зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* имеет важное биотехнологическое значение для моделирования многих процессов и разработки биотопливных технологий [16]. К преимуществам использования *C. reinhardtii* как модельного организма относятся наличие расшифрованного генома [11], протеомных баз данных, отработанных протоколов изучения метаболизма, что позволило раскрыть многие фундаментальные аспекты регуляции метаболизма у фотоавтотрофных организмов [9]. *C. reinhardtii* может расти за счет фотосинтеза на воздухе с CO₂ в качестве единственного источника углерода, или в гетеротрофных условиях в темноте с использованием различных экзогенных источников



углерода, а также в миксотрофных условиях (на свету в присутствии экзогенных органических соединений). Независимо от типа углеродного питания, *C. reinhardtii* остается зеленой и сохраняет нормально развитые хлоропласты [7].

При миксотрофном культивировании одноклеточных зеленых водорослей в присутствии одноатомного спирта метанола, как было показано на примерах *Chlorella minutissima*, *Scenedesmus obliquus* [15], *Botryococcus braunii* [12], а также *C. reinhardtii* [2], достигается значительное стимулирование их роста. Другой одноатомный спирт — этанол является эффективным источником углерода для микроводоросли *Euglena gracilis* [16]. Этанол экскретируется клетками *C. reinhardtii* в анаэробных условиях [8]. Продукт окисления этанола — ацетат ускоряет рост *C. reinhardtii* на свету и служит источником углерода и энергии [7] при гетеротрофном культивировании. В то же время для целого ряда микроводорослей установлен токсический эффект этанола, вызывающий ингибирование их роста [1,4]. Способность экзогенного этанола регулировать продуктивность *C. reinhardtii* в аэробных условиях на свету и в темноте ранее не исследовалась.

Целью нашей работы было изучение влияния экзогенного этанола на фотосинтез, дыхание и продуктивность накопительной культуры *C. reinhardtii*.

Материалы и методы исследования

Периодическую автотрофную культуру *C. reinhardtii* (IBASU-B — 163) выращивали на жидкой среде Кесслера в 0,5 л колбах при перемешивании и 24-часовом освещении флуоресцентными лампами с интенсивностью светового потока на поверхности колбы $100 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при комнатной температуре [5]. В качестве индикатора интенсивности роста культуры использовали общую концентрацию хлорофилла (Хл) в экспоненциальной фазе роста, поскольку известно, скорость деления клеток прямо пропорциональна концентрации Хл в культуре [6].

Концентрацию Хл определяли в спиртовых экстрактах клеток как описано ранее [19]. Эффекты этанола изучали на стадии экспоненциальной фазы роста накопительной культуры. Скорость накопления биомассы оценивали по объему уплотненных клеток (ОУК) — объем осадка клеток в мкл /мл после центрифугирования определенного объема клеточной суспензии при 1400 g в течение 5 мин в гематокритных трубках.

Интенсивность фотосинтеза, максимальную интенсивность дыхания и интенсивность темнового дыхания рассчитывали по изменению содержания CO_2 в газовой фазе над концентрированной суспензией микроводорослей (30–40 мг Хл/л) в термостатированной стеклянной ячейке методом инфракрасного газового анализа (ИКГА) с использованием S151 CO_2 анализатора Qbit system (Канада). Максимальная интенсивность



дыхания определяется как максимальная скорость выделения CO_2 после выключения освещения, со временем скорость выделения CO_2 стабилизируется и соответствует интенсивности темного дыхания [10]. Скорость газового потока составляла 0,4 л /мин при концентрации CO_2 700 – 800 мкМ. Интенсивность фотосинтеза определяли при освещении ячейки белым светом с плотностью потока 350 мкмоль фотонов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Темновое и максимальное дыхание микроводорослей измеряли при низком содержании CO_2 в газовом объеме после выключения света. Воздух перед подачей в анализатор пропускали через колонку с аскаритом для удаления CO_2 .

Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз (n), средние значения (M) и стандартное отклонение (m) рассчитывали для каждой обработки. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2010. Значимую разницу между выборками оценивали с помощью t-теста, статистически значимыми считали изменения с $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что метиловый спирт в концентрации 20–100 мМ значительно стимулирует рост, дыхание и продуктивность *C. reinhardtii* [2]. В настоящей работе исследовалось влияние различных концентраций этанола на рост культуры *C. reinhardtii* (рис. 1).

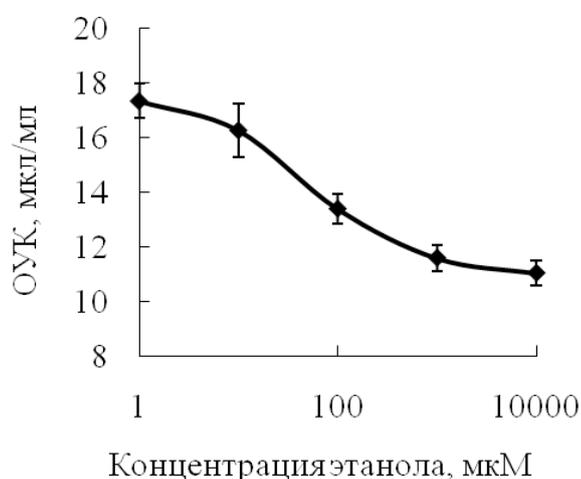


Рис. 1. Объем уплотненных клеток в автотрофной культуре *C. reinhardtii* на 3-ий день после добавления различных количеств этанола (M+m, n=3)

Fig. 1. Packed cell volume in autotrophic culture of *C. reinhardtii* on the third day after application of different amounts of ethanol (M+m, n=3)

Прирост биомассы *C. reinhardtii*, определенный по скорости изменения объема уплотнённых клеток (ОУК) в присутствии 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ, 10 мМ этанола, снижался (рис. 1). В присутствии 100 мкМ этанола рост культуры ингибировался на 23%, а 1 мМ и 10 мМ — на 33%.

В присутствии этанола снижается накопление Хл в клетках культуры, и наблюдается гибель клеток и на свету и в темноте. Световая микроскопия показала уменьшение их подвижности и увеличение доли фиксированных клеток. Данные о влиянии этанола на содержание Хл в клетках *C. reinhardtii* на свету и при темновой инкубации приведены на рис. 2.

На 4-ый день после добавления этанола независимо от концентрации, рН суспензии снижался до 3,5, что сопровождалось побурением культуры. Изменения рН, вызванные этанолом, не зависели также и от освещения (табл. 1). Постепенное закисление среды происходившее как на свету, так и в темноте, может быть одной из причин снижения концентрации Хл в клетках, т.к. В слабокислой среде хлорофилл легко теряет атом Mg^{2+} , превращаясь в феофитин [18].

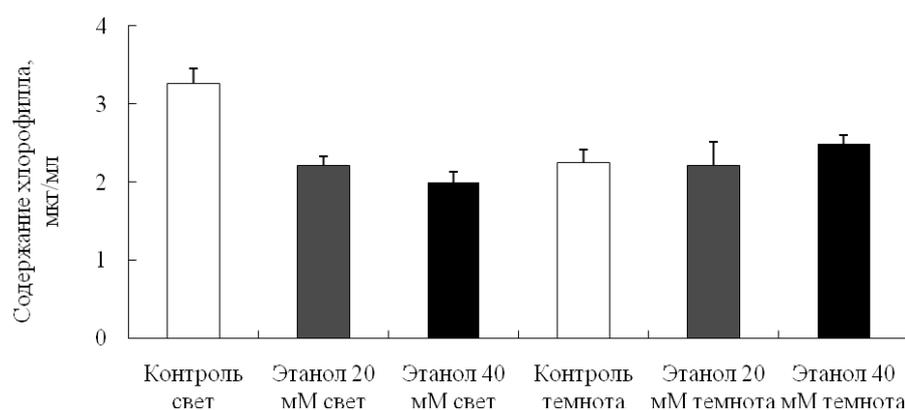


Рис. 2. Содержание общего Хл (мкг /мл) в суспензии *C. reinhardtii* на 4-ый день культивирования

А — на свету, В — в темноте (M+m, n=3)

Fig. 2. The content of total Chl ($\mu\text{g} /\text{ml}$) in *C. reinhardtii* suspension on the fourth day of cultivation

A — in the light, B — in the dark. (M+m, n=3)

Очевидно, снижение рН среды культивирования в присутствии этанола вызвано его неполным окислением внутри клеток микроводорослей. Окисление этанола происходит в несколько этапов: этанол \rightarrow ацетальдегид \rightarrow уксусная кислота \rightarrow CO_2 .

Изменение pH среды культивирования *C. reinhardtii*
при добавлении этанола. (M+m, n=6)

Table

Changing pH of growth medium *C. reinhardtii*
with ethanol addition. (M+m, n=6)

Время, ч	На свету			В темноте		
	Контроль	Этанол 20 мМ	Этанол 40 мМ	Контроль	Этанол 20 мМ	Этанол 40 мМ
1	6,49±0,37	6,5±0,29	6,51±0,41	6,49±0,26	6,5±0,17	6,53±0,31
18	6,35±0,11	6,28±0,31	6,29±0,22	6,42±0,09	6,16±0,24	6,18±0,18
48	6,36±0,18	5,48±0,15	5,51±0,13	6,31±0,17	5,27±0,16	5,28±0,29
96	6,4±0,32	3,6±0,27	3,46±0,29	5,9±0,32	3,6±0,37	3,6±0,33

Продуктом первого этапа является токсичный для клеток ацетальдегид. Метаболизм этанола с участием алкогольдегидрогеназы происходит в прямом и обратном направлении, и зависит от соотношения концентраций субстратов — этанола, ацетальдегида и никотинамидных коферментов. При экзогенном добавлении 40 мМ этанола равновесная концентрация ацетальдегида может составлять 1 мМ [13]. Образование значительных количеств уксусной кислоты, вызывающих снижение pH культуральной среды на несколько единиц, доказывает, что в условиях наших экспериментов система ферментативного окисления ацетальдегида в клетках активна. Избыток уксусной кислоты экскретируется в культуральную среду, когда скорость образования кислоты превышает скорость её полной внутриклеточной утилизации.

Интенсивность дыхания *C. reinhardtii* (R) определяли по выделению CO₂ в темноте. Данные приведенные на рис. 3, А показывают, что после шести часов выращивания микроводорослей в присутствии 50 мМ этанола значение R в накопительной культуре *C. reinhardtii* увеличивалось в два раза по сравнению с контролем. Повышение интенсивности дыхания может быть объяснено активацией работы цикла Кребса в результате утилизации дополнительного количества ацетил-КоА, образовавшегося в ходе окисления этанола.

В присутствии 50 мМ этанола параметр V_{max}, косвенно характеризующий внутриклеточный пул пирувата и малата [10], увеличивается на 29% по сравнению с контролем (рис. 3, В), что позволяет предполагать, что в присутствии этанола внутриклеточная концентрация трикарбоновых кислот повышается. При окислении этанола увеличивается содержание NADH в клетке [7], что также может быть причиной повышения концентраций малата или пирувата.



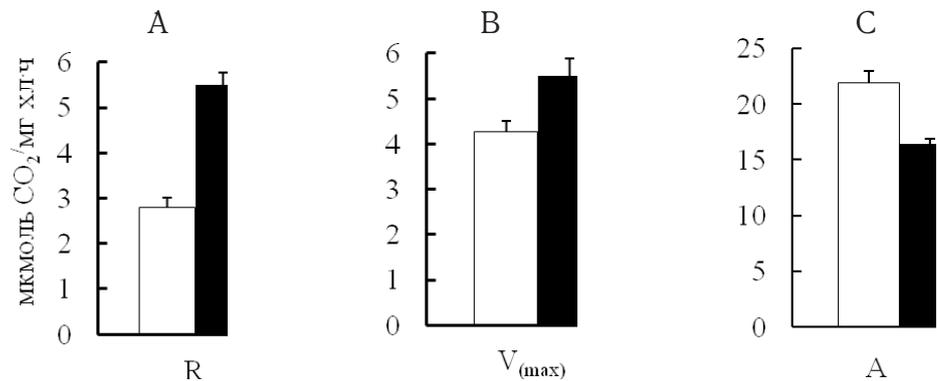


Рис. 3. Показатели CO₂ газообмена *C. reinhardtii*
(□ — контроль, ■ — в присутствии 50 мМ этанола)

Интенсивность темного дыхания (R). В — максимальная интенсивность дыхания (V_{max}). С — интенсивность фотосинтеза (A) (M+m, n=5).

Fig. 3. Indicators of CO₂ gas exchange by *C. reinhardtii*
(□ — control, ■ — in the presence of 50 mM ethanol)

A — dark respiration rate (R); B — the maximum rate of respiration (V_{max}); C — photosynthetic rate (A) (M+m, n=5).

Интенсивность фотосинтеза (A), рассчитанная по поглощению CO₂ на свету, снижалась в присутствии 50 мМ этанола на 25% по сравнению с контролем (рис. 3, C). Ингибирование фотосинтеза возможно является следствием повреждения пигмент-белковых комплексов фотосинтетических мембран из-за накопления ацетальдегида и снижения pH. Изменение R и V_{max} при добавлении этанола в культуральную среду *C. reinhardtii* подобны изменению этих параметров в ходе миксотрофного выращивания *C. reinhardtii* в присутствии ацетата [14]. Однако, в отличие от культивирования с этанолом, ацетат стимулирует рост водорослей. Таким образом, можно предположить, что токсические действие этанола на *C. reinhardtii* связано с его неполным окислением и накоплением промежуточных продуктов — ацетальдегида и уксусной кислоты. Понижение pH, вызванное накоплением уксусной кислоты, может приводить к денатурации белковых компонентов клетки и феофитинизации Хл.

Таким образом, экзогенный этанол в концентрации более 10 мкМ подавляет рост накопительной культуры *C. reinhardtii*. В присутствии этанола интенсивность фотосинтеза *C. reinhardtii* снижается, а интенсивность темного дыхания значительно возрастает. Токсическое действие этилового спирта на метаболизм *C. reinhardtii* сопровождается снижением pH среды культивирования в результате накопления промежуточных продуктов его обмена.

УДК 582.264.12:581.132:57.017.7

С.С. Степанов, О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ;
тел.: +38(044) 272 32 31; e-mail: membrana@ukr.net

ФОТОСИНТЕЗ, ДИХАННЯ ТА РІСТ МІКРОВОДОРОСТІ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В ПРИСУТНОСТІ ЕТАНОЛУ

Реферат

Мета. Метою даної роботи було вивчення впливу етанолу на швидкість фотосинтезу, дихання і продуктивність *Chlamydomonas reinhardtii*. **Методи.** Концентрацію хлорофілу визначали в спиртових екстрактах клітин спектрофотометричним методом. Швидкість накопичення біомаси оцінювали по зміні об'єму ущільнених клітин. Інтенсивність фотосинтезу, максимальну інтенсивність дихання і інтенсивність темного дихання визначали методом інфрачервоного газового аналізу. **Результати.** За присутності етанолу ріст культури в показнику зміни об'єму ущільнених клітин пригнічується, також знижується накопичення хлорофілу в клітинах культури і спостерігається загибель клітин і на світлі і в темряві. Це супроводжується зниженням рН середовища культивування від 7,2 до 3,5. Інтенсивність темного дихання зростає вдвічі після додавання 50 мМ етанолу до середовища культивування. Інтенсивність фотосинтезу знижується в присутності 50 мМ етанолу на 25% порівняно з контролем. **Висновки.** Зроблений висновок, що причина гальмування росту *C. reinhardtii* пов'язана з неповним окисленням етанолу, внаслідок чого в клітинах накопичуються проміжні сполуки його обміну, що супроводжується зниженням рН середовища культивування на кілька одиниць.

Ключові слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, фотосинтез, дихання, етанол, міксотрофія.

UDK 582.264.12:581.132:57.017.7

S.S. Stepanov, E.K. Zolotareva

M.G.Holodny Institute of Botany, NASU, 2, Tereshchenkivska str., 01004, Kyiv, Ukraine; tel.:
+38 (044) 272 32 31; e-mail: membrana@ukr.net

PHOTOSYNTHESIS, RESPIRATION AND GROWTH RATE OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ON EXOGENIC ETHANOL APPLICATION

Summary

Aim. The aim of the present work was studying the effect of ethanol on the rate of photosynthesis, respiration and productivity of *Chlamydomonas*



reinhardtii. **Methods.** The amount of chlorophyll (Chl) was estimated photometrically. The rate of biomass accumulation was estimated by changes in packed cell volume. The rate of photosynthesis, maximum intensity of respiration and dark respiration was determined by infrared gas analysis. **Results.** In the presence of ethanol growth of culture in the terms of packed cell volume is inhibited, also the accumulation of Chl in cell culture is reduced and cell death is observed both in the light and in the dark. This is accompanied by decreasing pH of the culture medium from 7.2 to 3.5. The intensity of dark respiration is doubled after the addition of 50 mM ethanol to the culture medium. The rate of photosynthesis is reduced in the presence of 50 mM ethanol on 25% compared with the control. **Conclusions.** There were made a conclusion that the cause of growth inhibition of *C. reinhardtii* was incomplete oxidation of ethanol, resulting reduction of pH in the medium by a few units.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, photosynthesis, respiration, ethanol.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божков А.И., Мензянова Н.Г. Влияние этилового спирта на метаболизм водорослей. Метаболизм нуклеиновых кислот и белка в клетках *Dunaliella viridis* Теод // Альгология. — 2002. — 12, 3. — С. 300–308.
2. Степанов С. С., Золотарева Е. К. Метаболический путь метанола у растений // Альгология. — 2011. — т. 21, № 2. — С. 178–190.
3. Bishop N.I., Senger H. Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus* // Meth. Enzymol. — 1971. — V. 23, part A. — P. 53–66.
4. El J. A Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 1996. — V. 31, No. 1. — P. 84–90.
5. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic assimilation in leaves of species // Planta. — 1980. — V. 149. — P. 78–90.
6. Gitelson A., Grits Y., Etzion D. Optimal properties of *Nannochloropsis sp* and application to remote estimation of cell mass // Biotech. Bioengineering. — 2000. — V. 69, No. 5. — P. 516–525.
7. Johnson X., Alric J. Interaction between Starch Breakdown, Acetate Assimilation, and Photosynthetic Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biol. Chem. — 2012. — V. 287, No. 31. — P. 26445–26452.
8. Hemschemeier A., Jacobs J., Happe T. Biochemical and physiological characterization of the pyruvate formate-lyase Pfl1 of *Chlamydomonas*



reinhardtii, a typically bacterial enzyme in a eukaryotic alga // Eukaryot. Cell. — 2008. — V. 7, No. 3. — P. 518–526.

9. Lee D., Fiehn O. High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Meth. — 2008. — V. 4, 7.

10. Leegood R.C., Sharkey T.D., S. von Caemmerer (eds.) Advances in Photosynthesis: Physiology and Metabolism. — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. — 2000. — P. 165.

11. May P., Wienkoop S., Kempa S., Usadel B., Christian N., Rupprecht J., Weiss J., Recuenco-Munoz L., Ebenhuß O., Weckwerth W., Walther D. Metabolomics- and proteomics-assisted genome annotation and analysis of the draft metabolic network of *Chlamydomonas reinhardtii* // Genetics. — 2008. — V. 179. — P. 157–166.

12. Nonomura A., Benson A. The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — V. 89, No. 20. — P. 9794–9798.

13. Perata P., Alpi A., LoSchiavo F. Influence of ethanol on plant cells and tissues // J. Plant Physiol. — 1986. — V. 126. — P. 181–188.

14. Roach T., Sedoud A., Krieger-Liszka A. Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition // Biochim. Biophys. Acta. — 2013. — V. 1827, No. 10. — P. 1183–1190.

15. Theodoridou A., Durnemann D., Kotzabasis K. Light dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol // Biochim. Biophys. Acta — 2002. — V. 1573, No. 2. — P. 189–198.

16. Yoval-Sánchez B., Jasso-Chávez R., Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Zavala J.S. Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis* // J. Bioenerg. Biomembr. — 2011. — V. 43, No. 5. — P. 519–530.

17. Wang Z.T., Ullrich N., Joo S., Waffenschmidt S., Goodenough U. Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii* // Eukar. Cell. — 2009. — V. 8. — P. 1856–1868.

18. Wickliff J.L., Aronoff S. Degradation of chlorophyll *a* to pheophytin *a*, pheophorbide *a*, and pyrrolophine XV for tracer studies // Anal. Biochem. — 1963. — V. 6. — P. 39–46.

19. Wintermans F.G., De Mots A. Chlorophyll determination. A suitable method for *Chlamydomonas* // Biochim. Biophys. Acta. — 1965. — V. 109. — P. 448–453.

Стаття надійшла до редакції 6.11.2013.

