https://doi.org/10.15407/frg2019.01.076
УДК 58.035.3

ВПЛИВ ІНТЕНСИВНОСТІ ОСВІТЛЕННЯ НА РІСТ МІКСОТРОФНИХ КУЛЬТУР *EUGLENA GRACILIS* ТА НАКОПИЧЕННЯ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ У ЇХ КЛІТИНАХ

В.М. МОКРОСНОП

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
01001 Київ, вул. Терещенківська, 2
e-mail: vmokrosnop@gmail.com

Мікроводорість *Euglena gracilis* здатна живитись як за рахунок фотосинтезу, так і поглинання органічних сполук із поживного середовища. Міксотрофне культивування *E. gracilis* із використанням етанолу як джерела вуглецю чинить значний вплив на метаболічні характеристики клітин мікроводорості порівняно з автотрофним культивуванням. Для більшості мікроводоростей етанол токсичний, але особливості біохімічної організації клітин *E. gracilis* забезпечують ефективне розщеплення цієї сполуки з утворенням запасного полісахариду парамілону. Етанол як легкозасвоюване джерело вуглецю затримує світлозалежне формування фотосинтетичного апарату клітин мікроводорості. Аналіз вмісту фотосинтетичних пігментів за різної інтенсивності освітлення показав, що мікроводорість *E. gracilis* є тіньовитривалим видом з особливим способом адаптації до затінення. Від інтенсивності освітлення клітин залежить також ефективність засвоєння органічного субстрату, що, у свою чергу, може впливати на ріст культури й пігментний склад клітин. Проаналізовано вплив трьох варіантів інтенсивності освітлення на культури *E. gracilis*, які культивували міксотрофно за наявності в поживному середовищі етанолу та етанолу з глутаматом натрію. Як контроль використано автотрофний варіант культури. Дослідження тривало 20 діб, протягом яких фіксували щільність клітин у культурах та вміст фотосинтетичних пігментів (хлорофілів і каротиноїдів) у клітинах. Установлено, що максимальна концентрація клітин у стаціонарну фазу росту досягається в культурі з етанолом і глутаматом натрію за інтенсивності освітлення 100 мкмоль/(м^2 · с). Знижений рівень хлорофілів у клітинах міксотрофних культур порівняно з автотрофними на початку експоненційної фази росту може свідчити про катаболітну репресію синтезу пігментів. Вміст хлорофілів, каротиноїдів та співвідношення хлорофілів *a*/*b* у клітинах міксотрофних культур з часом культивування збільшувались.

Ключові слова: Euglena gracilis, мікроводорість, міксотрофія, етанол, рівень росту, інтенсивність освітлення, хлорофіли, каротиноїди.

Протиста *E. gracilis* здатна живитись за рахунок як фотосинтезу, так і поглинання органічних субстратів із середовища існування, при цьому обидва процеси можуть відбуватись одночасно [1]. Етанол і

© В.М. МОКРОСНОП, 2019

глутамат натрію використовують як субстрати, що стимулюють накопичення біомаси культурою *E. gracilis*, підвищують її біотехнологічну цінність як продуцента антиоксидантів, парамілону й повноцінного білка [2—4]. Вплив етанолу на фотосинтетичний апарат *E. gracilis* досліджували переважно на стадії його розбудови в клітинах під впливом світла. Експериментально доведено, що додавання етанолу як поживного субстрату до культури *E. gracilis*, інкубованої в темряві, інгібує світлоіндукований синтез ферментів хлоропластів і білка світлозбирального комплексу ФС II [5]. Показано, що інтенсивність освітлення впливає на рівень поглинання клітинами органічного субстрату із середовища, й отже, може впливати на ріст культури і накопичення фотосинтетичних пігментів у міксотрофних клітинах [6].

Представників виду *Euglena* вважають світловитривалими мікроводоростями, але даних щодо того, як змінюються фізіологічні параметри клітин за різних інтенсивностей освітлення, недостатньо [7]. Автори праці [8] установили, що клітини *E. gracilis* є тіньовитривалими, але механізм їх адаптації до низької інтенсивності освітлення відрізняється від описаного для вищих тіньовитривалих рослин. Зі зниженням інтенсивності освітлення культури у клітинах *E. gracilis* зростає співвідношення хлорофілів *a*/*b*, що автори пов'язують зі збільшенням кількості реакційних центрів фотосистем, а не розмірів антен ФС II, до складу яких входить хлорофіл *b* [8]. Фотосинтетичний апарат клітин *E. gracilis* відрізняється від рослинного і має такі особливості організації: тилакоїди у гранах групуються по 2—3, кількість хлорофілу *b* значно менша за кількість хлорофілу *a*, пігментами ксантофілового циклу є діадиноксантин та діатоксантин. Особливості будови фотосинтетичного апарату *E. gracilis* можуть зумовлювати особливості реакції міксотрофних клітин на освітлення різної інтенсивності.

Метою цієї роботи було дослідження впливу міксотрофного культивування за наявності етанолу за різної інтенсивності освітлення на ріст культур *E. gracilis*, вміст і склад фотосинтетичних пігментів у процесі росту культури та взаємного затемнення клітин із часом.

Методика

Культури клітин *E. gracilis* var. *bacillaris* вирощували протягом 20 діб у сольовому поживному середовищі (Крамер і Мієрс, 1953) (варіант «контроль») без аерації та перемішування, з додаванням 100 мМ етанолу (варіант «+Ет») та суміші 100 мМ етанолу і 40 мМ глутамату натрію (варіант «+ЕтГт»). Культури вирощували у конічних колбах об'ємом 250 мл, заповнених на 200 мл культуральною рідиною. Окремі варіанти культур вирощували за інтенсивності освітлення 20, 100 і 250 мкмоль/(м^2 · с). Освітлення здійснювалось світлодіодною лампою білого світла (5 Вт, світлова температура 4100 К). Температура культивування змінювалась у межах 26—28 °С.

Через кожні 5 діб підраховували кількість клітин в одиниці об'єму культур і спектрофотометрично аналізували вміст хлорофілів у клітинах. Швидкість росту культури оцінювали за зміною щільності клітин водорості в одиниці об'єму культури методом підрахунку в ка-

мері Горяєва з використанням світлового мікроскопа (×150). Початкова концентрація клітин у дослідних варіантах становила ~0,5 · 10^5 кл/мл. Швидкість росту культур (r) розраховували за формулою [9]

$$r = \frac{\ln(N_t - N_0)}{\Delta T},$$

де N_0 — кількість клітин в одиниці об'єму культури в початковий момент часу 0; N_t — кількість клітин через період часу ΔT.

Фотосинтетичні пігменти (хлорофіли та каротиноїди) екстрагували 100 %-м ацетоном, кількісні розрахунки проводили за формулами Ліхтенталера [10].

Експерименти проводили в 3—5 біологічних повторностях (n), кількість аналітичних повторностей — не менш 3-х. Експериментальні дані представлені у вигляді середнього арифметичного (M) зі стандартною похибкою

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot$$

Оцінку значущості різниці між вибірками даних проводили за допомогою двохвибіркового t-тесту. Розрахунки проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2010.

Результати та обговорення

Ріст культур E. gracilis за різної інтенсивності освітлення. Внесення екзогенних джерел вуглецю — етанолу та глутамату натрію у поживне середовище значно стимулює накопичення біомаси міксотрофними культурами *E. gracilis*. Підвищення інтенсивності освітлення до 100—250 мкмоль/(м^2 · с) додатково сприяє розмноженню клітин у культурах, що ростуть за наявності органічних субстратів (рис. 1). Освітлення інтенсивністю 100 мкмоль/(м^2 · с) чинило найбільший позитивний вплив на ріст культур, тоді як за низької інтенсивності освітлення ріст культур значно пригнічувався як у контрольному, так і міксотрофних варіантах (див. рис. 1).

Найбільший приріст клітин зафіксовано до 5-ї доби росту культур у варіанті «+ЕтГт» за інтенсивності освітлення 250 мкмоль/(м^2 · с), але при цьому в перехідну фазу росту всіх варіантів культур приріст клітин

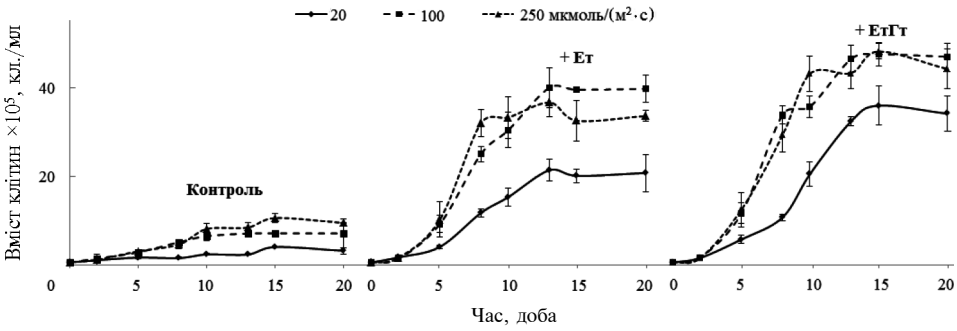

Рис. 1. Криві росту культур *E. gracilis* за різних інтенсивностей освітлення

Показник швидкості росту культур (r, доба$^{-1}$) за різних інтенсивностей освітлення в різні фази росту

Варіант	Інтенсивність освітлення, мкмоль/(м^2 · с)	Початок експоненційної фази (2—5-та доби)	Кінець експоненційної фази (5—10-та доби)	Перехідна фаза (10—15-та доби)
Контроль	20	0,16	0,07	0,11
	100	0,33	0,2	0,05
	250	0,23	0.17	0,02
+Ет	20	0,29	0,27	0,05
	100	0,64	0,24	0,05
	250	0,63	0,24	-0,004
+ЕтГт	20	0,44	0,26	0,11
	100	0,66	0,22	0,06
	250	0,71	0,25	0,02

знижувався, порівняно з іншими умовами освітлення (таблиця). На початку експоненційної фази росту культур за освітлення 100, 250 мкмоль/(м^2 · с) приріст клітин у варіантах «Контроль», «+Ет» був приблизно у 2 рази більшим, у варіанті «+ЕтГт» — в ~1,5 раза порівняно з низькою інтенсивністю освітлення 20 мкмоль/(м^2 · с). Наприкінці експоненційної фази та в перехідну фазу росту приріст клітин у міксотрофних варіантах культур, вирощених за низької інтенсивності освітлення, переважав показники варіантів, культивованих за вищої інтенсивності освітлення (100, 250 мкмоль/(м^2 · с).

У міксотрофних культурах за освітлення інтенсивністю 100 мкмоль/(м^2 · с) після досягнення стаціонарної фази росту концентрація клітин стає максимальною — збільшується у ~80—90 разів, у контрольному варіанті — в ~20 разів порівняно з днем висіву. Отже, у міксотрофному живленні клітин *E. gracilis* важливу роль відіграє автотрофна складова, оскільки достатня кількість органічного субстрату не забезпечує максимальної інтенсивності розмноження клітин культур. Освітлення інтенсивністю 250 мкмоль/(м^2 · с) чинить негативний вплив на життєздатність клітин у стаціонарну фазу їх росту,

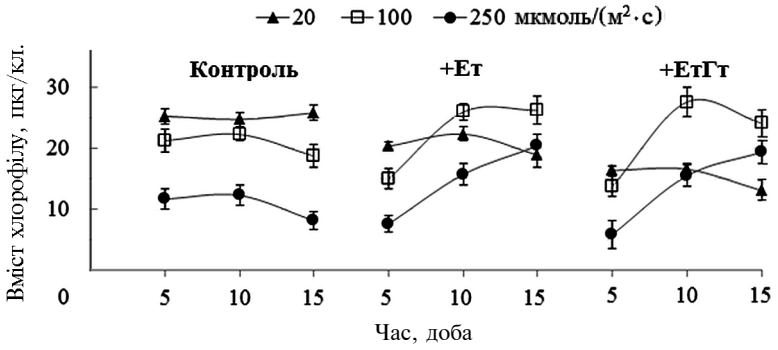

Рис. 2. Вміст хлорофілів у клітинах культур *E. gracilis*, вирощених за різних інтенсивностей освітлення

що виявляється у пришвидшеному відмиранні клітин після 15-ї доби порівняно з помірнішим освітленням 100 мкмоль/(м^2 · с).

Вміст хлорофілів і каротиноїдів у клітинах міксотрофних культур E. gracilis за різних інтенсивностей освітлення. Вміст хлорофілів у клітинах культур *E. gracilis* залежить від інтенсивності освітлення і змінюється з часом росту культури (рис. 2). В експоненційну фазу росту концентрація хлорофілів у клітинах тим більша, чим нижчою була інтенсивність освітлення при вирощуванні культур, що збігається з результатами роботи [8]. У контролі вміст хлорофілу в середньому на 30 % перевищував показники міксотрофних культур. Знижена концентрація фотосинтетичних пігментів у клітинах міксотрофних культур порівняно з контролем свідчить про катаболітну репресію синтезу хлорофілів органічними субстратами, що містяться у поживному середовищі.

У варіантах міксотрофних культур за освітлення 100 і 250 мкмоль/(м^2 · с) фіксували збільшення вмісту хлорофілів із 5-ї по 10-ту доби вирощування. У міксотрофних варіантах, які росли за інтенсивності освітлення 100 мкмоль/(м^2 · с), приріст пігментів до стаціонарної фази росту був на 25—30 % більшим, ніж за освітлення 250 мкмоль/(м^2 · с), що можна пояснити вищим рівнем фоторуйнування хлорофілів в останньому варіанті. Збільшення кількості клітин на одиницю об'єму культури в процесі її росту і накопичення клітинами пігментів призводить до зменшення середньої кількості фотонів, які досягають поверхні кожної клітини, що змушує клітини пристосовуватись до змінюваних умов освітлення. Отже, збільшення кількості хлорофілів у культурах в період інтенсивного їх росту вірогідно є адаптацією до зниження інтенсивності освітлення, яке залежить від пластичних можливостей клітин. Міксотрофне культивування забезпечує накопичення клітинами ендогенного вуглецю, необхідного для синтетичних процесів, що зумовлює відмінність у приростi фотосинтетичних пігментів порівняно з автотрофними варіантами [11]. Низька інтенсивність освітлення не стимулювала істотного накопичення хлорофілів у дослідний період (5—15-та доби) культивування в жодній із культур, що може бути пов'язано з переходом таких культур в умови, за яких значно пригнічуються всі світлозалежні процеси.

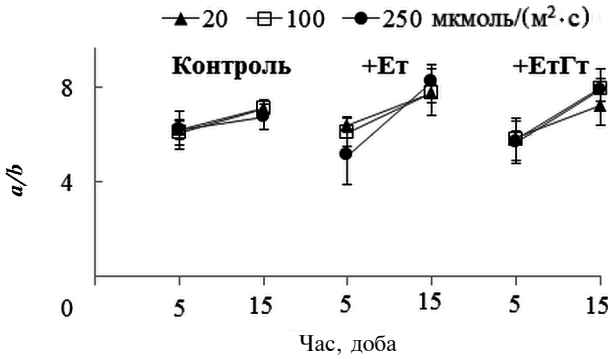

Рис. 3. Співвідношення хлорофілів *a*/*b* у клітинах культур *E. gracilis*, вирощених за різних інтенсивностей освітлення в експоненційній (5-та доба) та стаціонарній (15-та доба) фазах росту

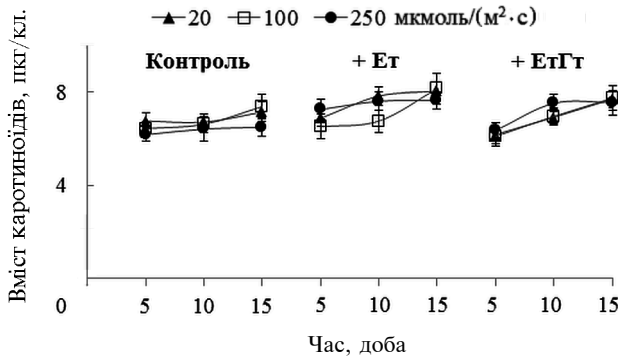

Рис. 4. Вміст каротиноїдів у клітинах дослідних культур *E. gracilis*, вирощених за різних інтенсивностей освітлення

Співвідношення хлорофілів *a/b* у клітинах з часом росту культури збільшується, що особливо виражено у міксотрофно культивованих клітинах (рис. 3). Таку тенденцію до збільшення вмісту хлорофілу *a* відносно хлорофілу *b* можна пояснити адаптацією клітин до зниження інтенсивності освітлення в культурі, що підтверджують дані праці [8]. Співвідношення хлорофілів *a/b* має відносно велике значення в клітинах *E. gracilis*, що пов'язано з особливостями структури фотосинтетичного апарату цієї мікроводорості.

Концентрація каротиноїдів у всіх варіантах культур зростала з часом вирощування, найінтенсивніше у варіанті з обома субстратами «+ЕтГт» (рис. 4). β-Каротин — кількісно переважаючий каротиноїд *E. gracilis*, захищає клітини від фотоінгібування, оскільки входить до складу фотосинтетичного апарату та має антиоксидантні властивості. Збільшення вмісту каротиноїдів у клітинах дослідних культур із підвищенням інтенсивності освітлення при їх вирощуванні не виявлено. Ймовірно, захист від вільних радикалів, що генеруються у хлоропластах, здійснюють переважно інші антиоксиданти, наприклад токофероли й аскорбінова кислота [12]. Кореляції між рівнями хлорофілів і каротиноїдів у клітинах не виявлено. Руйнування хлорофілів при переході клітин у стаціонарну фазу не супроводжувалось зниженням концентрації каротиноїдів у клітинах міксотрофних культур.

Таким чином, інтенсивність освітлення 100 мкмоль/(м^2 · с) є найсприятливішою з-поміж досліджених для накопичення біомаси міксотрофними культурами після досягнення стаціонарної фази росту. У першій половині експоненційної фази росту в клітинах міксотрофних культур вміст хлорофілів знижений, що зумовлено наявністю у середовищі органічних субстратів. У процесі росту міксотрофних культур рівень фотосинтетичних пігментів у клітинах і співвідношення хлорофілів *a/b* збільшуються, що є пристосуванням до взаємного затінення клітин.

REFERENCES

1. Mokrosnop, V.M., Polishuk, A.V. & Zolotareva, E.K. (2015). Functional state of the photosynthetic apparatus of cells of *Euglena gracilis* during mixotrophic cultivation. Dop. NAN Ukraine, 10, pp. 77-84 [in Ukrainian].

2. Mokrosnop, V.M. (2016). Dynamics of chlorophyll and paramylon accumulation in Euglena gracilis cells at mixotrophic cultivation. Biol Studii, 10, No. 2, pp. 141-148.
3. Rodriguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., Mendoza-Hernanderz, G. & Moreno-Sanchez, R. (2010). Increased synthesis of α-tocopherol, paramylon and tyrosine by Euglena gracilis under conditions of high biomass production. J. Appl. Microbiol, 109, pp. 2160-2172.
4. Yoval-Sanchez, B., Jasso-Chavez, R., Lira-Silva, E., Moreno-Sanchez, R. & Rodriguez-Zavala, J. S. (2011). Novel mitochondria alcohol metabolizing enzymes of Euglena gracilis. J. Bioenerg. Biomembr, 43, pp. 519-530.
5. Rikin, A. & Schwartzbach, S.D. (1989). Regulation by light and ethanol of the synthesis of the light harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II in Euglena. Planta, 178, pp. 76-83.
6. Nicolas, P., Freyssinet, G. & Nigon, V. (1980). Effect of light on glucose utilization by Euglena gracilis. Plant Physiol, 65, pp. 631-634.
7. Brody, M. (1986). Chlorophyll studies. In The biology of Euglena. Vol II. Biochemistry (Ed. D.E. Buetow). New York: Academic Press, Inc.
8. Beneragama, C.K. & Goto, K. (2010). Chlorophyll a:b ratio increases under low-light in "shade-tolerant" Euglena gracilis. Trop. agricult. res., 22, No. 1, pp. 12-25.
9. Andersen, R.A. (2005). Algal Culturing Techniques. London: Elsevier Academic Press.
10. Lichtenthaler, H.K. & Welburn, A.R. (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, 603, pp. 591-593.
11. Garlaschi, F.M., Garlaschi, A.M., Lombardi, A. & Forti, G. (1974). Effect of ethanol on the metabolism of Euglena gracilis. Plant Sci. Lett., 2, pp. 29-39.
12. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. Amer. J. clin. nutr., 62, No. 6, pp. 1322S-1326S.

Received 25.01.2019

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ОСВЕЩЕНИЯ НА РОСТ МИКСОТРОФНЫХ КУЛЬТУР *EUGLENA GRACILIS* И НАКОПЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ИХ КЛЕТКАХ

В.М. Мокроснол

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев

Микроводоросль *Euglena gracilis* способна питаться как за счет фотосинтеза, так и поглощения органических веществ из питательной среды. Миксотрофное культивирование *E. gracilis* с использованием этанола в качестве источника углерода оказывает существенное влияние на метаболические характеристики клеток микроводоросли по сравнению с автотрофным культивированием. Для большинства микроводорослей этанол является токсичным, однако особенности биохимической организации клеток *E. gracilis* обеспечивают эффективное расщепление этого соединения с образованием запасного полисахарида парамилона. Этанол как источник легкоусваиваемого углерода задерживает светозависимое формирование фотосинтетического аппарата клеток микроводорослей. Анализ содержания фотосинтетических пигментов при различной интенсивности света показал, что микроводоросль *E. gracilis* является теневыносливым видом с особым способом адаптации к затенению. От интенсивности освещения клеток зависит также эффективность усвоения органического субстрата, что, в свою очередь, способно влиять на рост культуры и пигментный состав клеток. Проанализировано влияние трех вариантов интенсивности освещения на культуры *E. gracilis*, которые культивировались миксотрофно при наличии в питательной среде этанола и этанола с глутаматом натрия. В качестве контроля использован автотрофный вариант культуры. Исследование длилось 20 сут, в течение которых фиксировали плотность клеток в культурах и содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в клетках. Установлено, что максимальная концентрация клеток в ста-

ционарной фазе роста достигается в культуре с этанолом и глутаматом натрия при интенсивности освещения 100 мкмоль/(м^2 · с). Сниженный уровень хлорофиллов в клетках миксотрофных культур по сравнению с автотрофными в начале экспоненциальной фазы роста может свидетельствовать о катаболитной репрессии синтеза пигментов. Содержание хлорофиллов, каротиноидов и соотношение хлорофиллов *a*/*b* в клетках миксотрофных культур со временем культивирования увеличивались.

Ключевые слова: *Euglena gracilis*, микроводоросль, миксотрофия, этанол, уровень роста, интенсивность освещения, хлорофиллы, каротиноиды.

THE EFFECT OF LIGHT INTENCITY ON THE GROWTH OF MIXOTROPHIC CULTURES OF *EUGLENA GRACILIS* AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS ACCUMULATION IN CELLS

V.M. Mokrosnop

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine
e-mail: *vmokrosnop@gmail.com*

Microalga *Euglena gracilis* is able to photosynthesis and can also absorb different organic substrates from the environment both under the light conditions and in the darkness. In comparison with autotrophy, mixotrophic cultivation of *E. gracilis* with ethanol as carbon source has a significant influence on the metabolic characteristics of the microalgal cells. For most microalgae ethanol is toxic, but due to the unique biochemical organization, *E. gracilis* cells are able to effectively utilize ethanol with accumulation of the storage polysaccharide paramylon. Ethanol as a source of easily digestible carbon retards the light-dependent formation of the photosynthetic apparatus of the microalgal cells. Analysis of photosynthetic pigments at different light intensities showed that *E. gracilis* microalga is a shade-tolerant organism with a special way to adapt to shade. Light intensity also changes the rate of organic substrates uptake, which can affect the growth rate of a culture and the content of pigments in the cells. Effect of three variants of light intensities on the cultures of *E. gracilis*, which were grown mixotrophically in the presence of ethanol and ethanol and glutamate in nutrition medium, was investigated in this work. Autotrophic culture was the control variant. The density of the cultures and the content of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) in the cells were fixed in every 3 days during 20 days of the investigation. At the stationary growth phase the maximal cell concentration was registered in the culture with ethanol and sodium glutamate under illumination 100 μmol/(m^2 · s). Decreased chlorophylls content in the cells of mixotrophic cultures in comparison with autotrophic cultures at the beginning of exponential growth phase can be explained by catabolic repression of photosynthetic pigments synthesis. It was shown that chlorophylls and carotenoids content, chlorophylls *a*/*b* ratio increased with duration of mixotrophic cultures growth.

Key words: *Euglena gracilis*, microalga, mixotrophy, ethanol, growth rate, light intensity, chlorophylls, carotenoids.