

<https://doi.org/10.15407/frg2019.03.267>

УДК 581.1:577.115:582.264

ДІЯ 2-(2-ОКСИПІРОЛІДИН-1-ІЛ)АЦЕТАМІДУ НА РІСТ І ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

С.С. СТЕПАНОВ, О.В. ПОЛЩУК

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
01601 Київ, вул. Терещенківська, 2
e-mail: serhiy1986@ukr.net

Одноклітинна зелена мікроводорість *Chlamydomonas reinhardtii* — модельний еукаріотичний організм для вивчення процесів фотосинтезу, клітинної рухливості, вуглецевого живлення, біосинтезу білка і розробки нових біотехнологічних регламентів. Як джерело вуглецю для гетеротрофного або міксотрофного живлення *C. reinhardtii* здатна використовувати ацетат. Ми вивчали вплив пірацетаму (2-(2-оксипіролідін-1-іл)ацетаміду) як можливо-го біостимулятора рослинних організмів на ріст і фотосинтетичні характеристики клітин *C. reinhardtii*. Накопичувальну культуру *C. reinhardtii* вирощували в міксотрофних умовах на рідкому середовищі при освітленні світлодіодними лампами з густиною світлового потоку 100 мкмоль фотонів/(м² · с) за додавання пірацетаму до концентрації 0,2–0,8 мг/мл. Швидкість росту культури оцінювали за збільшенням кількості клітин у середовищі культивування методом підрахунку в камері Горяєва під світловим мікроскопом. Токсичну дію Cu і Zn вивчали після додавання в середовище культивування в середині експоненційної фази росту культури сульфатів цинку і міді в концентрації відповідно 10 і 20 мг/л. Концентрацію O₂ визначали амперометричним методом за допомогою платинового електрода Кларка. Функціональний стан фотосинтетичного апарату оцінювали за параметрами кривої індукції флуоресценції хлорофілу на флуориметрі ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). Інтенсивність актинічного світла відповідала інтенсивності освітлення при культивуванні водоростей. За додавання пірацетаму до середовища культивування ефективність фотосинтезу зростала, що супроводжувалося збільшенням інтенсивності виділення O₂ на світлі та стимуляцією росту *C. reinhardtii*. За наявності 0,4 мг/мл пірацетаму в середовищі культивування концентрація клітин після 10 діб росту була вищою на 65 % порівняно з контролем. Встановлено, що пірацетам стимулює ріст культури за наявності токсичної концентрації ZnSO₄ унаслідок стрес-протекторної дії.

Ключові слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, пірацетам, фотосинтез, ріст, важкі метали, біостимулятори.

Chlamydomonas reinhardtii — рухома одноклітинна зелена мікроводорість, поширена в ґрунті й прісній воді. *C. reinhardtii* може рости на

світлі на простому культуральному середовищі, що містить неорганічні солі, для забезпечення своїх клітин енергією вона використовує фотосинтез. Як джерело вуглецю *C. reinhardtii* здатна використовувати ацетат для гетеротрофного і міксотрофного росту. *C. reinhardtii* є зручним об'єктом для дослідження різних біологічних процесів — рухливості джгутиків, фотосинтезу, біосинтезу білка, вуглецевого живлення і розробки нових біотехнологічних регламентів. Широка і різноманітна інформація, біологічні властивості *C. reinhardtii*, а також те, що в 2007 р. було визначено повну нуклеотидну послідовність її геному [1], забезпечили використання цієї мікроводорості як модельного організму при вивченні еукаріотичних фотосинтетичних організмів. Раніше ми виявили, що міксотрофний ріст *C. reinhardtii* стимулюється додаванням у середовище метанолу, при цьому зростають інтенсивність дихання, вміст розчинних білків і вміст вільних амінокислот (глутамінової кислоти, глутаміну, аланіну, серину, тирозину) [2, 3].

Біостимуляторами рослин вважають сполуки чи живі організми, які поліпшують утилізацію біогенних елементів рослинами і стимулюють їх ріст. Термін «біостимулятори рослин» стосується переважно агрокультури вищих рослин. Основні класи таких речовин представлені: екстрактами з водоростей, гуміновими кислотами, амінокислотами, симбіотичними бактеріями чи грибами [4]. Пошук нових ефективних біостимуляторів залишається актуальним напрямом дослідження.

Пірацетам — ноотропний лікарський засіб, похідна γ -аміномасляної кислоти, належить до класу рацетамів. Синтезовано низку його аналогів і гомологів, але пірацетам найдоступніший і найдешевший представник цієї групи [5]. Пірацетам легко проникає всередину клітини через плазматичну мембрану, не метаболізується. Підвищує енергетичний потенціал унаслідок пришвидшення синтезу АТФ, збільшення активності аденілатциклази та інгібування нуклеотидфосфатази в нейронах головного мозку, результатом чого є зростання стійкості тканин мозку при гіпоксії і токсичних впливах [6]. Пірацетам чинить мембраностабілізуючий вплив, чим протидіє негативним наслідкам гіпоксії, зокрема таким, як пероксидне окиснення ліпідів [7]. Він також активує гліколіз і пентозофосфатний шлях, зменшує потребу клітин у кисні [8].

У доступних літературних джерелах відсутні дані стосовно впливу рацетамів на метаболізм та життєдіяльність рослинних організмів. Рослинні організми в природних умовах зазнають стресу від гіпоксії. Нестачу кисню спричинюють затоплення кореневої системи чи зневоднення. Мікроводорості зазнають стресу за нестачі O_2 як у природних, так і в лабораторних умовах. Неспецифічні реакції рослинних організмів на стреси різноманітної природи загалом подібні. Розвиток адаптаційних реакцій у відповідь на дію стресора супроводжується пригніченням обмінних метаболічних процесів та сповільненням росту. Важкі метали входять до складу суміші мікроелементів середовища культивування мікроводоростей, проте навіть за незначного підвищення їх концентрації ріст мікроводоростей пригнічується. Так,

ZnSO₄ · 7H₂O концентрацією 0,8 мг/л вдвічі сповільнював швидкість експоненційного росту культури *C. reinhardtii* [9]. Надлишок цинку пригнічує активність фотосинтезу й циклу Кребса. Іони цинку заміщують іони магнію в реакційних центрах ензимів і знижують їх активність. За додавання 20 мг/л CuSO₄ · 5H₂O повністю припинявся ріст *C. reinhardtii* і зростав вміст активних форм кисню [10].

Ми дослідили вплив пірацетама на ріст *C. reinhardtii* за умов міксотрофного росту на рідкому поживному середовищі, визначили інтенсивність фотосинтезу, дихання та параметри кривої індукції флуоресценції хлорофілу за наявності пірацетама в середовищі культивування і в контролі, перевірили здатність пірацетама адаптувати мікроводорості до стресу, спричиненого дією важких металів.

Методика

Одноклітинну зелену водорість *C. reinhardtii* ми отримали з колекції культур мікроводоростей відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (IBASU-B-163). Накопичувальну міксотрофну культуру мікроводорості вирощували на триацетатфосфатному середовищі [11] в конічних колбах об'ємом 0,25 л за кімнатної температури й цілодобового освітлення світлодіодними лампами з інтенсивністю фотосинтетично активної радіації (ФАР) на поверхні колб 100 мкмоль фотонів/(м² · с). Для дослідження токсичної дії Cu і Zn ці метали у формі сульфатів вносили в концентрації 10 і 20 мг/л відповідно в середині експоненційної фази росту культури.

Індукцію флуоресценції хлорофілу визначали за загальноприйнятою методикою на флуориметрі ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина) після 1 год інкубування з пірацетамом концентрацією 0,2 мг/мл середовища культивування і в контролі. За параметрами кривої індукції флуоресценції обчислювали максимальний квантовий вихід (F_v/F_m) [12], фотохімічне гасіння флуоресценції (qP) [13], ефективний квантовий вихід електронного транспорту (Φ_{PSII}) [14], максимальний квантовий вихід у світлоадаптованому стані (F'_v/F'_m) [15], нефотохімічне гасіння флуоресценції (qN) та за Штерном—Вольмером (NPQ) [13].

Кількість клітин в 1 мл середовища культивування підраховували в камері Горяєва за 200-разового збільшення світлового мікроскопа. Проби для аналізу відбирали після ретельного перемішування культури. Клітини в сітці камери фотографували цифровою фотокамерою. Отримані зображення обробляли за допомогою комп'ютерної програми ImageTool 3.0. Проби для аналізу відбирали протягом 10 діб культивування, швидкість експоненційного росту *r* визначали за формулою [17]

$$r = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t}$$

Концентрацію O₂ визначали амперометричним методом за допомогою платинового електрода Кларка в скляній комірці об'ємом 2 мл

[18] за постійного перемішування культури мікродорості магнітною мішалкою при кімнатній температурі. Водорості адаптували до темряви і після освітлення визначали швидкість фотосинтетичного виділення O_2 протягом 3 хв. Після цього освітлення припиняли і протягом 5 хв визначали швидкість поглинання O_2 внаслідок дихання.

Експерименти проводили не менш як у трьох біологічних (n) та трьох аналітичних повтореннях. Експериментальні дані наведені як середньоарифметичні (M) зі стандартною похибкою (m). Значущість різниці між вибірками оцінено за двохвибірковим t -тестом із різними дисперсіями. Розрахунки виконано за допомогою програми Microsoft Excel 2013.

Результати та обговорення

За концентрації пірацетаму 0,2 мг/мл в середовищі культивування швидкість експоненційного росту культури не відрізнялась від контрольного значення без добавляння пірацетаму, але в контролі експоненційний ріст закінчувався на одну добу раніше. За концентрації пірацетаму 0,4 мг/мл швидкість експоненційного росту культури збільшувалась на 14 %, у зв'язку з чим на 10-ту добу культивування концентрація клітин у культурі виявилась вищою на 65 % порівняно з контролем (рис. 1). Збільшення концентрації пірацетаму в середовищі культивування до 0,8 мг/мл не супроводжувалося подальшим стимулюванням росту культури *C. reinhardtii*. Щоб дослідити здатність пірацетаму впливати на токсичність важких металів його добавляли до концентрації 0,4 мг/мл.

Приріст концентрацій клітин у культурі на другу добу після внесення солей важких металів і пірацетаму ілюструє рис. 2. За добавляння $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ до 10 мг/л ріст *C. reinhardtii* не пригнічувався порівняно з контролем, очевидно що така концентрація солі міді не токсична для мікродорості. У разі добавляння в середовище культивування $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ до концентрації 20 мг/л без пірацетаму ріст культури повністю припинявся, а за наявності пірацетаму становив 70 % приросту в контролі.

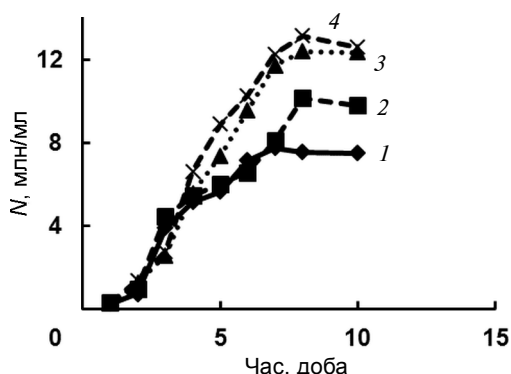


Рис. 1. Концентрація клітин (N) в міксотрофній культурі *C. reinhardtii* протягом десяти діб культивування у контролі (1) та за наявності пірацетаму в кількості 0,2 (2), 0,4 (3) і 0,8 мг/мл (4)

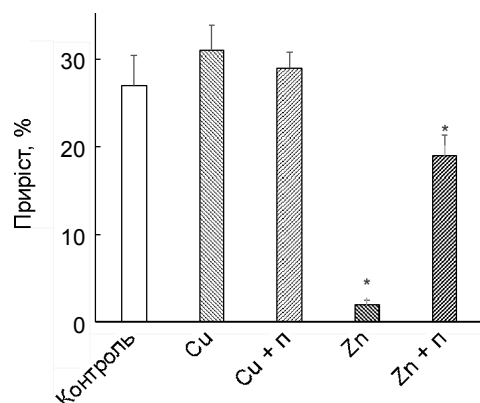


Рис. 2. Приріст концентрації клітин мікроводорості на третю добу культивування у контролі та за наявності солей важких металів ($M \pm m$, $n = 3$). * — різниця вірогідна порівняно з контролем ($p < 0,05$)

Отже, додавання пірацетаму до середовища культивування не лише поліпшує ріст культури *C. reinhardtii* за нормальних умов а й захищає її від токсичної концентрації $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. За умов міксотрофного живлення продуктивність культури може зростати як унаслідок підвищення ефективності фотохімічних реакцій, так і збільшення утилізації органічного карбону в формі ацетату.

Як відомо, пірацетам чинить мембраностабілізуючу дію і здатний активувати мітохондріальну АТФ-синтетазу [7]. Щоб установити ймовірний механізм дії пірацетаму, ми дослідили його вплив на зміну параметрів індукції флуоресценції хлорофілу та газообмін O_2 культури *C. reinhardtii* при освітленні та в темряві (рис. 3, 4).

За додавання пірацетаму в середовище культивування метаболічні процеси *C. reinhardtii* активуються, що виявляється в збільшенні інтенсивності виділення O_2 при освітленні на 19 % порівняно з контролем. Інтенсивність виділення кисню при освітленні мікроводоро-

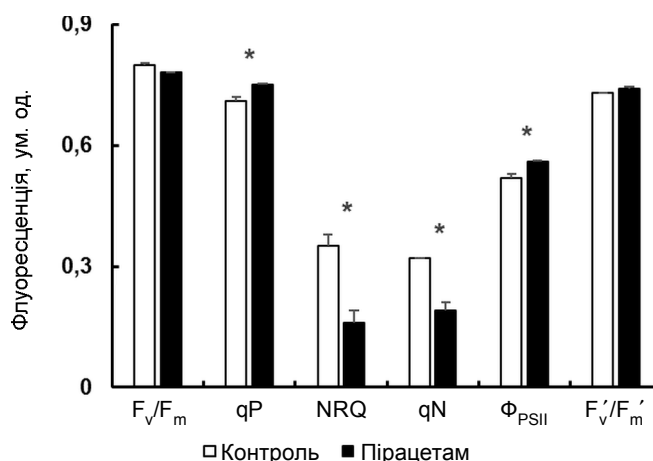


Рис. 3. Параметри кривої індукції флуоресценції хлорофілу за наявності в середовищі культивування 0,4 мг/мл пірацетаму і в контролі ($M \pm m$, $n = 3$). * — різниця вірогідна порівняно з контролем ($p < 0,05$)

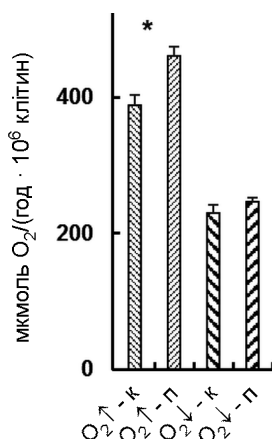


Рис. 4. Виділення O_2 при освітленні (↑) та поглинання O_2 в темряві (↓) культурою *C. reinhardtii* за наявності в середовищі культивування 0,4 мг/мл пірацетаму (π) і в контролі (κ)

стей характеризує активність їх фотосинтетичного апарату. За наявності пірацетаму в середовищі культивування зростає qP і зменшується NPQ відповідно на 6 і 54 %, тоді як F_v/F_m і F'_v/F'_m не змінюються порівняно з контролем. Зростає також Φ_{PSII} на 10 % і знижується qN на 40 % порівняно з контролем без пірацетаму.

Збільшення швидкості виділення O_2 при освітленні за дії пірацетаму узгоджується зі зростанням qP і Φ_{PSII} , а також зі зниженням NPQ і qN та свідчить про підвищення ефективності фотохімічного перетворення енергії. Інтенсифікація транспорту електронів у фотосистемі II (Φ_{PSII}) забезпечує рослину клітину відновними еквівалентами у формі НАДФН, які вона використовує для фіксації CO_2 в циклі Кальвіна. За дії пірацетаму ми не виявили збільшення швидкості поглинання O_2 в темряві як результату активації мітохондріального дихання, тобто за умов міксотрофного живлен-

ня ріст культури *C. reinhardtii* активується в зв'язку з підвищенням ефективності фотосинтезу.

Отже, пірацетам у концентрації 0,4 мг/мл можна рекомендувати як стимулятор росту й адаптоген для *C. reinhardtii*.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., ... Marshall W.F. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 2007. **318** (5848). P. 245–250.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* 2015. **27** (4). P. 1509–1516.
- Степанов С.С., Золотарева Е.К. Влияние метанола на фотосинтетическую активность и продуктивность *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (Chlorophyta). *Альгология*. 2011. **21**, № 2. P. 178–190.
- du Jardin P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scient. Horticult.* 2015. **196**. P. 3–14.
- Берестовицкая В.М., Тюренков И.Н., Васильева О.С., Перфилова В.Н., Остроглазов Е.С., Багметова В.В. Рацетамы: методы синтеза и биологическая активность. СПб.: Астерион, 2016. 287 с.
- Peuvot J., Schanck A., Deleers M., Brasseur R. Piracetam-induced changes to membrane physical-properties — a combined approach by P-31 nuclear-magnetic-resonance and conformational-analysis. *Biochem. Pharmacol.* 1995. **50**. P. 1129–1134.
- Muller W., Eckert G., Eckert A. Piracetam: noveltyin a unique mode of action. *Pharmacopsych.* 1999. **32** (S 1). P. 2–9. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-979230>
- Hitzenberger G., Rameis H., Manigley C. Pharmacological properties of piracetam. *CNS drugs*. 1998. **9** (Suppl 1). P. 19. doi: <https://doi.org/10.2165/00023210-199809001-00003>
- Mikulic P., Beardall J. Contrasting ecotoxicity effects of zinc on growth and photosynthesis in a neutrophilic alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) and an extremophilic alga (*Cyanidium caldarium*). *Chemosphere*. 2014. **112**. P. 402–411.

10. Jammers A., Blust R., De Coen W., Griffin J.L., Jones O.A. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals*. 2013. **26** (5). P. 731–740.
11. Tamburic B., Zemichael F.W., Maitland G.C., Hellgardt K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrog. Ener.* 2011. **36** (13). P. 7872–7876. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.074>.
12. Butler W.L. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1978. **29**. P. 345–378.
13. Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 1986. **10**. P. 51–62.
14. Genty B. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 1989. **990**. P. 87–92.
15. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. *J. Exp. Bot.* 2000. **51**. P. 659–668.
16. Bilger W., Bjorkman O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 1990. **25** (3). P. 173–185.
17. Andersen R.A. *Algal Culturing Techniques*. Acad. Press. Inc. — Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005. 578 p.
18. Зеленский М. И. Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. Ленинград : Наука, 1986. 140 с.

Отримано 11.02.2019

REFERENCES

1. Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon. O., ... , Rokhsar, D.S. & Grossman, A.R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848), pp. 245-250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
2. Stepanov, S.S. & Zolotareva, E.K. (2015). Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.*, 27 (4), pp. 1509-1516. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0445-9>
3. Stepanov, S.S. & Zolotareva, E.K. (2011). The effect of methanol on the photosynthetic activity and productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (Chlorophyta). *Int. J. Algae*, 21 (2), pp. 178-190 [in Russian].
4. du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scient. Horticult.*, 196, pp. 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
5. Berestovitskaya, V.M., Tyurenkov, I.N., Vasilyeva, O.S., Perfilova, V.N., Ostroglyadov, E.S. & Bagmetova, V.V. (2016). *Racetams: Synthesis Methods and Biological Activity*. SPb.: Asterion [in Russian].
6. Peuvot, J., Schanck, A., Deleers, M. & Brasseur, R. (1995). Piracetam-induced changes to membrane physical-properties — a combined approach by P-31 nuclear-magnetic-resonance and conformational-analysis. *Biochem. Pharmacol.*, 50, pp. 1129-1134. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00225-O](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00225-O)
7. Muller, W., Eckert, G. & Eckert, A. (1999). Piracetam: Novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsych.*, 32 (S 1), pp. 2-9. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979230>
8. Hitzenberger, G., Rameis, H. & Manigley, C. (1998). Pharmacological properties of piracetam. *CNS drugs.*, 9 (Suppl 1), p. 19. <https://doi.org/10.2165/00023210-199809001-00003>
9. Mikulic, P. & Beardall, J. (2014). Contrasting ecotoxicity effects of zinc on growth and photosynthesis in a neutrophilic alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) and an extremophilic alga (*Cyanidium caldarium*). *Chemosphere*, 112, pp. 402-411. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.049>
10. Jammers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J. L. & Jones, O.A. (2013). Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals*, 26 (5), pp. 731-740. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9648-9>

11. Tamburic, B., Zemichael, F.W., Maitland, G.C. & Hellgardt, K. (2011). Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrog. Ener.*, 36(13), pp. 7872-7876. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.074>.
12. Butler, W.L. (1978). Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29, pp. 345-378. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002021>
13. Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, 10, pp. 51-62. <https://doi.org/10.1007/BF00024185>
14. Genty, B. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.*, 990, pp. 87-92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
15. Maxwell, K. & Johnson, G.N.J. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Exp. Bot.*, 51, pp. 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
16. Bilger, W. & Bjorkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.*, 25 (3), pp. 173-185. <https://doi.org/10.1007/BF00033159>
17. Andersen, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Acad. Press. Inc. — Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
18. Zelensky, M.I. (1986). Polarographic determination of oxygen in studies on photosynthesis and respiration. Leningrad: Nauka [in Russian].

Received 11.02.2019

ДЕЙСТВИЕ 2-(2-ОКСИПИРОЛИДИН-1-ИЛ)АЦЕТАМИДА НА РОСТ И
 ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

С.С. Степанов, О.В. Полищук

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины
 01601 Киев, ул. Терещенковская, 2
 e-mail: serhiy1986@ukr.net

Одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* — модельный эукариотический организм для изучения процессов фотосинтеза, клеточной подвижности, углеродного питания, биосинтеза белка и разработки новых биотехнологических регламентов. В качестве источника углерода для гетеротрофного или миксотрофного питания *C. reinhardtii* способна использовать ацетат. Изучали влияние пирасетама (2-(2-оксипирролидин-1-ил)ацетамида) как возможного биостимулятора растительных организмов на рост и фотосинтетические характеристики клеток *C. reinhardtii*. Накопительную культуру *C. reinhardtii* выращивали в миксотрофных условиях на жидкой среде при освещении светодиодными лампами с плотностью светового потока 100 мкмоль фотонов/(м² · с) при добавлении пирасетама до концентрации 0,2—0,8 мг/мл. Скорость роста культуры оценивали по увеличению количества клеток в среде культивирования методом подсчета в камере Горяева под световым микроскопом. Токсическое действие Cu и Zn изучали после добавления в среду культивирования в середине экспоненциальной фазы роста культуры сульфатов цинка и меди в концентрации соответственно 10 и 20 мг/л. Концентрацию O₂ определяли амперометрическим методом с помощью платинового электрода Кларка. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата оценивали по параметрам кривой индукции флуоресценции хлорофилла на флуориметре ХЕ-РАМ (Walz, Германия). Интенсивность актиничного света соответствовала интенсивности освещения при культивировании водорослей. При добавлении пирасетама к среде культивирования эффективность фотосинтеза возрастала, что сопровождалось увеличением интенсивности

выделения O_2 на свету и стимуляцией роста *C. reinhardtii*. При наличии 0,4 мг/мл пирacetам в среде культивирования концентрация клеток после 10 сут роста была выше на 65 % по сравнению с контролем. Установлено, что пирacetам стимулирует рост культуры при наличии токсичной концентрации $ZnSO_4$ вследствие стресс-протекторного действия.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, пирacetам, фотосинтез, рост, тяжелые металлы, биостимуляторы.

INFLUENCE OF 2-(2-OXYPYROLIDIN-1-IL)ACETAMIDE ON GROWTH AND FUNCTIONAL STATE OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

S.S. Stepanov, O.V. Polishchuk

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine
e-mail: serhiy1986@ukr.net

The unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is a model eukaryotic organism for studying the processes of photosynthesis, cell motility, carbon nutrition, protein biosynthesis and the development of new biotechnological regulations. As a carbon source for heterotrophic or mixotrophic growth, *C. reinhardtii* is capable to use acetate. The aim of this work was to study the effect of piracetam (2-(2-oxypyrolidin-1-il)acetamide) as a possible biostimulant of plant organisms on growth and the photosynthetic characteristics of *C. reinhardtii* cells. Cumulative cultures of *C. reinhardtii* were grown under mixotrophic conditions on liquid medium, illuminated with LED lamps with a light flux density of $100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ with the addition of piracetam to a concentration of 0.2–0.8 mg/ml. The growth rate of the culture was estimated by the increase of cells number in the culture medium. The toxic effect of Cu and Zn was studied after adding zinc and copper sulphates at a concentration of 10 mg/ml and 20 mg/ml, respectively, to the culture medium in the mid-exponential growth phase of the culture. O_2 concentration was determined by the amperometric method using a Clark platinum electrode. The functional state of the photosynthetic apparatus was assessed by determining the parameters of the chlorophyll fluorescence induction curve with the XE-PAM fluorimeter (Walz, Germany). The intensity of actinic light corresponded to the intensity of illumination during the cultivation of algae. The results showed that the addition of piracetam to the culture medium led to an increase in the efficiency of photosynthesis, which was accompanied by an increase in the rate of O_2 evolution in the light and stimulation of *C. reinhardtii* growth. In the presence of piracetam (0.4 mg/ml) in the cultural medium, the cell concentration after 10 days of growth increased by 65 % as compared with the control. Piracetam stimulated culture growth in the presence of toxic concentrations of $ZnSO_4$, providing a stress-protective effect.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, piracetam, photosynthesis, growth, heavy metals, biostimulants.