



УДК 582.263.1:57.012.4:577.152.1

© 2012

С. С. Степанов, Н. О. Білявська, О. К. Золотарьова

## Вплив метанолу на структуру клітин і активність каталази у *Chlamydomonas reinhardtii*

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

*Метанол у низьких концентраціях позитивно впливає на ріст автотрофної накопичувальної культури *Chlamydomonas reinhardtii*. Досліджено вплив 0,2% метанолу на ультраструктуру клітин і активність каталази *C. reinhardtii*. Встановлено, що під впливом метанолу зменшується об'єм клітин *C. reinhardtii* та парціальний об'єм хлоропластів, збільшується парціальний об'єм вакуоль, мітохондрій і пластоглобул. Додавання метанолу активує каталазу мітохондрій, що дозволяє припустити її участь у окисненні та метаболізації цього розчинника.*

Для більшості прокариотів характерною є здатність використовувати для росту одновуглецеві (або С1-) сполуки, більш відновлені, ніж  $\text{CO}_2$ . До них належать окис вуглецю (СО), метан ( $\text{CH}_4$ ), метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), формальдегід ( $\text{HCHO}$ ), мурашина кислота ( $\text{HCOOH}$ ). У більшості з цих сполук вуглець представлений у вигляді метильної групи, тому мікроорганізми, які їх використовують, дістали назву метилотрофів [1]. Метаболізація С1-сполук в цих організмах відбувається через вузькоспеціалізовані метаболічні процеси, частково локалізовані в пероксисомах, які утворюються у великих кількостях у клітинах метилотрофів за наявності екзогенного метанолу, і навпаки, зникають при вилученні метанолу із середовища культивування. Окиснення метанолу у метилотрофів супроводжується утворенням пероксиду водню, який ферментативно розкладається на воду та кисень за участю локалізованої у пероксисомах каталази [2]. В останнє десятиліття отримано докази на користь того, що клітини вищих рослин і мікроводоростей також можуть асимілювати додані екзогенно С1-сполуки — метанол і форміат [3, 4]. Зокрема, нам вдалося встановити, що одноатомний спирт метанол позитивно впливає на ріст автотрофної культури одноклітинної зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* [5]. Стимулюючий ефект цього спирту проявляється у покращенні функціонального стану фотосинтетичного апарату, збільшенні швидкості фіксації  $\text{CO}_2$  і зменшенні втрати фіксованого  $\text{CO}_2$  в циклі фотодихання. Було показано, що при культивуванні мікроводорості протягом 7 діб з додаванням 50 мМ метанолу об'єм ущільнених клітин збільшувався на 34%, тоді як середній період генерації клітин у культурі знижувався на 28% порівняно з контролем. Крім того, був виявлений стимулюючий вплив низьких

концентрації метанолу на швидкість темного дихання [5]. Біохімічні процеси, які залучені до метаболізації метанолу зеленими мікроводоростями, вивчені недостатньо [4]. Так, відомо, що мікротільця клітин *C. reinhardtii* не містять каталази та інших ферментів циклу фотодихання [6], які беруть участь в асиміляції метанолу в клітинах вищих рослин.

Наша мета полягала у визначенні ультраструктурних змін, а також проведенні цитохімічного дослідження локалізації каталази у клітинах *C. reinhardtii* за умов додавання 0,2% метанолу в порівнянні з контролем.

Одноклітинна зелена водорість *C. reinhardtii* була отримана з колекції культур мікроводоростей відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (IBASU-B-163). Накопичувальну автотрофну культуру вирощували на рідкому мінімальному поживному середовищі Кеслера [7] в колбах об'ємом 0,5 л з перемішуванням магнітною мішалкою при кімнатній температурі і цілодобовому освітленні білими флуоресцентними лампами з інтенсивністю фотосинтетично активної радіації (ФАР) на поверхні колб 100 мкмоль фотонів  $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Коли культура досягала середини експоненційної фази росту, в середовище культивування додавали 0,2% метанолу і залишали культуру на ніч. Після 15 год інкубації з метанолом культуру концентрували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 2 хв. Концентровану культуру використовували для електронно-мікроскопічного дослідження структури клітин мікроводорості та цитохімічного дослідження каталази. Достовірність різниці середніх значень між дослідом і контролем оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Для електронно-мікроскопічного дослідження використовували концентровану культуру мікроводорості *C. reinhardtii*. Клітини поміщали в середину агарових блоків. Після передфіксації у формаліні проби фіксували 2,5% глутаровим альдегідом. Після промивання здійснювали дофіксацію розчином 1% OsO<sub>4</sub>. Зневоднення і заливку в епон-аралдитну смолу проводили за стандартною методикою. Ультратонкі зрізи клітин виготовляли на ультрамікротомі LKB-V (LKB, Швеція), досліджували і фотографували у трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1300 (JEOL, Японія). Визначення розмірів клітин і підрахунок парціальних об'ємів органел та їх компонентів на зображеннях зрізів проводили за допомогою комп'ютерної програми ImageTool 3.0 (UTHSCSA, США). Визначали лінійні розміри клітин, довжину (*L*) і ширину (*W*) як найдовшу і найкоротшу вісь на зрізі клітини, а також відношення ширини до довжини у відсотках. Об'єм клітин (*V*) обчислювали за формулою об'єму еліпсоїда:

$$V = \frac{\pi W}{2} \left( \frac{L}{2} \right)^2.$$

Локалізацію каталази в клітинах *C. reinhardtii* визначали за допомогою цитохімічної реакції з 3,3'-діамінобензидин-тетрагідрохлоридом (ДАБ) ("Sigma", США). Зразки культури мікроводорості фіксували в глутаровому альдегіді, а потім розподіляли по таких варіантах інкубаційних середовищ:

- A. 20 мг ДАБ + 2 мл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 8 мл 0,1 М гліцинового буфера (повне середовище);
- B. 20 мг ДАБ + 10 мл 0,1 М гліцинового буфера (контроль без субстрату);
- C. 20 мг ДАБ + 2 мл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 8 мл 0,1 М гліцинового буфера + 3 мг азиду натрію (контроль з інгібітором каталази).

Усі варіанти інкубували в темряві при 37 °С протягом 1 год. Перед обробкою в середовищі варіанта С проби попередньо інкубували з 3 мг азиду натрію протягом 30 хв. Після

інкубації і промивок здійснювали дофіксацію 2% OsO<sub>4</sub>. Потім проводили процедури за загальною схемою підготовки зразків для електронно-мікроскопічного дослідження. Індекс електронної щільності для мітохондрій визначали за допомогою інструменту “Line profile” комп’ютерної програми ImageTool 3.0. Індекс електронної щільності мітохондрій I<sub>М</sub> вказує, яку частку від щільності матриксу мітохондрій становить різниця щільностей мітохондрій та цитоплазми (контроль без субстрату). I<sub>М</sub> обчислювали за формулою

$$I_M = \frac{\Pi_{MM} - \Pi_{цит}}{\Pi_{MM}},$$

де  $\Pi_{цит}$  — щільність цитоплазми в пікселях;  $\Pi_{MM}$  — щільність матриксу мітохондрій у пікселях.

Оскільки культуру мікрободорості вирощували при цілодобовому освітленні, то її клітини знаходились на різних стадіях життєвого циклу. Умовно клітини з несинхронізованої культури можна розділити на два типи відповідно до стадій життєвого циклу — молоді (з площею до 10 мкм<sup>2</sup>) та зрілі (більше 10 мкм<sup>2</sup>). Клітини тетрад з розірваною материнською оболонкою відносили до клітин молодого типу. Розмноження шляхом поділу спостерігали в зрілих клітинах. Старі клітини рідко зустрічалися при дослідженні культур у електронному мікроскопі, тому ми не визначали вплив метанолу на такі клітини.

Істотних якісних змін органел у молодих і зрілих клітинах, оброблених 0,2% метанолом, не було виявлено, що свідчить про відсутність пошкоджуючої дії на ультраструктуру *C. reinhardtii* концентрації метанолу, що стимулює продуктивність культури клітин.

Однак проведені нами морфометричні дослідження показали, що додавання метанолу впливало на розміри клітин *C. reinhardtii* (табл. 1). Молоді клітини реагували зменшенням довжини клітин, тоді як їх ширина не змінювалась. Зрілі клітини відповідали на метанол зменшенням як їх довжини, так і ширини. Відповідно до лінійних розмірів у молодих і зрілих дослідних клітин зменшувались їх площа і об’єм. Метанол не впливав на товщину клітинної оболонки *C. reinhardtii*. Можна припустити, що зменшення розмірів і об’єму клітин відбувається через вплив метанолу на експресію генів, що відповідають за ріст клітинної оболонки, оскільки відомо, що метанол знижує експресію гена експансину клітинної оболонки рослин [8].

Морфометричний аналіз часток клітинних компонентів показав, що метанол зумовлює збільшення парціального об’єму вакуолей молодих клітин майже у 2 рази, у зрілих клітин — у 2,3 рази (табл. 2). Збільшення вакуолей під впливом метанолу можна пояснити змінами осмотичного потенціалу таких клітин. Форміат, який утворюється при метаболізмі метанолу всередині клітини, очевидно, зумовлює підвищення осмотичного тиску, що призводить до збільшення надходження води в клітину і росту парціального об’єму вакуолей. Під впливом метанолу відбувається зменшення на 10% парціального об’єму хлоропластів зрілих клітин. Метанол не впливає на відносний об’єм компонентів хлоропластів молодих і зрілих клітин, крім пластоглобул, парціальний об’єм яких збільшується на 78% у зрілих клітинах. Відносний об’єм ядер в молодих клітинах зменшується на 27% при додаванні метанолу. Спостерігається збільшення парціального об’єму мітохондрій на 22% у молодих і на 45% у зрілих клітинах порівняно з контролем, що може свідчити про посилення активності дихання. У молодих дослідних клітин збільшується відносний об’єм цитоплазми, очевидно, за рахунок зменшення відносного об’єму хлоропласту і ядра.

Результати нашого цитохімічного дослідження локалізації каталази *C. reinhardtii* подібні до даних по інших зелених одноклітинних водоростях. Ще у 1971 р. Жиро і Жанінски

Таблиця 1. Кількісні показники *C. reinhardtii*, що належать до молодих (1) та зрілих (2) клітин

Варіант	Довжина, мкм	Ширина, мкм	Відношення W/L, %	Площа зрізу, мкм <sup>2</sup>	Об'єм, мкм <sup>3</sup>	Товщина оболонки, мкм
Контроль 1	3,77 ± 0,06 <sup>б</sup>	2,97 ± 0,04 <sup>а</sup>	79,71 ± 1,75 <sup>а</sup>	8,40 ± 0,20 <sup>б</sup>	16,67 ± 0,56 <sup>б</sup>	0,067 ± 0,002 <sup>аб</sup>
Дослід 1	3,56 ± 0,08 <sup>а</sup>	3,01 ± 0,06 <sup>а</sup>	84,86 ± 2,22 <sup>б</sup>	7,87 ± 0,25 <sup>а</sup>	15,12 ± 0,84 <sup>а</sup>	0,068 ± 0,006 <sup>а</sup>
Контроль 2	4,74 ± 0,07 <sup>г</sup>	4,08 ± 0,06 <sup>б</sup>	85,31 ± 1,36 <sup>б</sup>	14,10 ± 0,31 <sup>г</sup>	36,38 ± 1,26 <sup>г</sup>	0,061 ± 0,002 <sup>а</sup>
Дослід 2	4,42 ± 0,08 <sup>б</sup>	3,73 ± 0,06 <sup>б</sup>	84,78 ± 1,34 <sup>б</sup>	12,59 ± 0,32 <sup>б</sup>	29,12 ± 1,32 <sup>б</sup>	0,064 ± 0,004 <sup>а</sup>

Примітка. Тут і в табл. 2 різними буквами в межах однієї графи вказано відмінні значення з імовірністю  $P \leq 0,05$ .

Таблиця 2. Співвідношення парціальних об'ємів компонентів *C. reinhardtii*, що належать до молодих (1) та зрілих (2) клітин, %

Варіант	Вакуолі	Хлоропласт					Ядро	Міто- хондрії	Полі- фосфатні гранули	Цито- плазма
		Загалом	Піреноїд	Обкладка	Крохмаль	Пласто- глобули				
Контроль 1	1,23 ± 0,35 <sup>б</sup>	57,53 ± 2,25 <sup>бв</sup>	20,29 ± 1,05 <sup>аб</sup>	10,40 ± 0,72 <sup>аб</sup>	1,90 ± 0,16 <sup>а</sup>	1,42 ± 0,32 <sup>бв</sup>	16,68 ± 1,04 <sup>б</sup>	2,26 ± 0,37 <sup>а</sup>	9,50 ± 1,28 <sup>а</sup>	12,80 ± 1,96 <sup>а</sup>
Дослід 1	2,42 ± 0,28 <sup>б</sup>	54,51 ± 2,05 <sup>б</sup>	20,79 ± 1,80 <sup>аб</sup>	9,82 ± 0,69 <sup>а</sup>	2,40 ± 0,43 <sup>а</sup>	1,17 ± 0,27 <sup>б</sup>	12,17 ± 0,84 <sup>а</sup>	2,77 ± 0,51 <sup>а</sup>	8,19 ± 1,33 <sup>а</sup>	19,94 ± 1,92 <sup>б</sup>
Контроль 2	0,65 ± 0,10 <sup>а</sup>	54,21 ± 1,29 <sup>б</sup>	17,31 ± 0,79 <sup>а</sup>	8,61 ± 0,46 <sup>а</sup>	3,33 ± 0,45 <sup>б</sup>	0,74 ± 0,14 <sup>а</sup>	10,36 ± 0,64 <sup>а</sup>	2,20 ± 0,26 <sup>а</sup>	7,84 ± 0,73 <sup>а</sup>	24,74 ± 1,48 <sup>б</sup>
Дослід 2	1,48 ± 0,28 <sup>б</sup>	48,83 ± 1,44 <sup>а</sup>	18,65 ± 0,81 <sup>а</sup>	9,82 ± 0,95 <sup>а</sup>	4,19 ± 0,84 <sup>б</sup>	1,32 ± 0,25 <sup>б</sup>	11,61 ± 0,46 <sup>а</sup>	3,18 ± 0,50 <sup>б</sup>	8,11 ± 0,73 <sup>а</sup>	26,79 ± 1,39 <sup>бв</sup>

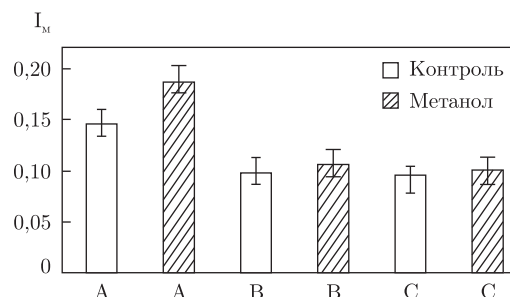


Рис. 1. Індекси електронної щільності мітохондрій у варіантах А, В і С, оброблених 0,2% метанолом, і в контролі

дійшли висновку про відсутність каталази в *C. reinhardtii*, оскільки отримали негативну реакцію на ДАБ [9]. Згодом для *C. reinhardtii* було показано наявність каталази, яка локалізувалась в основному в мітохондріях [10]. У зелених мікроводоростей на відміну від рослин цикл фотодихання є редукованим, а реакції, які у вищих рослин відбуваються в пероксисомах, локалізовані в мітохондріях. Тому ми досліджували мітохондрії, визначаючи інтенсивність забарвлення мітохондрій і цитоплазми клітин для обчислення індексу електронної щільності мітохондрій. У варіанті А після обробки ДАБ реактивом стали чіткіше помітні кристи і зовнішні мембрани мітохондрій порівняно з контрольними варіантами В і С. Також у варіанті А з додаванням метанолу виявлені везикули з чітко вираженою подвійною оболонкою і гомогенним вмістом, подібним за щільністю до такої цитоплазми. Інколи в таких везикулах можна виявити залишки мембранної системи крист мітохондрій, від яких вони, очевидно, походять.

Порівняння індексів електронної щільності мітохондрій варіантів А, В і С у контролі та при додаванні метанолу дозволяє кількісно охарактеризувати вплив метанолу на вміст каталази в мітохондріях *C. reinhardtii* (рис. 1). Наведені в діаграмі дані підтверджують локалізацію каталази в мітохондріях, оскільки індекс електронної щільності мітохондрій у варіанті А був завжди більший, ніж у контрольних варіантах В і С (див. рис. 1). Також додавання метанолу у варіанті А зумовлювало збільшення щільності мітохондрій на 28% порівняно з контролем без метанолу. Отже, метанол у концентрації 0,2% активує накопичення каталази в мітохондріях або підвищує її ферментативну активність.

Таким чином, метанол у концентрації 0,2% викликає кількісні зміни ультраструктури *C. reinhardtii*, зменшуючи розміри клітин і парціальний об'єм хлоропласта, а також збільшуючи парціальні об'єми вакуоль, мітохондрій та пластоглобул. Локалізована в мітохондріях каталаза активується метанолом, що дозволяє припустити її участь у окисненні та метаболізації цього розчинника.

1. Chistoserdova L., Kalyuzhnaya M. G., Lidstrom M. E. The Expanding World of Methylophilic Metabolism // Annu. Rev. Microbiol. – 2009. – **63**. – P. 477–499.
2. van der Klei I. J., Yurimoto H., Sakai Y. et al. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylophilic yeast // Biochem. Biophys. Acta. – 2006. – P. 1463–1462.
3. Gout E., Aubert S., Bligny R. Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies // Plant Physiol. – 2000. – **123**, No 1. – P. 287–296.
4. Navakoudis E., Ioannidis N. E., Dörnemann D. et al. Changes in the LHCII-mediated energy utilization and dissipation adjust the methanol-induced biomass increase // Biochem. Biophys. Acta. – 2007. – **1767**. – P. 948–955.
5. Stepanov S. S., Zolotareva E. K. The effect of methanol on photosynthetic activity and productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* dang. (Chlorophyta) // Int. J. Algae. – 2011. – **21**, No 2. – P. 178–190.

6. *The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes* / Ed. David B. Stern. – 2nd ed. – New York: Acad. Press, 2009. – Vol. 2. – 1004 p.
7. Bishop N. I., Senger H. Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus* // *Methods Enzymol.* – New York: Acad. Press, 1971. – **23**, Pt. A. – P. 53–66.
8. Downie A., Miyazaki S., Bohnert H. et al. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation // *Phytochemistry.* – 2004. – **65**, No 16. – P. 2305–2316.
9. Giraud G., Czaninski Y. Localisation ultrastructurale d'activités oxydasiques chez le *Chlamydomonas reinhardtii* // *C. r. Acad. Sci.* – 1971. – **273**. – P. 2500–2503.
10. Kato J., Yamahara T., Tanaka K. et al. Characterization of catalase from green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Plant Physiol.* – 1997. – **151**, No 2. – P. 262–268.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 25.10.2011

**С. С. Степанов, Н. А. Белявская, Е. К. Золотарева**

### **Влияние метанола на структуру клеток и активность каталазы у *Chlamydomonas reinhardtii***

*Метанол в низких концентрациях положительно влияет на рост автотрофной накопительной культуры *Chlamydomonas reinhardtii*. Исследовано влияние 0,2% метанола на ультраструктуру клеток и активность каталазы *C. reinhardtii*. Установлено, что под влиянием метанола снижается объем клеток *Chlamydomonas reinhardtii* и парциальный объем хлоропластов, повышается парциальный объем вакуолей, митохондрий и пластоглобул. Внесение метанола активирует каталазу митохондрий, что позволяет предположить ее участие в окислении и метаболизации этого растворителя.*

**S. S. Stepanov, N. O. Biliavs'ka, E. K. Zolotareva**

### **Methanol effects on cellular structure and catalase activity in *Chlamydomonas reinhardtii***

*Methanol at low concentrations stimulates the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* autotrophic batch culture. The aim of our study was to ascertain the methanol effects on the ultrastructure of *C. reinhardtii* and on the localization and activity levels of catalase in it. It has been shown that methanol decreases the volume of *C. reinhardtii* cells and the partial volume of chloroplasts, while it increases partial volumes of vacuoles, mitochondria, and plastoglobules. The catalase activity in mitochondria is enhanced by the methanol treatment, which allows us to suggest its involvement in the oxidation and metabolism of the solvent.*