

В. М. Мокросноп, О. В. Поліщук, О. К. Золотарьова

Функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин *Euglena gracilis* при міксотрофному культивуванні

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

Досліджено стан фотосинтетичного апарату і зміни редокс-стану пластохінонового пулу (ПХП) в міксотрофних культурах *Euglena gracilis*, вирощених фотоавтотрофно (контроль) і фотогетеротрофно з додаванням у середовище 100 мМ етанолу або 100 мМ етанолу в поєднанні з 40 мМ глутамату. Темнове відновлення ПХП, що корелює з відновленістю первинного хінонового акцептора Q_A , досліджено методом індукції флуоресценції хлорофілу *a*. Показано, що з часом темної інкубації в міксотрофних культурах *E. gracilis* відбувається поступове зниження максимального значення флуоресценції хлорофілу. Зроблено висновок, що додавання етанолу як субстрату при міксотрофному культивуванні *E. gracilis* підвищує швидкість фотосинтетичного транспорту електронів у її клітинах; після інкубації *E. gracilis* на світлі з субстратами активується темнове відновлення ПХП, що супроводжується зниженням здатності ФС2 до поглинання світлової енергії.

Ключові слова: *Euglena gracilis*, флуоресценція хлорофілу, етанол, міксотрофна культура, темнове відновлення пластохінонового пулу.

Мікроводорість *Euglena gracilis* належить до царства Протисти і має здатність як до фотосинтезу, так і до живлення за рахунок поглинання органічних субстратів із середовища існування, що є можливим як на світлі, так і в темряві [1]. Органічним джерелом енергії та вуглецю для цього організму можуть бути різноманітні сполуки, включаючи етанол, який для більшості інших мікроорганізмів є отруйним. Клітини *E. gracilis* метаболізують етанол у відносно високих концентраціях (до 1%) з активацією росту культури. Катаболізм етанолу в клітинах *E. gracilis* відбувається за участю алкоголь- та альдегіддегідрогеназ, розподілених між мітохондріями та цитоплазмою. Продуктами розщеплення молекули етанолу є дві молекули НАДН та ацетат, який є попередником ацетил-КоА [2–4]. Фізіологічними ефектами етанолу в темряві є активація клітинного дихання, запобігання втраті мітохондріальних ферментів при переведенні клітин *E. gracilis* на світлове культивування, інгібування світлоіндукованого синтезу хлоропластних ферментів, зокрема білків світлозбирального комплексу (СЗК) фотосистеми 2 (ФС2) [5–7]. Результати досліджень в цьому напрямку свідчать про високу пластичність фотосинтетичного апарату *E. gracilis*, що обумовлює здатність адаптуватись до різних метаболічних стратегій живлення [8].

Фотосинтетичний апарат *E. gracilis* має структурні та фізіологічні особливості, що відрізняють його від більшості вищих рослин та мікроводоростей. Хлоропласти *E. gracilis* хлорофітного типу, вкриті трьома оболонками. Тилакоїди в гранах групуються по 2–3, кількість хлорофілу *b* значно менша за кількість хлорофілу *a*, пігментами ксантофілового циклу є діадиноксантин та діатоксантин [9]. Вплив етанолу на стан фотосинтетичного апарату

E. gracilis, які ростуть на світлі, мало досліджений, хоча культивування *E. gracilis* за його наявності має біотехнологічне значення. Етанол прискорює синтез імуностимулюючого полісахариду парамілону, тирозину, який є попередником у синтезі вітаміну Е, накопичення повноцінного білка. Етанол значно стимулює ріст культури *E. gracilis*, особливо в комбінації з глутаматом і малатом [10].

Метою роботи був аналіз стану фотосинтетичного апарату і змін редокс-стану пластохінону в міксотрофних культурах *E. gracilis*, вирощених за наявності етанолу або суміші етанолу та глутамату.

Культура мікроводорості *Euglena gracilis* var. *bacillaris* вирощувалась 6 діб у сольовому поживному середовищі (Cramer and Myers, 1952) без перемішування та аерації при інтенсивності світла $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ та температурі $27 \text{ }^\circ\text{C}$.

На 7-му добу суспензію клітин розділяли на аліквоти по 20 мл, в кожну з яких (крім контролю) вносили субстрати: етанол (до концентрації 100 мМ) та етанол (100 мМ) з глутаматом (40 мМ).

Стан фотосинтетичного апарату клітин *E. gracilis* оцінювали за допомогою методу індукції флуоресценції хлорофілу з використанням флуорометра ХЕ-РАМ ("Walz", Німеччина). Оцінювали такі параметри флуоресценції хлорофілу *a*, як максимальний квантовий вихід ФС2 (F_v/F_m), фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP) та ефективний квантовий вихід ФС2 (Φ_{PSII}) [11]. Для оцінки вказаних параметрів зразок інкубували в темряві протягом 5 хв, після чого на фоні вимірювального світла визначали мінімальне значення флуоресценції хлорофілу (F_0), давали насичуючий спалах ($3000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), отримували максимальне значення флуоресценції хлорофілу (F_m) і вираховували F_v/F_m : $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Після насичуючого спалаху вмикали діюче світло інтенсивністю $150 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на 5 хв. Після закінчення цього часу фіксували значення F_t і знову давали насичуючий спалах, фіксували значення F'_m та вимикали діюче світло. Фіксували значення F'_0 та вираховували Φ_{PSII} : $\Phi_{PSII} = (F'_m - F_t)/F'_m$. Параметр F'_v/F'_m , квантовий вихід розділення зарядів у ФС2 на світлі (параметр Дженті), розраховували за формулою $F'_v/F'_m = \Phi_{PSII}/F_v/F_m$.

Для дослідження темного відновлення пластохінонового пулу (ПХП), що корелює з відновленістю первинного хінонового акцептора Q_A , аналізували зміни рівня F'_0 . Для індукції темного відновлення ПХП створювали аноксигенні умови, продуваючи зразок азотом 5 хв, після чого вмикали світло інтенсивністю $500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на 10 хв. Потім світло вимикали і реєстрували зміни рівня флуоресценції хлорофілу в темряві протягом 10 хв. Для оцінки зміни положення СЗК давали насичуючі спалахи з інтервалом 2 хв протягом 10 хв темної інкубації. Таким чином, отримували значення F'_m для кожного спалаху.

Фотосинтетичну активність організмів, здатних до фотосинтезу, можна встановити за параметрами флуоресценції хлорофілу *a*. Спостереження за змінами показників флуоресценції хлорофілу (Φ_{PSII} , F_v/F_m та F'_v/F'_m) дає змогу аналізувати вплив умов існування організмів на ефективність перетворення енергії світла в енергію хімічних зв'язків. Раніше ми показали, що при вирощуванні *E. gracilis* на світлі за наявності етанолу значно стимулюється клітинне дихання, що може істотно вплинути на стан фотосинтетичного апарату організму [12].

Показник Φ_{PSII} характеризує частку поглинутого світла, що використовується на фотохімічні реакції. Зміни Φ_{PSII} при фіксованій інтенсивності світла відображають зміни інтенсивності лінійного електронного транспорту в хлоропластах. У мікроводорості *E. gracilis*,

вирощеної в міксотрофних умовах, Φ_{PSII} підвищений порівняно з контролем (табл. 1). Додавання глутамату разом з етанолом сприяло збільшенню Φ_{PSII} на 58%, а одного лише етанолу — на 42% порівняно з контрольним значенням. Фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу було найбільшим у клітин, інкубованих за наявності етанолу з глутаматом, і переважало на 72% контрольний показник, тоді як в культурі з етанолом — на 48%. Таким чином, додавання як одного етанолу, так і етанолу з глутаматом позитивно вплинуло на швидкість електронного транспорту *E. gracilis*, а значить, і ефективність фотосинтезу.

Показник F_v/F_m , що характеризує максимальну ефективність розділення зарядів у ФС2, мав найбільше значення в контрольному варіанті — 0,51. У клітин *E. gracilis*, вирощених за міксотрофних умов, значення F_v/F_m були нижчими за контроль, причому при додаванні етанолу з глутаматом знижувалися до 0,46. Параметр Дженті, подібно до Φ_{PSII} , зростав за наявності етанолу, а найбільше значення спостерігалось у варіанті з додаванням етанолу з глутаматом.

Низьке значення F_v/F_m для міксотрофних культур, найімовірніше, свідчить не про пошкодження фотосинтетичного апарату, а зумовлені зміною редокс-стану ПХП у темряві. За час темної преінкубації зразків відбувається поступове відновлення ПХП, внаслідок чого підвищується мінімальний рівень флуоресценції (F'_0), що підтверджено результатами наших експериментів, наведеними нижче.

Процес темного відновлення ПХП описаний для багатьох фотосинтезуючих організмів [9, 13]. Перенесення електронів відновних еквівалентів хлоропластів на ПХП забезпечується НАДФН дегідрогеназою, яка разом з термінальною оксидоредуктазою залучена в процес хлоропластного дихання. При відсутності світла, яке збуджує ФС1, та в умовах пригнічення роботи оксидоредуктази відбувається відновлення ПХП, яке можна рееструвати за збільшенням рівня флуоресценції F'_0 .

У суспензіях клітин з етанолом або етанолом і глутаматом спостерігався підвищений рівень F'_0 порівняно з контролем (рис. 1). У перші хвилини після вимкнення діючого світла швидкість відновлення ПХП у дослідних зразках зростала, що виглядає на кривій флуоресценції як незначне підвищення, тоді як для контрольного варіанта характерною була його відсутність.

Інкубація *E. gracilis* з етанолом протягом 24 год стимулює клітинне дихання в 3 рази порівняно з автотрофним варіантом культури. У зв'язку з цим концентрація кисню в міксотрофній культурі знижується, що може впливати на рівень відновленості ПХП [12]. Генерація відновлених еквівалентів у процесі катаболізму екзогенних субстратів та транслокація їх в хлоропласти стимулює відновлення ПХП у темряві [14]. Зростання швидкості відновлення ПХП у перші хвилини після вимкнення світла може бути додатково пов'язано з більш активним утворенням НАДФН на світлі в дослідних зразках, внаслідок збільшення ефективності фотосинтезу клітин, про що свідчать наведені вище результати.

Таблиця 1. Показники флуоресценції хлорофілу культур *E. gracilis*, інкубованих 24 год на світлі за наявності етанолу, етанолу з глутаматом та при відсутності субстрату

Параметр	Контроль	Етанол	Етанол + глутамат
Φ_{PSII}	0,19 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,3 ± 0,06
F'_v/F'_m	0,37 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,64 ± 0,04
F_v/F_m	0,51 ± 0,014	0,49 ± 0,01	0,46 ± 0,02

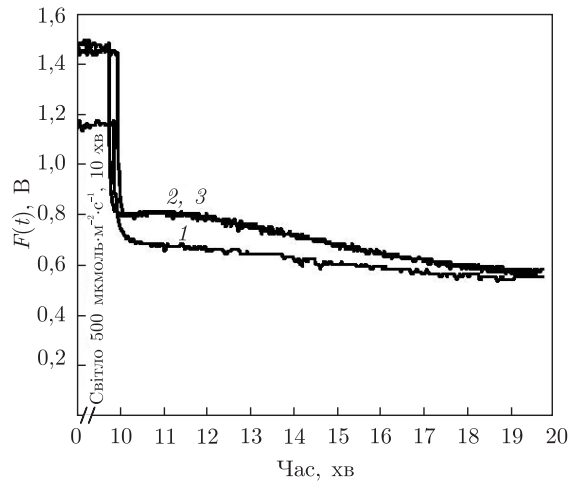


Рис. 1. Зміна показника F'_0 клітин *E. gracilis*, інкубованих 24 год за наявності етанолу та етанолу з глутаматом після вимкнення діючого світла інтенсивністю $500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. 1 — контроль; 2 — міксотрофна культура з етанолом; 3 — міксотрофна культура з етанолом і глутаматом

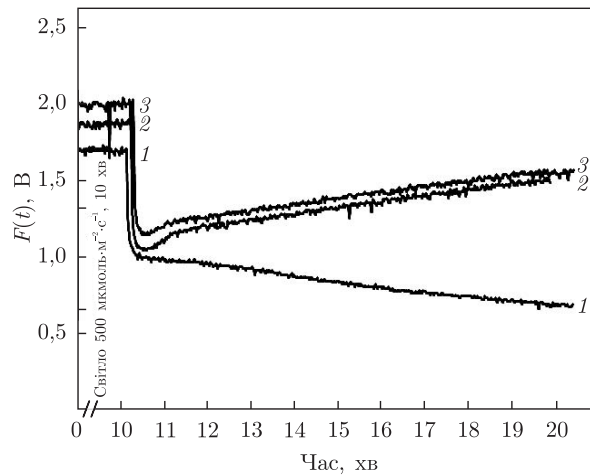


Рис. 2. Зміна показника F'_0 суспензій клітин *E. gracilis* в анаеробних умовах після вимкнення діючого світла інтенсивністю $500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. До вимірювання зразки інкубувалися 24 год за наявності етанолу та етанолу з глутаматом. 1 — контроль; 2 — міксотрофна культура з етанолом; 3 — міксотрофна культура з етанолом і глутаматом

Динаміку темного відновлення ПХП визначали за зміною F'_0 в умовах аноксії. Згідно з отриманими результатами (рис. 2), у дослідних варіантах у суспензіях *E. gracilis* відбувалося пролонговане зростання рівня флуоресценції F'_0 , яке мало найбільше значення в першу хвилину вимірювання. В контрольному варіанті рівень флуоресценції F'_0 був низьким та спадав з часом вимірювання.

Швидкість відновлення ПХП ($\Delta F'_0$) оцінювали за відношенням значень F'_0 одразу після вимкнення діючого світла та після 10 хв вимірювання: $\Delta F'_0 = (F'_{0(10 \text{ хв})} - F'_{0(1 \text{ с})}) / F'_{0(10 \text{ хв})}$. Для клітин, що інкубувалися з етанолом і глутаматом, швидкість відновлення ПХП була найбільшою і становила $0,32 \pm 0,01$, у варіанті з етанолом — $0,26 \pm 0,03$, а в контролі — $-0,35 \pm 0,07$.

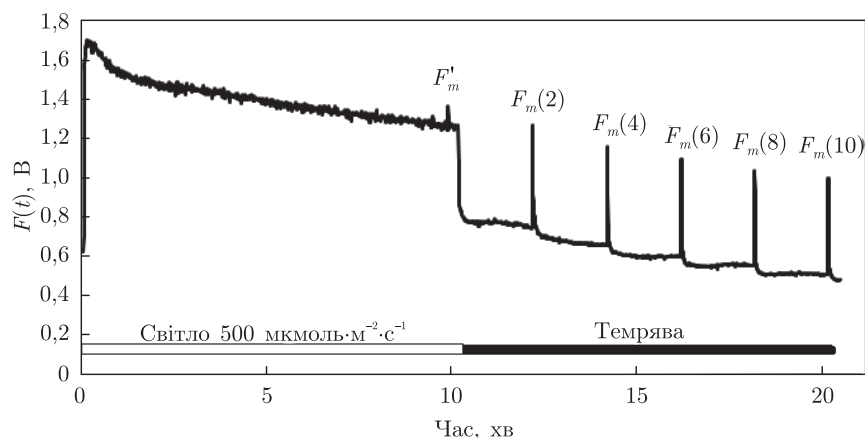


Рис. 3. Крива індукції та темнового нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу *a* клітин *E. gracilis* контрольного зразка. $F_m(2, \dots, 10)$ — максимальний рівень флуоресценції після темнового проміжку тривалістю 2, \dots , 10 хв

Таким чином, інгібування окиснення ПХП оксидоредуктазою, індуковане відсутністю O_2 , сприяло безперервному відновленню пластохінону в клітинах, що інкубувалися за наявності етанолу або етанолу з глутаматом. Це може свідчити про високий відновний потенціал таких клітин порівняно з автотрофними клітинами.

Відомо, що темнове відновлення ПХП впливає на активність ФС2 і рівень темнового нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу. На клітинах зеленої мікроводорості *Chlamydomonas reinhardtii* було показано, що додавання ацетату до поживного середовища стимулює не тільки мітохондріальне дихання клітин, але й хлоропластне. Темнове відновлення ПХП та збільшення трансмембранного градієнта рН у тилакоїдах є причиною активації процесів, спрямованих на сповільнення лінійного електронного транспорту. До таких процесів відносять функціонування віолаксантинового циклу та активацію фосфатази, яка активує переміщення СЗКП зі стану 1 у стан 2. Ці процеси зумовлюють розвиток темнового нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу у вищих рослин і більшості мікроводоростей, наприклад *C. reinhardtii* [15].

У клітинах *E. gracilis* відсутній типовий ксантофіловий цикл та типове для більшості фотосинтетичних організмів переміщення СЗКП між ФС2 і ФС1. Дослідження М. Доеге та ін. [9] свідчать про те, що діадіноксантиновий цикл не здійснює істотного внеску в розвиток швидко релаксуючого компонента нефотохімічного гасіння флуоресценції (qE), а компонент із середньою швидкістю темної релаксації (qT) не залежить від переміщення СЗКП, кількість яких у клітинах даного організму значно знижена. Перерозподіл енергії світла між фотосистемами в хлоропластах *E. gracilis* контролюється особливим пігмент-білковим комплексом, який пов'язаний з обома фотосистемами і складається з білків СЗК1 та СЗКП. Було встановлено, що флуоресценція даного комплексу, ізольованого за допомогою електрофорезу, збігається з флуоресценцією всієї клітини. Даний механізм qT залежить від активності фосфатази, а отже, і від редокс-стану ПХП [9].

Згідно з результатами дослідження впливу екзогенних джерел вуглецю на розвиток темнового нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу в міксотрофних культурах *E. gracilis* (рис. 3), з часом темної інкубації у даного організму відбувається поступове зниження максимального значення флуоресценції хлорофілу, що свідчить про

зменшення енергії світла, яка поглинається ФС2. Між дослідними зразками та контролем не було виявлено достовірної різниці у швидкості спаду максимальної флуоресценції з часом.

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що додавання етанолу при міксо-трофному культивуванні *E. gracilis* підвищує ефективність фотосинтетичного транспорту електронів; після інкубації *E. gracilis* на світлі з субстратами активується темнове відновлення ПХП.

Цитована література

1. Cook J. The cultivation and growth of *Euglena* // The Biology of *Euglena*. Vol. 1 / Ed. D.E. Buetow. – New York, London: Academic Press, 1968. – P. 243–314.
2. Ono K., Kawanaka Y., Izumi Y., Inui H., Miyatake K., Kitaoka S., Nakano Y. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis* // J. Biochem. – 1995. – **117**. – P. 1178–1182.
3. Rodriguez-Zavala J. S., Ortiz-Cruz M. A., Moreno-Sánchez R. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis* // J. Eukaryot. Microbiol. – 2006. – **53**, No 1. – P. 36–42.
4. Yaval-Sánchez B., Jasso-Chávez, Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., Rodriguez-Zavala J. S. Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis* // J. Bioenerg. Biomembr. – 2011. – **43**. – P. 519–530.
5. Garlaschi F., Garlaschi A., Lombardi A., Forti G. Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis* // Plant Sci. Lett. – 1974. – **2**. – P. 29–39.
6. Harris R., Kirk J. Control of chloroplast formation in *Euglena gracilis* // Biochem. J. – 1969. – **113**. – P. 195–205.
7. Rikin A., Schwartzbach S. Regulation by light and ethanol of the synthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II in *Euglena* // Planta. – 1989. – **178**. – P. 76–83.
8. Vannini G. Degeneration and regeneration of chloroplasts in *Euglena gracilis* grown in the presence of acetate: ultrastructural evidence // J. Cell Sci. – 1983. – **61**. – P. 413–422.
9. Doege M., Ohmann E., Tschiersch H. Chlorophyll fluorescence quenching in the alga *Euglena gracilis* // Photosynth. Res. – 2000. – **63**. – P. 159–170.
10. Rodriguez-Zavala J. S., Ortiz-Cruz M. A., Mendoza-Hernández G., Moreno-Sánchez R. Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production // J. Appl. Microbiol. – 2010. – **109**. – P. 2160–2172.
11. Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // J. Exp. Bot. – 2000. – **51**, No 345. – P. 659–668.
12. Мокросноп В. М., Поліщук О. В., Золотарьова О. К. Вплив етанолу на дихання і фотосинтез *Euglena gracilis* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 3. – С. 49–56.
13. Ekelund N. G. A., Aronsson K. A. Changes in chlorophyll a fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash // Environ. Exp. Bot. – 2007. – **59**. – P. 92–98.
14. Hoefnagel M. H. N., Atkin O. K., Wiskich J. T. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – **1366**, Iss. 3. – P. 235–255.
15. Endo T., Asada K. Dark induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell Physiol. – 1996. – **37**, No 4. – P. 551–555.

References

1. Cook J. The Biology of *Euglena*. Vol. 1 Ed. D.E. Buetow, New York, London: Academic Press, 1968: 243–314.
2. Ono K., Kawanaka Y., Izumi Y., Inui H., Miyatake K., Kitaoka S., Nakano Y. J. Biochem., 1995, **117**: 1178–1182.
3. Rodriguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Moreno-Sánchez R. J. Eukaryot. Microbiol., 2006, **53**, No 1: 36–42.
4. Yaval-Sánchez B., Jasso-Chávez, Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., Rodriguez-Zavala J.S. J. Bioenerg. Biomembr., 2011, **43**: 519–530

5. Garlaschi F., Garlaschi A., Lombardi A., Forti G. *Plant Sci. Lett.*, 1974, **2**: 29–39.
6. Harris R., Kirk J. *Biochem. J.*, 1969, **113**: 195–205.
7. Rikin A., Schwartzbach S. *Planta.*, 1989, **178**: 76–83.
8. Vannini G. *J. Cell Sci.*, 1983, **61**: 413–422.
9. Doege M., Ohmann E., Tschiersch H. *Photosynth. Res.*, 2000, **63**: 159–170.
10. Rodriguez-Zavala J. S., Ortiz-Cruz M. A., Mendoza-Hernández G., Moreno-Sánchez R. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, **109**: 2160–2172.
11. Maxwell K., Johnson G. N. *J. Exp. Bot.*, 2000, **51**, No 345: 659–668.
12. Mokrosnop V. M., Polishchuk O. V., Zolotareva O. K. *Microbiology and Biotechnology*, 2014, No 3: 49–56.
13. Ekelund N. G. A., Aronsson K. A. *Environ. Exp. Bot.*, 2007, **59**: 92–98.
14. Hoefnagel M. H. N., Atkin O. K., Wiskich J. T. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1366**, Iss. 3: 235–255.
15. Endo T., Asada K. *Plant Cell Physiol.*, 1996, **37**, No 4: 551–555.

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

Надійшло до редакції 08.07.2015

В. М. Мокросноп, А. В. Полищук, Е. К. Золотарева

Функциональное состояние фотосинтетического аппарата клеток *Euglena gracilis* при миксотрофном культивировании

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

*Исследовано состояние фотосинтетического аппарата и изменения редокс-состояния пластохинонового пула (ПХП) в миксотрофных культурах *Euglena gracilis*, выращенных фотоавтотрофно и фотогетеротрофно с добавлением в среду 100 мМ этанола или 100 мМ этанола в сочетании с 40 мМ глутамата. Темновое восстановление ПХП, коррелирующее со степенью восстановленности первичного хинонового акцептора Q_A , исследовано методом индукции флуоресценции хлорофилла а. Показано, что при темновой инкубации в миксотрофных культурах *E. gracilis* происходит постепенное снижение максимального значения флуоресценции хлорофилла. Сделан вывод, что добавление этанола в качестве субстрата при миксотрофном культивировании *E. gracilis* повышает скорость фотосинтетического транспорта электронов в ее клетках; после инкубации *E. gracilis* с субстратами на свету активизируется темновое восстановление ПХП, что сопровождается снижением способности ФС2 к поглощению световой энергии.*

Ключевые слова: *Euglena gracilis*, флуоресценция хлорофилла, этанол, миксотрофная культура, темновое восстановление пластохинонового пула.

V. M. Mokrosnop, A. V. Polishchuk, E. K. Zolotareva

The functional state of the photosynthetic apparatus of *Euglena gracilis* cells at the mixotrophic cultivation

M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

*The state of the photosynthetic apparatus and changes in the redox state of a plastoquinone pool (PQP) in mixotrophic cultures of *Euglena gracilis* grown either photoautotrophically or photoheterotrophically by adding 100 mM ethanol or 100 mM ethanol together with 40 mM glutamate in the media are studied. Dark reduction of PQP, which correlated with the reduction degree of the primary quinone acceptor Q_A , has been studied by the induction of the fluorescence of chlorophyll a.*

It is shown that, at the dark incubation, the maximum value of chlorophyll fluorescence gradually decreases in mixotrophic cultures of E. gracilis. It has been concluded that the addition of ethanol as a substrate at the mixotrophic cultivation of E. gracilis increased the rate of photosynthetic electron transport in its cells; the dark reduction of PQP was activated after the light incubation of E. gracilis with substrates and accompanied by a decrease in the ability of PS 2 to absorb the light energy.

Keywords: *Euglena gracilis*, chlorophyll fluorescence, ethanol, mixotrophic culture, dark reduction of a plastoquinone pool.