

Карбоангидразная активность и усвоение бикарбонатного иона клеток *Chlorella* и *Scenedesmus*

Севдалина Т. Аврамова*, Наталия А. Пронина**, Виктор Е. Семеновко**, Димитр И. Георгиев*, Искра С. Пешева*

* Научно-производственная лаборатория альгологии, БАН, 1113 София

** Институт физиологии растений АН СССР, Москва

В настоящее время не существует единого мнения относительно возможности усвоения фотосинтезирующими клетками водорослей бикарбонатного иона и, соответственно, выращивания этих организмов на средах с бикарбонатом в качестве источника углерода для фотосинтеза. Поскольку клеточные мембраны не проницаемы для HCO_3^- -иона, а в реакциях карбоксилирования рибулозодифосфата с участием рибулозодифосфаткарбоксилазы может использоваться в качестве субстрата только CO_2 , в фотосинтезирующих клетках для усвоения бикарбоната должны существовать также определенные биохимические механизмы транспорта и превращения его в углекислоту. Хотя эти механизмы остаются неясными, различные авторы (Чернядьев и др., 1975; Findenegg, 1976, 1979) предполагают участие в усвоении HCO_3^- фермента карбоангидразы, который, катализируя реакции гидратации \rightleftharpoons дегидратации CO_2 , может при определенной локализации в клетке и соответствующих значениях pH в клеточных компартаментах обеспечить усвоение углерода из бикарбоната (Findenegg, 1979; Пронина и др., 1981).

Известно, что карбоангидразная активность в клетках водорослей существенным образом изменяется в зависимости от обеспеченности клеток углекислотой, повышаясь, в частности, при снижении концентрации CO_2 , что может указывать на участие этого фермента в реакциях биохимической адаптации фотосинтезирующих клеток к условиям углеродного питания (Raven, 1970; Graham, Reed, 1971; Findenegg, 1979; Пронина и др., 1981). Показано, кроме того, что карбоангидраза в клетках водорослей представлена различными формами, проявление и активность которых в клетках в различной степени изменяются в зависимости от условий выращивания культур (Семеновко и др., 1977; Пронина и др., 1981).

В настоящей работе представлены результаты исследования продуктивности водорослей по накоплению сухой биомассы и интенсивности фотосинтеза по включению ^{14}C , динамики карбоангидразной активности в бесклеточном гомогенате и в отдельных его фракциях, а также в интактных клетках *Chlorella* и *Scenedesmus* во время адаптации водорослей к низким концентрациям CO_2 и к бикарбонатному иону с целью выяснения механизмов усвоения водорослями бикарбоната и возможности эффективного выращивания их на средах с этим соединением.

Материалы и методы

Объектом исследования служили одноклеточные водоросли *Scenedesmus acutus* Meyen штамм Tomaselli-8, *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* Beijer. штамм С-3 и *Chlorella* sp. (контрольная культура).

Водоросли выращивали в установке, описанной ранее (Д и л о в и др., 1972) в условиях периодической смены света и темноты. Длительность светового периода составляла 8 ч, темнового — 16 ч. Интенсивность света — 8000 лх. Во время светового периода температуру поддерживали на уровне 30°C , а во время темнового — на $22-24^\circ\text{C}$. Культуры выращивали на минеральной питательной среде следующего состава (mg/dm^3): NH_4NO_3 — 320; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 395,2; KH_2PO_4 — 136; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 5,62; H_3BO_3 — 1,24; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 4,38; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,45; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,58; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,48; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,56; NaVO_3 — 0,24; NaHCO_3 — 1000.

Обеспечение водорослей углекислотой во время светового периода осуществлялось посредством продувания культур 100 dm^3 газовой смеси с 2% CO_2 на 1 dm^3 суспензии в час. Во время темнового периода культуры барботировали обычным воздухом; рН культуры поддерживалось на уровне 6,5—7,0.

Плотность культур в начале каждого светового периода была $0,8 \text{ mg/cm}^3$ сухого вещества и поддерживалась на этом уровне путем разбавления свежей питательной средой в конце каждого периода освещения.

Схема проведения опытов была следующей. Контрольные культуры выращивали в описанных выше условиях. Опытные культуры за 3 часа до окончания светового периода переводили на барботаж обычным воздухом (0,03% CO_2), после чего в суспензию вносили бикарбонат натрия — 4 g/dm^3 (конечная концентрация 5 g/dm^3) и продолжали в дальнейшем культивирование водорослей в этих условиях, при барботировании их обычным воздухом. Поддерживали рН опытных культур на уровне 9,1—9,5, периодически (2—3 раза в течение светового периода) корректируя его путем продувания культур в течение 10—15 с чистой углекислотой при выключенном свете.

Плотность опытных культур поддерживалась на таком же уровне, как и в контроле, но разбавляли их средой, содержащей 5 g/dm^3 бикарбоната натрия.

Гомогенизацию клеток водорослей, измерение карбоангидразной активности в бесклеточном гомогенате и в отдельных его фракциях, а также в интактных клетках проводили по методике, описанной ранее (С е м е н е н к о и др., 1977).

Интенсивность фотосинтеза определяли по включению ^{14}C из $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ при рН 9,1 по методу, описанному Георгиевым и др. (Г е о р г и е в et al., 1972).

Результаты и обсуждение

Ранее Г е о р г и е в ы м и др. (1977) была показана способность *Scenedesmus acutus* Meyen штамма Tomaselli-8 к росту на среде с бикарбонатом в отсутствие CO_2 . При этом продуктивность культуры (прирост сухой биомассы) после 3-суточной адаптации становилась такой же, как продуктивность ее при росте на насыщающих концентрациях CO_2 .

Настоящее исследование показало, что адаптационный период может быть сокращен, если *Scenedesmus acutus* предварительно адаптировать в течение 3 ч к низкой (0,03%) концентрации CO_2 .

Как видно из рис. 1, при выращивании на среде с бикарбонатом адаптированных к низкой концентрации CO_2 клеток *Scenedesmus* прирост их сухой биомассы выравнивается с контролем уже в первые сутки. Поскольку прирост биомассы при 0,03% CO_2 составляет всего лишь 15—20% от продук-

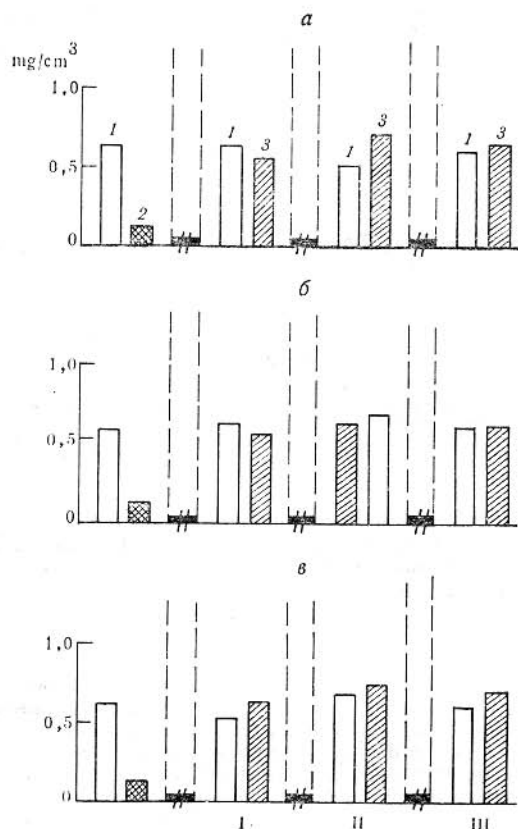


Рис. 1. Продуктивность *Scenedesmus acutus* (а), *Chlorella* sp. (б) и *Ch. vulgaris* var. *vulgaris* (в) при выращивании на 2% CO_2 (1), 0,03% CO_2 (2) и 0,03% $\text{CO}_2 + \text{NaHCO}_3$ (3). I, II и III — соответственно первый, второй и третий день роста; пунктиром выделены темновые (16 h) и световые (8 h) периоды

тивности в контроле, а внесение в среду бикарбоната компенсирует недостаток CO_2 , можно думать, что адаптированные клетки *Scenedesmus* способны усваивать углерод из бикарбоната. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в последнее время для *Scenedesmus* другими авторами (Findenegg, 1980; Miller, Colman, 1980; Radmer, Ollinger, 1980), которые также предполагают возможность выращивания водорослей на бикарбонатных средах путем фотосинтетического усвоения бикарбонатного иона.

Наши исследования показывают, что такая же возможность существует и для *Chlorella*. Как видно из рис. 1—б, адаптированные к низким концентрациям CO_2 клетки *Chlorella* дают такие же приросты сухой биомассы на среде с бикарбонатом, как и в контроле. Это качество не определяется специ-

кой отдельного штамма, потому что исследования были проведены с двумя различающимися по своим физиологическим характеристикам культурами хлореллы, а именно *Chlorella* sp. (контрольная) (рис. 1—б) и *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* штамм С-3 (рис. 1—в).

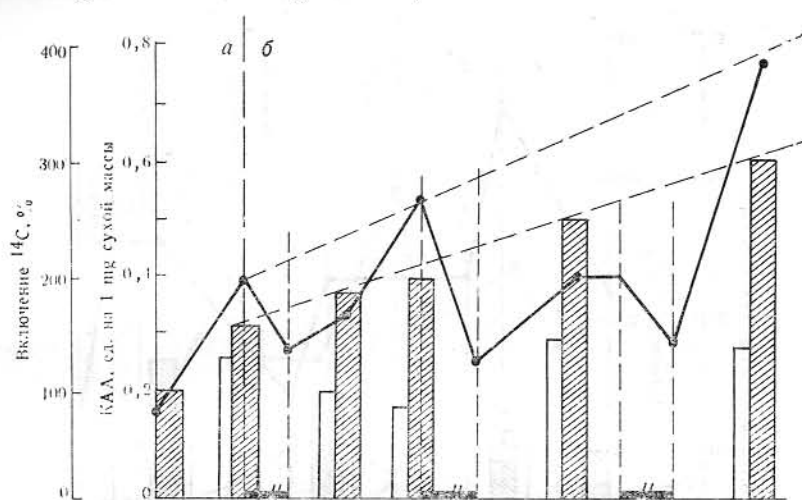


Рис. 2. Изменение карбоангидразной активности и интенсивности фотосинтеза *Scenedesmus acutus* Meyen штамм Tomaselli-8 при адаптации клеток к 0,03% CO_2 и HCO_3^-

а — трехчасовая адаптация к 0,03% CO_2 ; б — выращивание на бикарбонатной среде; пунктиром выделены темновые (16 h) и световые (8 h) периоды; заштрихованные столбики показывают интенсивность фотосинтеза адаптированных к бикарбонату клеток, а белые — неадаптированных

Как отмечалось выше, реакция взаимопревращения форм углерода $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ катализируется ферментом карбоангидраза. Доказано, что при снижении концентрации CO_2 карбоангидразная активность в клетках разных водорослей возрастает (Raven, 1970; Graham, Reed, 1971; Findenegg, 1979; Пронина и др., 1981), что различные авторы связывают с участием этого фермента в процессах транспорта углекислоты к центрам карбоксилирования в условиях, когда возрастает диффузионное сопротивление CO_2 . Действительно, как видно из рис. 2, в клетках *Scenedesmus* наблюдается возрастание карбоангидразной активности не только при переводе их на низкие концентрации CO_2 (рис. 2 — а), но и в последующие световые периоды роста культуры на среде с бикарбонатом (рис. 2 — б). При этом активность карбоангидразы в темновые периоды снижается и снова возрастает на свету. Можно было бы думать, что это увеличение карбоангидразной активности в световые периоды связано с прохождением клеточных циклов. Однако, как видно из этого рисунка, максимальный уровень карбоангидразной активности при длительном пребывании клеток на среде с бикарбонатом постепенно возрастает. Это свидетельствует, очевидно, что наблюдающиеся изменения обусловлены не только онтогенетическими процессами, но и постепенной адаптацией клеток именно к усвоению бикарбоната. Еще более убедительно об этом говорят результаты прямого измерения скорости ассимиляции ^{14}C из бикарбоната. Как видно из рисунка, адаптированные клетки на бикарбонате почти в два раза более интенсивно ассимилируют ^{14}C из бикарбоната, чем неадаптированные клетки. Существенно при этом, что у *Scenedesmus* наблюдается постепенное возрастание фотосин-

тетической ассимиляции углерода, которое достаточно близко коррелирует с отмеченным выше возрастанием максимальных значений карбоангидразной активности. Описанные закономерности изменения активности фермента и фотосинтетической ассимиляции углерода из бикарбоната указы-

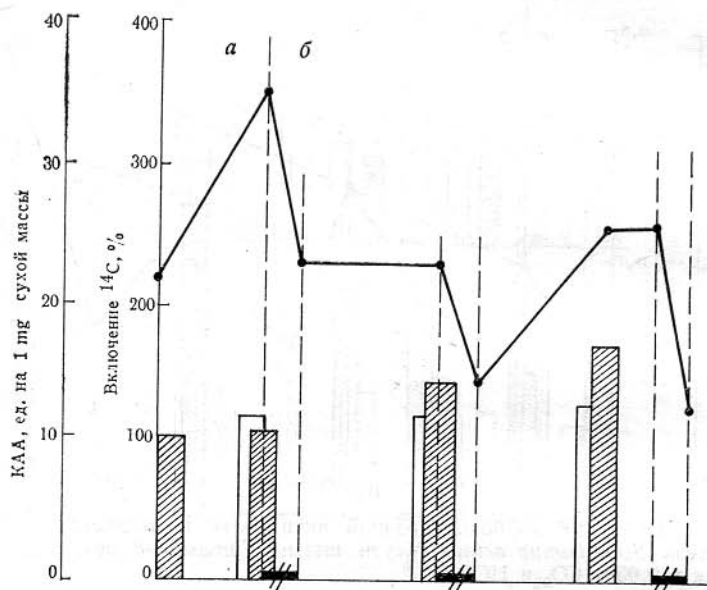


Рис. 3. Изменение карбоангидразной активности и интенсивности фотосинтеза *Chlorella vulgaris* штамм С-3 при адаптации клеток к 0,03% CO₂ и HCO₃⁻. Обозначения, как на рис. 2.

вают на участие карбоангидразы в механизмах адаптации клеток *Scenedesmus* к усвоению бикарбоната.

У адаптированных к бикарбонату клеток *Chlorella* (рис. 3) также наблюдается возрастание активности ассимиляции углерода из NaH¹⁴CO₃ по сравнению с неадаптированными, хотя и не в такой степени, как у *Scenedesmus*. Карбоангидразная активность у *Chlorella*, так же как у *Scenedesmus*, возрастает в период адаптации к низкой концентрации CO₂ (рис. 3 — а), которое, вероятно, связано с адаптацией ферментных систем, ответственных за активацию транспорта CO₂ в клетке в условиях высоких диффузионных сопротивлений. Наблюдаются такие же падения активности фермента в темновые периоды. Однако уровень карбоангидразной активности в световых периодах практически не изменяется при выращивании культуры на среде с бикарбонатом и имеет такое же значение, как и у контрольной культуры. Это, возможно, обусловлено тем, что клеткам *Chlorella* в отличие от *Scenedesmus* свойственна (даже при насыщающих фотосинтез концентрациях CO₂) существенно более высокая активность карбоангидразы (Семенов и др., 1977), что и может определять способность хлореллы к росту на бикарбонатной среде.

Ранее нами было показано, что карбоангидраза в клетках водорослей представлена разными формами фермента — мембранносвязанной и растворимой. При этом существенные различия обнаружены в распределении карбоангидразной активности в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus*. При насыщаю-

щей концентрации CO_2 у *Chlorella* вся карбоангидраза представлена мембранно-связанной формой, а у *Scenedesmus* — растворимой формой фермента (Семеновко и др., 1977, 1979). При снижении концентрации CO_2 в клетках *Chlorella* синтезируется растворимая карбоангидраза, а у *Scenedesmus*

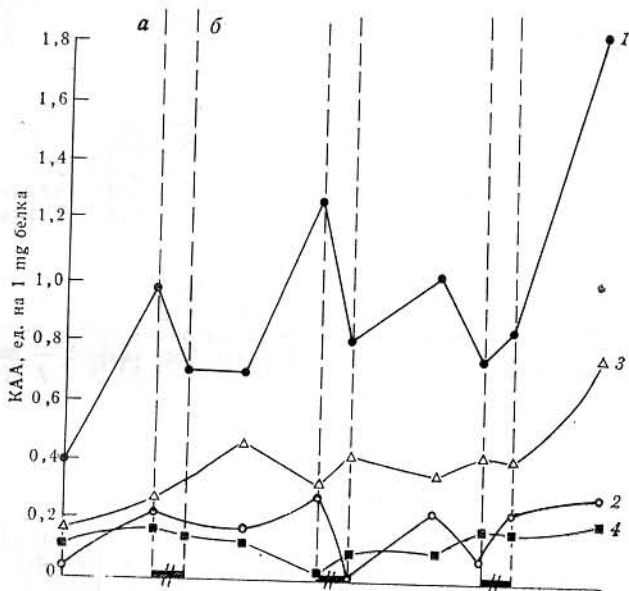


Рис. 4. Динамика карбоангидразной активности клеток *Scenedesmus acutus* в бесклеточном гомогенате (1), нерастворимых клеточных компонентах (2), растворимых белках (3) и интактных клетках (4) при адаптации их к 0,03% CO_2 и HCO_3^-

а — трехчасовая адаптация к 0,03% CO_2 ; б — выращивание на бикарбонатной среде

mus — мембранно-связанная. Учитывая это, при изучении механизмов адаптации клеток водорослей к ассимиляции бикарбоната представляет интерес выяснить поведение отдельных форм фермента.

На рис. 4 представлены данные, характеризующие динамику изменения карбоангидразной активности в бесклеточном гомогенате и в отдельных его фракциях при адаптивных перестройках клеток *Scenedesmus* к низкой концентрации CO_2 (рис. 4 — а) и к бикарбонатному иону (рис. 4 — б). Как видно из этого рисунка, рассчитанная на 1 мг белка карбоангидразная активность в суммарном гомогенате имеет такой же характер изменений, как и при расчете на единицу сухого веса (рис. 2). Наблюдаются такие же возрастания активности при снижении концентрации CO_2 и в световые периоды адаптации к бикарбонатному иону. Отчетливо видно также возрастание максимальных значений карбоангидразной активности от начала к концу опыта. Активность мембранно-связанной и растворимой форм карбоангидразы, так же как и карбоангидразная активность интактных клеток, следует общему ходу изменений активности фермента в суммарном гомогенате. Обращает на себя внимание при этом то, что мембранно-связанная форма карбоангидразы, появляющаяся в клетках *Scenedesmus* при снижении концентрации CO_2 (рис. 4 — а), сохраняется и постепенно повышается в период адаптации к усвоению бикарбонатного иона.

У *Chlorella* штамм С-3 в отличие от *Scenedesmus* наблюдается (рис. 5) появление растворимой формы фермента, активность которого в период адаптации к усвоению бикарбоната (рис. 5 — б) несколько возрастает, несмотря на то, что суммарная карбоангидразная активность в гомогенате

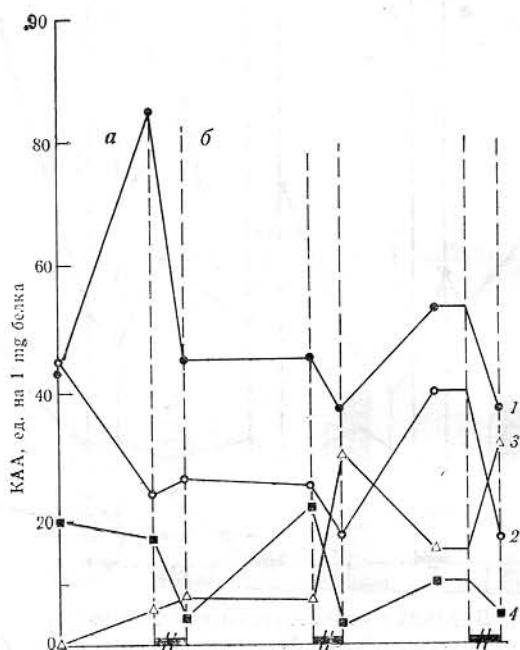


Рис. 5. Динамика карбоангидразной активности клеток *Chlorella vulgaris* штамм С-3 при адаптации их к 0,03% CO_2 и HCO_3^- . Обозначения, как на рис. 4

остается практически на одном и том же высоком уровне, который более чем в 10 раз выше, чем у *Scenedesmus*. Можно думать, что интактные клетки *Chlorella*, имеющие высокую карбоангидразную активность, способны катализировать процесс образования CO_2 из HCO_3^- в среде. Тогда карбоангидраза, катализируя взаимобратимость $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ на поверхности клетки, может обеспечить достаточным количеством CO_2 -субстрата клетку, что не требует перестройки в ее ферментных системах.

Существенно отметить при этом, что ведущим (индуцирующим) фактором в адаптации клеток водорослей является, очевидно, не HCO_3^- -ион, а недостаток CO_2 . Как видно из рис. 4 и 5, необходимый для усвоения бикарбонатного иона ансамбль ферментных форм формируется уже при снижении концентрации CO_2 . И в дальнейшем при выращивании клеток на бикарбонате этот комплекс форм карбоангидразы сохраняется.

Таким образом, полученные результаты показывают, что продуктивность культур *Chlorella* и *Scenedesmus* на бикарбонате может достигать таких же величин, как и при использовании CO_2 . Необходимо напомнить, что в описанных опытах выращивание водорослей проводили при интенсивности света 8000 lx. При такой освещенности клеток снабжение их углеродом из бикарбоната было достаточным для фотосинтеза. Вместе с тем возможно,

что при больших интенсивностях света снабжение углеродом из бикарбоната может оказаться недостаточным, что требует дополнительных исследований.

Л и т е р а т у р а

- Георгиев, Д., С. Аврамова, Н. Николов. 1977. Фотосинтетично използване на бикарбонатния йон при интензивно култивиране на *Scenedesmus acutus*. — Раст. науки, XI, № 8, 38—45.
- Дилов, Хр., М. Божкова, Ст. Стаев. 1972. Практически блок для култивирования микроводорослей в лабораторных условиях. — Докл. Акад. с.-х. наук (Болгария), 4, № 2, 169—175.
- Семеновко, В. Е., С. Аврамова, Д. Георгиев, Н. А. Пронина. 1977. Сравнительное изучение активности и локализации карбоангидразы в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus*. — Физиол. растений, 24, № 5, 1055—1059.
- Семеновко, В. Е., С. Аврамова, Д. Георгиев, Н. А. Пронина. 1979. О световой зависимости карбоангидразной активности клеток *Chlorella* и *Scenedesmus*. — Физиол. растений, 26, № 5, 1069—1075.
- Пронина, Н. А., С. Аврамова, Д. Георгиев, В. Е. Семеновко. 1981. Динамика карбоангидразной активности *Chlorella* и *Scenedesmus* при адаптации клеток к свету высокой интенсивности и к низкой концентрации CO_2 . — Физиол. растений, 28, № 1, 43—52.
- Чернядьев, И. И., И. В. Терехова, Ю. М. Комарова, Н. Г. Доман, О. И. Горонкова, О. Н. Альбицкая. 1975. Об участии карбоангидразы в фотосинтезе. — Докл. АН СССР, 223, № 2, 501—503.
- Findenegg, G. R. 1976. Correlation between accessibility of carboanhydrase for external substrate and regulation of photosynthetic use of CO_2 and HCO_3^- by *Scenedesmus obliquus*. — Z. Pflanzenphysiol., 79, 428—437.
- Findenegg, G. R. 1979. Inorganic carbon transport in microalgae. I. Location of carbonic anhydrase and $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$ exchange. — Plant Sci. Letters, 17, 101—108.
- Findenegg, G. R. 1980. Inorganic carbon transport in microalgae. II. Uptake of HCO_3^- ions during photosynthesis of five microalgae species. — Plant Sci. Letters, 18, 289—297.
- Georgiev, D., Ch. Dilov, R. Hristova. 1972. Effect of light and temperature on radioactive carbon ^{14}C released from *Scenedesmus acutus* in a nutrient medium. — C. R. Acad. Agric. (Bulgaria), 5, 151—154.
- Graham, D., M. L. Reed. 1971. Carbonic anhydrase and the regulation of photosynthesis. — Nat. New Biol., 231, 81—83.
- Miller, G., B. Colman. 1980. Evidence for HCO_3^- transport by the blue green alga (*Cyanobacterium*) *Coccochloris penicostis*. — Plant Physiol., 65, 397—402.
- Radmer, R., O. Ollinger. 1980. Light driven uptake of oxygen carbon dioxide and bicarbonate by green alga *Scenedesmus*. — Plant Physiol., 65, 723—729.
- Raven, J. A. 1970. Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. — Biol. Rev., 45, 167—221.

Поступила 15. IV. 1982 г.