

---

---

**В.В. ПОДОРВАНОВ, О.А. ЛАЗАРЕНКО, О.Ф. ТЕРЕЩЕНКО**

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ 01001  
*membrana@ukr.net*

## **ВПЛИВ ІНГІБИТОРІВ КАРБОАНГІДРАЗИ НА РІСТ І ПІГМЕНТНИЙ СКЛАД СИНЬОЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЕЙ**

*К л ю ч о в і с л о в а: синьозелені водорості, ацетозоламід, етоксизоламід, карбоангідраза*

V.V. PODORVANOV, A.A. LAZARENKO, A.F. TERESCHENKO

M.G. Kholodny Institute of botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

### **THE EFFECT OF CARBOANGYDRASE INHIBITORS ON THE GROWS AND PIGMENT COMPOSITION OF CYANOBACTERIA**

The effect of carboanhydrase inhibitors acetozolamide (AZ) and ethoxyzolamide (EZ) on the grows and pigment composition of photosynthetic apparatus of cyanobacteria (*Spirulina platensis* (Norst) Geitl. and *Nostoc linckia* (Roth.) Born. et Flash.) was studied. It was established that both inhibitors had no effect on biomass production by *Spirulina platensis* and on content of chlorophyll  $\alpha$  and carotenoids. But biomass production by two strains *Nostoc linckia*, which was found at two opposite slopes of «Evolution Canyon», Mount Carmel Natural Oren, Israel, microclimate of which is very different, was depressed in some extent by 0.1 mM AZ and fully depressed by 0.5 mM EZ. After addition of this inhibitors to the growth medium the content in both strains was greatly altered. There were some differences in the sensitivity of these *Nostoc linckia* strains to carboanhydrase inhibitors. The mechanisms of these inhibitors action are discussed.

*К e y w o r d s: cyanobacteria, acetozolamide, ethoxyzolamide, carboanhydrase*

**В.В. ПОДОРВАНОВ, А.А. ЛАЗАРЕНКО, А.Ф. ТЕРЕЩЕНКО**

Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України, г. Київ

### **ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ КАРБОАНГИДРАЗЫ НА РОСТ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ**

Изучено влияние ацетозоламида (АзА) и этоксизоламида (ЭзА) на рост синезеленых водорослей и пигментный состав фотосинтетического аппарата. Установлено, что эти ингибиторы достоверно не влияют на накопление биомассы и содержание хлорофилла  $\alpha$  и каротиноидов у *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl. В тоже время, накопление биомассы двумя штаммами *Nostoc linckia* (Roth.) Born. et Flash., выделенными из почвы противоположных склонов «Эволюционного Каньона» природного заповедника Маунт Кармель (Израиль), которые существенно отличаются климатическими условиями, в определенной степени угнетается АзА 0,1 мМ и полностью подавляется 0,5 мМ ЭзА. Внесение в среду указанных ингибиторов сильно изменяло пигментный аппарат обоих штаммов. Отмечена разная чувствительность штаммов *Nostoc linckia* к ингибиторам карбоангидразы. Обсуждаются механизмы действия исследованных ингибиторов.

*К л ю ч е в ы е с л о в а: синезеленые водоросли, ацетозоламід, етоксизоламід, карбоангідраза*

© В.В. ПОДОРВАНОВ, О.А. ЛАЗАРЕНКО, О.Ф. ТЕРЕЩЕНКО, 2006

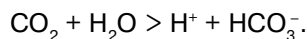
## Вступ

Відомо, що клітини різних мікроводоростей здатні накопичувати неорганічний вуглець ( $C_H$ ,  $CO_2 + HCO_3^-$ ) у концентраціях, яка перевищує таку в навколишньому середовищі в сотні разів, що особливо детально вивчено у зелених мікроводоростей.

Із використанням цієї групи водоростей було показано, що в утилізації  $C_H$  з довкілля під час фотосинтезу беруть участь різні форми карбоангідрази (КА). Передусім це стосується клітин, які ростуть в умовах обмеженого надходження  $C_H$  і мають механізм накопичення  $CO_2$ , що ґрунтується на активному транспорті  $C_H$  через плазматичну мембрану та оболонку хлоропластів [4, 12, 13,].

Це зворотна реакція взаємоперетворення двох основних форм  $C_H$  відбувається й за відсутності ферменту, проте в останньому разі для встановлення рівноваги необхідний більший проміжок часу, який може досягати декількох секунд. Відомо, що КА є одним з найактивніших серед відомих ферментів [3, 6]. Так, реакція гідратації  $CO_2$  при 25 °C характеризується числом обертів близько  $10^6 \text{ c}^{-1}$ , тобто рівновага встановлюється практично миттєво. Локалізація внутрішньоклітинної активності КА, представлена розчинами і мембранозв'язаними формами, варіює залежно від виду водоростей [3, 6]. Крім того, існує і зовнішня периплазматична активність КА, особливо у клітин, що виростили за умов обмеженого надходження  $C_H$  [3, 6]. Зовнішня КА, очевидно, бере участь у перетворенні  $HCO_3^-$  в  $CO_2$ , що використовується рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксілазою (РидФК). Це особливо важливо для клітин, здатних активно накопичувати  $C_H$ . Останній, незалежно від форми, в якій він міститься у середовищі, доставляється у клітину переносником у вигляді  $HCO_3^-$  [5, 6].

Менш з'ясованою є участь КА в накопиченні та утилізації  $C_H$  у синьо-зелених водоростей, у яких активний транспорт показаний і для  $CO_2$ , і для  $HCO_3^-$  [7, 14, 15]. Кінетичні характеристики залежності швидкості фотосинтезу від внутрішньоклітинної концентрації  $C_H$  засвідчують, що незалежно від форми, в якій він вноситься до середовища, на внутрішньому боці плазмалеми виявляється лише  $HCO_3^-$  [5, 6]. Це свідчить на користь того, що мембранні транспортні білки, вірогідно, відіграють роль векторної КА. Даний фермент прискорює реакцію гідратації  $CO_2$  з утворенням іона бікарбонату:



У цілому КА активність у синьозелених водоростей більш низька та варіабельна. Зауважимо, що у них не виявлено локалізації периплазматичної активності цього ферменту [7]. Проте встановлена досить низька КА активність у гомогенатах клітин синьозелених водоростей, культивованих за лімітованих рівнях  $C_H$ . Як і в зелених водоростей, у клітинах синьозелених КА активність залежно від виду представлена також розчинними та мембранозв'язаними формами. Деякі автори [8] вважають, що у клітин *Oscillatoria* sp., вирощених за умов постачання культури додатковою кількістю  $CO_2$ , КА активність локалізувалася в цитоплазмі клітин. У

гомогенатах двох штамів *Anabena variabilis* 50—70% КА активності проявлялася як мембранозв'язана, тоді як один із штамів мав лише повністю розчинні форми [19]. У *Chlorogoeopsis fritschii* Ленерас та співр. також виявили КА активність, яка майже на 90% була мембранозв'язаною [10]. Рівень активності КА в гомогенатах клітин синьозелених водоростей, вирощених за обмеженого доступу  $C_H$ , варіювала в межах 0,8-30 од/г білка залежно від виду водоростей [6-10], проте у деяких штамів *Anabena variabilis* і *Anacystis nidulans* КА активності взагалі не виявлено [9]. Виділено два мутанти *A. nidulans*, які потребують для росту високого рівня  $CO_2$ , накопичують  $C_H$ , але не здатні утилізувати його для фотосинтетичної фіксації. Це наводить на думку, що в даному разі має місце блокування перетворення форм  $C_H$  [11]. Можливо, загальноприйняті на той час методи визначення активності КА не дали змоги виявити її активність як у мутантів, так і у диких штамів. Подібні результати отримані й для штаму *A. nidulans* [7].

Використання методів мас-спектроскопії значно збільшило чутливість визначення дуже низьких рівнів активності КА у синьозелених водоростей, що дозволило чітко встановити наявність у них цього ферменту [6, 14, 15]. На підставі інгібування транспорту  $C_H$  у синьозелених водоростей інгібітором КА етоксизоламідом (ЕЗА) було зроблено припущення, що дегідровання  $HCO_3^-$  та регідровання  $CO_2$  є послідовним етапом його транспорту, що наводить на думку про існування загального переносника для субстратів [6]. Проте, з іншого боку, вплив натрію на транспорт  $CO_2$  і  $HCO_3^-$  передбачає існування окремих шляхів доставки цих форм  $C_H$  у клітину [14].

У зв'язку із низькою активністю карбоангідрази у синьозелених водоростей одним з найважливіших підходів до вивчення її ролі в життєдіяльності клітин є використання інгібіторів цього ферменту — сульфонамідів для впливу як на активний транспорт  $C_H$ , так і на ряд пов'язаних з ним процесів [16].

Метою даного дослідження було вивчення впливу інгібіторів карбоангідрази ацетозолаїмду і ЕЗА на нагромадження біомаси та пігментний склад у представників *Cyanophyta* — *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl. і *Nostoc linckia* (Roth.) Born. et Flash. Слід зазначити, що транспорту  $C_H$  у *S. platensis* присвячена лише одна праця Каплана [9], а у видів *Nostoc* це питання взагалі не вивчалось.

### Матеріали і методика досліджень

Об'єктами досліджень були альгологічно чисті культури синьозелених водоростей *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl., штам 26, із колекції культур відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України та *Nostoc linckia* (Roth.) Born. et Flash. штамми В 85 і В 86, виділені із двох протилежних схилів «Еволюційного Каньйону» у природному заповіднику Маунт Кармель, Ізраїль (Nahal Oren, Mount Carnel, Israel) О.М.Виноградовою зі співавторами [18] у відділі спорових рослин Інституту ботаніки. Штам В 86, знайдений на північному схилі «Еволюційного

Каньйону», що характеризувався високою інсоляцією, сухістю і мінливістю мікроклімату, був визначений авторами як *N. linckia* (Roth.) Born. et Flash. in sensu Elenk. f. *calciola* (Breb.) Elenk., а штам В 85, зібраний на південному схилі, для якого характерний більш м'який мікроклімат — як *N. linckia* (Roth.) Born. et Flash. in sensu Elenk. f. *muscorum* (Breb.) Elenk. [18].

*Spirulina platensis* вирощували на стандартному середовищі Зарука [2], два штами *N. linckia* — на середовищі Фітцджеральда № 11 [17]. Інокуляцію проводили в стерильних умовах; культури вирощували у люміностахах у колбах Ерленмейера ємністю 0,5 л. Інтенсивність освітлення досягала 2,5 тис. лк за режиму 12—12 (світло—темрява) і температури 25—27 °С.

Інгібітори АзА і ЕзА, які характеризуються різною розчинністю у ліпідах, вносили в культуральне середовище в концентраціях 0,05—0,5 мМ.

Матеріал для аналізів відбирали через 20 діб з моменту культивування водоростей шляхом центрифугування живильного середовища (3 тис. г) протягом 15 хв. з наступним 2—3-кратним відмиванням культури водоростей дистильованою водою. Вміст хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів визначали в ацетоновому екстракті водоростей на спектрофотометрі СФД-46 та розраховували за формулою Хольма—Веттштейна [1].

Біомасу у пробах визначали ваговим методом. Проведено дві серії експериментів з 6-кратною повторністю.

### Результати досліджень та їх обговорення

Визначена активність КА у вказаних штамів під впливом різних концентрацій двох інгібіторів, зокрема ацетозоламідів і етоксизоламідів, на ріст синьозелених водоростей та пігментний склад.

На рис. 1 представлені результати вивчення біомаси культури *S. platensis*, яка виросла у присутності АзА та ЕзА, на 20-ту добу культивування. Виявлена значна подібність кривих росту культури під дією обох інгібіторів, проте кількість біомаси під впливом ЕзА була дещо нижчою порівняно з варіантом АзА. Як видно на рис. 1, жоден із використаних інгібіторів в концентраціях 0,05—0,5 мМ суттєво не пригнічував нагромадження біомаси даної водорості. Слід відзначити певне підвищення приросту біомаси в разі використання низьких концентрацій АзА. Відсутність суттєвого інгібування ростових процесів культури *S. platensis* пояснюється, можливо, низькою КА активністю клітин спіруліни. Це може бути пов'язане з високою концентрацією  $C_H$  у середовищі культивування. З іншого боку, особливості будови клітинної оболонки *S. platensis* також можуть перешкоджати надходженню використаних інгібіторів в клітини водорості. Враховуючи вищу розчинність ЕзА порівнянню з АзА можна припустити, що він легше зв'язується з плазматичною мембраною і проникає усередину клітини.

АзА і ЕзА у концентраціях 0,05 — 0,5 мМ суттєво не впливали на вміст хлорофілу  $a$  і каротиноїдів у клітинах *S. platensis* (рис. 2). Таким чином, отримані результати свідчать про низький інгібуючий ефект двох вивче-

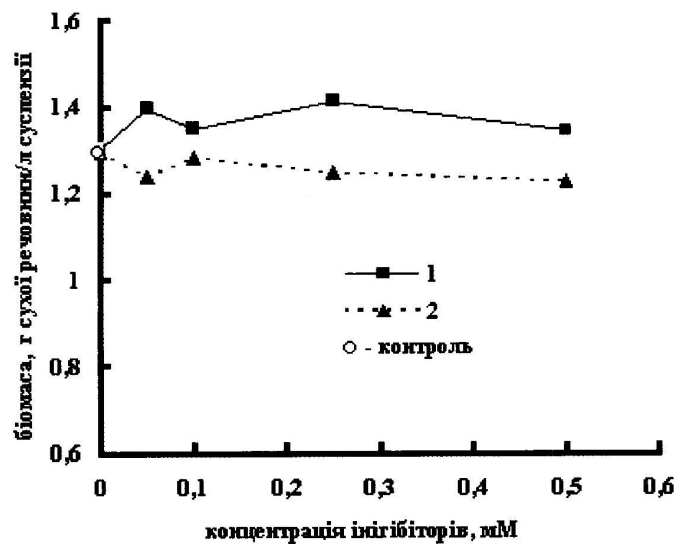


Рис. 1. Накопичення біомаси *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl. на 20-ту добу культивування під впливом інгібіторів (1 — ацетозоламід; 2 — етоксизоламід)

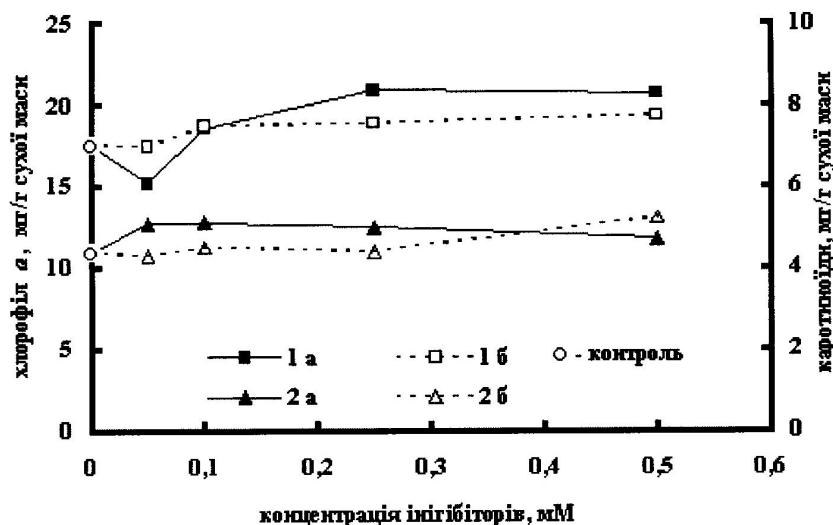


Рис. 2. Вміст хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів у клітинах *S. platensis* на 20-ту добу культивування (1а — хлорофіл  $\alpha$ , ацетозоламід; 1б — хлорофіл  $\alpha$ , етоксизоламід; 2а — каротиноїди, ацетозоламід; 2б — каротиноїди, етоксизоламід)

них інгібіторів як на ростові показники, так і на пігментний склад хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів.

Протилежні результати отримано в разі вивчення впливу інгібіторів КА на нагромадження біомаси двома штамми *N. Linckia*. Як видно з рис. 3, АзА в усіх використаних концентраціях істотно не впливав на вміст пігментів. Водночас ЕзА вже в концентрації 0,05 мМ призводив до значного зменшення вмісту хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів, а за концентрації 0,5 мМ вміст пігментів аближався до нуля (рис. 3). При цьому істотних роз-

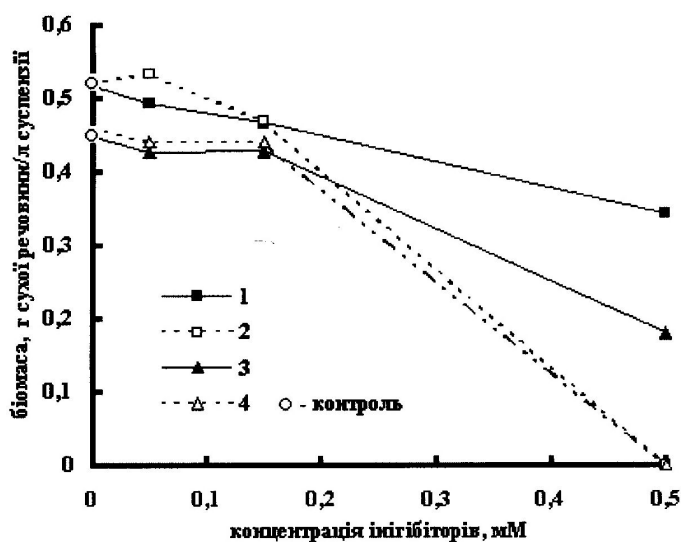


Рис. 3. Накопичення біомаси двох штамів *Nostoc linckia* (Roth.) Born. et Flash. на 20-ту добу культивування (1, 3 — ацетозоламід; 1, 2 — етоксизоламід; 1, 2 — штам В 86; 3, 4 — штам В 85)

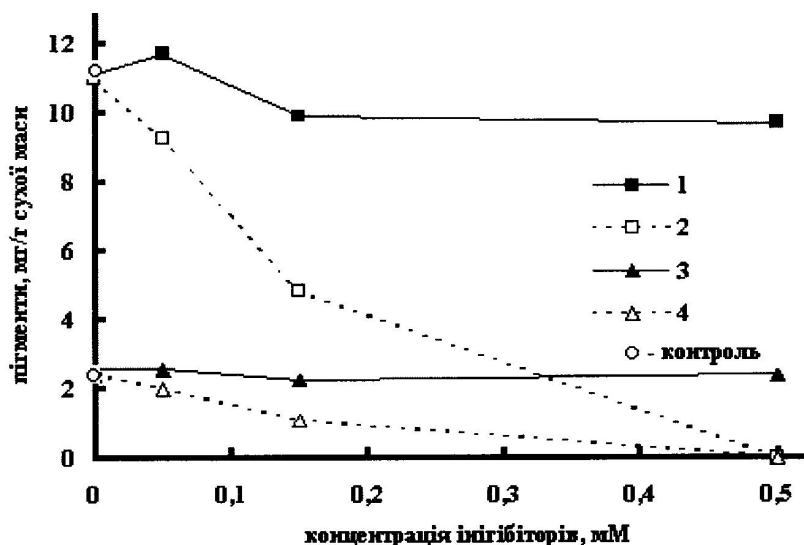


Рис. 4. Вміст хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів в біомасі *N. linckia* В 86 на 20-ту добу культивування (тут і на рис. 5: 1, 2 — хлорофіл  $\alpha$ ; 3, 4 — каротиноїди; 1, 3 — ацетозоламід; 2, 4 — етоксизоламід)

біжностей між двома штамми в разі використання ЕзА не спостерігалося (рисунки 4, 5). Значне зниження вмісту хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів відбувалося при нижчих концентраціях ЕзА, ніж інгибування росту культури, що добре видно при порівнянні рисунків 4, 5 і 3.

Отриманні нами дані узгоджу з результатами інших авторів. Так, показано, що в клітинах синьозеленої водорості *Synechococcus PCC7942* ЕзА в концентрації 0,2 мМ повністю інгибував фотосинтетичне виділення кисню за наявності в середовищі 1 мМ  $C_H$  і рН 8,0. АзА навіть у концент-

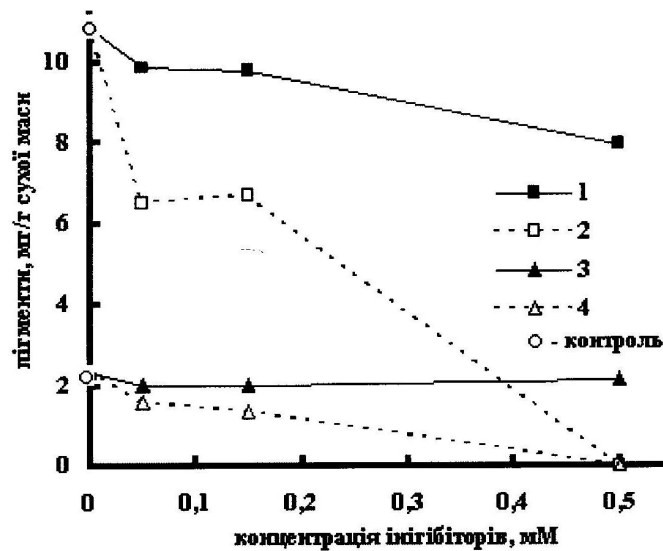


Рис. 5. Вміст хлорофілу  $\alpha$  і каротиноїдів в біомасі *N. linckia* В 85 на 20-ту добу культивування

рації до 0,4 мМ зовсім не впливав на процес фотосинтетичного виділення кисню. Ступінь інгибування фотосинтезу ЕзА поступово знижувався по мірі підвищення концентрації  $C_H$  у середовищі. Так, за концентрації  $C_H$  100 мМ інгибування не спостерігалось, що автори пов'язують із вільною дифузєю  $CO_2$  у клітини. Аналогічні дані отримано і з використанням інших видів синьозелених водоростей, зокрема *Anabaena variabilis* М3 і *Synechocystis* 6803 [16]. Автори показали, що ЕзА викликає різке зниження величини клітинного пула  $C_H$  і фіксації  $CO_2$  [16]. Тірел зі співр. [17] на синьозеленій водорості *Synechococcus* sp. UTEX 625 також встановили, що ЕзА інгибує транспорт у клітини  $C_H$ . Механізм дії даного інгібітора вони пояснюють його взаємодією з переносниками  $C_H$ , які мають КА-подібну активність.

### Висновки

Таким чином, дослідженні нами два види синьозелених водоростей мають різну чутливість до дії інгібіторів карбоангідрази. Однією з причин цього може бути склад живильних середовищ з різним вмістом  $C_H$ . Так, середовище Зарука [2], на якому культивували *S. platensis*, містить до 200 мМ бікарбонату натрію, тоді як середовище Фітцджеральда [17] для вирощування *N. Linckia* — 0,2 мМ бікарбонату натрію. Тому можна припустити, що у *S. platensis* КА активність клітин дуже низька у зв'язку з тим, що синтез КА репресований високими концентраціями субстрату, бо транспорт  $C_H$ , вірогідно, відбувається за градієнтом концентрації. Іншою можливою причиною різної реакції вивчених видів синьозелених водоростей на дію інгібіторів КА можуть бути розбіжності у властивостях периплазматичного шару та клітинної стінки, які можуть регулювати проникнення інгібіторів до клітин, а також різною розчинністю інгібіторів у ліпідах. Крім того, різна чутливість двох штамів *N. Linckia* до ЕзА, очевид-

но, може бути пов'язана з їх екологічними особливостями — у природі вони зростають у різних умовах.

Автори виражають подяку Оксані Миколаївні Виноградовій за надані штами синьозеленої водорості *N. linckia*, Надії Дмитрівні Тупик — за вирощування водоростей.

1. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.К., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. — М., 1975. — 329 с.
2. Михайлов А.А., Верзилин И.Н., Пинкевич В.В., Шаренкова Х.А. Влияние температурных и световых условий культивирования на продуктивность *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. // Научн. докл. высш. шк. Биол. науки. — 1972. — № 2. — С. 67—73.
3. Судына Е.Г., Шнюкова Е.И. IBASU—В — коллекция культур водорослей отдела биохимии Института ботаники им. Н.Г. Холодного АН УССР // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. — М.: Наука, 1991. — С. 145—151.
4. Терещенко А.Ф., Лось С.И., Тупик Н.Д. Роль карбоангидразы в накоплении биомассы *Cyanoophyta* // Альгология. — 1999. — 2, № 2. — С. 140.
5. Aizawa K., Miyachi S. Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in microalgae and cyanophyta // FEMS Microbiol. Rev. — 1986. — 39. — P. 215—233.
6. Badger M.R. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in aquatic phototrops // M.D. Hatch, N.K. Boardman, eds. The Biochemistry of plants: A comprehensive treatise. — New York: Photosynthesis Acad. Press, 1987. — 10. — P. 215—233.
7. Badger M.R., Price G.D. Carbonic anhydrase activity associated with the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942* // Plant Physiol. — 1989. — 89, № 1. — P. 51—60.
8. Ingle R.K., Colman B. Carbonic anhydrase levels in blue-green algae // Can. J. Bot. — 1975. — 53, № 20. — P. 2385—2387.
9. Kaplan A. Photoinhibition in *Spirulina platensis*: response of photosynthesis and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake capability to CO<sub>2</sub>-depleted conditions // J. Exp. Bot. — 1981. — 32, № 129. — P. 669—677.
10. Lanras T., Hawthornthwaite A.M., Codd G.A. Lokalization of carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Chlorogloopsis fritschii* // FEMS Microbiol. Lett. — 1985. — 26. — P. 285—288.
11. Marcus Y., Volokita M., Kaplan A. The location of the transporting system for inorganic carbon and the nature of the form translocated in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Exp. Bot. — 1984. — 35, № 157. — P. 1136—1144.
12. Miller A.G., Canvin D.T. Distinction between HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>2</sub> dependent photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* based on the selective response of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport to Na<sup>+</sup> // FEBS Lett. — 1985. — 187, № 1. — P. 29—32.
13. Miller A.G., Espie G.S., Canvin D.T. Physiological aspect of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport by cyanobacteria: a review // Can. J. Bot. — 1990. — 68, № 6. — P. 1291—1302.
14. Price G.D., Badger M.R. Ethoxzolamide inhibition of CO<sub>2</sub> uptake in the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942* without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity // Plant Physiol. — 1989. — 89, № 1. — P. 37—43.
15. Price G.D., Badger M.R. Ethoxzolamide inhibition of CO<sub>2</sub> dependent photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942* // Plant Physiol. — 1989. — 89, № 1. — P. 44—50.
16. Tyrell P.N., Kandasamy R.A., Crotty C.M., Espie G.S. Ethoxzolamide differentially inhibits CO<sub>2</sub> uptake Na<sup>+</sup> — independent and Na<sup>+</sup> — dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in the cyanobacterium *Synechococcus sp. UTEX 625* // Plant Physiol. — 1996. — 112, № 1. — P. 79—88.
17. Zender A., Gorham E. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutz emend Elenk // Can. J. Microbiol. — 1960. — 6, № 2. — P. 195—200.
18. Vinogradova O.N., Kovlenko O.V., Wasser S.P., Nevo E., Kislova O.A., Belikova O.A. Biodiversity of *Cyanophyta* in Israel. Preliminary studies at «Evolution Canyon», Lower Nahal Oren, Mt. Carmel Natural Preserve // Algologia. — 1995. — 5, № 1. — P. 46—59.
19. Yagawa Y., Shirawa Y., Miyachi S. Carbonic anhydrase from the blue-green alga (Cyanobacterium) *Anabaena variabilis* // Plant Cell Physiol. — 1984. — 25. — P. 775—783.



