

УДК 581.1:582.26/.27

С.С. СТЕПАНОВ, Е.К. ЗОЛОТАРЕВА

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
01001 Киев, ул. Терещенковская, 2, Украина

ВЛИЯНИЕ МЕТАНОЛА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (*Chlorophyta*)

Исследовано влияние метанола на фотосинтетическую активность и продуктивность *Chlamydomonas reinhardtii*. Установлено, что небольшие концентрации метанола (0,1–0,4 объемных процента) стимулируют рост автотрофной накопительной культуры *Ch. reinhardtii*. Стимулирующий эффект проявляется в улучшении функционального состояния фотосинтетического аппарата, увеличении скорости фиксации CO₂ и уменьшении потерь CO₂ в цикле фотодыхания. При культивировании в течение 7 сут в присутствии 50 мМ метанола объем уплотненных клеток увеличивался на 34 %. Средний период удвоения клеток в культуре снижался на 28 % по сравнению с контролем. Обнаружено стимулирующее влияние небольших концентраций метанола на скорость темнового дыхания микроводоросли.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, фотосинтез, дыхание, фотодыхание, метанол, стимуляция роста.

Введение

Метанол (CH₃OH) – простейшее органическое соединение, образующееся в значительных количествах в результате метаболизма высших растений и микроводорослей (MacDonald, Fall, 1993). Согласно оценкам Фола и Бенсона (Fall, Benson, 1996), общее поступление метанола в атмосферу не уступает количеству летучих монотерпенов, выделяемому растениями, и составляет более 100 миллионов тонн в год. Основным процессом, в результате которого в растительной клетке образуется метанол, является деэтерификация пектина, которая катализируется пектинэстеразой (ПЭ). Уровень экспрессии ПЭ, а также количество выделяющегося метилового спирта возрастают при абиотических стрессах, механическом повреждении или вирусной инфекции (Pelloux et al., 2007). Метанол влияет на экспрессию сотен генов, включая гены, участвующие в защите от стрессовых воздействий (Downie et al., 2004). В светлое время суток поглощение метанола растениями существенно возрастает, что приводит к увеличению фотосинтетической продуктивности С-3 растений (Nonomura, Benson, 1992). Предполагается, что в растительной клетке CH₃OH окисляется до CO₂, который сразу фиксируется в темновой фазе фотосинтеза (Colas

© С.С. Степанов, Е.К. Золотарева, 2011

des Francs-Small et al., 1993). Показано, что экзогенно добавленный метанол эффективно поглощается клетками растений и водорослей. Он включается в метаболизм так же быстро, как и экзогенный бикарбонат или формальдегид, участвуя в синтезе сахаров и аминокислот (Cossins, 1964; Colas des Francs-Small et al., 1993). Исследование распределения радиоактивной метки ^{14}C -метанола в продуктах метаболизма позволило выявить 4 последовательных этапа его окисления с образованием сначала формальдегида, а затем муравьиной кислоты и двуокиси углерода (рис. 1).

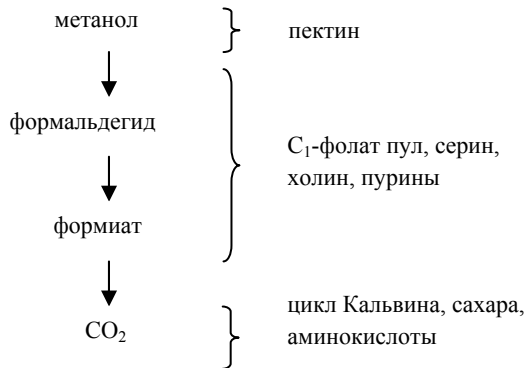


Рис. 1. Схема метаболизма метанола в растительных клетках (по Fall, Benson, 1996)

Микроводоросли по-разному реагируют на введение в среду экзогенного метанола. Так, метиловый спирт в концентрации 0,2 % ингибировал рост *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Skeletonema costatum* и *Prorocentrum minimum* (El Jay, 1996; Okumura et al., 2001). В то же время, *Scenedesmus obliquus* оказался толерантным к присутствию 2 % метанола, а при добавлении 0,5 % этого спирта накопление биомассы возрастало вдвое (Theodoridou et al., 2002). Значительное увеличение биомассы отмечено также при добавлении 1 % метанола в культуральную среду *Chlorella minutissima* (Kotzabasis et al., 1999).

Введение метанола в среду культивирования микроводорослей вызывало изменения в молекулярной организации фотосинтетического аппарата – уменьшался размер светособирающей антенны, в результате чего эффективность трансформации световой энергии возрастала (Navakoudis et al., 2007). Известно, что формиат, образующийся при метаболизме метанола, защищает фотосинтетический аппарат от фотоингибирования в условиях низкой концентрации CO_2 (Shiraishi et al., 2000).

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* – модельный организм для изучения процессов фотосинтеза, питания и фотовыделения водорода (Harris, 2001). В последние годы в связи с разработкой фотобиотехнологии производства H_2 активно исследуется метаболизм *Ch. reinhardtii* при переходе к анаэробному существованию.

В естественных условиях из-за падения концентрации кислорода в водоемах в ночное время и ее возрастании при активации фотосинтеза микроводоросли часто переходят от аэробного существования к аноксии и обратно. При анаэробной инкубации клеток *Ch. reinhardtii* в среде накапливаются продукты брожения, в т.ч. формиат (Hemschemeier et al., 2008). Помимо формиата природные местообитания *Ch. reinhardtii* могут содержать повышенные концентрации метанола, образующиеся в результате жизнедеятельности бактерий и грибов. Механизм влияния экзогенного метанола или продуктов его окисления на рост и продуктивность *Ch. reinhardtii* до настоящего времени не исследован.

Целью данной работы было изучение влияния экзогенного метанола на скорость фотосинтеза, дыхания, эффективность трансформации световой энергии и продуктивность одноклеточной зеленой водоросли *Ch. reinhardtii*.

Материалы и методы

Схема эксперимента и условия роста

Для исследований использовали штамм *Ch. reinhardtii* из коллекции культур микроводорослей отдела мембранологии и фитохимии Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (IBASU-B – 163). Накопительную автотрофную культуру выращивали на жидкой минимальной питательной среде Кеслера (Bishop et al., 1971) в колбах объемом 0,5 л при комнатной температуре и круглосуточном освещении белыми флуоресцентными лампами с интенсивностью фотосинтетически активной радиации (ФАР) на поверхности колб 100 мкмоль фотонов·м²·с⁻¹. Предварительные опыты показали, что культура *Ch. reinhardtii* при начальной концентрации клеток 1 млн/мл выходит на экспоненциальную фазу роста через 3 сут и достигает стационарной фазы через 7–10 сут культивирования. Влияние возрастающих концентраций метанола на прирост биомассы изучали, добавляя метанол в колбы объемом 250 мл с 100 мл культуры *Ch. reinhardtii* при одинаковой начальной концентрации клеток. Объем уплотненных клеток (ОУК) определяли после 7 сут культивирования. Для исследования динамики прироста количества клеток и содержания хлорофилла в середине экспоненциальной фазы роста водоросли разделяли на два варианта – с внесением 50 мМ метанола и контрольный – без него. Полученные варианты использовали для отбора проб ежедневно в течение трех суток культивирования.

Инфракрасный газовый анализ (ИКГА)

Интенсивность видимого фотосинтеза, темнового дыхания и фотодыхания определяли по изменению содержания СО₂ в газовой фазе над суспензией водорослей методом ИКГА, используя систему Qbit (Канада) (Sharkey, 1988). Через камеру с водорослями обеспечивали

поток газа со скоростью 0,4 л/мин и концентрацией углекислого газа 700–800 мкмоль. Для измерений газообмена использовали концентрированную суспензию микроводорослей (30–40 мкг/мл хлорофилла), помещая ее в стеклянную термостатированную ячейку с водяной рубашкой ($t = 26\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$). Интенсивность перемешивания регулировали повышением уровня суспензии в камере. Скорость поглощения углекислого газа определяли на постоянном свете при интенсивности ФАР 350 мкмоль фотонов·м²·с⁻¹. Темновое дыхание определяли при низком содержании CO₂ в газовом объеме над суспензией микроводорослей после выключения света. Перед подачей в анализатор воздух пропускали через колонку с аскаритом для удаления CO₂ из газовой фазы. Послесветовой выброс CO₂ оценивали по максимальной скорости выделения CO₂ сразу после выключения освещения микроводорослей. Для получения статистически достоверных результатов опыт повторяли 3–4 раза.

Определение концентрации хлорофилла

Для определения концентрации хлорофилла отбирали 5 мл суспензии микроводоросли. Клетки осаждали центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин, супернатант сливали, а осадок клеток ресуспендировали в 5 мл 96 % этилового спирта при перемешивании стеклянной палочкой до обесцвечивания клеток. Экстракт центрифугировали, супернатант переносили в кюветы и определяли оптическую плотность при 649, 665, 750 нм на спектрофотометре СФ-46. Концентрацию хлорофилла рассчитывали по формулам Винтерманса и Де Мотса (Wintermans, De Mots, 1965):

$$\begin{aligned} \text{хлорофилл } a &= 13,70(A_{665}-A_{750})-5,76(A_{649}-A_{750}); \\ \text{хлорофилл } b &= 25,80(A_{649}-A_{750})-7,60(A_{665}-A_{750}); \\ \text{хлорофилл } a+b &= 6,10(A_{665}-A_{750})+20,04(A_{649}-A_{750}). \end{aligned}$$

Индукция флуоресценции

Индукцию модулированной флуоресценции хлорофилла *a* определяли по общепринятой методике на флуориметре ХЕ-РАМ (Walz, Германия). Интенсивность актиничного света соответствовала интенсивности освещения при культивировании водорослей (ФАР 100 мкмоль фотонов·м²·с⁻¹). Клетки перед началом эксперимента адаптировали к темноте в течение 10 мин. По параметрам кривой индукции флуоресценции рассчитывали максимальный квантовый выход (F_v/F_m) (Butler, 1978), фотохимическое тушение флуоресценции (qP), квантовый выход электронного транспорта (Φ_{PSII}) и эффективный квантовый выход (F_v/F_m') (Maxwell et al., 2000).

Определение объема уплотненных клеток (ОУК)

Для определения ОУК из каждого варианта отбирали образцы по 5 мл. Суспензию концентрировали, центрифугируя 3 мин при 1500 g и

гомогенизируя осадок в 1 мл среды культивирования. Концентрированную культуру с помощью шприца переносили в гематокритные капилляры, нижнюю часть которых закрывали. Капилляры центрифугировали при 3500 g 5 мин. ОУК определяли по отношению объема осажденных водорослей к объему капилляра в мкл/мл.

Определение концентрации клеток

Количество клеток в микролитре среды культивирования подсчитывали в камере Горяева при 200-кратном увеличении светового микроскопа. Пробы для анализа отбирали после тщательного перемешивания культуры. Клетки на сетке камеры фотографировали цифровой фотокамерой. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Image Tool 3.0. Отбор проб для анализа проводили ежедневно на протяжении 4 сут культивирования, определяя скорость экспоненциального роста (r) по уравнению (Andersen, 2004):

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

где N_0 – начальное количество клеток в единице объема; N_t – количество клеток через интервал времени Δt . Период деления клеток (T_2) определяли по уравнению: $k = r/0,6931$.

Результаты и обсуждение

В присутствии небольших концентраций метилового спирта (0,1–0,4 объемных процента) ОУК в среде увеличивался по сравнению с контролем (рис. 2). В наибольшей степени стимуляция роста культуры проявлялась при добавлении 0,2 % (50 мМ) метанола. Если содержание метанола превышало 0,6 %, рост культуры *Ch. reinhardtii* подавлялся. После 7 сут культивирования ОУК в присутствии 50 мМ метанола возрастал по сравнению с контролем на 34 % (рис. 3).

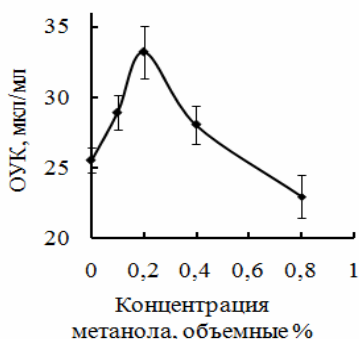
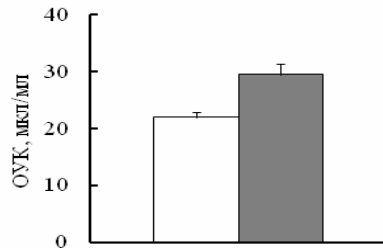


Рис. 2. Объем уплотненных клеток (ОУК) в автотрофной культуре *Chlamydomonas reinhardtii* после внесения разных концентраций метанола. Вертикальными штрихами отмечены стандартные отклонения трех независимых экспериментов

Ранее Теодориду с соавт. (Theodoridou et al., 2002), изучавшие влияние метанола на рост *Scenedesmus obliquus*, показали, что при культивировании в присутствии 0,5 % метилового спирта, ОУК водоросли возрастает в два раза по сравнению с контролем. Сходные

данные были получены также для водного растения *Lemna gibba*, биомасса которого увеличивалась на 25 % после суточной экспозиции в присутствии 0,2 % метанола (Dewez et al., 2003). Таким образом, действие метанола видоспецифично, и в низких концентрациях этот спирт положительно влияет на рост некоторых микроводорослей и водных растений.

Рис. 3. Объем уплотненных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* на 7-е сутки после добавления 50 мМ метанола. □ – контроль, ■ – в присутствии метанола. Вертикальными штрихами отмечены стандартные отклонения пяти независимых экспериментов



На рис. 4 показано изменение количества клеток при автотрофном культивировании в течение 3 сут после внесения 50 мМ метанола. Наиболее интенсивно концентрация клеток возрастает в первые сутки культивирования и в присутствии метанола, в отличие от контрольного варианта, кривая роста не имеет лаг-фазы. В табл. 1 показан период удвоения клеток *Ch. reinhardtii* в контрольном варианте и в присутствии 50 мМ метанола, который положительно влияет на увеличение количества клеток. Со временем он снижает на 28 % среднее за 4 сут культивирования время удвоения клеток по сравнению с контролем. Клетки в первые сутки инкубации с метанолом делятся почти в 2,7 раза быстрее, чем в контроле, затем темпы их удвоения замедляются. Очевидно, это связано с тем, что из-за быстрого поглощения и метаболизации метанола его концентрация на протяжении нескольких суток культивирования постепенно снижается.

Таблица 1

Период удвоения клеток T_2 за сутки в течение 3 сут роста автотрофной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* в присутствии 50 мМ метанола

Интервал, сут	1–2	2–3	3–4	1–4
T_2 , контроль	2,41	1,18	1,57	1,58
T_2 , метанол 50 мМ	0,91	1,22	1,37	1,13

Скорость фотосинтетического поглощения CO_2 при интенсивности ФАР 350 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ составляла 24,84 мкмоль CO_2 ·мг хл.⁻¹·ч⁻¹ и после внесения 50 мМ метилового спирта возрастала незначительно – до 26,14 мкмоль CO_2 ·мг хл.⁻¹·ч⁻¹. Низкий прирост фотосинтетического поглощения CO_2 можно объяснить отсутствием метанола в жидкой фазе из-за быстрой утилизации последнего.

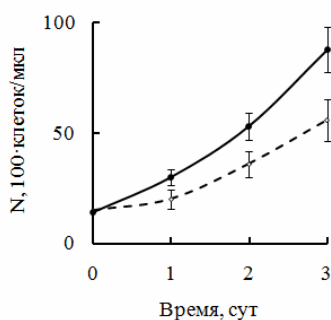


Рис. 4. Концентрация клеток (N) в автотрофной культуре *Chlamydomonas reinhardtii* в течение 3 сут культивирования при добавлении 50 мМ метанола. Сплошная кривая – в присутствии метанола, штриховая – контроль. Вертикальные линии обозначают стандартные отклонения трех независимых экспериментов

О влиянии метанола на эффективность фотосинтетического преобразования энергии судили по кривым индукции флуоресценции. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что максимальная эффективность фотосинтеза F_v/F_m возрастает при добавлении метилового спирта, причем наибольший эффект отмечали через 6-20 ч после его добавления.

Таблица 2

Динамика параметров кривой индукции флуоресценции хлорофилла *Chlamydomonas reinhardtii* в контроле и в присутствии 50 мМ метанола

Параметр	1 ч		6 ч	
	Контроль	Метанол	Контроль	Метанол
F_v/F_m	$0,631 \pm 0,01$	$0,652 \pm 0,02$	$0,572 \pm 0,043$	$0,659 \pm 0,035$
qP	$0,846 \pm 0,04$	$0,857 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,063$	$0,9 \pm 0,06$
Φ_{PSII}	$0,53 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,05$
F_v/F_m'	$0,63 \pm 0,006$	$0,63 \pm 0,004$	$0,57 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,02$
Параметр	20 ч		46 ч	
	Контроль	Метанол	Контроль	Метанол
F_v/F_m	$0,706 \pm 0,008$	$0,734 \pm 0,01$	$0,695 \pm 0,014$	$0,692 \pm 0,019$
qP	$0,881 \pm 0,067$	$0,91 \pm 0,06$	$0,858 \pm 0,091$	$0,908 \pm 0,071$
Φ_{PSII}	$0,59 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,04$
F_v/F_m'	$0,67 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,007$	$0,66 \pm 0,03$	$0,062 \pm 0,01$

Фотохимическое тушение флуоресценции qP, квантовый выход электронного транспорта Φ_{PSII} и эффективный квантовый выход F_v/F_m' существенно не изменялись. Данные указывают на то, что метиловый

спирт улучшает функциональное состояние фотосинтетического аппарата и не влияет на скорость транспорта электронов между фотосистемами.

На рис. 5 приведены данные о влиянии метанола на содержание суммы хлорофиллов в пересчете на клетку. Добавление метанола до концентрации 50 мМ к автотрофной культуре *Ch. reinhardtii* приводило к снижению накопления хлорофилла, что не сопровождалось изменением соотношения хлорофиллов *a/b*. Ранее (Theodoridou et al., 2002) было показано, что добавление метанола приводит к двукратному снижению содержания светособирающего комплекса фотосистемы II (ССКII) в клетках *Scenedesmus obliquus*. Этот полипептидный комплекс является местом связывания основного количества хлорофилла фотосинтетических мембран. Очевидно, уменьшение содержания общего хлорофилла в клетках *Ch. reinhardtii* вызвано подавлением биосинтеза полипептидов ССКII индуцированным экзогенным метанолом.

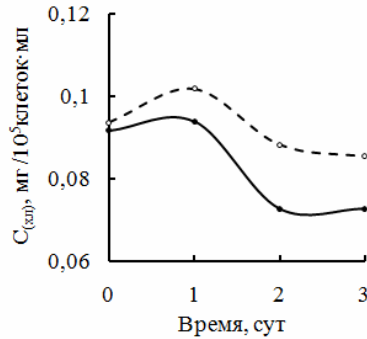


Рис. 5. Концентрация хлорофилла ($C_{\text{хл}}$) в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в течение 3 сут культивирования. Штриховая линия — контроль, сплошная — с добавлением 50 мМ метанола

Рост культуры *Ch. reinhardtii* зависит также от интенсивности темнового дыхания, которую оценивали по скорости выделения CO_2 в газовый объем над суспензией клеток, адаптированных в течение 15 мин к темноте. Скорость темнового выделения CO_2 клетками *Ch. reinhardtii* в присутствии 50 мМ метанола на 23 % выше, чем в контрольных вариантах без добавления спирта (рис. 6). Увеличение скорости темнового дыхания в клетках, обработанных метанолом, свидетельствует о стимуляции окислительного фосфорилирования и биосинтетических процессов. Возможно также, что дыхание активируется трикарбоновыми кислотами цикла Кребса, образующимися при метаболизации метанола.

Общее поглощение кислорода на свету является результатом двух процессов: темнового дыхания и светоиндуцируемого дыхания (фотодыхания), связанного с фотохимическими процессами в хлоропластах. Каталитические механизмы фотодыхания отличаются от реакций темнового дыхания (Leegood et al., 2000; Wingler et al., 2000). Зависимая от света стадия фотодыхания завершается образованием гликолата в

хлоропластах, дальнейшие превращения которого происходят в пероксисомах с образованием глиоксилата и глицина. Совокупность реакций метаболизма углерода в фотодыхании называют «гликолатным путем». В митохондриях из двух молекул глицина образуется молекула серина, освобождается CO_2 и одна молекула аммиака. При декарбоксилировании глицина образуется НАДН, при окислении которого в митохондриях дополнительно поглощается O_2 .

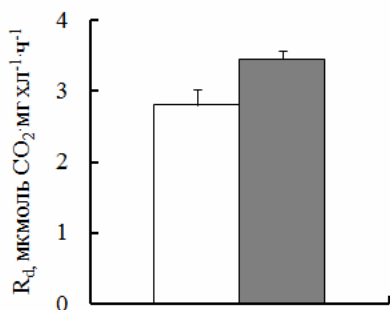
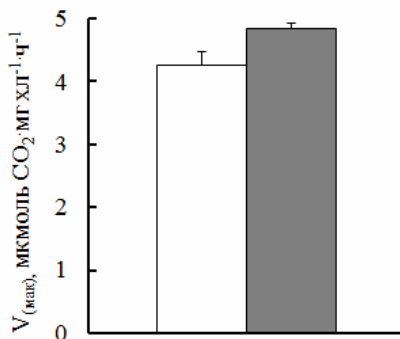


Рис. 6. Скорость темного дыхания (R_d) *Chlamydomonas reinhardtii* в присутствии 50 мМ метанола (□ – контроль, ■ – в присутствии метанола)

Нономура и Бенсон (Nonomura, Benson, 1992) показали, что фотодыхание в присутствии экзогенного метанола не ингибируется. Известно, что формиат, образующийся в пероксисомах, участвует в биосинтезе серина (Wingler et al., 1999). Это позволяет предполагать, что экзогенно добавленный метанол может включаться в цикл фотодыхания *Ch. reinhardtii*.

Рис. 7. Максимальная скорость выделения CO_2 ($V_{\text{макс}}$) культурой *Chlamydomonas reinhardtii* при добавлении 50 мМ метанола и в контроле (□ – контроль; ■ – метанол)



На рис. 7 показаны максимальные скорости выделения CO_2 клетками *Ch. reinhardtii* после выключения света. Резкое увеличение концентрации CO_2 в первые моменты после выключения света рассматривается как продолжение фотодыхания в темноте, не маскируемое фотосинтезом. При выключении света пул глицина, накапливающийся в результате фотодыхания, быстро расщепляется в митохондриях. В результате выделяется количество CO_2 , превышающее

темновое дыхание. *Ch. reinhardtii* отличаются от высших растений тем, что окисление гликолевой кислоты и трансаминирование глиоксилата происходит в митохондриях, и поэтому синтез глицина при фотодыхании у них снижен (Stern, Harris, 2009).

Из данных рис. 7 видно, что в присутствии 50 мМ метилового спирта послесветовое выделение CO_2 оказалось на 14 % больше, чем в контрольном варианте. Очевидно, добавление метанола, стимулирующее фотосинтетическую активность хлоропластов, способствует накоплению глицина в митохондриях и активации фотодыхания.

Таким образом, метаболизм метанола выполняет ту же функцию, что и фотодыхание, т.е. обеспечивает одноуглеродными соединениями анаболические процессы в клетке.

Выводы

Метиловый спирт в концентрации 0,1–0,4 % объемных процента стимулирует рост автотрофной накопительной культуры *Chlamydomonas reinhardtii*. Наибольшая стимуляция отмечена при концентрации метанола 50 мМ, выражавшаяся в увеличении ОУК на 34 % и уменьшении среднего времени деления клеток на 28 % по сравнению с контрольной культурой. Метиловый спирт положительно влияет на состояние фотосинтетического аппарата, не изменяя при этом скорость транспорта электронов в хлоропластах. Вместе с тем показано, что в присутствии метанола снижается содержание хлорофилла в клетках, несколько повышается скорость фотосинтетического поглощения CO_2 и темнового дыхания. Увеличение послесветового выброса CO_2 на 14 % свидетельствует о стимуляции фотодыхания и возможном накоплении метаболитов на свету в клетках, обработанных метанолом. Таким образом, экзогенное добавление метанола повышает автотрофную продуктивность *Ch. reinhardtii* и может быть рекомендовано в качестве стимулирующей добавки при массовом культивировании микроводорослей.

Авторы благодарны В.В. Подорванову и А.В. Полищуку за помощь при выполнении экспериментов и участие в обсуждении результатов.

Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. – Hong Kong: Acad. Press, Inc., 2004. – Vol. 16. – P. 239–260.

Bishop N.I., Senger H. Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus* // Methods in Enzymology. – New York: Acad. Press, 1971. – Vol. 23, pt. A. – P. 53–66.

Butler W.L. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1978. – 29. – P. 7502–7506.

Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase // Plant Physiol. – 1993. – 102, N 4. – P. 1171–1177.

- Cossins R. The utilisation of carbon-1 compounds by plants. The metabolism of methanol-¹⁴C and its role in amino acid biosynthesis // Can. J. Biochem. – 1964. – **44**. – P. 1739–1802.
- Dewez D., Dautremepuits C., Jeandet P., Vernet G., Popovic R. Effects of Methanol on Photosynthetic Processes and Growth of *Lemna gibba* // Photochem. Photobiol. – 2003. – **78**, N 4. – P. 420–424.
- Downie A., Miyazaki S., Bohnert H., John P., Coleman J., Parry M., Haslam R. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation // Phytochemistry. – 2004. – **65**, N 16. – P. 2305–2316.
- El Jay A. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1996. – **57**, N 2. – P. 191–198.
- Fall R., Benson A. Leaf methanol – the simplest natural product from plants // Trends Plant Sci. – 1996. – **1**, N 9. – P. 296–301.
- Harris E.H. *Chlamydomonas* as a model organism // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – **52**. – P. 363–406.
- Hemschemeier A., Jacobs J., Happe T. Biochemical and Physiological Characterization of the Pyruvate Formate-Lyase Pfl1 of *Chlamydomonas reinhardtii*, a Typically Bacterial Enzyme in a Eukaryotic Alga // Eukaryot. Cell. – 2008. – **7**, N 3. – P. 518–526.
- Kotzabasis K., Hatzjathanasiou A., Bengoa-Ruigomez M.V. et al. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: role of the concentration and frequency of administration // J. Biotechnol. – 1999. – **70**. – P. 357–362.
- Leegood R.C., Sharkey T.D., S. von Caemmerer. Advances in Photosynthesis: Physiology and Metabolism. – Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2000. – P. 160–168.
- MacDonald R., Fall R. Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere // Atm. Environ. – 1993. – **27**, pt. A. – P. 1709–1713.
- Maxwell K., Jonson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // J. Exp. Bot. – 2000. – **51**, N 345. – P. 659–668.
- Navakoudis E., Ioannidis N.E., Dörnemann D., Kotzabasis K. Changes in the LHCII-mediated energy utilization and dissipation adjust the methanol-induced biomass increase // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – **1767**, N 7. – P. 948–955.
- Nonomura A., Benson A. The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. – 1992. – **89**, N 20. – P. 9794–9798.
- Okumura Y., Koyama J., Takaku H., Satoh H. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2001. – **41**, N 2. – P. 123–128.
- Pelloux J., Rustérucci C., Mellerowicz E.J. New insights into pectin methylesterase structure and function // Trends Plant Sci. – 2007. – **12**, N 6. – P. 267–277.
- Sharkey T.D. Estimating the rate of photorespiration in leaves // Physiol. Plant. – 1988. – **73**, N 1. – P. 147–152.
- Shiraishi T., Fukusaki E. I., Miyake C., Yokota A., Kobayashi A. Formate protects photosynthetic machinery from photoinhibition // J. BioSci. Bioeng. – 2000. – **89**, N 6. – P. 564–568.
- Stern D, Harris E.H. The *Chlamydomonas* Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes. Ed. 2. – Dordrecht: Acad. Press, Inc., 2009. – P. 271–275.

- Theodoridou A., Dörnemann D., Kotzabasis K.* Light dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – **1573**, N 2. – P. 189–198.
- Wingler A., Lea P.J., Leegood R.C.* Photorespiratory metabolism of glyoxylate and formate in glycine-accumulating mutants of barley and *Amaranthus edulis* // *Planta.* – 1999. – **207**, N 4. – P. 518–526.
- Wingler A., Lea P.J., Quick W.P., Leegood R.C.* Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection // *Phil. Trans. Roy. Soc. B.* – 2000. – **355**, N 1402. – P. 1517–1529.
- Wintermans F.G.M., De Mots A.* Chlorophyll determination A suitable method for *Chlamydomonas* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1965. – **109**. – P. 448–453.

Получена 18.11.10

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова

S.S. Stepanov, E.K. Zolotareva

N.G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereschenkovskaya St., 01001 Kiev, Ukraine

THE EFFECT OF METHANOL ON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY
AND PRODUCTIVITY OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG.
(*CHLOROPHYTA*)

Small concentrations of methanol (0.1–0.4 %) stimulated the growth of autotrophic batch culture *Chlamydomonas reinhardtii*. The stimulatory effect is to improve the functional state of the photosynthetic apparatus, increasing the rate of CO₂ fixation and reducing the losses of CO₂ in the cycle of photorespiration. The cell packed volume was increased by 34 % when grown for 7 days in the presence of 50 mM methanol. Doubling time was decreased by 28 % compared with control. The stimulating effect of small concentrations of methanol on the dark respiration rate was also observed.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, photosynthesis, respiration, photorespiration, methanol, growth stimulation.