



УДК 57.023.581.1

## СТИМУЛЮВАННЯ НАКОПИЧЕННЯ ЛІПІДНИХ ВКЛЮЧЕНЬ КЛІТИНАМИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

**С. С. Степанов**

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна  
e-mail: serhiy1986@ukr.net

За умов відсутності нітрогену (-N) в середовищі культивування *Chlamydomonas reinhardtii*, подібно до інших мікродоростей, накопичують запасні ліпіди у формі триацилгліцеролів. Нестача нітрогену гальмує ріст мікродоростей, тому для підвищення загального виходу ліпідів використовують різні способи стимуляції росту культури. В роботі вивчався вплив метанолу – додаткового джерела вуглецевого живлення, на здатність клітин *C. reinhardtii* накопичувати ліпіди за умов нестачі нітрогену й окисного стресу, викликаного додаванням  $H_2O_2$ . Внутрішньоклітинний вміст ліпідів оцінювали за флуоресценцією Нільського червоного (НЧ) на конфокальному скануючому мікроскопі та кількісно визначали на спектрофлюориметрі QuantaMaster (США). Додавання 50 мМ метанолу не впливало на динаміку накопичення ліпідів клітинами *C. reinhardtii*. Після внесення в -N середовище 100 мкМ  $H_2O_2$  рівень накопичення ліпідів знижувався. У разі сумісного додавання 50 мМ метанолу та 100 мкМ  $H_2O_2$  вміст ліпідів у клітинах *C. reinhardtii* зростав порівняно з -N контролем.

**Ключові слова:** *Chlamydomonas reinhardtii*, ліпіди, метанол,  $H_2O_2$ , дефіцит нітрогену.

### ВСТУП

Мікродорості – дуже велика і різноманітна група фотосинтезуючих організмів, які можуть застосовуватись як сировина для поновлюваних джерел енергії [1]. Завданням для біотехнологічного отримання дизельного палива є максимізація внутрішньоклітинного вмісту ліпідів під час культивування мікродоростей. У низці досліджень було підтверджено, що азотне голодування, негативно впливаючи на ріст культур, індукує значне накопичення нейтральних ліпідів у клітинах *C. reinhardtii* та інших мікродоростей [2, 3]. Загальний вихід ліпідів може бути підвищений завдяки стимуляції росту культури у процесі покращення вуглецевого живлення. Метанол може утилізуватись мікродоростями як джерело карбону й енергії [8] і стимулює ріст *C. reinhardtii*. З'ясовано, що додавання метанолу до середовища культивування *Chlorella* sp. супроводжується підвищенням вмісту ліпідів [1]. Утилізація метанолу пов'язана зі зростанням внутрішньоклітинної концентрації  $H_2O_2$  [7]. Існують відомості, що окисний стрес, обумовлений екзогенним  $H_2O_2$ , зумовлює накопичення ліпідів

у *C. reinhardtii* [10]. Метою роботи було визначити вплив екзогенного метанолу та  $H_2O_2$  на накопичення ліпідів клітинами *C. reinhardtii* за дефіциту нітрогену.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

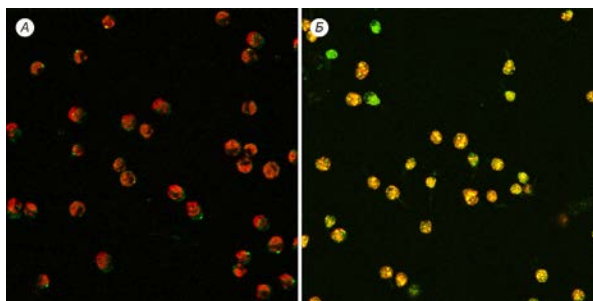
Для дослідження використовували автотрофну накопичувальну культуру *C. reinhardtii*, яку вирощували, як описано раніше [8], на середовищі, котре не містило ацетату, при цілодобовому освітленні  $200 \text{ мкмоль фотонів} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ . У середині експоненційної фази росту (5 діб) мікроевентури переводили на середовище без нітрогену (-N середовище). Одночасно додавали 50 мМ метанолу і (або) 100 мкМ  $H_2O_2$ .

Вміст ліпідів кількісно визначали на спектрофлюориметрі QuantaMaster за змінною флуоресценції Нільського червоного (НЧ) при 590 нм, що відповідає максимуму спектра емісії барвника в комплексі з ліпідами. Вимірювання виконували за методикою Коу [4]. Для цього в кювету вносили 2 мл культури *C. reinhardtii*, додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) і 40 мкл НЧ в ДМСО з концентрацією  $100 \text{ мкг} \times \text{мл}^{-1}$  і витримували 5 хв у темряві перед вимірюванням.

Ліпідні включення в клітинах *C. reinhardtii* візуалізували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа LSM 510 META. Підготовку мікропрепаратів проводили за методикою Wang [9].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Під час автотрофного росту культура *C. reinhardtii* досягала стаціонарної фази на 10–14-ту добу росту. Для дослідження індукції накопичення ліпідів використовували культуру на експоненційній фазі росту (5 діб) з концентрацією  $3 \text{ млн} \times \text{мл}^{-1}$ . Протягом дослідження концентрація клітин залишалася постійною. Після першої доби культивування на середовищі без нітрогену спостерігається утворення ліпідних включень, які реєструються як вкраплення зеленого кольору на зображеннях конфокального мікроскопа (див. рисунок).



Зображення клітин *C. reinhardtii* отримані за допомогою конфокального мікроскопа: А – на середовищі з нітрогеном; Б – через 4 доби після росту на середовищі без нітрогену

Images of *C. reinhardtii* cells obtained by using confocal microscopy: A – growth in the medium with nitrogen; B – cells after 4 days of growth on medium without nitrogen

Проби відбирали в динаміці відразу після перенесення на -N середовище та через кожну добу протягом 4 діб. Індукцію ліпідних включень при культивуванні без нітрогену можна вважати стандартним прийомом, оскільки він часто використовується та дає найкращий результат [6]. Спочатку після видалення нітрогену зі середовища вміст ліпідів у клітинах не змінювався, а після 2, 3 та 4-ї доби культивування зростав на 61, 80 та 232 %, відповідно (див. таблицю).

Відносно повільне зростання вмісту ліпідів на середовищі без нітрогену є характерним для фотоавтотрофного росту, в цьому отримані нами дані узгоджуються з літературними [5]. Під час росту на середовищі без нітрогену з додаванням 50 мМ

метанолу динаміка накопичення ліпідів у культурі не відрізнялася від контролю. Раніше нами було доведено, що 50 мМ метанол покращує ріст культури *C. reinhardtii* в нормальних умовах [8]. Відсутність стимулюючого впливу 50 мМ метанолу на накопичення ліпідів на середовищі без нітрогену можна пояснити низькою швидкістю метаболізму метанолу в стресових умовах росту. У варіанті з додаванням 100 мкМ  $H_2O_2$  зростання вмісту ліпідів становило тільки 87 % на 4-ту добу. Можна припустити, що окисний стрес, обумовлений  $H_2O_2$ , призводить до порушення функції фотосинтетичного апарату і відповідно до зниження накопичення ліпідів у стресових умовах. У разі комбінації трьох чинників – дефіциту нітрогену, додавання 50 мМ метанолу та 100 мкМ  $H_2O_2$  – вміст ліпідів підвищується на 63 % після першої доби культивування. У кінці досліджу вміст ліпідів перевищував початковий на 273 %. Така комбінація чинників під час культивування найкраще стимулювала накопичення ліпідів у *C. reinhardtii*. Це, можливо, пов'язано з прискоренням окислення й утилізації метанолу за наявності  $H_2O_2$ .

**Флуоресценція Нільського червоного в культурах *C. reinhardtii* на середовищі без нітрогену з додаванням метанолу або(і)  $H_2O_2$**

**Nile red fluorescence in cultures of *C. reinhardtii* grown in the medium without nitrogen with the addition of methanol or (and)  $H_2O_2$**

Варіант	Флуоресценція, ум. од.				
	Час відбору проб, доба				
	1	2	3	4	5
Без нітрогену	4867±356	5036±521	7833±413	10367±665	16200±565
Без нітрогену + 50 мМ метанол	5004±212	5160±352	8659±299	8766±501	15231±409
Без нітрогену + 100 мкМ $H_2O_2$	4981±304	6006±400	4928±324	9124±475	9088±312
Без нітрогену + 50 мМ метанол + 100 мкМ $H_2O_2$	5105±432	8356±378	9849±293	12988±314	18143±463

Отже, додавання 50 мМ метанолу та 100 мкМ  $H_2O_2$  забезпечувало додаткове накопичення ліпідів у клітинах *C. reinhardtii*, які культивувалися за нестачі нітрогену.

1. Choi W., Oh S., Seo Y. et al. Effects of methanol on cell growth and lipid production from mixotrophic cultivation of *Chlorella* sp. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2011; 16: 946–955.
2. Deng X., Fei X. Li Y. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. **African Journal of Microbiology Research**, 2011; 5: 260–270.
3. Fan J., Yan C., Andre C. et al. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant and Cell Physiology**, 2012; 53(8): 1380–1390.
4. Kou Z., Bei S., Sun J., Pan J. Fluorescent measurement of lipid content in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, 2013; 25(6): 1633–1641.
5. Msanne J., Xu D., Konda A.R. et al. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Phytochemistry**, 2012; 75: 50–59.
6. Sharma K., Schuhmann H., Schenk P. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, 2012; 5(5): 1532–1553.
7. Shen C., Yeh K. Hydrogen peroxide mediates the expression of ascorbate-related genes in response to methanol stimulation in *Oncidium*. **Journal of Plant Physiology**, 2010; 167(5): 400–407.
8. Stepanov S., Zolotareva E. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, 2015; 27(4): 1509–1516.
9. Wang Z., Ullrich N., Joo S. et al. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic Cell**, 2009; 8: 1856–1868.

10. Yilancioglu K., Cokol M. et al. Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. **PLoS One**, 2014; 9(3): e91957.
11. Zolotarova O.K., Shniukova E.I., Sivash O.O. et al. **Prospects of microalgae using in biotechnology**. Kyiv: Alterpres, 2008. (In Ukrainian).

## STIMULATION OF ACCUMULATION OF LIPID BODIES IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* CELLS

S. S. Stepanov

M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2, Tereshchenkivska St., Kyiv 01601, Ukraine

In the absence of nitrogen (-N) in the cultural medium, *Chlamydomonas reinhardtii*, like other microalgae, accumulate storage lipids in the form of triacylglycerols. The nitrogen deficit inhibits growth of algae, thus, different methods stimulate algae growth are used to increase the overall yield of lipids. We studied the effect of methanol – an additional source of carbon nutrition, on the accumulation of lipids in *C. reinhardtii* cells under nitrogen starvation and oxidative stress induced by the addition of  $H_2O_2$ . The intracellular lipid content was estimated by fluorescence of Nile red (NR) under the confocal scanning microscope and quantified by help of the spectrofluorimeter QuantaMaster (USA). An addition of 50 mM methanol did not affect the dynamics of accumulation of lipids in the *C. reinhardtii* cells. Lipid accumulation decreased after supplement of the -N media with 100  $\mu M$   $H_2O_2$ . The lipid content in *C. reinhardtii* cells was increased in comparison with -N control when a combination of 50 mM methanol and 100  $\mu M$   $H_2O_2$  was added.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, lipids, ethanol,  $H_2O_2$ , nitrogen deficiency.

## СТИМУЛІРОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ЛИПИДНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ КЛЕТКАМИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

С. С. Степанов

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины  
ул. Терещенковская, 2, Киев 01601, Украина

При отсутствии азота (-N) в среде культивирования *Chlamydomonas reinhardtii*, подобно другим микроводорослям, накапливает запасные липиды в форме триацилглицеролов. Недостаток азота тормозит рост микроводорослей, поэтому для повышения общего выхода липидов используют различные способы стимуляции роста культуры. В работе изучали влияние метанола – дополнительного источника углеродного питания, на способность клеток *C. reinhardtii* накапливать липиды в условиях недостатка азота и окислительного стресса, вызванного добавлением  $H_2O_2$ . Внутриклеточное содержание липидов оценивали по флуоресценции Нильского красного (НЧ) на конфокальном сканирующем микроскопе и количественно определяли на спектрофлуориметре QuantaMaster (США). Добавление 50 мМ метанола не влияло на динамику накопления липидов клетками *C. reinhardtii*. После внесения в -N среду 100 мкМ  $H_2O_2$  уровень накопления липидов снижался. При совместном добавлении 50 мМ метанола и 100 мкМ  $H_2O_2$  содержание липидов в клетках *C. reinhardtii* возрастало по сравнению с -N контролем.

**Ключевые слова:** *Chlamydomonas reinhardtii*, липиды, этанол,  $H_2O_2$ , дефицит азота.

Одержано: 07.06.2016