

УДК 582.261/.27

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА РОСТ КРАСНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Galdieria sulphuraria*

© 2024 г. Ю. В. Болычевцева¹*, И. Н. Стадничук²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской Академии наук
Москва, 119071 Россия

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
Москва, 127726 Россия
*e-mail: bolychev1@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Полиэкстремофильные красные микроводоросли рода *Galdieria*, обитая в необычных для эукариот условиях горячих серных источников, обладают способностью к гетеротрофии. Показано, что в темновых условиях у модельного вида *Galdieria sulphuraria* не наблюдали изменения роста в присутствии этанола. При этом на свету, несмотря на проявление известного для клеток стрессорного действия этанола, происходила активизация роста микроводорослей. Усиление клеточного дыхания, наблюдающееся как в темноте, так и на свету еще до активизации роста и фотосинтеза, может указывать на действие этанола как фактора окислительного стресса. Заметное ускорение роста культуры *G. sulphuraria*, вероятнее всего, происходило в результате стимуляции дыхания этанолом с образованием CO₂ и его использования хлоропластами в виде дополнительного углеродного субстрата при фотосинтезе. Рост культуры *G. sulphuraria* на свету в присутствии этанола заметно снижен по сравнению с наблюдаемым в присутствии классического органического субстрата глюкозы. Можно предположить, что при стрессе, вызванном этанолом, на свету индуцируется система двух последовательных ключевых ферментов в цепи метаболизма первичных спиртов — алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы, что в результате полного окисления этанола приводило бы к ускорению роста *G. sulphuraria*, по сравнению с фотоавтотрофной культурой.

Ключевые слова: *G. sulphuraria*, этанол, глюкоза, фотогетеротрофия, фотосинтез, алкогольдегидрогеназа

DOI: 10.31857/S0555109924050091 **EDN:** QTGHRD

Cyanidiales являются рано обособившейся в ходе эволюции [1] филой красных водорослей, большинство представителей которой обитают в геотермальных серных источниках, содержащих ионы тяжелых металлов при pH 0.5–4.0 и температурах вплоть до 56°C. Эти микроводоросли сочетают особенности строения клеток-эукариот с эколого-биохимическими особенностями, присущими экстремофильным видам архей и бактерий. Виды, приспособленные к одному, или реже к двум [2, 3] экстремальным факторам, встречаются и среди других групп водорослей, но возможность обитания сразу при воздействии нескольких неблагоприятных факторов, то есть полиэкстремофилия, известна лишь у Cyanidiales. Благодаря исключительности свойств и минимальным для эукариот размерам генома, равного 12–18 Mb [4–6], Cyanidiales как представители архепластид стали одним из важнейших объектов исследований в

клеточной физиологии, биохимии, молекулярной биологии, филогеномике и эволюционной биологии. Они играют важную роль в изучении многих сторон окислительного фотосинтеза и вопросов его происхождения. Полиэкстремофилия и многие особенности метаболизма были унаследованы Cyanidiales от архей и бактерий, что указало на возможность горизонтального переноса генов от прокариот к эукариотам и стало новым этапом в понимании эукариотной организации клетки [1, 6].

В составе Cyanidiales виды рода *Galdieria* (всего четыре рода, включая также *Cyanidiococcus*, *Cyanidioschyzon* и *Cyanidium*, и чуть более 10 видов) [1, 6] характеризуются наибольшей устойчивостью к тяжелым металлам и к высоким концентрациям соли (вплоть до 1.5 M NaCl) [7]. Важной чертой, отличающей род *Galdieria*, является способность наряду с фотоавтотрофией к темновому гетеротрофному (хемогетеротрофному) росту, известному

для представителей ряда групп одноклеточных водорослей. Возможность светового гетеротрофного (миксотрофного) роста встречается чаще, хотя также является нетривиальным свойством [8, 9].

Высокоокислые серные источники с повышенной температурой крайне бедны микроорганизмами. Предполагаемым источником осмотически усваиваемых органических продуктов для видов рода *Galdieria* служат продукты жизнедеятельности длительно находящихся в той же среде нефотосинтезирующих прокариот или, возможно, собственных клеток, находящихся в составе прибрежных водорослевых матов [6–8], что подразумевает разнообразие образующихся органических субстратов. Выявлено 27 усвояемых углеводов и полиолов и с учетом сахарофосфатов, ряда аминокислот, интермедиатов цикла Кребса, до 50 органических экзогенных субстратов, которые могут использоваться видами рода *Galdieria*, что является своеобразным рекордом для микроводорослей [1, 9–12].

Световая гетеротрофия (фотогетеротрофия, или миксотрофия) и темновая гетеротрофия (хемотротрофия) служат адаптивной стратегией, позволяющей использовать растворенные органические вещества в тех случаях, когда в среде обитания они становятся наиболее выгодным источником энергии [8]. Таким образом, возможность фото- и хемотротрофного питания в разных биохимических вариантах является успешной эволюционной стратегией микроводорослей, увеличивающей их физиолого-биохимическую активность [8]. Взаимоотношение дыхательного и фотосинтетического процессов при фотогетеротрофии и возможные для усвоения органические субстраты пока полностью не выяснены, что подразумевает дальнейшие исследования *Galdieria* и других водорослей-миксотрофов [8, 10, 13, 14].

Экстремофильные организмы вызывают все больший интерес благодаря своим уникальным метаболическим способностям и большому биотехнологическому потенциалу. Биоремедиация бытовых и промышленных сточных вод, характеризующихся повышенной температурой и содержащих органические вещества, является наиболее перспективным направлением использования микроводорослей рода *Galdieria* в биотехнологии. Прибрежные водорослевые маты горячих природных источников, содержащие *G. sulphuraria*, указывают на возможность иммобилизации культуры в очистных сооружениях [15], поэтому использование микроводорослей рода *Galdieria* для извлечения органических веществ из отходов пищевых производств может быть перспективным [16, 17]. Список потребляемых *Galdieria* субстратов, несмотря на обширность, нельзя считать полным. Требуется дальнейшие исследования, чтобы установить полный круг потребляемых продуктов с учетом их возможной токсичности. Среди десятков известных

для *Galdieria* органических субстратов не значатся сведения об этаноле как возможном органическом источнике энергии, хотя этиловый спирт — энергетически выгодное соединение, конечными продуктами превращений которого в клетке являются CO_2 и H_2O . Цель настоящей работы — выяснение влияния этанола на рост микроводоросли *G. sulphuraria*.

МЕТОДИКА

Штамм и условия культивирования. В опытах использовали аксеничную культуру термоацидофильной красной микроводоросли *G. sulphuraria* (Galdieri) Merola, штамм IPPAS P513 из Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН. Водоросли выращивали при 38°C на культуральной среде Аллен, доводя pH до 2.5 за счет микродобавки H_2SO_4 [6, 10]. Контрольную фотоавтотрофную культуру и фотогетеротрофные культуры, с 0.1% этанола или 0.1% глюкозы, выращивали при круглосуточном освещении на постоянном дневном 3500K свету 40 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹ (лампы SL 20/32735, Китай). Наряду с этим, в варианте опыта с автотрофной культурой и культурой с добавкой этанола эксперимент проводили в полной темноте. Для выращивания использовали конические колбы объемом 100 мл, внося в каждую по 50 мл среды для культивирования (высота жидкости в колбе — 4 см). Клеточные суспензии ежедневно перемешивали механически в течение 5 мин, не используя барботирование или качание для уменьшения испарения этанола [18]. Отбор аликвот для определения ростовых характеристик в культурах клеток проводили 5 раз: на 1 (нулевая точка), 2, 4, 8 и 11 сут в трех биологических повторностях. Дальнейший рост прекращали из-за повышенного испарения спирта при температуре выше комнатной или израсходования добавляемой глюкозы. Подсчет клеток проводили в камере Горяева на бинокулярном микроскопе Биомед 6, (ООО “Биомед”, Китай—Россия). Начальная плотность составляла 1.2×10^6 кл./мл.

Спектры поглощения. Для регистрации спектров поглощения использовали аликвоты клеток объемом 1.5 мл. Спектры образцов измеряли в прямоугольных стандартных оптических кюветах на 1.0 см на спектрофотометре Beckman DU-650 (“Beckman Coulter Inc.”, США) в спектральном диапазоне 400–750 нм.

Значение минимального уровня светорассеяния клеточных образцов при 750 нм, не искажаемого поглощением хлорофилла, служило для сопоставления с результатами подсчета числа клеток и для определения их фотосинтетической и дыхательной активности [19–21].

Для получения спектров, корректно отражающих абсорбционные свойства фотосинтетического аппарата, спектр каждого образца регистрировали

трижды, усредняли, после чего вычитали вклад рассеянного света во всей видимой спектральной области регистрации, используя математическое обеспечение “Origin 6.1”.

Расходование этанола и глюкозы. Для отделения клеток культуральную жидкость в объеме 1.5 мл центрифугировали в течение 10 мин при 7000 g на центрифуге Eppendorf (“MiniSpin”, Германия). Содержание этанола в надосадочной жидкости определяли хроматографически по мере роста культуры одновременно с отбором проб для подсчета числа клеток. Использовали газовый хроматограф Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия), оснащенный капиллярной колонкой ZB-WAXplus размером 30 м × 0.25 мм × 0.35 μм (“Phenomenex”, США) и ПИД-детектором. Разделение проводили в градиенте температуры. Газом-носителем служил азот марки ОСЧ. Для учета повышенного испарения спирта из культуральной среды [18] при 38°C в течение всего 11-дневного эксперимента использовали не содержащие клеток контрольные колбы с внесенным этанолом (спирт этиловый ректифицированный, “Люкс”, 96.3%, ГОСТ 5962-2013, ООО “Донской”, РФ). Расходование D-глюкозы (“Renewal”, РФ) в культуральной среде определяли спектрофотометрически при 504 нм глюкозооксидазным методом, используя набор “Агат-Мед” (Россия). Как и для подсчета числа клеток, уровень этанола и глюкозы измеряли в трех сериях экспериментов.

Определение клеточного дыхания и фотосинтеза. Поглощение кислорода в темноте и выделение кислорода на свету регистрировали непосредственно в суспензии клеток *G. sulphuraria* на потенциометре, снабженном электродом Кларка Охуграф, (“Hansatech”, Германия), как описано в работах [20, 21] в термостатируемой кювете объемом 1 мл при 38°C. Фотосинтетическую активность определяли с естественным донором (H₂O) и акцептором (CO₂) электронов. Клетки предварительно концентрировали для достижения равных значений оптической плотности суспензии (OD₇₅₀) мягкой фильтрацией (фильтры “Nalgene”, USA, размер пор 0.45 μм). Изменение концентрации кислорода в среде выражали в нмоль O₂/(OD₇₅₀ мл·мин. Источником белого света служил осветитель ОИ-24 (“ЛОМО”, Россия), интенсивность освещения – 800 мкМ фотонов м⁻² с⁻¹. Непосредственно перед измерениями собранные клетки для адаптации к темновым условиям выдерживали 20 мин в темноте и для преадаптации к свету освещали в течение 20 мин белым светом лампы SL 20/32735, используемой для выращивания культуры.

Статистическая обработка. Для статистического анализа различий при построении гистограмм использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в программе “Origin 7”. Значимыми считались различия с доверительной вероятностью 95% ($P < 0.05$). Столбцы гистограмм,

соответствующие сравниваемым средним величинам, обозначались латинскими буквами, которые при выявлении статистической достоверности различий снабжались знаком*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики роста и дыхания клеток *G. sulphuraria* в темноте с этанолом. Микроорганизмы в своем большинстве не способны к росту и нейтрализации этанола, если его содержание превышает 4% [22, 23]. Концентрация спирта, которая вызывает окислительный стресс и клеточный токсикоз, тем не менее, индивидуальна. Концентрации этанола, используемые для гетеротрофного роста микроводорослей, обычно не превышают 0.5–1.0% [23, 24]. При большем содержании токсическое действие спирта усиливается настолько, что рост микроорганизмов сначала замедляется, а затем останавливается. Оптимальные концентрации этанола также видоспецифичны. Например, при наличии в среде 0.5% этанола биомасса зеленой водоросли *Dunaliella viridis* была меньше биомассы, нараставшей в среде с 0.3% этанола [24]. Лишь у *E. gracilis* этанол остается активным стимулятором гетеротрофного роста в концентрации, достигающей 1.5% [25]. В настоящей работе рассмотрена возможность роста *G. sulphuraria* в присутствии этанола на свету и в темноте. В световых условиях, то есть в режиме фотогетеротрофии, добавление в среду этанола в концентрации 0.5 или 1.0% не давало прибавки в росте (данные не показаны), по сравнению с концентрацией, равной 0.1%. В дальнейшем, во всех проведенных экспериментах использовалась концентрация, равная 0.1% (21.7 мМ, вес/об.), чтобы сделать менее вероятным токсическое действие спирта. Эта же концентрация этанола была использована и для темновых условий. На рис. 1 представлены две гистограммы, отражающие количество клеток в культуре *G. sulphuraria*, находящейся в темноте без добавки и с добавкой этанола. Статистическая обработка результатов показала отсутствие достоверных изменений роста у исходно фотоавтотрофной культуры, не содержащей этанол, что в этом случае естественно из-за блокировки фотосинтеза и отсутствия иных источников энергии (рис. 1а). В присутствии этанола статистически значимых изменений роста также не наблюдалось (рис. 1б). Количество клеток в обоих вариантах культуры оставалось на постоянном и одинаковом уровне (состояние переживания клеток).

Исследование дыхания у клеток *G. sulphuraria*, помещенных в темноту, показало низкую скорость поглощения O₂ контрольными клетками при истощении субстратов дыхания в отсутствие фотосинтеза, тогда как в присутствии этанола дыхание возрастало на второй день примерно в 2.5 раза, и в последующие дни падало до значений, сравнимых с таковыми у контрольных растений (рис. 2).

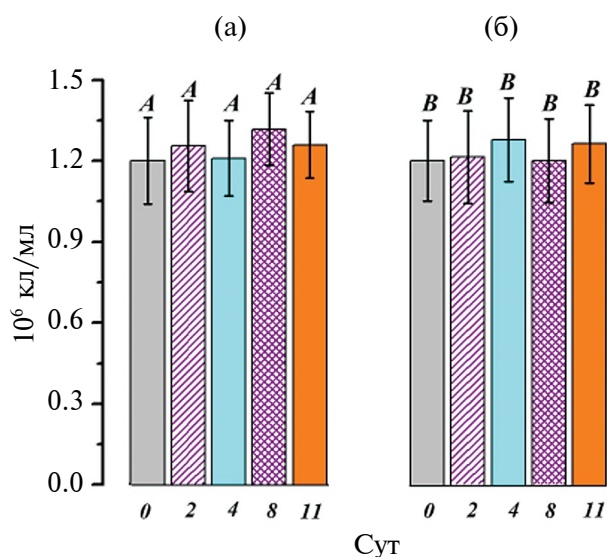


Рис. 1. Рост культуры *G. sulphuraria* в темноте без этанола (а) и при добавлении 0.1% этанола (б). Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$). Совпадение буквенных обозначений над столбцами указывает на отсутствие статистически значимых изменений в сериях измерений. Доведительный интервал $P \leq 0.05$.

Так как культура практически не росла в присутствии этанола, а дыхание при этом значительно возрастало, можно видеть, что стимуляция роста этанолом в темновых условиях не реализовывалась. В таком случае можно предположить проявление токсического действия этанола (мягкого стресса), что существенно отличает его от известных для *G. sulphuraria* иных органических субстратов, поскольку в присутствии глюкозы или других гексоз и глицерина наблюдается темновой гетеротрофный рост *G. sulphuraria*, который значительно превосходит возможности фотоавтотрофии [10, 11, 26]. Последующее снижение скорости поглощения кислорода клетками *G. sulphuraria* в темноте в присутствии этанола даже в условиях стресса также можно объяснить истощением дыхательного субстрата в отсутствие фотосинтеза (рис. 2).

Характеристики роста клеток *G. sulphuraria* на свету в фотоавтотрофных или фотогетеротрофных (в присутствии этанола или глюкозы) условиях. В эксперименте на свету (рис. 3) у контрольной фотоавтотрофной культуры (столбцы А) в первые несколько дней сохранялось состояние лаг-фазы. Тенденция к росту числа клеток началась после 4 сут и становилась достоверной к 8 и 11 сут ($A^* \geq A$). Наблюдаемый здесь и в других работах [10, 27] медленный рост фотоавтотрофной культуры объясняется особенностями экологии *G. sulphuraria* [6]. В высококислых серных источниках с повышенной температурой, в которых обитает эта микроводоросль, буферное равновесие

$\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ уже при $\text{pH} < 4$ полностью смещено в сторону CO_2 , а повышенная температура заметно снижает растворимость углекислого газа, что приводит к низкой фотосинтетической активности и замедленному фотоавтотрофному росту *Galdieria* [10, 13, 28]. Гетеротрофия с использованием возможно большего числа органических соединений становится жизненно важным свойством. Возможность метаболизма этанола, несмотря на его побочное отрицательное действие, по-видимому, в числе таких свойств.

В присутствии этанола лаг-фаза (столбцы В) занимала столько же времени, сколько при фотоавтотрофии. Достоверное опережение в росте по сравнению с фотоавтотрофной культурой ($B^* > A^*$) прослеживалось в последние дни опыта. К окончанию эксперимента, на 11 сут, численность “этанольных” клеток превышала накапливаемую при фотоавтотрофии в 1.7 раза, что могло указывать на усвоение этанола на свету. Необходимо отметить, что при использовании также 0.1%-ного этанола в среде для зеленой микроводоросли *Haematococcus pluvialis* было получено почти такое же увеличение биомассы: в среднем в два раза [29].

Длительность лаг-фазы в зависимости от органического субстрата у *G. sulphuraria* могла заметно различаться, например, составляя до 30 сут при использовании лимонной кислоты [28] и даже 40 сут при добавлении дульцитолу [10]. Для сопоставления с этанолом была использована фотогетеротрофная культура, содержащая 0.1% глюкозы, изменения роста которой начинались практически без лаг-фазы (рис. 3). На 2–4 сут эксперимента, к началу усиления роста на этаноле, численность клеток в культуре, содержащей глюкозу, уже удваивалась в

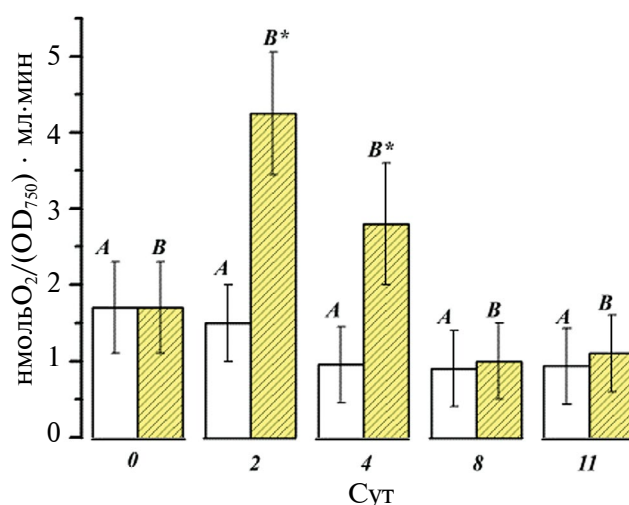


Рис. 2. Изменение скорости поглощения кислорода при темновом дыхании клеток *G. sulphuraria*, находящихся в темноте без добавления (А) и с добавлением 0.1% этанола (В). * Обозначены статистически значимые различия (см. Методы).

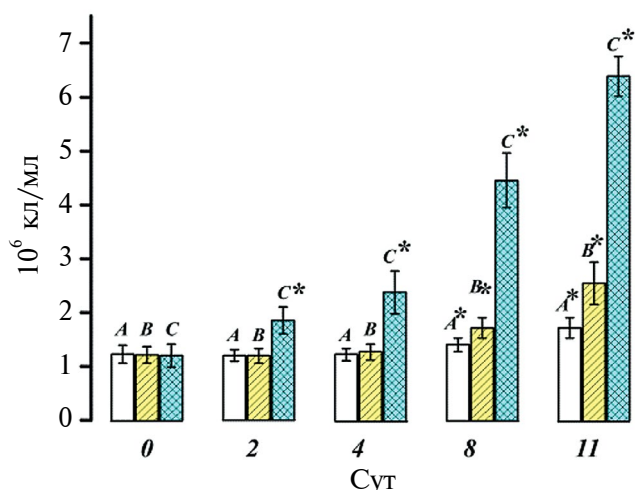


Рис. 3. Динамика роста культуры *G. sulphuraria* на свету в течение 11 сут без добавок (А, фотоавтотрофная культура), в присутствии 0.1% этанола (В) и в присутствии 0.1% глюкозы (С). Приведены средние значения и доверительные интервалы ($n = 3$). Совпадение буквенных обозначений в каждой серии означает отсутствие статистически значимых различий; * Обозначены статистически значимые различия.

экспоненциальной фазе роста и продолжала далее увеличиваться более быстрыми темпами. В итоге, на 11 сут количество клеток в присутствии глюкозы примерно в 4 раза превосходило их количество при выращивании на этаноле и почти в 7 раз – при фотоавтотрофном росте.

Для оценки роста микроводорослей наряду с подсчетом клеток использовалось измерение светорассеяния, величина которого пропорциональна

сухой биомассе в широком диапазоне концентраций [19, 20, 29]. Измерение светорассеяния связано с регистрацией спектров поглощения фотосинтетических пигментов непосредственно в клетке и позволяло сочетать данные о росте культуры с изменениями дыхания и фотосинтеза в пробах.

Спектры поглощения суспензии клеток *G. sulphuraria*. Показателем уровня светорассеяния на разных сроках выращивания исследуемой культуры микроводоросли *G. sulphuraria* служили данные об ординатах спектров поглощения при 750 нм. На рис. 4а ординаты измеренных спектральных кривых при 750 нм отражают уровень светорассеяния клеточных суспензий на 11 сут эксперимента (ординаты спектра 3 при 750 нм уменьшены вдвое). На рис. 4б представлены те же спектры, что и на рис. 4а, но после вычитания вклада, вносимого светорассеянием, и нормирования в максимуме поглощения хлорофилла.

Из рис. 4 видно, что к 11 сут светорассеяние вносило существенный вклад в амплитуду спектральных кривых (рис. 4а), но после вычитания вклада светорассеяния форма спектров (shape) во всей спектральной области измерений от 400 до 750 нм оставалась практически неизменной (рис. 4б).

Изменения в соотношении полос поглощения при 625 нм (фикобилисомы) и 678 нм (хлорофилл) были незначительными. Очевидно, что и спирт, и глюкоза в малых концентрациях, в отличие от 1% глюкозы [27], практически не влияли на относительное содержание пигментов, что указывало на отсутствие нарушений фотосинтетического аппарата.

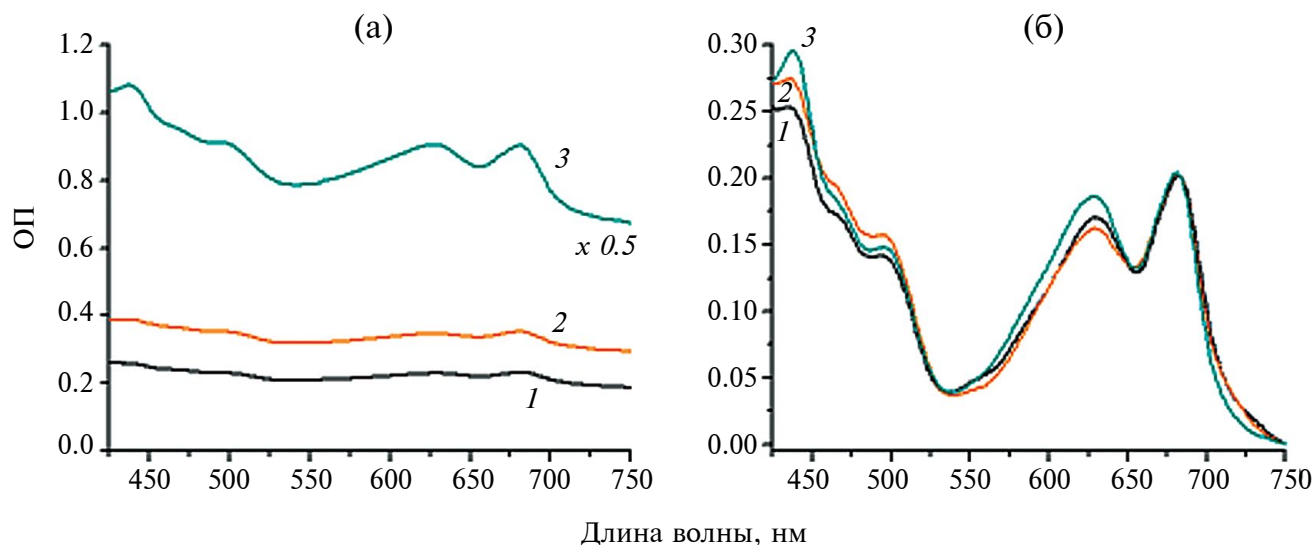


Рис. 4. Спектры поглощения культуры клеток *G. sulphuraria* на 11 сут роста на свету (а), и те же спектры после вычитания вклада, даваемого светорассеянием, и нормирования в максимуме поглощения хлорофилла (б): 1 – фотоавтотрофная культура; 2 – фотогетеротрофная культура, содержащая 0.1% этанола; 3 – фотогетеротрофная культура, содержащая 0.1% глюкозы (ординаты спектра 3 при 750 нм уменьшены вдвое).

Дыхание и фотосинтез клеток *G. sulphuraria* на свету в фотоавтотрофных или фотогетеротрофных условиях. Данные о росте *G. sulphuraria* были сопоставлены с результатами измерения дыхания и фотосинтеза (рис. 5).

Клеточное дыхание в фотоавтотрофном режиме оставалось низким, его некоторое увеличение в ходе эксперимента оставалось в пределах точности измерений (рис. 5а, столбцы А). В присутствии этанола потребление кислорода достоверно увеличивалось уже на 2 день ($B^* > B$), так же как и у клеток, помещенных в темноту (рис. 2). Наибольшее усиление дыхания наблюдалось при потреблении глюкозы ($C^* > B^* > A$). На 4 сут уровень дыхания культуры, содержащей этанол, сравнился с уровнем, наблюдаемым в присутствии глюкозы. На 8 сут потребление кислорода сохранялось примерно одинаковым в обеих фотогетеротрофных культурах ($B^* \approx C^*$) и к окончанию эксперимента, на 11 сут, в обоих случаях начинало снижаться (рис. 5а), что можно объяснить истощением глюкозы и значительным уменьшением концентрации спирта в культуральной жидкости (см. рис. 6). Таким образом, в течение эксперимента, начиная со 2 сут, уровень дыхания при добавлении этанола и глюкозы достоверно превышал уровень фотоавтотрофной культуры (B^* и $C^* > A$). Следует отметить, что на фоне резко увеличившейся скорости дыхания в присутствии этанола на 2 сут эксперимента в темноте и на свету (рис. 2 и 5а) рост культуры микроводорослей не обнаруживался (рис. 1 и 3). В дальнейшем, в темноте в присутствии этанола не происходило увеличения количества клеток (рис. 1), а на свету рост активизировался по сравнению с

фотоавтотрофной культурой лишь в последние дни эксперимента на 8 и 11 сут (рис. 3). Совокупность этих данных указывает на то, что этанол вызывает стресс, который клетки микроводоросли преодолевают на свету, по-видимому, благодаря процессу фотосинтеза.

Определение скорости фотосинтетического выделения кислорода в фотоавтотрофной культуре показало, что, судя по средним значениям, происходило ее увеличение, но согласно доверительным интервалам, это увеличение нельзя считать достоверным. В сравнении с фотоавтотрофией усиление фотосинтеза при добавлении этанола и глюкозы (рис. 5б) было достоверным и весьма заметным (B^* и $C^* > A$). По всей вероятности, резкое возрастание скорости дыхания в начале лаг-фазы в присутствии этанола сопровождалось ускоренным образованием углекислого газа, который используется в качестве конечного акцептора фотосинтеза и ускоряет этот процесс.

Фотосинтетическая активность в присутствии глюкозы в среде уже на 2 сут увеличивалась вдвое. К этому дню в культуре с этанолом уровень фотосинтеза еще оставался прежним, что коррелировало в этом случае с наличием лаг-фазы. Однако на 4 сут фотосинтез в присутствии этанола обогнал фотосинтез при наличии глюкозы, достигая максимума на 8 сут, оставаясь выше и в последние 11 сут. На первый взгляд, данное увеличение фотосинтетической активности в сравнении не только с фотоавтотрофной, но и с фотогетеротрофной культурой с глюкозой выглядит парадоксально, так как увеличение числа клеток *G. sulphuraria* в присутствии глюкозы значительно опережает их

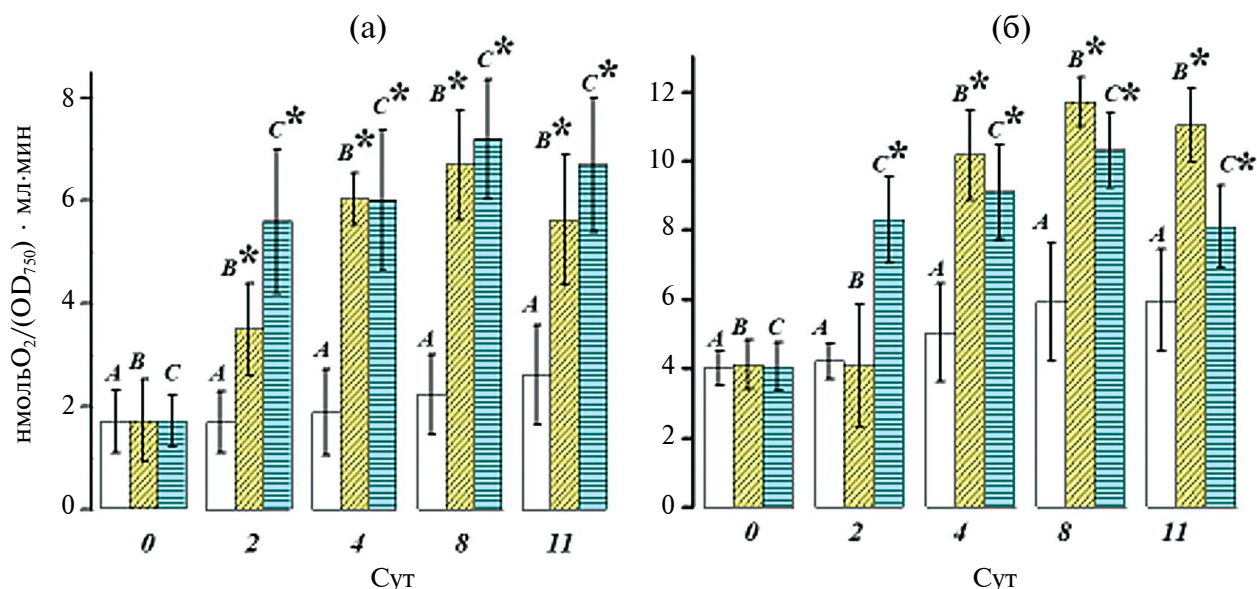


Рис. 5. Поглощение кислорода при темновом дыхании (а) и выделение кислорода при фотосинтезе с поправкой на затраты O₂ при дыхании (б) в культуре клеток *G. sulphuraria* при фотоавтотрофном росте (А), фотогетеротрофном в присутствии 0.1% этанола (В) или 0.1% глюкозы (С). * Отмечены статистически значимые различия.

прибавку в присутствии спирта. Однако, как отмечалось выше, ускорению фотосинтеза в культуре с этанолом способствовало усиление дыхания, в результате чего в клетках возрастала концентрация углекислого газа, который становился дополнительным субстратом-стимулятором фотосинтетического процесса. В то же время, именно благодаря продуцированию субстратов дыхания (глюкозы и восстановителей) в процессе фотосинтеза культура клеток в присутствии этанола (рис. 5б) на свету сохраняла высокую скорость дыхания, в отличие от темноты, когда субстраты дыхания исчерпывались (рис. 2). Следует добавить, что глюкоза является у фотосинтетиков конечным продуктом фотосинтетических реакций. При поступлении извне она может поэтому сразу же использоваться клеткой как строительный материал, что и приводит к более быстрому росту клеточной массы без значительной параллельной этому интенсификации фотосинтеза. Кроме того, известно, что одной из регуляторных функций глюкозы у различных фотосинтезирующих организмов является ингибирование фотосинтетической активности [6, 8, 10, 14].

Изменение концентрации этанола в культуре клеток в темноте или на свету. Изменение концентрации этанола на свету и отсутствие его потребления клетками *G. sulphuraria* в темноте подтверждаются хроматографическим определением спирта в культуральной среде (рис. 6). Этанол — легко испаряющаяся жидкость, потери которой при комнатной температуре и стационарном культивировании составляют не менее 20% [16]. При 38°C испарение протекает еще интенсивнее, составляя в условиях эксперимента 65% на 11 сут инкубации (рис. 6, кривая 1, контроль в отсутствие клеток). Кривая 2, полученная для культуры клеток, росших в темноте с этанолом, почти полностью совпадала с кривой 1 в пределах точности эксперимента за все время измерений (рис. 6), что подтвердило отсутствие потребления этанола клетками *G. sulphuraria* в темновых условиях (рис. 2). Хотя кривая, отражающая снижение концентрации этанола, измеренной для культуры клеток, росших с этанолом на свету (кривая 3), начиная с 4–5 сут расходится с кривой, отражающей испарение спирта (кривая 1), определенное достоверное потребление этанола клетками можно наблюдать только в конце периода культивирования согласно кривой 3 (рис. 6), полученной для клеток, находившихся на свету. Для сравнения приведено полное потребление за время эксперимента глюкозы и значительное сокращение периода лаг-фазы (рис. 6, кривая 4).

Необходимо отметить, что снижение концентрации этанола в ростовой среде по мере культивирования *G. sulphuraria* может быть связано не только с испарением, как показано на рис. 6 (кривая 1), а также с адаптацией клеток к присутствию этанола на свету к концу периода культивирования.

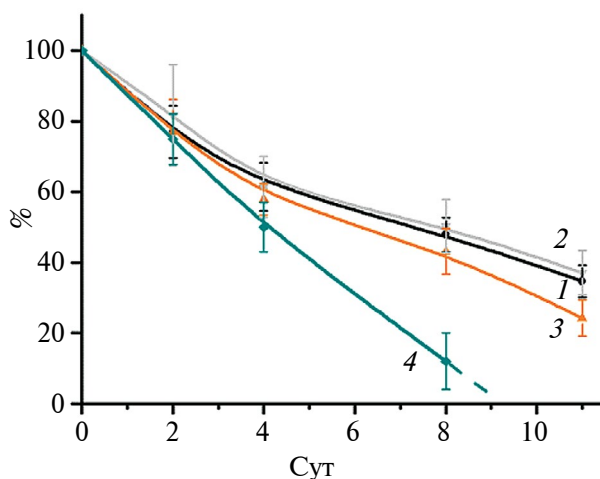


Рис. 6. Динамика расходования (%) этанола и глюкозы в среде клетками *G. sulphuraria*: 1 — контроль, среда с 0.1% этанола без клеток; 2 — среда с 0.1% этанола после выращивания *G. sulphuraria* в темноте; 3 — среда с 0.1% этанола после выращивания *G. sulphuraria* на свету; 4 — среда с 0.1% глюкозы при световом выращивании клеток. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$).

Известно, что многие микроводоросли метаболизируют этанол при помощи последовательно функционирующих ферментов алкогольдегидрогеназы (АДГ), окисляющей этанол до ацетальдегида, и ацетальдегиддегидрогеназы, преобразующей получаемый ацетальдегид в ацетат [30, 31]. В процессе адаптации к этанолу *G. sulphuraria* может индуцировать синтез этих ферментов, что в таком случае объясняет более быстрое исчерпание этанола в среде с клетками на свету (рис. 6, кривая 3), по сравнению с изменением его концентрации в среде с клетками в темноте (рис. 6, кривая 2). Тем более, что согласно геномным данным, *G. sulphuraria* способна к синтезу глицериндегидрогеназы/железосодержащей алкогольдегидрогеназы (FeADH, Gasu_57960), относящейся к типу III АДГ [32]. Кроме того, обнаружено также присутствие гена второго ключевого фермента превращений этанола, ацетальдегиддегидрогеназы [33]. Роль обоих ферментов не сводится лишь к окислению этанола, так как они рассматриваются как активные участники защиты клеток от окислительного стресса [34].

Таким образом, влияние этанола на рост культуры *G. sulphuraria* является комплексным, способствует увеличению плотности культуры благодаря, в конечном итоге, ускорению дыхания с выделением CO_2 , который усиливает фотосинтез как конечный акцептор. С одной стороны, дыхание ускоряется при стрессе, вызываемом этанолом, с другой стороны, после периода адаптации при возможном метаболизме этанола также может ускориться выделение CO_2 . Баланс между дыханием, фотосинтезом и возможным усвоением этанола представлен на рис. 7. Образующийся в митохондриях в цикле

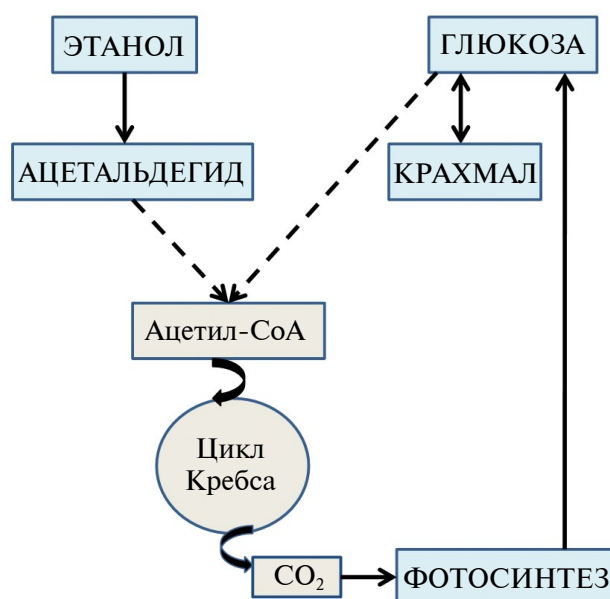


Рис. 7. Схема, отражающая баланс между дыханием и фотосинтезом (см. в текст).

Кребса CO_2 поступает в хлоропласты, интенсифицируя фотосинтез. Экзогенная глюкоза обладает большими метаболическими и энергетическими возможностями, образуя запасные углеводы и регулируя активность фотосинтетических ферментов. Сравнение с добавляемой глюкозой (рис. 7) позволяет интерпретировать ряд особенностей роста *G. sulphuraria*, несмотря на то, что два органических субстрата, этанол и глюкоза, различаются по многим параметрам. Глюкоза не обладает токсичностью, активно транспортируется внутрь клетки [35] и, в отличие от этанола, усваивается клетками *G. sulphuraria* в концентрации вплоть до 17% [12]. Возможности усвоения глюкозы при фотогетеротрофии, как показано в настоящей работе, в несколько раз превышают возможности потребления этанола (рис. 3). Быстрое расходование глюкозы как субстрата при концентрации 0.1% происходит еще до окончания срока эксперимента (рис. 6), так как одновременно с обеспечением роста клеток часть глюкозы запасается впрок в форме багрянкового крахмала [27].

Сопоставление данных по фотоавтотрофному, фотогетеротрофному и темновому гетеротрофному росту *G. sulphuraria* [36–38] показало, что ингибирование фотосинтетического аппарата глюкозой при выращивании *G. sulphuraria* в темноте в значительной мере снимается при фотогетеротрофии [37–39]. Образующийся при окислении глюкозы углекислый газ транспортируется из митохондрий в хлоропласты, где используется в фотосинтезе. В присутствии этанола интенсификация фотосинтеза, происходящая вслед за возрастанием клеточного дыхания, также может объясняться

дополнительным использованием клеткой в фотосинтетическом процессе углекислого газа, образующегося при дыхании.

Наиболее вероятной причиной возможного потребления этанола на свету после периода адаптации к вызванному им стрессу является световая активация АДГ и ацетальдегиддегидрогеназы как ферментов, отвечающих за усвоение этанола при поступлении в клетку. Потребление этанола, выгодное энергетически, одновременно приводит к снижению внутриклеточной концентрации и стрессового воздействия этанола.

* * *

ВКЛАД АВТОРОВ. Авторы принимали равное участие в экспериментах, написании и редактировании рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700044-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoon H.S., Müller K.M., Sheath R.G., Ott F.D., Bhattacharya O. // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 482–492. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00210.x>
2. Pollio A., Cennamo P., Ciniglia C., De Stefano M., Pinto G., Huss V.A.R. // Protist. 2005. V. 156. № 3. P. 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.04.004>
3. Liu C., Liu J., Hu S., Wang X., Wang X., Guan Q. // Peer J. 2019. 7:e7189. P. 1–10. <https://doi.org/10.7717/peerj.7189>
4. Muravenko O., Selyakh I., Kononenko N., Stadnichuk I. // Eur. J. Phycol. 2001. V. 36. P. 227–232.
5. Miyagishima S., Tanaka K. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 62. P. 926–941. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab052>
6. Stadnichuk I.N., Tropin I.V. // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. № 5. P. 472–487. <https://doi.org/10.31857/S0320972522050050>
7. Seckbach J. Overview of Cyanidian Biology. / Eds. J. Seckbach, D.J. Chapman. N.Y.: Springer, 2010. 345 p.
8. Selosse M.-A., Charpin M., Not F. // Ecol. Lett. 2017. V. 20. № 2. P. 246–263. <https://doi.org/10.1111/ele.12714>

9. Přibyl P., Cepák V. // J. Appl. Phycol. 2019. V. 31. P. 1555–1564.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-1738-9>
10. Gross W., Schnarrenberger C. // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. № 4. P. 633–648.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-1738-9>
11. Oesterhelt C., Schnarrenberger C., Gross W. // Eur. J. Phycol. 1999. V. 34. № 3. P. 271–277.
<https://doi.org/10.1080/09670269910001736322>
12. Schmidt R.A., Wiebe M.G., Eriksen N.T. // Biotechnol. Bioeng. 2005. V. 90. № 1. P. 77–84.
<https://doi.org/10.1002/bit.20417>
13. Seckbach J., Baker F.A., Shugerman P.M. // Nature. 1970. V. 227. P. 744–745.
14. Tischendorf G., Oesterhelt C., Hoffmann S., Girmus J., Schnarrenberger C., Gross W. // Eur. J. Phycol. 2007. V. 42. № 3. P. 243–251.
<https://doi.org/10.1080/09670260701437642>
15. Lang I., Bashir S., Lorenz M., Rader S., Weber G. // Appl. Phycol. 2022. V. 3. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1765702>
16. Čížková M., Vítová M., Zachleder V. Microalgae - From Physiology to Application. / Ed. M. Vitova. IntechOpen. 2019. P. 1–17.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.89810>
17. Selvaratnam T., Pegallapati A.K., Montelya F., Rodriguez G., Nirmalakhandan N., Van Voorhies W., Lammers P.J. // Bioresour. Technol. 2014. V. 156. P. 395–399.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.075>
18. Duboc P., von Stockar U. // Biotechnol. Bioeng. 1998. V. 58. № 4. P. 426–439.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980520\)58:4<428::AID-BIT10>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980520)58:4<428::AID-BIT10>3.0.CO;2-7)
19. Sloth J.K., Wiebe M.G., Eriksen N.T. // Enzyme Microbial. Technol. 2006. V. 38. № 1–2. P. 168–175.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>
20. Schwern, P., Hübner H., Buchholz R. // Eng. Life Sci. 2016. V. 17. № 2. P. 140–144.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201600004>
21. Voloshina O.V., Bolychevtseva Y.V., Kuzminov F.I., Gorbunov M.Y., Elanskaya I.V., Fadeev V.V. // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. № 8. P. 858–870.
22. Saeki A., Taniguchi M., Matsushita K., Toyama H., Theeragool, G. Lotong, N., Adachi O. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997. V. 61. № 2. P. 317–323.
23. Jiang Y., Xiao P., Shao Q., Qin H., Hu Z., Lei A., Wang J. // Biotechnol. Biofuels. 2017. V. 10. № 239. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0931-9>
24. Божков А.И., Мензянова Н.Г., Сысенко Е.И. // Biotechnologia Acta. 2014. V. 7. № 1. P. 93–99.
25. Rodriguez-Zavala J.S., Rodriguez-Zavala M.A., Ortiz-Cruz R., Moreno-Sanchez R. // J. Eukaryot. Microbiol. 2006. V. 53. № 1. P. 36–42.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00070.x>
26. Sloth J.K., Jensen H.C., Pleissner D., Eriksen N.T. // Bioresource Technology. 2017. V. 238. P. 296–305.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.043>
27. Stadnichuk I.N., Semenova L.R., Smirnova G.P., Usov A.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 88–93.
28. Sentsova O.Yu. // Botanichesky J. 1991. V. 76. № 1. P. 69–79.
29. Averina N.G., Kozel N.V., Shcherbakov R.A., Radyuk M.S., Manankina E.E., Goncharik R.G., Shalygo N.V. // Proceedings Nat. Acad. Sci. Belarus. Biol. Series. 2020. V. 65. P. 7–15.
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-7-15>
30. Lowrey J., Brooks M.S., McGinn P.J. // J. Appl. Phycol. 2015. V. 27. P. 1485–1498.
<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0459-3>
31. Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de Bashan L.E., Bashan Y. // Water Res. 2011. V. 45. P. 11–36.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
32. Saura P.P., Chabi M., Corato A., Cardol P., Remacle C. // Front. Plant Sci. 2022. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022>
33. Rossoni A.W., Schönknecht G., Lee H.L., Rupp R.L., Flachbart S., Mettler-Altmann T. et al. // Plant Cell Physiol. 2019. V. 60. № 3. P. 702–712.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy240>
34. Lin G.-H., Hsieh M.-C., Shu H.-Y. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 9921.
<https://doi.org/10.3390/ijms22189921>
35. Barbier G., Oesterhelt C., Larson M.D., Halgren R.G., Wilkerson C., Garavito R.M. et al. // Plant Physiol. 2005. V. 137. № 2. P. 460–474.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.051169>
36. Curien G., Lyska D., Guglielmino E., Westhoff P., Janetzko J., Tardif M. et al. // New Phytologist. 2021. V. 231. P. 326–338.
<https://doi.org/10.1111/nph.17359>
37. Stadnichuk I.N., Rakhimberdieva M.G., Bolychevtseva Yu.V., Yurina N.P., Karapetyan N.V., Selyakh I.O. // Plant Sci. 1998. V. 136. № 1. P. 11–23.
38. Oesterhelt C., Schmälzlin E., Schmitt J.M., Lokstein H. // Plant J. 2007. V. 51. P. 500–511.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03159.x>
39. Roth M.S., Westcott D.J., Iwai M., Niyogi K.N. // Commun. Biol. 2019. V. 2. P. 347.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0577-1>

Effect of Ethanol on the Growth of the Red Microalga *Galdieria sulphuraria***Yu. V. Bolychevtseva^{a,*} and I. N. Stadnichuk^b**^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia*^b*Timiryasev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 127726 Russia*^{*}*e-mail: bolychev1@yandex.ru*

Polyextremophilic red microalgae of the genus *Galdieria*, which inhabit hot sulphur springs under conditions unusual for eukaryotes, are capable of heterotrophy. Among the dozens of exogenous organic substrates identified for *Galdieria*, ethanol is not mentioned as a possible energy source. As it turned out that ethanol did not alter the growth of the model species *Galdieria sulphuraria* when grown in the dark. In contrast, the growth of microalgae is activated in the light, despite the known cell stressor effect of ethanol. The effect of ethanol as an oxidative stress factor may be indicated by the increase in cellular respiration observed in the dark and also in the light even before the activation of photosynthesis. The marked acceleration of growth of *G. sulphuraria* culture in the light is most likely due to the stimulation of respiration by ethanol with generation of CO₂ and its use by chloroplasts as an additional carbon substrate during the photosynthetic process. Compared to the classical organic substrate glucose, the light-induced growth of *G. sulphuraria* cultures in the presence of ethanol is less intense. It can be speculated that ethanol stress in light induces the system of two consecutive key enzymes in the primary alcohol metabolism chain (alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase), which then leads to the eventual complete oxidation of ethanol, resulting in accelerated growth of *G. sulphuraria*.

Keywords: *Galdieria sulphuraria* , ethanol, glucose, photoheterotrophy, photosynthesis, alcohol dehydrogenase