

ПУТИ ФИКСАЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Геворгиз Р.Г., Лелеков А.С.

ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Россия; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2021

Аннотация. В работе рассматриваются механизмы ассимиляции, фиксации и утилизации неорганических форм углерода клетками цианобактерий. Источниками углерода являются углекислый газ, который в зависимости от величины pH может находиться в форме CO_2 , гидрокарбонат-ионов HCO_3^- или карбонат-ионов CO_3^{2-} . Углекислый газ и гидрокарбонат-ионы являются источниками неорганического углерода для микроводорослей. Поэтому именно доступность углерода в той или иной форме может выступать в роли лимитирующего рост фактора. На сегодняшний день достаточно подробно исследован CO_2 -концентрирующий механизм в клетках микроводорослей и цианобактерий, благодаря которому максимальные скорости фотосинтетического выделения кислорода при низких и высоких концентрациях CO_2 одинаковые. Эффективность использования внутриклеточного углерода повышается за счёт наличия внутриклеточного пула, в котором углерод представлено в форме гидрокарбонат-ионов, и снижения потерь CO_2 из-за диффузионных процессов. В литературе приводятся описания CO_2 -концентрирующего механизма для разных видов микроводорослей. Большая часть исследований CO_2 -КМ выполнено на эукариотических клетках, у которых внутриклеточный пул углерода может находиться и в цитоплазме, и в строме хлоропласта. Также описан CO_2 -КМ для цианопрокариот, у которых, согласно, в цитоплазме карбоангидраза не обнаружена. На основе современных представлений о CO_2 -КМ для спироулины *A. platensis* предложена обобщённая схема, которая описывает основные пути метаболизма неорганического углерода.

Ключевые слова: спироулина, углекислый газ, гидрокарбонат-ион, карбонат-ион, ассимиляция, углерод-концентрирующий механизм.

Цианобактерии – представители низших фототрофов – обладают чрезвычайно гибким метаболизмом, что позволяет им расти и вегетировать практически в любых типах экосистем, включая экстремальные. В ходе эволюции цианобактерии приобрели способность переживать неблагоприятные периоды лимитирования роста различными абиотическими факторами среды. Особую роль в лимитировании роста играют биогенные элементы: азот, фосфор, углерод и др. В среднем для фитопланктона нормальное соотношение данных элементов в структуре клеток является 1 P : 7 N : 40 C [1]. Содержание биогенов в клетках микроводорослей может сильно варьировать. Например, скорость поглощения того или иного элемента определяется не только его внешней концентрацией, но и активностью, количеством транспортных систем, которые участвуют в ассимиляции. Причём перенос биогенных элементов через мембрану обычно требует затрат энергии в виде АТФ [2]. Величина внешней концентрации, строго говоря, не может рассматриваться как основной параметр, от которого зависит поглощение элемента. При низких температурах среды даже в условиях питательно насыщенного раствора, скорость поглощения элементов микроводорослями будет мала либо равна нулю вследствие низкой активности транспортных систем. Кроме того, их активность зависит от pH среды, солёности. Исключением могут являться незаряженные молекулы, например, углекислый газ, который может диффундировать через мембрану клетки без затрат энергии.

Доля углерода в биомассе низших фотоавтотрофов составляет около 50 % сухого вещества (СВ) клеток [3]. Источниками углерода являются углекислый газ, который в зависимости от величины pH может находиться в форме CO_2 , гидрокарбонат-ионов HCO_3^- или карбонат-ионов CO_3^{2-} . Известно [4], что именно углекислый газ и гидрокарбонат-ионы являются источниками неорганического углерода для микроводорослей. Поэтому именно доступность углерода в той или иной форме может выступать в роли лимитирующего рост фактора. В некоторых случаях микроводоросли способны к миксотрофному или даже гетеротрофному росту, поглощая органический углерод [5]. Однако для ассимиляции органических источников углерода на клеточной мембране должны сформироваться транспортные симпорт-системы, что требует определённого времени, которое может достигать нескольких суток [6].

Понимание путей метаболизма углерода у цианобактерий имеет важнейшее прикладное значение, например, при разработке технологий использования щелочных водоёмов, при алголизации почв, при очистке сточных вод, а также при культивировании цианобактерий в промышленных масштабах (спироулина, носток и др.). При интенсивном культивировании спироулины (*Arthrospira platensis*) одним из ключевых факторов, определяющих форму кривой роста, является углеродное обеспечение. При оптимальных световых и температурных условиях скорость роста будет определяться концентрацией биогенных элементов в питательной среде. Обычно при выращивании спироулины используется питательная среда Заррук [7], основным элементом которой является гидрокарбонат натрия. Способность клеток *A. platensis* выдерживать высокие величины pH позволяет культивировать спироулину без дополнительной подачи CO_2 , что значительно упрощает лабораторные исследования и удешевляет промышленное культивирование данного объекта. Без дополнительной подачи CO_2

в культуру единственным источником углерода является гидрокарбонат-ионы. Известно, что из-за высокого начального содержания пищевой соды в питательной среде именно поглощение гидрокарбонат-ионов клетками определяет динамику рН в накопительной культуре. При высоких значениях рН среды (>11) углерод представлен в растворе только карбонат-ионами [8].

Целью данной работы являлся анализ и обобщение литературных данных о путях метаболизма неорганического углерода в культурах цианобактериот.

Ключевой фермент, обеспечивающий связывание неорганического углерода с последующим образованием фосфолированных сахаров, является рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РБФК). РБФК локализована в строме хлоропластов у микроводорослей или в карбоксисомах цианобактерий. Количество данного белка может составлять до половины всех белков клетки [4]. В планетарном масштабе РБФК обеспечивает практически всю первичную продукцию [9]. РБФК катализирует присоединение CO₂ к первичному акцептору углерода в цикле Кальвина рибулозо-1,5-бисфосфату, при этом образуется две C₃ молекулы фосфоглицериновой кислоты (ФГК). Также фермент катализирует оксигенацию рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием одной C₃ ФГК и C₂ молекулы гликолата, который преобразуется в цепи метаболических реакций фотодыхания при участии АТФ до ФГК. В некоторых случаях происходит экскреция гликолата, что приводит к значительным энергетическим потерям и снижению скорости и эффективности фиксации углерода [10]. Карбоксилазная и оксигеназная активность РБФК определяются соотношением концентраций углекислоты и кислорода в окрестностях реакционного центра фермента. Поэтому адаптация клеток микроводорослей к недостатку CO₂ может проявляться в увеличении внутриклеточного количества CO₂ либо в увеличении количества активности самого РБФК [4].

На сегодняшний день достаточно подробно исследован CO₂-концентрирующий механизм в клетках микроводорослей и цианобактерий, благодаря которому максимальные скорости фотосинтетического выделения кислорода при низких и высоких концентрациях CO₂ одинаковые [4]. Эффективность использования внутриклеточного углерода C_i повышается за счёт наличия внутриклеточного пула, в котором C_i представлено в форме гидрокарбонат-ионов, и снижения потерь CO₂ из-за диффузионных процессов. Существенную роль в ассимиляции углерода играет цинк-содержащий фермент карбоангидраза (КА), участвующий в различных стадиях работы CO₂-концентрирующего механизма [4]. У цианобактерий внутриклеточная β-карбоангидраза ассоциирована с карбоксисомами [11]. В результате работы карбоангидразы на один поглощенный ион HCO₃⁻ образуется одна молекула CO₂ и один гидроксил-ион OH⁻ [12]. CO₂ используется в цикле Кальвина, а OH⁻ выносится во внешнюю среду. В литературе приводятся описания CO₂-концентрирующего механизма для разных видов микроводорослей. Большая часть исследований CO₂-КМ выполнено на эукариотических клетках, у которых внутриклеточный пул C_i может находиться и в цитоплазме, и в строме хлоропласта [11]. Также описан CO₂-КМ для цианобактериот [12], у которых, согласно [13], в цитоплазме карбоангидраза не обнаружена. Многочисленные исследования хлоропластов показали присутствие КА как в мембранах, так и в строме. C_i из внутриклеточного пула поступает в карбоксисому, где за счёт работы КА в зоне активного центра РБФК преобразуется в CO₂. При этом образуются гидроксил-ионы, избыток которых поступает в цитоплазму или удаляется за пределы клетки [4,12].

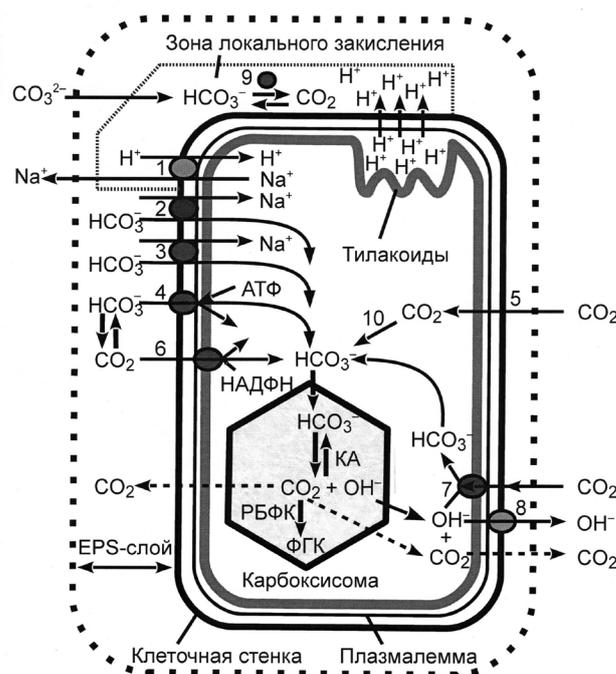


Рисунок 1. Схема поглощения и утилизации неорганического углерода клетками цианобактерий. Пояснения в тексте

Рассмотрим пример работы CO_2 -КМ у цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont. На рисунке 1.2 представлена схема ассимиляции неорганического углерода. Согласно современным представлениям [8] существует три основных переносчика, которые обеспечивают транспорт гидрокарбоната в клетку, причём активность переносчиков при разных концентрациях HCO_3^- в среде различная. При высоких концентрациях HCO_3^- работает переносчик BicA, который характеризуется низким сродством к гидрокарбонат-иону. Этот переносчик не требует затрат энергии, осуществляет, по сути, облегчённый транспорт (или симпорт с Na^+). Также низкое сродство препятствует избыточному поступлению гидрокарбонатов в клетку. Избыток натрия удаляется из клетки посредством специального канала (антипорт с H^+), который играет важную роль в регуляции внутриклеточного pH и транспорта многих ионов [4].

При снижении потока углерода в клетку включается дополнительный канал SbtA, который характеризуется большим сродством к HCO_3^- . SbtA, также как BicA, осуществляет облегчённый транспорт при участии катиона Na^+ без затрат энергии АТФ. В условиях недостатка углерода для реализации максимально возможного потока включается активный транспорт за счёт энергии АТФ посредством работы переносчика ВСТ1, который характеризуется высоким сродством к HCO_3^- . Отметим, что на начальных этапах накопительного культивирования величина pH стандартной питательной среды Заррук около 8,5 единиц. Следовательно, доля неорганического углерода в форме CO_2 составляет около 20 % от суммарного углерода в среде [11]. Поэтому поток углерода в клетку может быть представлен не только ионами HCO_3^- , но и углекислым газом. Молекулы CO_2 проникают в клетку либо за счёт диффузии, либо за счёт облегчённого транспорта с участием переносчиков NDH-13 и NDH-14 [13].

В современной литературе вопросам ассимиляции углерода клетками цианопрокариот уделено достаточно большое внимание. Однако практически нет упоминаний об ассимиляции карбонат-ионов. Хотя, в некоторых работах показано [11], что в качестве источника углерода для спирулины могут использоваться ионы CO_3^{2-} . Возможно, карбонат-ион при участии экстрацеллюлярной КА, находящейся в слое экзополисахаридов [4] в локальных зонах закисления [12], преобразуется в гидрокарбонат-ион и CO_2 , которые, согласно вышеуказанному механизму, поступают в клетку. Отметим, что ключевую роль в поддержании низких значений pH в зоне локального закисления играет транспорт протонов из полости тилакоидов.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Егоров В.Н., Поповичев В.Н., Гулин С.Б. и др. Влияние первичной продукции фитопланктона на оборот биогенных элементов в прибрежной акватории Севастополя (Чёрное море). *Биология моря*, 2018, т. 44, № 3, с. 207-214. [Egorov V.N., Popovichev V.N., Gulin S.B. et al. The influence of primary phytoplankton production on the turnover of biogenic elements in the coastal water area of Sevastopol (the Black Sea). *Marine biology*, 2018, vol. 44, no. 3, pp. 207-214. (In Russ.)]
2. Железнова С.Н. Продукционные характеристики морской диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin в интенсивной культуре при различных источниках азота в питательной среде. *Морской биологический журнал*, 2019, т. 4, № 1, с. 33-44. [Zheleznova S.N. Production characteristics of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin in intensive culture with various sources of nitrogen in the nutrient medium. *Marine biological journal*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 33-44. (In Russ.)] doi: 10.21072/mbj.2019.04.1.04
3. Кожемяка А.Б. Зависимость концентрации органического вещества в клетке от её объёма для черноморских видов Bacillariophyta. *Морский экологичный журнал*, 2014, т. XIII, № 1, с. 35-43. [Kozhemyaka A.B. The dependence of the concentration of organic matter in the cell on its volume for the Black Sea species of Bacillariophyta. *Morsky ekologichny zhurnal*, 2014, vol. XIII, no. 1, pp. 35-43. (In Russ.)]
4. Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль CO_2 -концентрирующего механизма. *Физиология растений*, 2000, т. 47, № 5, с. 801-810. [Pronina N.A. Organization and physiological role of the CO_2 -concentrating mechanism. *Plant physiology*, 2000, vol. 47, no. 5, pp. 801-810. (In Russ.)]
5. Стуколова И.В., Тренкеншу Р.П. Основные типы питания водорослей (краткий глоссарий). *Вопросы современной альгологии*, 2020, № 1 (22), с. 34-38. [Stukolova I.V., Trenkenshu R.P. The main types of algae nutrition (a brief glossary). *Questions of modern algology*, 2020, no. 1 (22), pp. 34-38. (In Russ.)] doi: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-34-38
6. Тренкеншу Р.П., Жондарева Я.Д. Кинетика симпорта органических форм биогенов у микроводорослей. *Морские биологические исследования: достижения и перспективы*. Севастополь: Экози-гидрофизика, 2018, т. 3, с. 452-455. [Trenkenshu R.P., Zhondareva Ya.D. Kinetics of import of organic forms of biogens from microalgae. *Marine biological research: achievements and prospects*. Sevastopol: Ekosi-hydrophysics, 2018, vol. 3, pp. 452-455. (In Russ.)]
7. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. Paris: Ph.D. thesis, 1966, 138 p.
8. Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. Advances in understanding the cyanobacterial CO_2 -concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J. Exp. Bot.*, 2008, vol. 59, no. 7, pp. 1441-1461. doi: 10.1093/jxb/erm112
9. Losh J.L., Young J.N., Morel F.M. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytol*, 2013, vol. 198, pp. 52-58.

10. Raven J.A., Beardall J. Dark respiration and organic carbon loss / In: *Borowitzka M.A., Beardall J., Raven J., Beardall J. The physiology of microalgae*. Springer, 2016, pp. 129-140.
11. Самылина О.С. Углерод-концентрирующий механизм как компонент адаптации экстремально натронофильной цианобактерии *Euhalothece natronophila* к существованию в содовых озёрах: *автореф. дис. канд. биол. наук*. М., 2008, 24 с. [Samylina O.S. Carbon-concentrating mechanism as a component of adaptation of the extremely natronophilic cyanobacterium *Euhalothece natronophila* to existence in soda lakes: *abstract of the dissertation of the candidate. biol. nauk*. М., 2008, 24 p. (In Russ.)]
12. Janson Ch., Northen T. Calcifying cyanobacteria – the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Op. Biotech*, 2010, vol. 21, pp. 365-371.
13. Price G.D. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynth. Res*, 2011, vol. 109, pp. 47-57. doi: 10.1007/s11120-010-9608-y

PATHWAYS OF INORGANIC CARBON METABOLISM IN CYANOBACTERIA

Gevorgiz R.G, Lelekov A.S.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Abstract. The paper considers the mechanisms of assimilation, fixation and utilization of inorganic forms of carbon by cyanobacteria cells. Carbon sources are carbon dioxide, which, depending on the pH value, can be in the form of CO₂, bicarbonate ions HCO₃⁻ or carbonate ions CO₃²⁻. Carbon dioxide and bicarbonate ions are sources of inorganic carbon for microalgae. Therefore, it is the availability of carbon in one form or another that can act as a limiting factor for growth. To date, the CO₂-concentrating mechanism in the cells of microalgae and cyanobacteria has been studied in sufficient detail, due to which the maximum rates of photosynthetic oxygen release at low and high concentrations of CO₂ are the same. The efficiency of using intracellular carbon is increased due to the presence of an intracellular pool in which carbon is represented in the form of bicarbonate ions, and the reduction of CO₂ losses due to diffusion processes. The literature describes the CO₂-concentrating mechanism for different types of microalgae. Most of the studies of CO₂-CM were performed on eukaryotic cells, in which the intracellular pool of carbon can be located both in the cytoplasm and in the stroma of the chloroplast. CO₂-CM is also described for cyanoprokaryotes, in which, according to, carbonic anhydrase is not detected in the cytoplasm. On the basis of modern concepts of CO₂-CM for *A. platensis*, a generalized scheme is proposed that describes the main pathways of inorganic carbon metabolism.

Key words: *spirulina, carbon dioxide, bicarbonate ion, carbonate ion, assimilation, carbon-concentrating mechanism*