

Ефект на хербицида Атразин върху синтезата на липиди и стероли в сладководното зелено микроводорасло *Monodus subterraneus* Petersen

Зорница Каменарска

Abstract: The changes in the sterols and the main lipid classes and their fatty acid profiles in the green freshwater microalga *Monodus subterraneus* Petersen after treatment with 10^{-5} M of the herbicide Atrazine were investigated. The chlorophyll content decreased almost twice relative to control. The treatment led to decreased concentration of TAG, MGDG and DGTS and increased content of DGDG and SQDG. The amount of the palmitic acid decreased, but the concentration of the unsaturated C_{16} and C_{18} acids was not affected. The content of eicosapentaenoic acids increased in TAG and MGDG. In the sterol biosynthesis a slight activation of the second step of alkylation at C-24 was observed. The changes in the composition of lipids and sterols can be used for a biomonitoring of the effect of the pollutants on the investigated organism. The changes in the metabolism can also lead to an increased production of some valuable biologically active compounds.

Key words: *Monodus subterraneus*, eicosapentaenoic acid, Atrazine

ВЪВЕДЕНИЕ

Зеленото сладководно микроводорасло *Monodus subterraneus* Petersen (разред Eustigmatales, семейство Monodopsidaceae) е многообещаващ източник на биологично активната ейкозапентаенова киселина (20:5). По-подробно познаване на биосинтетични пътища би позволило по-високото ѝ производство. Един от най-използваните начини за изясняване на биосинтетични пътища е излагането на водораслите на действието на хербициди [1].

Атразинът [2-хлоро-4-(етиламино)-6-(изопропиламино)-s-триазин] е един от най-важните триазинови хербициди, който се прилага широко в селското стопанство поради високата толерантност на житните култури към неговото действие. Основните му недостатъци са неговото относително бавно разграждане, което зависи от температурата на почвата [2] и от скоростта на микробното действие [3]. По тази причина, попадайки във водата, част от хербицида би могла да засегне микроводорасли, макроводорасли, риби и безгръбначни [4].

Целта на настоящото изследване е да се проучи ефекта на Атразина върху състава на липидите и стеролите в сладководното зелено микроводорасло *Monodus subterraneus*, който да даде информация относно биогенетичните пътища на липиден синтез, и по-специално на биосинтетичните механизми, свързани с натрупването на полиненаситени местни киселини.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Микроводорасловата култура (проба и контрола) се култивира в среда от BG11 [5]. В експерименталната проба се добавя Атразин до достигане на крайна концентрация от 10^{-5} M. Специфичната скорост на растеж се определя чрез измерването на концентрацията на хлорофила. Началната концентрация на хлорофил е 15 mg/l.

Екстрахират се липофилните вещества. Тоталните липиди се разделят на неутрални и полярни посредством микроколонна хроматография. Полярните липиди допълнително се разделят на липидни класове чрез двумензионална тънкослойна хроматография. Мастно-киселинният им състав се анализира чрез газова хроматография след превръщане на масните киселини в метилови естери. Подробно описание на работната схема е публикувано по-рано [6].

Стеролиите се изолират посредством колонна хроматография. Анализират се чрез газова хроматография и газова хроматография - мас спектрометрия по описан метод [7].

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

След четириднешно култивиране в присъствието на $10^{-5}M$ Атразин, съдържанието на хлорофил в пробата е почти два пъти по-ниско спрямо това в контролата. Резултатите корелират с факта, че Атразина е инхибитор на фотосинтезата, и по-специално на фотосистема II.

Количеството на тоталните липиди в пробата е по-ниско спрямо това в контролата с 13 %. Третирането с Атразин води до намаление на триацилглицерола почти два пъти от 23.3 % на 13.3 % от тоталните липиди. Подобно намаление на триацилглицерола е наблюдавано и при други микроводорасли, поставени при неблагоприятни условия. Счита се, че растежът на културата се осъществява за сметка на консумацията на триацилглицерол [6]. Количеството на моногалактозил диацилглицерола (МГДГ) намалява от 25.2 % до 19.0 %, докато количеството на другите два гликолипида – дигалактозил диацилглицерола (ДГДГ) и сулфохиновозил диацилглицерола (СХДГ) нараства съответно от 19.6 % на 28.9 % и от 9.8 на 15.5 %. МГДГ е прекурсор в биосинтезата на ДГДГ и СХДГ и би могло да се предположи, че третирането с Атразин води до активацията на този биохимичен път на трансформация. Количеството на фосфолипидите (ФЛ) нараства от 8.6 % в контролата до 14.1 % в пробата, а количеството на диацилглицерол-N-трихомоселина (ДГТС) намалява от 13.5 % на 9.2 % след третирането с Атразин.

Количеството на тоталните мастни киселини в пробата намалява с около 1/3 в сравнение с това в контролата. Концентрацията на палмитиновата киселина (16:0) намалява, докато концентрацията на ненаситените C_{16} и C_{18} киселини остава непроменена. Увеличава се съдържанието на ейкозапентаенова киселина (20:5) в МГДГ и ТАГ в третираната проба (Таблица 1). Получените резултати показват, че Атразинът инхибира прокариотния път на синтез на 20:5 в *M. subterraneus* тъй като е доказано, че ненаситените C_{18} киселини служат като прекурсори в биосинтеза на 20:5 в този биосинтетичен път [8]. Еукариотният път не е засегнат от инхибитора. В него се използват като прекурсори мастни киселини, свързани с фосфолипидите. Продуктите от този път се изнасят през хлоропластната мембрана и водят до повишено съдържание на ейкозапентаеновата киселина в МГДГ [9].

Таблица 1.

Ефект на третирането с $10^{-5} M$ Atrazine върху основните липидни класове и техния мастно-киселинен състав в *Monodus subterraneus*

Липидни класове	М А С Т Н И К И С Е Л И Н И																
	14:0	16:0	16:1	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:1	18:2	18:3	18:3	20:0	20:2	20:3	20:4	20:5
			n-7	n-5				n-9	n-7	n-6	n-6	n-3			n-6	n-6	n-3
МГДГ																	
Контрола	4.0	10.5	8.9	0.4	0.2	0.1	0.3	2.1	0.7	0.6	0.6	0.5	0.3	0.1	0.4	3.1	57.2
Проба	4.1	8.8	15.6	0.3	0.2	0.1	0.3	1.8	0.5	0.6	0.3	0.6	0.4	0.2	0.1	2.0	64.1
ДГДГ																	
Контрола	2.0	23.2	50.2	0.2	0.4	0.2	0.2	4.7	1.0	0.7	0.2	0.7	0.1	0.1	0.2	0.5	15.5
Проба	2.5	21.4	50.0	0.2	0.4	0.2	0.3	5.1	0.8	0.7	0.1	0.9	0.1	0.1	0.1	0.5	16.8
СХДГ																	
Контрола	3.2	48.3	42.9	0.2	0.1	0.1	0.3	3.3	0.7	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.3
Проба	3.4	50.5	41.1	0.1	0.1	0.2	0.3	3.3	0.5	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2
ДГТС																	
Контрола	2.9	25.1	27.5	0.9	0.7	0.3	2.0	2.6	1.0	1.1	0.8	0.6	0.4	0.1	0.2	8.1	25.4
Проба	3.8	23.1	37.3	1.0	1.0	0.3	2.4	2.8	1.0	1.2	0.5	0.8	0.6	0.1	0.0	5.1	18.6
ФЕ																	
Контрола	2.2	12.5	11.6	0.6	0.2	0.0	2.8	4.5	2.8	2.4	1.7	0.2	0.5	0.6	2.5	18.6	35.6
Проба	1.9	11.6	11.9	0.5	0.4	0.2	4.0	5.0	4.4	3.0	1.0	0.3	0.9	0.7	2.1	14.6	37.0

Таблица 1 - продължение

Липидни класове	М А С Т Н И К И С Е Л И Н И																
	14:0	16:0	16:1	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:1	18:2	18:3	18:3	20:0	20:2	20:3	20:4	20:5
			n-7	n-5				n-9	n-7	n-6	n-6	n-3			n-6	n-6	n-3
ФГ																	
Контрола	0.9	18.7	5.6	33.3	0.3	0.1	1.7	2.0	3.2	0.9	0.1	0.3	0.1	0.5	0.0	0.8	31.3
Проба	0.9	20.3	6.7	35.1	0.9	0.2	1.3	2.1	2.5	0.9	0.1	0.4	0.6	0.1	0.0	0.5	27.2
ФХ+ФИ																	
Контрола	2.6	33.3	25.5	0.4	0.4	0.3	2.4	12.9	1.0	4.1	1.1	0.3	0.2	0.6	0.3	7.3	7.2
Проба	4.0	29.1	19.5	0.6	0.8	1.0	6.2	20.6	1.1	4.7	1.1	0.3	0.5	0.3	0.0	4.7	4.9
ФК																	
Контрола	2.3	40.3	29.7	0.4	0.0	0.7	3.1	11.4	0.9	3.0	0.1	0.1	0.5	2.5	0.1	1.8	2.7
Проба	5.2	49.4	29.6	0.4	0.4	0.3	2.6	3.7	0.8	1.5	0.6	0.2	0.2	0.4	0.0	1.2	3.4
ТАГ																	
Контрола	2.7	19.2	35.4	1.3	0.4	0.4	2.1	14.0	2.0	1.6	1.0	0.4	0.4	0.1	2.1	2.7	14.0
Проба	3.4	17.7	26.8	0.8	0.3	0.4	2.2	10.6	1.2	1.3	0.4	0.4	0.6	0.9	0.5	2.9	29.9
СМК																	
Контрола	3.1	17.5	38.4	1.2	0.4	0.5	3.4	13.3	2.0	1.4	0.7	0.3	0.5	0.5	1.1	1.8	13.6
Проба	4.0	23.4	31.9	1.2	0.5	0.9	7.2	13.9	1.8	2.2	0.7	0.5	0.7	0.9	0.7	1.1	8.1
СЕ																	
Контрола	2.5	17.1	18.9	5.0	0.5	0.4	3.7	10.1	1.8	1.0	0.6	5.7	0.6	0.6	0.0	5.8	23.9
Проба	2.4	14.7	15.4	1.0	2.1	1.7	4.2	10.3	2.1	1.4	0.6	6.9	1.4	1.0	1.6	10.7	18.3

1. Стойностите от трите измервания на метиловите естери в стандартна смес чрез газова хроматография варират в рамките на 12 % за минималните компоненти и до 5 % за останалите.
2. Съкращения: ДГДГ- дигалактозил диацилглицерол, МГДГ- моногалактозил диацилглицерол, СХДГ – сулфохиновозил диацилглицерол, ДГТС – дигалактозил-N-трихомосерин, ФЕ – фосфатидилетаноламин, ФГ – фосфатидилглицерол, ФХ – фосфатидилхолин, ФИ – фосфатидинозитол, фосфатидна киселина, ТАГ – триацилглицерол, СМК – свободни мастни киселини, СЕ – стеролови естери.

Третирането с Атразин има незначителен ефект върху състава на стеролите в *M. subterraneus*. Наблюдава се леко повишение на съдържанието на С29-стеролите, докато съдържанието на холестерол намалява. Това вероятно се дължи на активиране на ензимите, отговорни за втория етап на алкилиране при С-24. Холестеролът намалява пропускливостта на клетъчните мембрани по-силно отколкото С29-стеролите, от което следва, че настъпилите промени в качествения и количествения състав на стеролите нямат адаптивна функция.

В заключение, получените резултати водят до по-доброто разбиране на всички опасни последици за околната среда от използването на хербициди и могат да се прилагат за мониторинг на замърсяването на водите. От друга страна, това изследване дава информация за възможностите за увеличаване на производството на ейкозапентаенова киселина чрез добавяне на специфични химикали.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Lyon TA, Primm JG, Wojdan MS, Morehouse KD, Grogger ML, Vintila S, Veverka DV (2013) Environmental manipulation of select algae strains for maximal oil production. BIOS 84, 21-29.
- [2]. Lydy MJ, Carter, DS, Crawford CG (1996) Comparison of gas chromatography mass spectrometry and immunoassay techniques on concentrations of atrazine in storm runoff. Arch Environ. Contamin Toxicol 31, 378-385.
- [3]. Radosevich M, Traina SJ, Hao YL, Tuovinen OH (1995) Degradation and mineralization of Atrazine by a soil bacterial isolate. Appl Environ Microbiol 61, 297-302.
- [4]. Solomon KR, Carr JA, Du Preez LH, Giesy JP, Kendall RJ, Smith EE, Van Der Kraak G (2008). Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. Crit Rev Toxicol 38, 721-772.

[5]. Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z (2002) Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid, *Phytochemistry* 60, 497– 503.

[6]. Khozin-Goldberg I, Shrestha P, Cohen Z (2005) Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incise*. *Biochim Biophys Acta* 1738, 63 – 71.

[7]. Kamenarska ZG, Dimitrova-Konaklieva SD, Stefanov KL, Popov SS (2003) A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the Black Sea. *J Serb Chem Soc* 68, 269-275.

[8]. Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Shayakhmetova I, Cohen Z (2002) Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *J Phycol* 38, 745–756.

[9]. Khozin I, Cohen Z (1996) Differential response of microalgae to the substituted pyridazinone Sandoz 9785 reveal different pathways in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA). *Phytochemistry* 42, 1025-1029.

За контакти:

д-р Зорница Ганчева Каменарска - Център по молекулна медицина, Медицински университет – София, e-mail : kamenarska@mmcbg.org

Докадът е рецензиран.