

PRODUCCION Y EXCRECION DE GLICOLATO EN *CHLORELLA MARINA*

Freddy Pacheco León

Escuela de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional.
Heredia, 3000. Costa Rica.

Geoffrey A. Codd

Department of Biological Sciences.
University of Dundee.
DD1 4 HN. Scotland. Gran Bretaña.

ABSTRACT

The marine green alga Chlorella marina (CCAP 211/27) excreted glycollate when incubated under high photon irradiance, high pH and low CO₂. The glycollate pathway inhibitors α -hydroxy-2-pyridine-methanesulfonate (HPMS) and isonicotinylnyl hydrazide (INH) increased glycollate excretion rates by inhibiting glycollate metabolism. Neither compound affected ribulose biphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase activity, indicating that the inhibitors do not influence glycollate metabolism. Neither compound affected ribulose biphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase activity, indicating that the inhibitors do not influence glycollate formation rates but that glycollate excretion in their presence may be taken as an index of the rate of glycollate production.

Previous growth under air or air plus 5% CO₂ did not influence rates of glycollate production. The excretion of glycollate obtained with C. marina during photosynthesis under normal conditions of growth, is a demonstration that under those the glycollate production and metabolism occur in healthy cells.

INTRODUCCION

El proceso de fotorrespiración, tan importante en áreas tropicales, está caracterizado por las simultáneas tomas de oxígeno y liberación de CO₂. En aire que contiene 300 ppm CO₂ y 21 % de oxígeno, la fotorrespiración puede reducir hasta en un 30 % la productividad fotosintética de plantas terrestres y acuáticas. Debido a que en el ambiente marino la concentración de compuestos del CO₂ es alta (aproximadamente 2 mmol dm⁻³ HCO₃, pH 8.3), se ha sugerido que las algas marinas podrían mostrar características fotorrespiratorias diferentes a los vegetales no marinos (Tolbert y Osmond, 1976).

En virtud de que el CO₂ liberado durante la fotorrespiración proviene del grupo carboxilo del glicolato formado a partir de la ribulosa bifosfato (RuBP), y de que diversas especies de los grupos Chlorophyta, Phaeophyta, Rhodophyta y Angiospermae han sido reportadas como capaces de excretar glicolato (Fogg, 1976), si dicha excreción se diera en *Chlorella marina*, la determinación de sus tasas de excreción en presencia y ausencia de los inhibidores del metabolismo del glicolato (HPMS y

INH) podría considerarse como un índice de la tasa de síntesis de glicolato.

La reacción de oxigenasa de la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBP) que resulta de la eventual producción de glicolato es favorecida por concentraciones bajas de CO_2 y altas de oxígeno. Esta reacción compite con la reacción de carboxilación de la misma enzima en que la especie activa es el CO_2 y el producto es el ácido fosfoglicérico. Se ha sugerido que la concentración de CO_2 en el sitio de carboxilación es mantenida por la acción de la enzima anhidrasa carbónica (E.C. 4.2.1.1.) y que la represión de esta enzima en algas cultivadas bajo altas concentraciones de CO_2 (Nelson et al., 1969) resulta en la estimulación de la síntesis de glicolato cuando las células son transferidas a concentraciones bajas de CO_2 (Colman et al., 1974; Ingle y Colman, 1976).

HPMS (α -hidroxi-2-piridín metano sulfonato) ha sido caracterizado como inhibidor de la enzima que cataliza la conversión de glicolato en glioxilato en plantas superiores (Zelitch, 1957) y algas (Lord y Merret, 1969; Codd y Merret, 1971). El efecto inhibitorio en algas es consistente con un aumento en la excreción de glicolato durante la fotosíntesis. Si la oxidación del glicolato es inhibida completamente por el HPMS, el aumento en la tasa de excreción se puede considerar como una medida de la tasa de producción de glicolato en el alga (Codd, 1970).

En la presente investigación se estudia la regulación del metabolismo y la excreción de glicolato en el alga verde unicelular *Chlorella marina* (CCAP 211/27) bajo diferentes condiciones de crecimiento y experimentación, como una introducción al estudio sistemático de la fotorrespiración en un organismo de amplia distribución que podría constituirse en un modelo útil para su estudio.

MATERIALES Y METODOS

Células de *Chlorella marina* cultivadas en agua de mar artificial (medio ASP-2), fueron utilizadas para toda la experimentación, siguiendo la descripción de Provasoli (1963) y McLachlan (1973). Para evitar contaminantes, el medio es esterilizado en una autoclave a 0,1 MPa y la solución

de vitaminas esterilizada por filtración y agregada al medio luego de que éste se ha enfriado.

Las células son cultivadas en frascos de vidrio equipados con agitadores magnéticos, aire estéril ($260 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$), y mantenidas a iluminación constante a una irradiación fotónica de $550 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ provenientes de tubos fluorescentes de luz blanca.

Los cultivos son mantenidos en aire + 5 % CO_2 en algunos casos. Para efecto de los experimentos de excreción de glicolato, las células de *Chlorella marina* son concentradas por centrifugación en una centrífuga MSE 4L a 2.500 g, 4 C, por 15 minutos, lavadas y resuspendidas en una solución tampón Hepes (10 mmol dm^{-3}) pH 8,0, a una densidad celular de aproximadamente $25 \mu \text{g}$ de clorofila cm^{-3} . La suspensión celular resultante es colocada en un recipiente transparente ($2 \times 2,5 \text{ cm}^3$) descrito por Stewart (1978) y burbujeadas con 100 % oxígeno, aire, o aire más 5 % CO_2 , a una tasa de $0,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$. La suspensión de algas es equilibrada por espacio de 10 minutos en la oscuridad antes de exponerla a la luz blanca proveída por un proyector de transparencias Leitz Wetzlar, equipado con un bombillo con filamento de tungsteno. La irradiación fotónica en la superficie del recipiente es de $1.800 \mu \text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y la temperatura es mantenida entre 23 y 25 C por medio de un ventilador colocado para disipar el calor generado por la fuente de irradiación. A tiempo diferentes, muestras de 1 cm^3 o 2 cm^3 son removidas y colocadas en una centrífuga de mesa (Eppendorf 5412) a 10.000 g por minuto. Los sobrantes son usados luego para la determinación de glicolato de acuerdo con el método de Calkins (1943).

Todos los gases (95 % aire + 5 % CO_2 , 100 % aire, 100 % oxígeno) son proveídos por la British Oxygen Company. Todas las sustancias químicas, con excepción del α -hidroxi-2-piridín metano sulfonato (Fluka AG, Chemische Fabrik, RFA) y el 2,7-dihidroxinaftaleno (Sigma Ltda., Londres), fueron obtenidas de la casa BDH (British Drug Houses, Inglaterra).

RESULTADOS

Cuando células de *Chlorella marina* fueron incubadas en presencia de 5 mmol dm^{-3} HPMS bajo condiciones fotorrespiratorias de concentra-

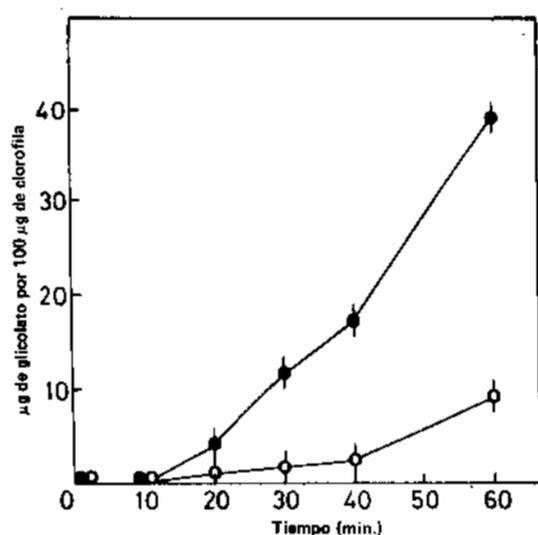


Figura 1

Efecto de HPMS sobre la excreción de glicolato por células de *Chlorella marina*. ● + HPMS; ○ -HPMS.

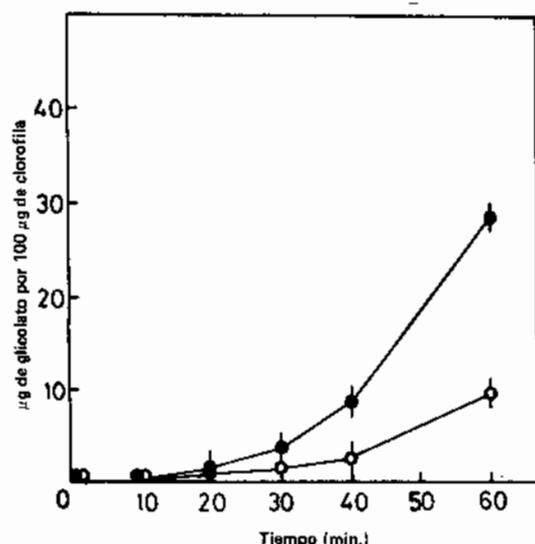


Figura 2

Efecto de INH sobre la excreción de glicolato por células de *Chlorella marina*. ● + HPMS; ○ -HPMS.

ción alta de oxígeno y baja de CO_2 , pH básico y alta intensidad de luz, se detectó la excreción de glicolato, aumentando la misma en presencia de HPMS (Fig. 1). En ambos casos la excreción se presentó de manera lineal durante los 60 minutos que duraron los experimentos, siendo la cantidad excretada, después de ese tiempo en presencia de HPMS, cerca de cuatro veces superior a la excretada en ausencia del inhibidor.

Para estudiar el posible efecto que una alta concentración de CO_2 durante el crecimiento pudiera tener en la subsecuente excreción de glicolato, fueron realizados experimentos con algas cultivadas con aire y con altos niveles de CO_2 (aire + 5% CO_2), encontrándose que en los casos experimentados (ver Figs. 3 y 4) no se evidenció ninguna relación entre las tasas de excreción y los niveles de CO_2 durante el cultivo. Una comparación de las figuras 3 y 4 también demuestra que las tasas de excreción de glicolato son menores cuando se burbujea aire durante el experimento de excreción, que cuando se utiliza oxígeno puro.

En el estudio presente, en que se utilizan células de *C. marina*, se demostró que 10 mmol dm^{-3} INH estimula la excreción de glicolato

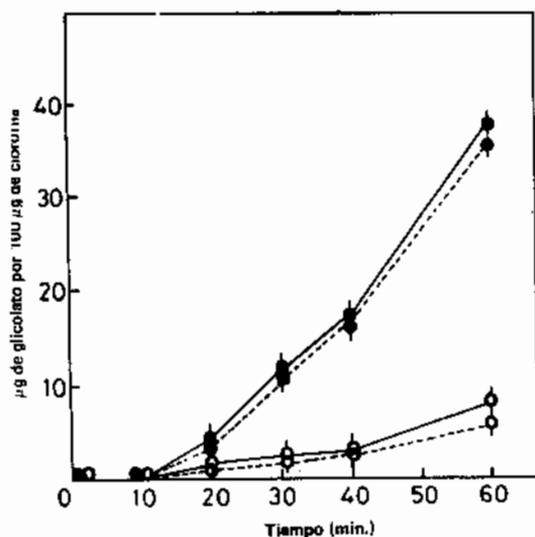


Figura 3

Comparación de la excreción de glicolato por células de *Chlorella marina* cultivadas con 5% CO_2 y en condiciones de aire normales.

● + HPMS; ○ -HPMS.

— cultivadas en aire

- - - cultivadas con 5% CO_2 .

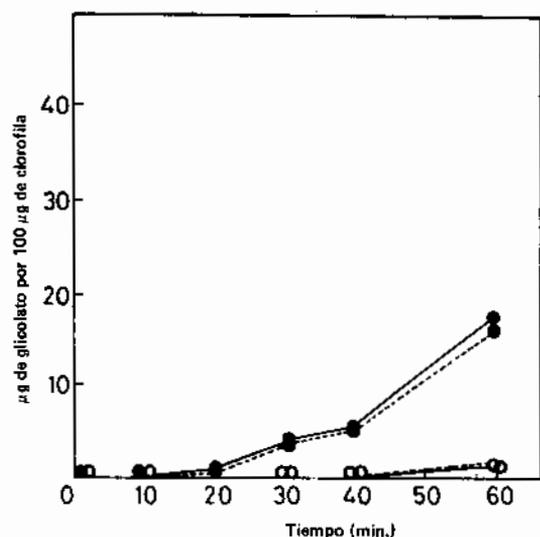


Figura 4

Comparación de la excreción de glicolato burbujeando aire (en lugar de oxígeno) durante los experimentos de excreción. Volúmenes de 10 mmol dm⁻³ de NaHCO₃ fueron agregados a cada uno.

● + HPMS; ○ -HPMS

— cultivadas en aire

- - - cultivadas con 5% CO₂.

(Fig. 2) bajo condiciones estandarizadas utilizadas en los experimentos de excreción con HPMS (Fig. 1). Los niveles de glicolato alcanzados después de 60 minutos de iluminación, en las suspensiones celulares de *C. marina* cultivadas con adición de aire, fue aproximadamente un 300% superior en presencia del inhibidor INH.

DISCUSION

Chlorella marina, así como otras algas marinas y de agua dulce (Hellebust, 1965; Fogg, 1976), excreta glicolato (Fig. 1). La excreción del glicolato por parte de algas se cree que ocurre en situaciones en que la tasa de producción de glicolato es superior a la tasa de glicolato que es metabolizado (Fogg, 1976). Ahora bien, si el inhibidor HPMS no afecta la tasa de biosíntesis de glicolato sino que más bien inhibe principalmente la transformación de glicolato en glioxalato, esto permite tomar a la tasa de excreción de glicolato en presencia de

HPMS como una medida de la formación de glicolato. Así, los datos incluidos en las figuras 1 y 3 permiten concluir que las tasas de producción de glicolato en *C. marina* son superiores en forma consistente a las tasas de excreción del mismo compuesto, implicando, por tanto, la presencia de una enzima oxidante del glicolato en las células de *C. marina*.

Colman et al. (1974), Ingle y Colman (1976) y Colman (1978) han informado cómo especies de *Chlorella* de agua dulce y la cianoficea *Coccochloris peniocyctis* cultivadas a 5% CO₂, excretaron glicolato al ser incubadas en la luz, pero que si eran mantenidas por lo menos 30 minutos con aire (0,04% CO₂) antes de los experimentos, no se daba la excreción.

Una comparación de las tasas de excreción de glicolato en presencia y ausencia de HPMS en células cultivadas en aire (Fig. 1) y en aire + 5% CO₂ (Fig. 3), indica que el CO₂ suplido durante el crecimiento no sólo no tuvo influencia alguna en la producción eventual de glicolato, sino que tampoco afectó significativamente los niveles de oxidación enzimática del glicolato durante los experimentos de excreción. Estos resultados corroboran la observación de que los niveles de la enzima oxidante del glicolato en *C. marina* son poco afectados por el CO₂ suplido durante el crecimiento, tal y como ha sido reportado para *Chlorella fusca*, pero en contraste para la que sucede con *Euglena gracilis* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Codd et al., 1969; Nelson y Tolbert, 1969).

El INH (derivado de la isonicotina) es un potente inhibidor de la conversión enzimática de glicina en serina, paso importante en la ruta metabólica del glicolato (Pritchard et al., 1962; Sado, 1980; Beudeker y Tabita, 1983). Mientras Nelson y Tolbert (1969) y Colman et al. (1974) encontraron que el INH estimulaba la excreción de glicolato en algas verdes, Colman y Hosein (1980) no encontraron ningún efecto en diatomeas de agua dulce.

El INH también estimuló los niveles de excreción de glicolato en *C. marina* (Fig. 2), aunque estos fueron menores que los logrados con HPMS (Fig. 1). El estímulo en la excreción del compuesto en presencia de INH es importante en vista que se conoce que este inhibidor evita la conversión de

glicina en serina (Pritchard et al., 1962; Fedina, 1980), paso responsable de la producción de CO_2 característica del proceso fotorrespiratorio. Por lo tanto, un estímulo en la excreción de glicolato causada por el INH, representa una respuesta indirecta a la inhibición del paso glicina-serina del camino metabólico del glicolato en un sitio diferente al de la oxidación del glicolato. Un aumento en la excreción del glicolato causada por el INH se podría explicar como resultado de la conversión reversible de glicina en glioxalato y glicolato, respectivamente. Aunque ha sido reportada la excreción de glicina en *Chromatium vinosum* (Asami y Akazawa, 1978) y de glioxalato en *Sphaerocystis schroeteri* (Stewart y Codd, 1981), que podrían explicar los menores niveles de excreción de glicolato obtenidos con INH en comparación con los observados con HPMS (Figs. 1 y 2), se pudo determinar que *C. marina* no excreta ninguno de los metabolitos reportados por los mencionados autores, en coincidencia con los informes de Hellebust (1965) para algunas algas marinas unicelulares.

La excreción de glicolato observada en *C. marina* durante la fotosíntesis en un ambiente de aire (Fig. 4) es una demostración de que bajo condiciones normales de crecimiento, la producción de glicolato y su metabolismo ocurren en células sanas en las condiciones estudiadas. En concordancia con los estudios de Codd y Merret (1971) para algas dulceacuícolas, la adición de oxígeno puro a las suspensiones de *C. marina*, dio como resultado la obtención de mayores niveles de producción de glicolato que los observados cuando solamente se agregaba aire durante los experimentos de excreción (Figs. 1 y 3). Las condiciones fotorrespiratorias de alta irradiación, baja concentración de CO_2 y alta concentración de O_2 durante los experimentos de excreción, aunque podrían ser cuestionados como condiciones "artificiales", Fogg (1976) ha reportado la existencia de condiciones similares en el ambiente marino. Por lo tanto, los estudios realizados en el laboratorio, en esta

oportunidad, podrían extenderse de cierta manera a los ambientes naturales.

Tal y como se muestra en las figuras 3 y 4, no se observó ningún estímulo de la excreción de glicolato, cuando se compararon células cultivadas en ambientes de alta concentración de CO_2 (y las cultivadas a 0,04 % CO_2). La afirmación que la excreción de glicolato por las algas sólo es posible lograrla cuando las células han sido cultivadas en aire con un suplemento de CO_2 (1 a 5 %), como resultado de una menor eficiencia fotosintética en ellas atribuida a una represión de la enzima anhidrasa carbónica (con una estimulación concomitante de la reacción de oxigenasa de la ribulosa difosfato carboxilasa-oxigenasa), de acuerdo con los informes de Ingle y Colman (1976), Hogetsu y Miyachi (1979) y Bird et al. (1980), no se puede aplicar al presente caso. De acuerdo con Raven (1970), en organismos con el Ciclo de Calvin, en el que el carbono es aportado como CO_2 y en los que la reacción de carboxilación usa CO_2 , no hay una utilidad obvia que fundamente la presencia de la anhidrasa carbónica (que cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono). De acuerdo con Miyachi y Shirawa (1979), la especie activa de " CO_2 " utilizada por *Chlorella vulgaris* es CO_2 ; Shelp y Calvin (1980) han informado que CO_2 es también utilizado por *Chlorella emersonii*. Osterlind (1957) y Rabinowitch (1968) habían llegado también a conclusiones similares. Si en *C. marina* se presenta una situación como la descrita para las otras especies de *Chlorella*, y en vista de los resultados ya aquí señalados con los experimentos de excreción, se podría concluir que, aun en el caso de que la anhidrasa carbónica estuviera presente, su papel como un paso importante en el mecanismo concentrador de CO_2 a partir de bicarbonato, no es importante en esta alga marina. El hecho de que en el océano la concentración de CO_2 sea unas 50 veces más alta que en la atmósfera, apoya la idea de que el mecanismo concentrador de CO_2 no tiene razón de existir en *Chlorella marina*.

LITERATURA CITADA

- Asami, S. y Akazawa, T. 1978. Biosynthetic mechanism of glycolate in *Chromatium*. 6 Glycolate formation and metabolism under low O_2 . Plant and Cell Physiology. 18: 149-159.
- Beudeker, R. F. y Tabita F. R. 1983. Control of photorespiratory glycolate metabolism in an oxygen-resistant mutant of *Chlorella sorokiniana*. Journal of Bacteriology. 155: 650-656.
- Bird, I. F.; Cornelius, M. J. y Keys, A. J. 1980. Effect of carbonic anhydrase on the activity of ribulose biphosphate carboxylase. Journal of Experimental Botany. 31: 365-369.
- Calkins, V. P. 1943. Microdetermination of glycolic and oxalic acid. Ind. Engng. Chem. Analyst. Edn. 15: 762-763.
- Codd, G. A. 1970. Carbon dioxide metabolism in synchronously dividing cultures of *Euglena gracilis*. Ph. D. Thesis. University of Bradford, England. 204 pp.
- Codd, G. A. y Merret, M. J. 1971. The regulation of glycolate metabolism in division synchronized cultures of *Euglena*. Plant. Physiology. 47: 640-643.
- Codd, G. A.; Lord, J. M. y Merret, M. J. 1969. The glycolate oxidising enzyme of algae. FEBS Letters. 5: 341-342.
- Colman, B. 1978. Excretion of glycollate by a species of *Chlorella* (Chlorophyceae). Journal of Phycology. 14: 434-437.
- Colman, B.; Miller, A. G. y Grodzinski, B. 1974. A study of the control of glycolate excretion in *Chlorella*. Plant Physiology. 53: 395-397.
- Fedina, I. S. 1980. Influence of isonicotiny hydrazide on photosynthesis in C_3 and C_4 plantas. Comptes Rendus de L' Academie Bulgare des Sciences. 33: 401-404.
- Fogg, G. E. 1976. Release of glycollate from tropical marine plants. Australian Journal of Plant Physiology. 3: 57-61.
- Hellebust, J. A. 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. Limnology and Oceanography. 10: 129-206.
- Hogetsu, D. y Miyachi, S. 1979. Role of carbonic anhydrase in photosynthetic CO_2 fixation in *Chlorella*. Plant and Cell Physiology. 20: 747-756.
- Ingle, R. K. y Colman, B. 1976. The relationship between carbonic anhydrase activity and glycolate excretion in the blue green alga *Coccochloris peniocystis*. Planta. 128: 217-223.
- Lord, J. M. y Merret, M. J. 1969. The effect of hydroxymethane sulphonate on photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Experimental Botany. 20: 743-750.
- McLachlan, J. M. 1973. Isolation and purification. 2. Growth media-marine. In "Handbook of Phycological Methods". (J. Stein, ed.). Cambridge University Press. Great Britain. pp. 25-51.
- Miyachi, S. y Shirawa, Y. 1979. Form of inorganic carbon utilized for photosynthesis in *Chlorella vulgaris* 11 h. cells. Plant and Cell Physiology. 20: 341-348.
- Nelson, E. B. y Tolbert, N. E. 1969. The regulation of glycolate metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica Acta. 185: 263-270.
- Nelson, E. D.; Tolbert, N. E. y Hess, J. L. 1969. Glycolate stimulation of oxygen evolution during photosynthesis. Plant physiology. 44: 55-59.
- Osterlind, S. 1957. Inorganic carbon sources of green algae. III. Measurement of photosynthesis in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. Physiologia Plantarum. 4: 242-254.
- Pritchard, G. G.; Griffin, W. J. y Whittingham, C. P. 1962. The effect of CO_2 concentration, light intensity and isonicotiny hydrazide on the photosynthetic production of glycolic acid by *Chlorella*. Journal of Experimental Botany. 13: 176-184.
- Provasoli, L. 1963. Growing marine seaweeds. In "Proc. Int. Seaweed Symp". (Devirville y Feldman, Editores). Pergamon Press. Oxford. 4: 9-17.
- Rabinowitch, E. I. 1956. Photosynthesis and related processes. Interscience Publ. Inc. New York. pp. 1.886-1.892.
- Sado, M.; Asami, S.; Nishimura, M. y Akazawa, T. 1980. Glycine-serine transformation in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. Plant and Cell Physiology. 2: 1.077-1.084.
- Shelp, B. J. y Calvin, D. T. 1980. Utilization of exogenous inorganic carbon species in photosynthesis by *Chlorella pyrenoidosa*. Plant Physiology. 65: 774-779.
- Stewart, R. 1978. The effects of light quality on phytoplankton carbon metabolism. Ph. D. Thesis. University of Dundee. Scotland. 258 pp.
- Stewart, R. y Codd, G. A. 1981. Glycollate and glyoxylate excretion by *Sphaerocystis Schroeteri* (Chlorophyceae). British Phycological Journal. 16: 177-182.
- Tolbert, N. E. y Osmond, C. B. 1976. The Great Barrier Reef photorespiration expedition: introduction. Australian Journal of Plant Physiology. 3: 1-8.
- Zelitch, I. 1957. α -Hydroxysulphonates as inhibitors of the enzymic oxidation of glycolic and lactic acids. Journal of Biological Chemistry. 224: 251-260.