

СТАТЬИ

УДК 57.082.26

БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* IPPAS D-294, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИОНОЛОМ, ПРИ ВЫСОКОЙ СОЛЕННОСТИ В ОПТИМАЛЬНОМ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

¹Али-заде Г.И., ²Сулейманова Л.М., ¹Джалилова А.Р.

¹Бакинский государственный университет, Баку, e-mail: cayimhu@mail.ru;

²Азербайджанский медицинский университет, Баку, e-mail: leyla_suleymanli@yahoo.com

В работе представлены результаты изучения биопродуктивности, биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при высокой солености в оптимальном и низкотемпературном режимах культивирования. Показано, что в условиях высокой солености (3 М NaCl) и низкотемпературного стресса биопродуктивность клеток снижается на 25% по отношению к оптимальному режиму культивирования. Модификация клеток ионолом при концентрациях 25–350 мкМ приводит к стимуляции роста культуры *Dunaliella* в оптимальном, а при низкотемпературных режимах интервал увеличивается до 25–500 мкМ. Установлено, что модификация клеток различными концентрациями ионола в течение 24 ч в оптимальных условиях культивирования снижают биосинтез хлорофиллов (82% хлорофилла *a*; 85% хлорофилла *b*), синтез суммы каротиноидов при этом несколько увеличивается до 6% водорослями. Параметр, отношения суммы хлорофиллов и каротиноидов, характеризующий энергизацию фотосинтетической мембраны, составляет 4,5 в оптимальном режиме культивирования. Установлено, что низкотемпературный стресс увеличивает толерантность клеток к действию синтетического антиоксиданта ионола. Наблюдается уменьшение соотношения хлорофилла *a* / хлорофилла *b*, а также снижение соотношения хлорофиллы/каротиноиды, за счет подавления синтеза суммы хлорофиллов.

Ключевые слова: зеленая микроводоросль *Dunaliella*, биопродуктивность, ионол, соленость, синтез хлорофиллов, сумма каротиноидов

PIGMENT BIOSYNTHESIS IN *DUNALIELLA SALINA* IPPAS-294 CELLS MODIFIED BY 2,6 DI-TRET-BUTYL CRESOL AT HIGH SALINITY IN OPTIMAL AND LOW-TEMPERATURE CULTIVATION CONDITIONS

¹Alizade G.I., ²Suleymanova L.M., ¹Dzhalilova A.R.

¹Baku State University, Baku, e-mail: cayimhu@mail.ru;

²Azerbaijan Medical University, Baku, e-mail: leyla_suleymanli@yahoo.com

In this work have been presented the results of influence investigations of bioproductivity and biosynthesis of pigments in *Dunaliella salina* IPPAS D-294 cells grown at high salinity condition (3,0 M NaCl) and low temperature stress, bioproductivity of cells reduces 25% compared to optimal regime of cultivation. The modification of cells by 2,6 di-tret-butyl cresol at concentrations 25-350 mkM leads to grown stimulation of *Dunaliella* culture in optimal regime, bid in low temperature regime the interval incases up to 25-500 mkM. It was identified that, the modification of cells by various concentrations ionol whiten 24 hours in optimal regime of cultivation decreases biosynthesis of chlorophyll (82% chlorophyll *a*, 85% chlorophyll *b*), but incases up to 6% by seaweed. Parameter of ratio chlorophyll and carotenoid amount, characterizing energization of photosynthetic membrane consyts of 4,5 in optimal regime of cultivation. It was identified that, low temperature stress, increases the tolerance of cells to synthetic activity if ionol. Decrease of chlorophyll *a* / chlorophyll *b* ratio and also decease cartonoid ratio due to suppression of synthesis of chlorophyll amount.

Keywords: *Dunaliella* microalgae, salinity, bioproductivity, 2,6 di-tret-butyl cresol, biosynthesis of chlorophyll and carotenoids

Литературные данные, касающиеся изменения пигментных систем у различных представителей рода *Dunaliella* под воздействием экстремальных условий существования сводятся к тому, что абсолютное содержание всех пигментов в клетках *Dunaliella* при увеличении концентрации осмотически действующих солей, недостатке биогенных элементов, повышении и понижении температуры, как правило увеличивается [1]. Абсолютное содержание хлорофиллов *a* и *b* и их суммы в клетках всех видов, *Dunaliella* в экстремальных

условиях существования имеет тенденцию уменьшаться.

Известно, что также в процессе роста культур содержание и соотношение пигментов в биомассе изменяется. По данным [2] максимальное количество всех пигментов образуется в период интенсивного роста водорослей. Во время логарифмической фазы роста культуры *Dunaliella salina* абсолютное содержание каротиноидов в клетках уменьшается [3, 4]. Накопление последнего наблюдается лишь при переходе культуры в стационарную фазу [2]. Поэтому мы экс-

перименты проводили в течение 24 ч в интенсивном режиме культивирования, где достигается только стационарная фаза роста. Адаптация растений к низким температурам связана с восстановлением нарушенного баланса между такими важнейшими физиологическими процессами, как рост, пигментообразование и фотосинтез [5].

Несмотря на то, что растения обычно обладают высоким уровнем антиокислительной активности и, как правило, содержат большое количество антиоксидантов различной химической природы [6–8], нам хотелось также исследовать, в какой степени ионы (классический синтетический антиоксидант) минеральной среды выращивания может влиять на биосинтез каротиноидов и хлорофиллов в клетках *Dunaliella salina*.

Цель исследования: изучение в оптимальных и в условиях низкотемпературного стресса влияния различных концентраций 2,6 ди-*трет*-бутил крезола (ионола) в минеральной среде на рост и биосинтез пигментов в клетках *Dunaliella*.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выделенная из соленого озера Масазыр, находящегося на северо-западе территории города Баку.

Водоросли выращивали при температуре 27°C в стеклянных фотореакторах (250 мл), на установке для выращивания культур одноклеточных водорослей. Минеральная среда содержала (г/л): NaCl – 175 (3,0 М); KNO₃ – 5,0; KH₂PO₄ – 1,25; MgSO₄ – 50; FeSO₄ – 0,009 раствор микроэлементов (мг/л) – Ca(NO₃)₂·H₂O – 735; H₃BO₃ – 735; ZnSO₄·7H₂O – 615; (NH₄)₂MoO₄ – 100; MnCl₂·4H₂O – 180. Суспензию клеток в фотореакторах в течение 24 ч освещали белым светом (16 Вт/м²) и непрерывно продували смесью (воздух + 1,5% CO₂) с температурой 27°C для контрольных и 5°C для опытных суспензий (низкотемпературный стресс). Клетки выращивали в течение 24 ч, в интенсивно-накопительном режиме культивирования и освещали круглосуточно. Рост культуры определяли периодическим подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом или нефелометрическим измерением оптической плотности суспензии на фотозлектроколориметре.

В работе были использованы 2,6 ди-*трет*-бутил крезол (ионол) в концентрациях 25–500 мкМ. Ионол (М.в. 220,35 г/моль) в чистом виде порошок белого цвета, хорошо растворимый в этиловом спирте. В суспензию клеток добавляли синтетический антиоксидант с фиксированными концен-

трациями (25; 50; 150; 250; 350; 500 мкМ) и выращивали в течение 24 ч.

Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре и рассчитывали на основании коэффициентов Веттштейна [9].

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 (кривая 1) представлены результаты динамики роста культуры микроводоросли *Dunaliella* в оптимальных условиях (температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м², содержание CO₂ в воздушной смеси 1,5%, минеральная среда, содержащая 3,0 М NaCl). Выращивание клеток в 250 мл стеклянных фотореакторах и подаче воздушной смеси с температурой 25°C в интенсивно-накопительном режиме культивирования в течение 24 ч показали, что оптическая плотность клеточной суспензии увеличивается в 3 раза.

Такая тенденция роста популяции продолжается и в последующих повторных вариантах выращивания контрольных суспензий. Подача в фотореакторы воздушной смеси с температурой 5°C (низкотемпературный стресс) приводит к замедлению роста и снижению биопродуктивности на 25% (кривая 2). Несмотря на снижение динамики роста популяции при низкотемпературном стрессе деление клеток в течение 24-часового культивирования в интенсивно-накопительном режиме составляет высокий показатель (увеличение оптической плотности в 2,5 раза). В этих условиях добавляли в минеральную среду выращивания синтетический антиоксидант 2,6 ди-*трет*-бутил фенол в различных концентрациях и прослеживали динамику роста культуры.

На рис. 2 представлена зависимость роста клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 в интенсивно-накопительном режиме культивирования от различных концентраций ионола в минеральной среде. Как видно из рисунка, присутствие ионола в минеральной среде выращивания при высокой солености в оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования заметно влияет на рост культуры. Так, при концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в минеральной среде ионола в оптимальном (1) режиме культивирования наблюдается стимуляция динамики роста культуры клеток на 4% и 6% соответственно, по отношению к контрольным суспензиям. При концентрациях (150; 250; 350 мкМ) в минеральной среде стимуляция роста остается на высоком уровне (107; 106; 102%). Значит, 2,6 ди-*трет*-бутил крезол при концентрациях 25–350 мкМ сопоставим с активностью обычных фитогормонов [1].

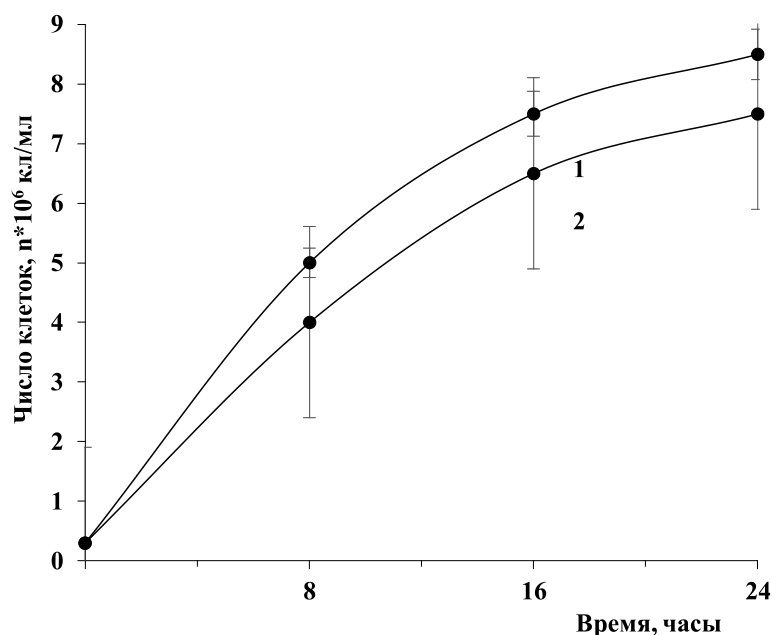


Рис. 1. Динамика роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при высокой солености в оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования. Температура 27 °С, интенсивность света 16 Вт/м²

При повышении содержания 2,6 ди-*трет*-бутил крезола в минеральной среде (500 мкМ) оно приобретает обратный знак, наблюдается подавление до (8–9%) соответственно роста культуры в течение 24-часового культивирования в интенсивно-накопительном режиме. Под влиянием этого синтетического антиоксиданта максимальная дифференцировка наблюдается при концентрации 150 мкМ (7%) по сравнению с контрольными клетками. Сравнительное изучение зависимости роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций 2,6 ди-*трет*-бутил крезола в минеральной среде с высокой соленостью, в условиях низкотемпературного стресса показала, что присутствие ионола в среде выращивания заметно влияет на рост культуры (рис. 2, кривая 2). Так, в диапазоне концентраций 25–350 мкМ в минеральной среде 2,6 ди-*трет*-бутил крезола наблюдается стимуляция роста культуры, которая превышает на 5–8% контрольные суспензии клеток. Повышение концентрации синтетического антиоксиданта до 500 мкМ рост популяции клеток *Dunaliella* остается на контрольном уровне 100%. В данном эксперименте видно, что присутствие различных концентраций 2,6 ди-*трет*-бутил крезола в минеральной среде с высокой соленостью в диапазоне 25–500 мкМ не сказывается (подавление ро-

ста не наблюдается) на биопродуктивности водорослей. В данном случае увеличивается толерантность клеток к антиоксиданту по сравнению с клетками, выращенными при оптимальном режиме культивирования, вероятно, связанного с работой эндогенной антиоксидантной системы клеток и 2,6 ди-*трет*-бутил крезола.

Выраженная ростостимулирующая активность 2,6 ди-*трет*-бутил крезола при его концентрациях 25–350 мкМ в минеральной среде с высокой соленостью в оптимальном режиме культивирования и в диапазоне концентраций 25–500 мкМ при низкотемпературном стрессе делает этот антиоксидант перспективным и эффективным средством доступной и надежной регуляции (активации) роста культуры клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294.

На рис. 3 представлены результаты зависимости биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций ионола в минеральной среде, выращенных при оптимальных условиях. Как видно из рисунка, ростостимулирующие концентрации 25–350 мкМ и последующая высокая концентрация 500 мкМ ионола снижают биосинтез общего количества хлорофиллов (до 82% хлорофилла *a*; 85% хлорофилла *b*), синтез суммы каротиноидов при этом несколько увеличивается до 6%, по отношению к контрольным клеткам. Это

характерно для водоросли *Dunaliella* где четко сказано, что при изменении условий существования абсолютное содержание и соотношение пигментов меняется [5]. Концентрации синтетического антиокси-

данта в минеральной среде не влияют на соотношения хлорофилла *a* и хлорофилла *b*. При этом соотношения хлорофиллы/каротиноиды снижаются с увеличением концентрации ионола в минеральной среде.

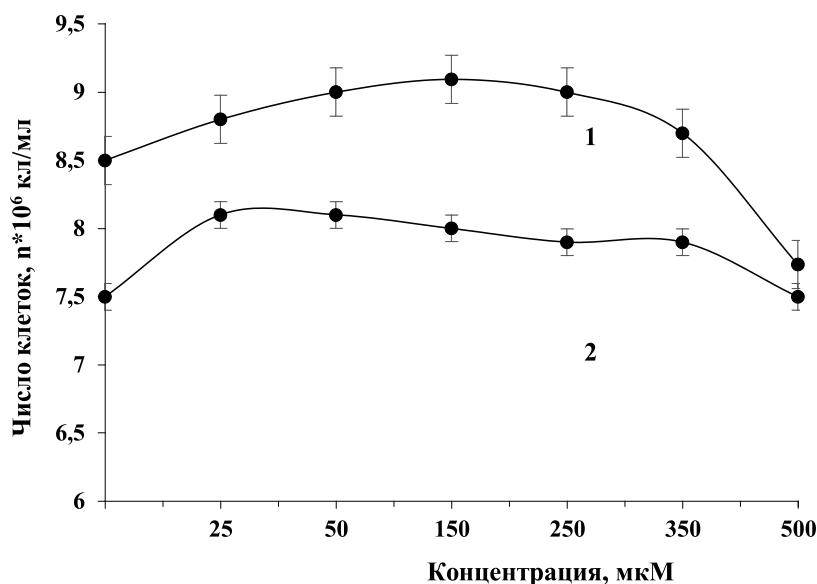


Рис. 2. Зависимость динамики роста популяции контрольных клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций ионола в минеральной среде (3,0 NaCl) при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования. Температура 27 °С, интенсивность света 16 Вт/м²

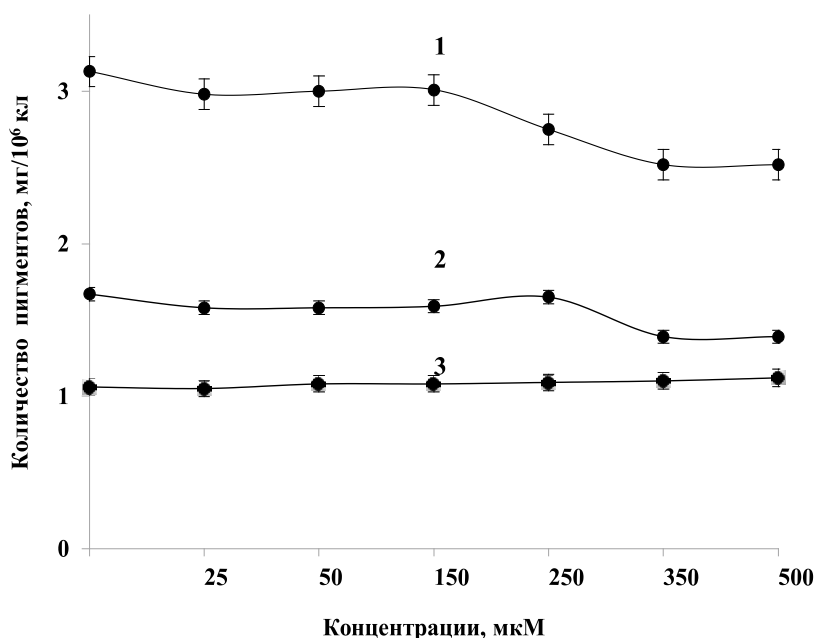


Рис. 3. Зависимость биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций 2,6 ди-трет-бутил крезола в минеральной среде (3,0 NaCl), выращенных при оптимальном режиме культивирования. 1 – биосинтез хлорофилла *a*; 2 – биосинтез хлорофилла *b*; 3 – биосинтез суммы каротиноидов. Температура 27 °С, интенсивность света 16 Вт/м²

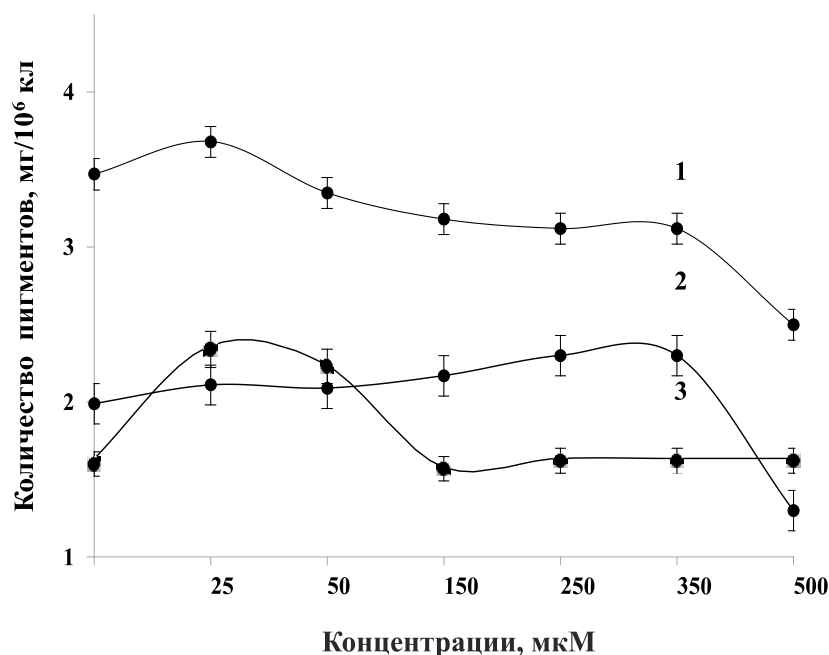


Рис. 4. Зависимость биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций 2,6 ди-tert-бутил крезол в минеральной среде (3,0 NaCl), выращенных в условиях низкотемпературного стресса. 1 – биосинтез хлорофилла а; 2 – биосинтез хлорофилла в; 3 – биосинтез суммы каротиноидов. Температура 27 °С, интенсивность света 16 Вт/м²

На рис. 4 представлены результаты зависимости биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций ионола в минеральной среде, выращенных в условиях низкотемпературного стресса. Как видно из рисунка, ростостимулирующие концентрации и последующие высокие концентрации ионола повышает биосинтез хлорофилла а (25мкМ), в интервале концентраций 50–500 мкМ биосинтез хлорофилла а снижается до 72%. В этих условиях биосинтез хлорофилла в при концентрациях (25–350 мкМ) повышается до 15%, а при 500 мкМ резко снижается 65%. Низкотемпературный стресс и увеличение концентрации синтетического антиоксиданта ионола в минеральной среде (3,0 NaCl) биосинтез суммы каротиноидов клетками повышается при концентрациях 25 и 50 мкМ на 46% и 39% соответственно, затем снижается и остается на контрольном уровне. В этих исследованиях увеличение концентрации синтетического антиоксиданта ионола в минеральной среде приводит к уменьшению соотношения хлорофилла а / хлорофилла в. Соотношения хлорофиллы/каротиноиды, при концентрациях 25–500 мкМ уменьшаются, по отношению к контрольным клеткам.

Таким образом, увеличение концентрации синтетического антиоксиданта ионола в минеральной среде при оптимальных условиях выращивания клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 соотношения хлорофилла а / хлорофилла в не меняется. Синтетический антиоксидант ионол в минеральной среде (3,0 NaCl) выращивания приводит к уменьшению соотношения хлорофиллы/каротиноиды в клетках. Низкотемпературный стресс увеличивает толерантность клеток к действию синтетического антиоксиданта ионола. В этом случае наблюдается уменьшение соотношения хлорофилла а / хлорофилла в, а также снижению соотношения хлорофиллы/каротиноиды, за счет подавления синтеза суммы хлорофиллов.

Список литературы

1. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Теод. Киев: Наукова думка, 1973. 244 с.
2. Burak H., Dunbar A., D. James Gilmour D.J. Enhancement of *Dunaliella salina* growth by using wavelength shifting dyes. Journal of Applied Phycology. october 2019. Vol. 31. Issue 5. P. 2791–2796.
3. Али-заде Г.И., Магеррамова Х.Х., Джалилова А.Р., Алиев И.И., Гасанова Г.С., Дибирова Г.Г. Ответные реакции клеток *Dunaliella* при низкотемпературном стрессе // Экология и водное хозяйство. 2012. № 5. С. 20–23.
4. Alizadeh G.I., Jalilova A.R., Maharramova Kh.Kh., Aliev I.I., Dibirova G.H., Gasanova G.S. The antioksidative ac-

tivity of *Dunaliella* cells under low temperature stress. International Journal of Biopharmaceutical and Nanomedical Sciences. 2013. Vol. 2 (1). P. 74–78.

5. Климов С.В. Морозостойкость растений озимой пшеницы зависит от адаптации фотосинтеза и дыхания в разных временных интервалах // Известия РАН, серия биологическая. 2009. № 3. С. 313–322.

6. Алинкина Е.С., Мишарина Т.А., Фаткулина Л.Д., Бурлакова Е.Б. Сравнение антирадикальной активности ионола, компонентов свежего имбиря и его экстрактов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 564–569.

7. Saha S.K., Kazipet N., Murray P. The Carotenogenic *Dunaliella salina* CCAP 19/20 Produces Enhanced Levels of Carotenoid under Specific Nutrients Limitation. BioMed Research International. Vol. 2018. Article ID 7532897. 11 p.

8. Chernobai N., Kadnikova N., Kovalenko I. The role of cold adaptation in cryopreservation of *dunaliella salina* ted. microalgae. Advances in Biology & Earth Sciences. 2019. Vol. 4. No. 2. P. 119–127.

9. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений // Высшая школа. 1975. 392 с.