

БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA*, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИОНОЛОМ, В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Г.И. Али-заде^{1*}, А.Р. Джалилова², И.И. Алиев², Х.Х. Магеррамова²

¹ Кафедра биофизики и молекулярной биологии, Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

² Лаборатория Биотехнологии, Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

BIOSYNTHESIS OF PIGMENTS *DUNALIELLA* CELLS, MODIFIED BY IONOL IN CONDITIONS OF LOW TEMPERATURE STRESS

G.I. Alizadeh, A.R. Jalilova, I.I. Aliev, Kh.Kh. Maharramova (Department of Biophysics and Molecular Biology, Baku State University, Baku, Azerbaijan; Laboratory of Biotechnology, Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. В работе представлены данные изучения действия различных концентраций синтетического антиоксиданта ионола на биопродуктивность и биосинтез пигментов клетками *Dunaliella*. Показано, что модификация клеток различными концентрациями ионола в течение 24 часов в оптимальных условиях снижают биосинтез хлорофиллов и каротиноидов водорослями. В условиях низкотемпературного стресса, повышается биосинтез пигментов клетками.

Abstract. In the work the results of investigations of the influence of various concentrations of synthetic antioxidant ionol on bioproductivity and biosynthesis of pigments by *Dunaliella* cells have been presented. It was shown that, the modification of cells by various concentrations of ionol within 24 hours under optimal conditions, decreases biosynthesis of chlorophyll and carotenoid by the seaweeds. In conditions of low temperature stress, increases biosynthesis of pigments by the cells.

Ключевые слова: зеленая микроводоросль *Dunaliella*, биопродуктивность, ионол, синтез хлорофиллов и каротиноидов.

Keywords: green microalgae *Dunaliella*, bioproductivity, ionol, biosynthesis of chlorophyll and carotenoid.

* Г.И. Али-заде, к.б.н., доц., Бакинский Государственный Университет, AZ1148, ул. З. Халилова 23, Баку, Азербайджан, e-mail: cayimhu@mail.ru

Received: 06 April 2018; **Accepted:** 27 June 2018; **Published:** 02 August 2018

1. Введение

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 (Masyuk, 1973; Alizadeh *et al.*, 2017). Абсолютное содержание хлорофиллов *a* и *b* и их суммы в клетках всех видов

Dunaliella в экстремальных условиях существования имеет тенденцию, уменьшаться.

Известно также, что в процессе роста культур *Dunaliella* содержание и соотношение пигментов в биомассе изменяется. По данным (Robotnova & Milko, 1976) максимальное количество всех пигментов образуется в период интенсивного роста водорослей. Во время логарифмической фазы роста культуры *Dunaliella salina* абсолютное содержание каротинов в клетках уменьшается (Alizadeh *et al.*, 2012; Alizadeh *et al.*, 2013). Накопление последних наблюдается лишь при переходе культуры в стационарную фазу (Robotnova & Milko, 1976). Поэтому мы проводили эксперименты в течение 24 часов в интенсивном режиме культивирования, где только достигается стационарная фаза роста. Адаптация растений к низким температурам связана с восстановлением нарушенного баланса между такими важнейшими физиологическими процессами, как рост, пигментообразование и фотосинтез (Klimov, 2009; Akimova & Sokolova, 2010; Alizadeh *et al.*, 2014).

Несмотря на то, что растения обычно обладают высоким уровнем антиокислительной активности и, как правило, содержат большое количество антиоксидантов различной химической природы (Alinkina *et al.*, 2012; Shorning *et al.*, 1999), нам хотелось также исследовать, в какой степени ионол минеральной среды выращивания может влиять на биосинтез каротиноидов и хлорофиллов в клетках *Dunaliella salina*.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния различных концентраций синтетического антиоксиданта 2,6 ди-*трет*-бутил крезол (ионола) в минеральной среде на рост и биосинтез пигментов в клетках *Dunaliella*, выращенных при оптимальных и в условиях низкотемпературного стресса.

2. Объект и методика исследований

Объектом исследования служила галофильная 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 – 87,5 (1,5 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)MoO₄ – 100; MnCl₂ • 4H₂O – 180. Суспензию клеток в фотореакторах в течение 24 часов освещали белым светом (16 Вт/м²) и непрерывно продували смесью (воздух+1,0% CO₂) с температурой 27°C для контрольных и + 5°C для опытных суспензий (низкотемпературный стресс). Клетки выращивали в течение 24 часов, 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.

Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре для каротиноидов 440,5 нм, для хлорофилла *a* 662 нм, а для хлорофилла *b* 644 нм и рассчитывали на основании коэффициентов Веттштейна (Gavrilenko *et al.*, 1975).

Эксперименты проводились в 3-4 повторности и рассчитаны среднестатистические значения.

3. Результаты и их обсуждения

На рисунке 1 (кривая 1) представлены результаты динамики роста культуры микроводоросли *Dunaliella* при оптимальных условиях (температура 27°C , интенсивность света 16 Вт/м^2 , содержание CO_2 в воздушной смеси 1,0%, минеральная среда, содержащая 1,5 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 часов показало, что оптическая плотность клеточной суспензии увеличивается в 3,5-4 раза.

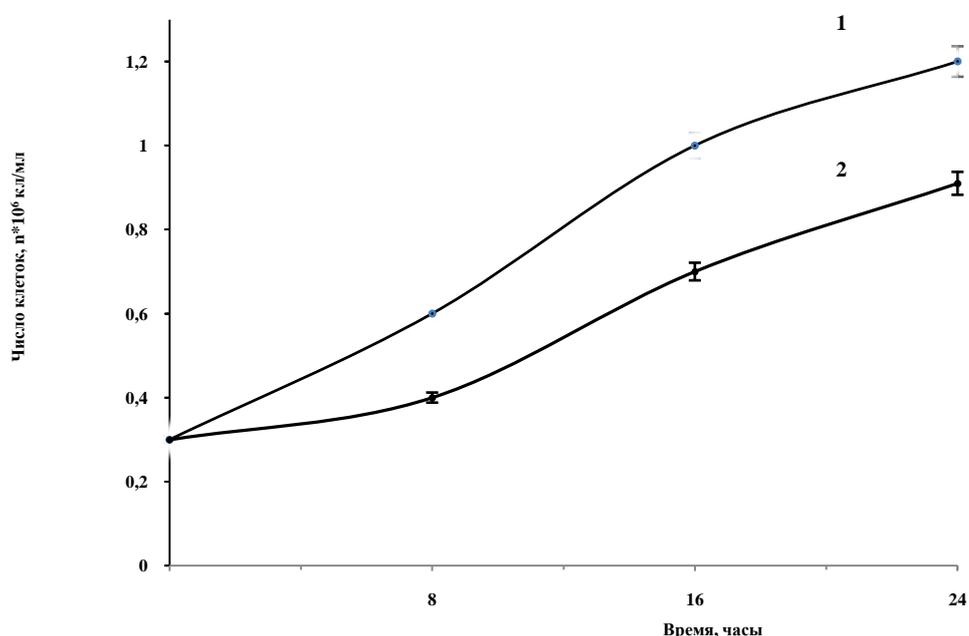


Рис. 1. Динамика роста клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования. Температура - 27°C , интенсивность света - 16 Вт/м^2

Fig. 1. Dynamics of cell growth of *Dunaliella salina* IPPAS D-294 with optimal (1) and low-temperature (2) cultivation regimes. Temperature - 27°C , light intensity - 16 W/m^2

Такая тенденция роста популяции продолжается и в последующих повторных вариантах выращивания контрольных суспензий. Подача в фотореакторы воздушной смеси с низкой положительной 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 3 раза). В этих условиях добавляли в минеральную среду выращивания синтетический антиоксидант ионол в различных концентрациях и прослеживали динамику роста культуры.

На рисунке 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 среде выращивания при оптимальном (2) и низкотемпературном (1) режимах культивирования заметно влияет на рост культуры. Так, при концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в минеральной среде ионола в оптимальном (2) режиме культивирования наблюдается стимуляция динамики роста культуры клеток на 3 % и 4 % соответственно, по отношению к контрольным суспензиям.

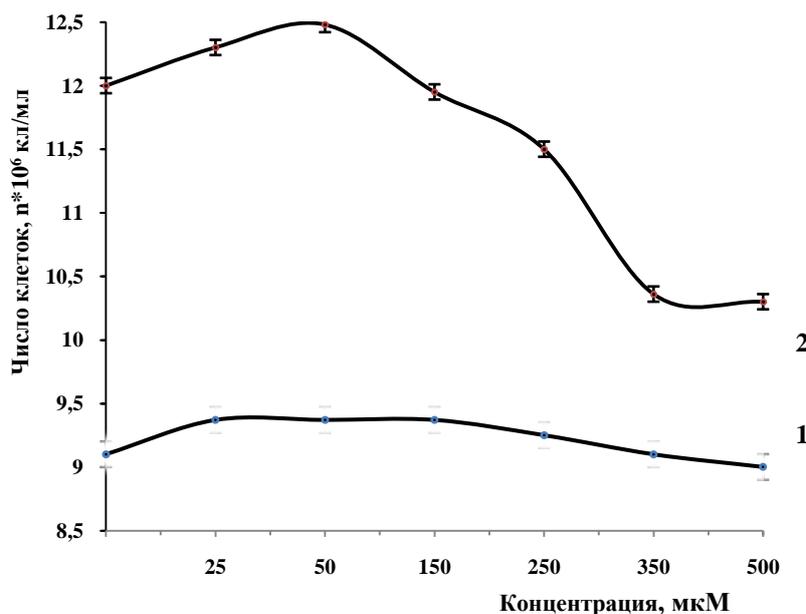


Рис. 2. Зависимость роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций 2,6 ди-*tert*-бутил крезола (ионола) в минеральной среде при оптимальном (2) и низкотемпературном (1) режимах культивирования. Температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м²

Fig. 2. Dependence of growth in the population of *Dunaliella salina* IPPAS D-294 cells on various concentrations of 2,6 di-*tert*-butyl cresol (ionol) in the mineral medium with optimal (2) and low-temperature (1) cultivation regimes. Temperature - 27⁰С, light intensity - 16 W/m²

Значит, ионол при низких концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ сопоставим с активностью обычных фитогормонов. При концентрациях 150-250 мкМ в минеральной среде ростостимулирующее действие ионола заметно уменьшается (99-96%). При повышении содержания ионола в минеральной среде примерно на порядок (350-500 мкМ) оно приобретает обратный знак, наблюдается подавление до (15%) соответственно роста культуры в течение 24 часового культивирования в интенсивно-накопительном режиме. По сравнению с оптимальным режимом культивирования, зависимость роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций ионола в минеральной среде, в условиях низкотемпературного стресса показала, что присутствие ионола в среде выращивания заметно влияет на рост культуры (рис. 2, кривая 1). Так, при диапазоне концентраций 25-150 мкМ в минеральной среде ионола наблюдается стимуляция роста культуры, которая составляет 103%. Увеличение концентрации

ионола до 250 мкМ в минеральной среде ростостимулирующее действие ионола сохраняется (102%), а при 350 мкМ соответствуют контрольным клеткам. При повышении содержания ионола в минеральной среде примерно на порядок (500 мкМ) незначительно снижает (99%) рост культуры в течение 24 часового культивирования в интенсивно-накопительном режиме, в условиях низкотемпературного стресса. Выраженная ростостимулирующая активность ионола при его низких концентрациях 25-50 мкМ в минеральной среде при оптимальном режиме культивирования и в диапазоне концентраций 25-350 мкМ при низкотемпературном стрессе делает этот антиоксидант перспективным и эффективным средством доступной и надежной регуляции (активации) роста культуры клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294.

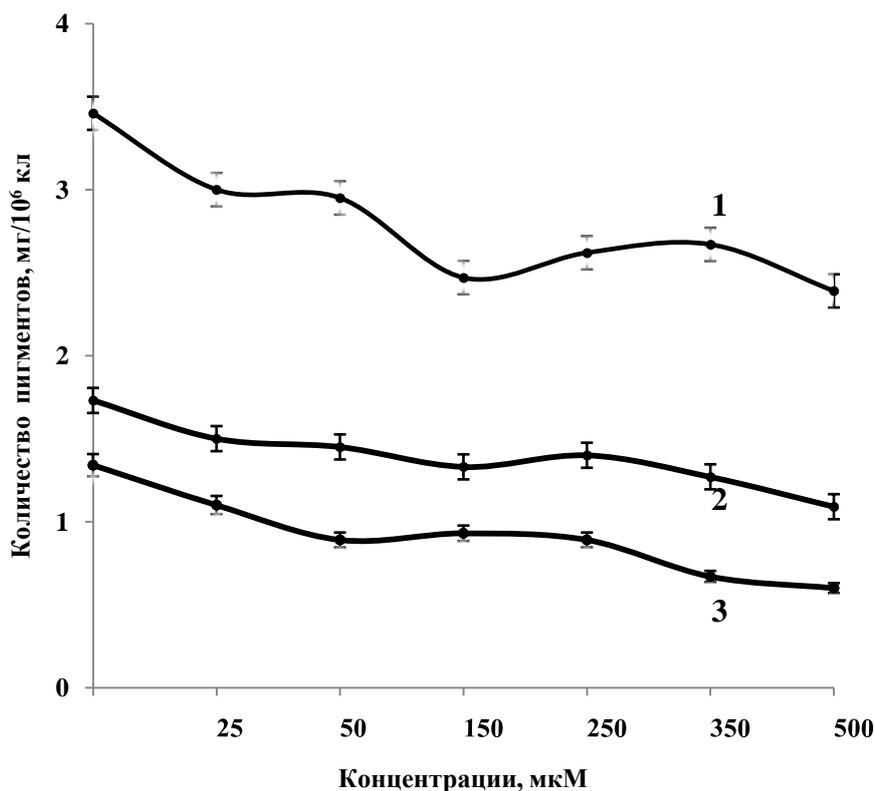


Рис. 3. Зависимость биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPASD-294 от различных концентраций 2,6 ди-*tert*-бутил крезола (ионола) в минеральной среде, выращенных при оптимальных условиях. 1- биосинтез хлорофилла *a*; 2- биосинтез хлорофилла *b*; 3-биосинтез суммы каротиноидов. Температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м²

Fig. 3. Dependence of pigment biosynthesis in *Dunaliella salina* IPPASD-294 cells on different concentrations of 2,6 di-*tert*-butyl cresol (ionol) in mineral medium grown under optimal conditions. 1- biosynthesis of chlorophyll *a*; 2- biosynthesis of chlorophyll *b*; 3- biosynthesis of the sum of carotenoids. Temperature 27⁰С, light intensity 16 W/m²

На рисунке 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 25-50 мкМ и последующие высокие концентрации ионола снижают биосинтез общего количества хлорофиллов (до 69% хлорофилла *a*; 63% хлорофилла *b*), а также синтеза суммы каротиноидов до 44%. Это характерно для водоросли *Dunaliella*, где четко сказано, что при

изменении условий существования абсолютное содержание и соотношение пигментов меняется (Masyuk, 1973). Увеличение концентрации синтетического антиоксиданта в минеральной среде приводит к уменьшению (150-250 мкМ), а затем увеличению (350-500 мкМ) соотношения хлорофилла *a*/ хлорофилла *b*, а также увеличению соотношения хлорофиллы/каротиноиды.

На рисунке 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 повышают биосинтез хлорофилла *a*, в интервале концентраций 50-150 мкМ увеличивает биосинтез хлорофилла *b*.

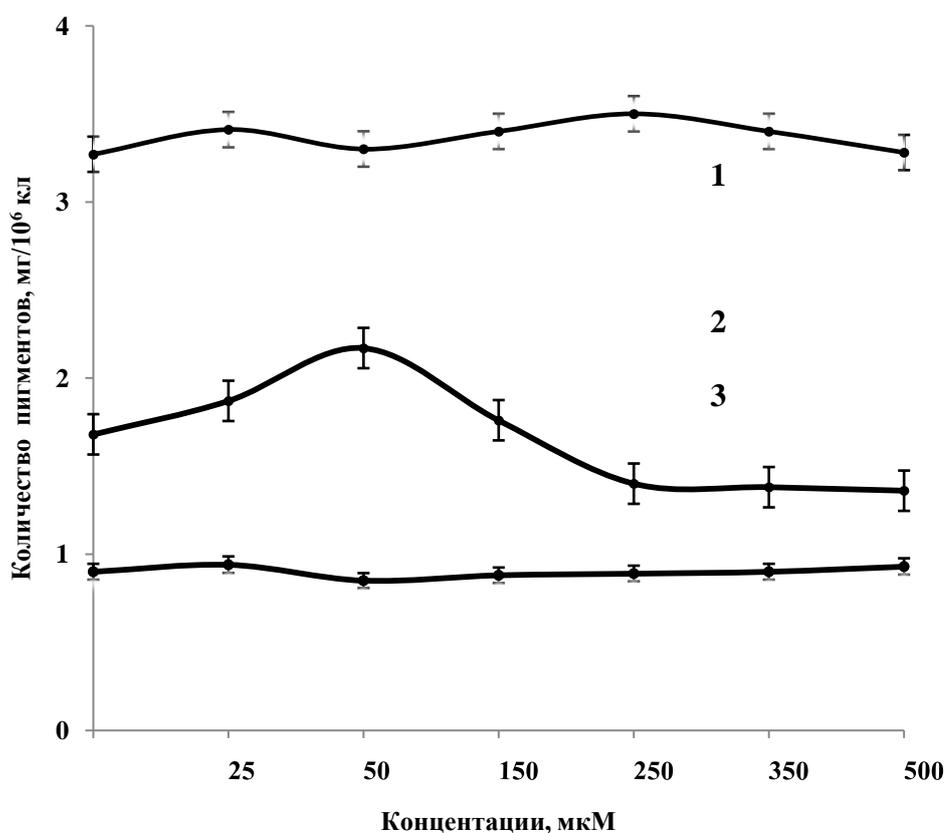


Рис. 4. Зависимость биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPASD-294 от различных концентраций 2,6 ди-*tert*-бутил крезола (ионола) в минеральной среде, выращенных в условиях низкотемпературного стресса. 1-биосинтез хлорофилла *a*; 2- биосинтез хлорофилла *b*; 3-биосинтез суммы каротиноидов. Температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м²

Fig.4. Dependence of pigment biosynthesis in *Dunaliella salina* IPPASD-294 cells on various concentrations of 2,6 di-*tert*-butyl cresol (ionol) in mineral medium grown under low-temperature stress conditions. 1-biosynthesis of chlorophyll *a*; 2- biosynthesis of chlorophyll *b*; 3-biosynthesis of the sum of carotenoids. Temperature 27⁰С, light intensity 16 W/m²

Низкотемпературный стресс и увеличение концентрации синтетического антиоксиданта ионола в минеральной среде не влияет на биосинтез суммы каротиноидов клетками. В этих исследованиях увеличение концентрации синтетического антиоксиданта в минеральной среде приводит к увеличению

соотношения хлорофилла *a*/хлорофилла *b*, а соотношения хлорофиллы/каротиноиды, при концентрациях 50-150 мкМ увеличивается, а при концентрациях 250-500 мкМ уменьшается 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 приводит к уменьшению (при 150-250 мкМ), а затем увеличению (при 350-500 мкМ) соотношения хлорофилла *a*/ хлорофилла *b*. Синтетический антиоксидант ионол в минеральной среде выращивания приводит к увеличению соотношения хлорофиллы/каротиноиды в клетках. Низкотемпературный стресс увеличивает толерантность клеток к действию синтетического антиоксиданта ионола. В этом случае наблюдается увеличение соотношения хлорофилла *a*/хлорофилла *b*, а также уменьшению соотношения хлорофиллы/каротиноиды, за счет повышенного синтеза общих каротиноидов. Уменьшение соотношения хлорофиллы/каротиноиды приводит к снижению интенсивности фотосинтеза. В действительности клетки, выращенные при низкотемпературном стрессе, имеют более низкие показатели скорости выделения кислорода водорослями, чем в оптимальном режиме культивирования.

4. Выводы

1. Показано, что синтетический антиоксидант 2,6 ди-*трет*-бутил крезол (ионол) при концентрациях 25-50 мкМ в минеральной среде выращивания (оптимальные условия), и концентрациях 25-250 мкМ (низкотемпературный стресс) стимулируют рост на 1-3% популяции клеток *Dunaliella* по отношению к контрольным условиям.
2. Установлено, что при оптимальных условиях роста стимулирующие концентрации 25-50 мкМ и последующие высокие концентрации ионола снижают биосинтез общего количества хлорофиллов (до 69% хлорофилла *a*; 63% хлорофилла *b*), а также синтеза суммы каротиноидов (до 44%).
3. Выявлено, что клетки, модифицированные синтетическим антиоксидантом ионолом в условиях низкотемпературного стресса, увеличивают биосинтез пигментов водорослями.

Литература

- Alizadeh, G.I., Maharramova, Kh.Kh., Aliyev, I.I., Dibirova, G.H. (2012). The response reaction of *Dunaliella* cells against the influence of Methylene blue and Norflurazon under the low temperature stress conditions. *Ecology and water economy*, 5, 20-23 (in Russian).
- Alinkina, E.S., Misharina, T.A., Fatkulina, L.D., Burlakova, E.B. (2012). Comparison of anti-radical activity of ionol, components of fresh ginger and its extracts. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(5), 564-569 (in Russian).
- Gavrilenko, B.F., Ladigina, M.E., Khandobina, L.M. (1975). *A large praction on plant physiology*. High school, 392p. (in Russian).
- Klimov, S.V. (2009). The frost resistance of winter wheat plants depends on the adaptation of photosynthesis and respiration in different time intervals.

- Proceedings of the Russian Academy of Sciences, Biological Series*, 3, 313-322 (in Russian).
- Masyuk, N.P. (1973). *Morphology, taxonomy, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod.* Kiev, Naukova Dumka (in Russian).
- Rabotnova, I.L., Milko, E.S. (1996). Influence of cultivation conditions on the formation of carotene by the alga *Dunaliella*. In *Biology of autotrophic microorganisms*, Moscow State University, Moscow (in Russian).
- Shorning, B.Yu., Poleshchuk, S.V., Gorbatenko, I.Yu., Vanyushin, B.F. (1999). The effect of antioxidants on the growth and development of plants. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences, Biological Series*, 1, 30-38 (in Russian).
- Alizadeh, G.I., Jalilova, A.R., Maharramova, Kh.Kh., Aliev, I.I., Dibirova, G.H., Gasanova, G.S. (2013). The antioksidative activity of *Dunaliella* cells under low temperature stress. *International Journal of Biopharmaceutical and Nanomedical Sciences*, 2(1), 74-78.
- Alizadeh, G.I., Jalilova, A.R., Maharramova, Kh.Kh., Aliyev, I.I. (2017). Carotenogenesis in *Dunaliella* cells under stressed conditions. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5(5), 41-46.
- Akimova, G.P., Sokolova, M.G. (2010). Low temperature impact on protein content and peroxidase activity during pea inoculation with *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 6(4), 81-89.