

УСТОЙЧИВОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК *DUNALIELLA SALINA IPPAS D-294* МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНТИОКСИДАНТОМ 2,6 ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ ФЕНОЛОМ В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Г.И. Али-заде¹, А.Р. Джалилова^{2*}, И.Б. Алиева¹, И.И. Алиев²,
Х.Х. Магеррамова²

¹Кафедра Биофизики и Молекулярной Биологии, Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

²Центр биотехнологии, Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

RESISTANCE OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF *DUNALIELLA SALINA IPPAS D-294* CELLS MODIFIED BY SYNTHETIC ANTIOXIDANT 2,6 DI-TRET-BUTYL PHENOL LOW TEMPERATURE STRESS

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

Резюме. На основании полученных результатов показано, что модификация клеток синтетическим антиоксидантом 2,6 ди-трет-бутил фенолом в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в оптимальных и низкотемпературных режимах в течение 24 часов в условиях высокой солености, стимулируют рост и биопродуктивность клеток *Dunaliella*. Выявлено, что клетки *Dunaliella*, модифицированные 2,6 ди-трет-бутил фенолом, в условиях низкотемпературного стресса и высокой солености, проявляют повышенную функциональную устойчивость к действию различных острых доз УФ-В излучения, по сравнению с клетками выращенными в оптимальном режиме и высокой солености.

Abstract. On the basis of obtained results it was shown that the modification of cells by synthetic antioxidant 2,6 di-tret-butyl phenol with concentrations of 25 mkM, and 50 mkM within 24 hours in conditions of high solinity, catalyses growth and bioproductivity of *Dunaliella* cells. It was identified that *Dunaliella* cells modified by 2,6 di-tret-butyl phenol under conditions of low temperature stress and high solinity show high functional stability against various intense doses of UV-B radiation in comparison with the cells grown in optimal conditions of high solinity.

Ключевые слова: *Dunaliella*, соленость, синтетический антиоксидант 2,6 ди-трет-бутил фенол, низкотемпературный стресс, УФ-В излучение.

Keywords: *Dunaliella*, solinity, synthetic antioxidant 2,6 di-tret-butyl phenol, low temperature stress, UV-B irradiation.

* **Айнура Джалилова**, Центр биотехнологии, Бакинский Государственный Университет, AZ1148, ул. З. Халилова, 23, Баку, Азербайджан, e-mail: cayimhu@mail.ru

Received: 08 June 2018;

Accepted: 10 October 2018;

Published: 11 December 2018.

1. Введение

Известно большое число синтетических соединений, которые при экзогенном применении регулируют рост и развитие растений. Соединения, тормозящие рост растений путем ингибирования растяжения клеток и их деления,

называются ретардантами роста, и есть, которые выполняют ростостимулирующее действие (Shirshikova *et al.*, 2001). Значительный интерес представляют исследования особенностей действия синтетического соединения 2,6 ди-трет-бутил фенола, который относится к классу пространственно затрудненных фенолов (Etshov *et al.*, 1972). Для эффективного использования антиоксидантов необходимо связать химию и биологию антиоксидантов, т.е. зависимость биологической активности антиоксидантов от их свойств как ингибиторов радикальных реакций, а также их эффективной концентрации (Burlakova, 2007; Raduk *et al.*, 2009). Активно изучалась возможность использования антиоксидантов в растениеводстве в качестве стимуляторов роста (Burlakova *et al.*, 1998). В больших концентрациях синтетические антиоксиданты начинают действовать в обратном направлении и не тормозить, а напротив - ускорять свободно-радикальные реакции (Ali-zadeh *et al.*, 2016). При длительном круглосуточном действии низкой положительной температуры холодоустойчивость растений и клеток возрастает (Ali-zadeh *et al.*, 2014; Drozdov *et al.*, 1984). Определенная часть повреждений при низкотемпературном стрессе обусловлена действием образующихся в клетке во время стресса активных форм кислорода (АФК) в результате активации процессов перекисного окисления липидов, вызывающих повреждения мембран. Низкотемпературный стресс приводит к изменениям количества и активности ферментов защиты, а также ферментативных элементов, такие как каротиноиды, флавоноиды, α -токоферол, аскорбат и др. (Raduk *et al.*, 2009; Heath & Packer, 1968). Накопление антиоксидантов можно отнести к проявлению общей неспецифической защитной реакции клетки на низкотемпературный стресс (Raduk *et al.*, 2009; Ali-zadeh *et al.*, 2016; Hodges *et al.*, 1996).

Целью работы явилось исследование влияния различных концентраций пространственно затрудненного фенола - 2,6 ди-трет-бутил фенола на рост, активность эндогенной антиоксидантной системы водоросли *Dunaliella* и их УФ-защитной активности в клетке, в условиях высокой солености и низкотемпературного стресса.

2. Материалы и методы

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 Абдуллаева-Семененко содержала (г/л): NaCl – 175,5 (3,0 M); 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+1,5% CO₂) с температурой 27°C при оптимальном и 5°C при низкотемпературном режимах культивирования. Источником УФ-В излучения служила ртутная лампа СВД-120 с острыми дозами 15, 18 и 21 10³Эрг/мм². Пространственно- затрудненный фенол – 2,6 ди-трет-бутил фенол в работе использовался в концентрациях 25 и 50 мкМ. Клетки выращивали в течение 24

часов, в интенсивно-накопительном режиме культивирования и освещали круглосуточно. Рост культуры через 24 часа определяли периодическим подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом и нефелометрическим измерением оптической плотности суспензии на фотоэлектроколориметре.

Для измерения фотосинтетической активности клеток, выращенные водоросли осаждали центрифугированием 3000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре и переносили на свежеприготовленную минеральную среду Абдуллаева-Семененко. Плотность суспензии клеток доводили до 10^6 кл/мл (оптическая плотность $OD=0,8$). Скорость выделения кислорода клетками измеряли на полярографической установке, с применением платинового электрода Кларка, освещая суспензию в термостатированном объеме, белым светом насыщающей интенсивности (100 Вт/м^2).

3. Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций (25 мкМ и 50 мкМ) 2,6 ди-*трет*-бутил фенола в минеральной среде при оптимальном режиме культивирования в условиях высокой солености. Как видно из рисунка, присутствие 2,6 ди-*трет*-бутил фенола в среде выращивания заметно влияет на рост культуры.

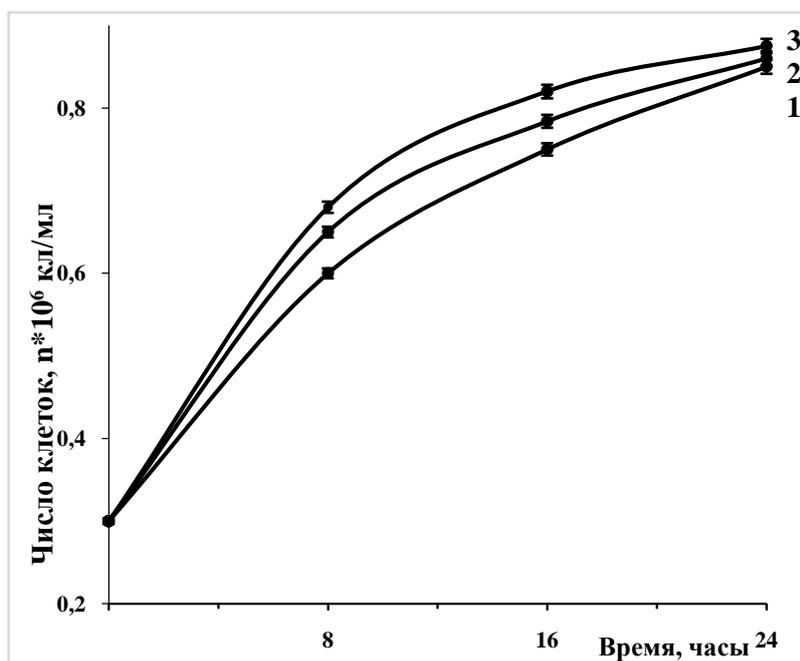


Рис.1. Динамика роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при оптимальном режиме культивирования: 1- контроль; 2- 2,6 ди-*трет*-бутил фенол 25 мкМ; 3- 2,6 ди-*трет*-бутил фенол 50 мкМ. Температура 27°C , интенсивность света 16 Вт/м^2

Figure 1. Population dynamics of *Dunaliella* IPPAS D-294 cells in optimal growth conditions: 1- control; 2- 25 μM of 2,6 *di-tert-butyl phenol*; 3- 50 μM of 2,6 *di-tert-butyl phenol*. Temperature of 27°C , with light intensity of 16 Wt/m^2

Так, при исследованных концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в минеральной среде 2,6 ди-*трет*-бутил фенола дифференцировка клеток увеличивается на 1 % и 3% соответственно, по отношению с контрольным суспензиям. Значит, 2,6 ди-*трет*-бутил фенол при концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ сопоставим с активностью обычных фитогормонов (Burlakova *et al.*, 2007).

На рис. 2, представлена зависимость роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций (25- 50мкМ) 2,6 ди-*трет*-бутил фенола в минеральной среде, в условиях низкотемпературного стресса и высокой солености. Как видно из рисунка, присутствие 2,6 ди-*трет*-бутил фенола в среде выращивания заметно влияет на рост культуры. Так, при концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в минеральной среде 2,6 ди-*трет*-бутил фенола наблюдается стимуляция роста культуры, которая повышается на 3 % и 5 % соответственно, в течение 24 часового культивирования в интенсивно-накопительном режиме, в условиях низкотемпературного стресса.

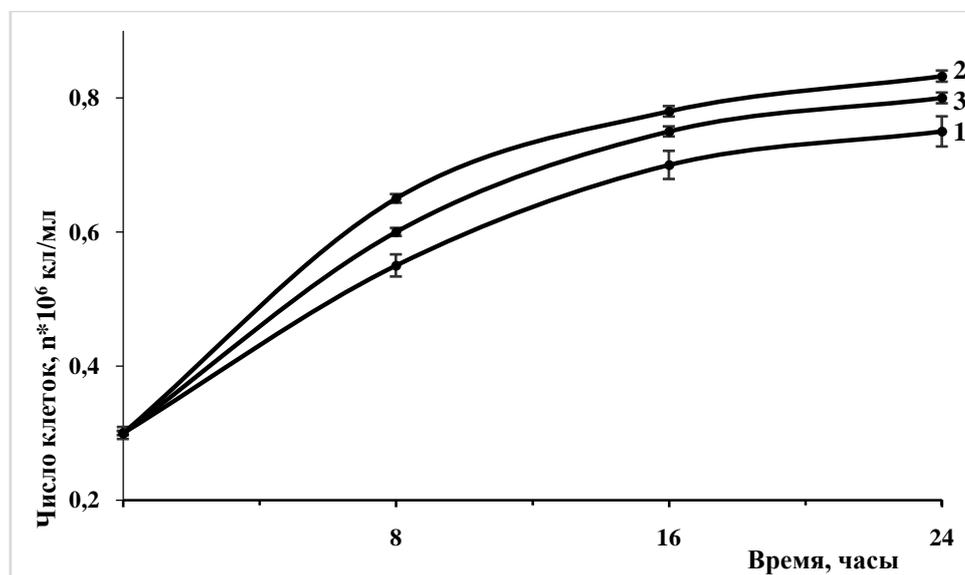


Рис. 2. Динамика роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при низкотемпературном режиме культивирования: 1- контроль; 2- 2,6 ди-*трет*-бутил фенол 25 мкМ; 3- 2,6 ди-*трет*-бутил фенол 50 мкМ. Температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м²

Figure 2. Population dynamics of *Dunaliella* IPPAS D-294 cells in low temperature cultivation: 1- control : 2- 25 μM of 2,6 di-*tert*-butyl phenol: 3- 50 μM of 2,6 di-*tert*-butyl phenol Temperature of 27⁰С, with light intensity of 16 Wt/m²

Для выяснения функциональной активности *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при модификации водорослей в течение 24 часов с различными концентрациями (25 мкМ и 50 мкМ) синтетического антиоксиданта 2,6 ди-*трет*-бутил фенола в минеральной среде в условиях низкотемпературного стресса и высокой солености было показано, что 2,6 ди-*трет*-бутил фенол в исследованном диапазоне подавляет фотосинтетическое выделение кислорода суспензией клеток.

На рис. 3 представлены результаты фотосинтетического выделения кислорода облученными различными острыми дозами УФ-В света контрольными клетками *Dunaliella*, и клетками, модифицированными в течение 24 часов при интенсивном культивировании с 25 мкМ и 50 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом, в

оптимальных условиях и высокой солености. Как видно из рисунка, у контрольных клеток (кривая 1), облученных острой дозой $15 \cdot 10^3$ Эрг/мм² функциональная активность подавляется до уровня 57%.

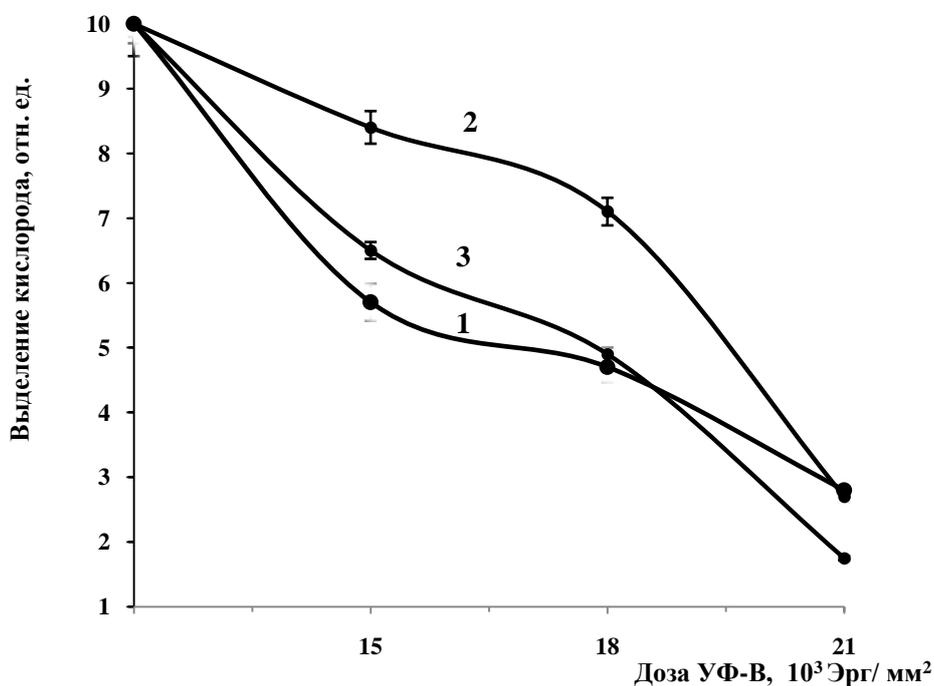


Рис.3. Фотосинтетическое выделение кислорода контрольными и клетками, выращенными в среде с различными концентрациями 2,6-*трет*-бутил фенола, при облучении острыми дозами УФ-В света: 1- контроль; 2- 25 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил фенола; 3- 50 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил фенола. Температура 40⁰С, интенсивность света 100 Вт/м²

Figure 3. Photosynthetic selection of oxygen by controls and cells grown in condition with various consentrotions of 2,6 di-*трет*-butyl phenol under intense doses of UV-B light: 1- control; 2- 25 mkM of 2,6 di-*трет*-butyl phenol; 3- 50 mkM of 2,6 di-*трет*-butyl phenol Temperature of 40⁰С, with light intensity of 100 Wt/m²

Последующее увеличение острой дозы УФ-В излучения $18 \cdot 10^3$ Эрг/мм² существенно снижает (47%) фотосинтетическое выделение кислорода клетками (рис.3, кривая 1). Острые дозы $21 \cdot 10^3$ Эрг/мм² приводит к более глубокому подавлению фотосинтетического выделения кислорода 28%. Клетки, модифицированные 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом с концентрацией 25 мкМ при действии острой дозы УФ-В излучения $15 \cdot 10^3$ Эрг/мм² не проявляют функциональную устойчивость 84%, по сравнению с контрольными клетками. Увеличение острой дозы до $18 \cdot 10^3$ Эрг/мм² подавляет функциональную активность модифицированных клеток (71%). А острые дозы УФ-В излучения $21 \cdot 10^3$ Эрг/мм² значительно снижают (27%) фотосинтетическое выделение кислорода модифицированными 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом клетками (рис.3, кривая 2). Увеличение концентрации (50 мкМ) синтетического антиоксиданта 2,6-*трет*-бутил фенола при модификации клеток показало, что устойчивость функциональной активности сохраняется на уровне (65%) при острых дозах $15 \cdot 10^3$ Эрг/мм² УФ-В излучения (рис.3, кривая 3). Острые дозы $18 \cdot 10^3$ Эрг/мм² УФ-В излучения подавляют функциональную активность клеток (49%), которая не отличается от контрольных клеток, где подавление составляет (47%).

Увеличение острой дозы $21 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$ УФ-В излучения снижает функциональную активность клеток до 17,5%. Это показатели устойчивости функциональной активности модифицированных 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом клеток в условиях высокой солености.

На рисунке 4 представлены результаты фотосинтетического выделения кислорода облученными различными острыми дозами УФ-В света контрольными клетками *Dunaliella*, и клетками, модифицированными в течение 24 часов при интенсивном культивировании с 25 мкМ и 50 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом в условиях низкотемпературного стресса и высокой солености. Как видно из рисунка, у контрольных клеток, облученных острой дозой $15,0 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$ функциональная активность подавляется и составляет 74%.

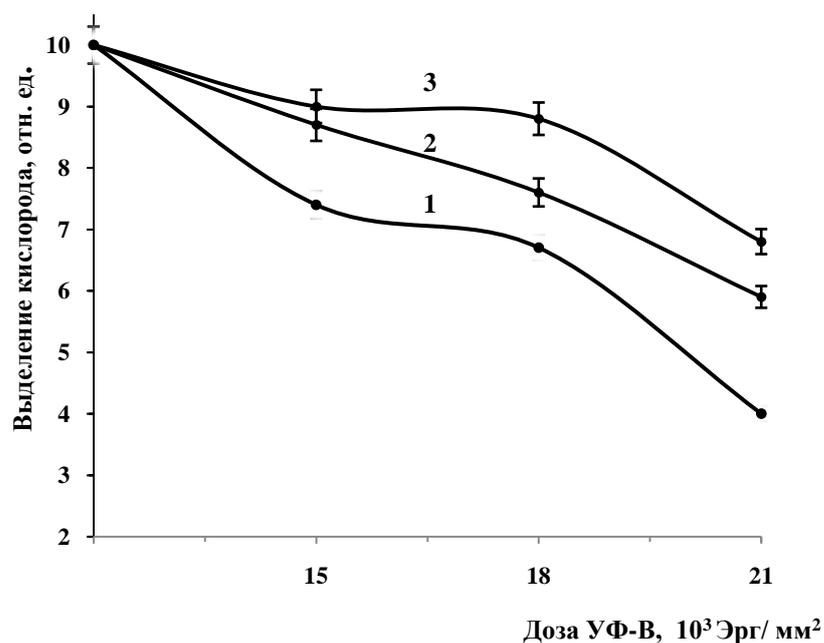


Рис.4. Фотосинтетическое выделение кислорода контрольными и клетками, выращенными в условиях низкотемпературного стресса в среде с различными концентрациями 2,6-*трет*-бутил фенола, при облучении острыми дозами УФ-В света: 1- контроль; 2- 25 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил фенола; 3- 50 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил фенола. Температура 40°C , интенсивность света 100Вт/м^2

Figure 4. Photosynthetic selection of oxygen by controls and cells grown under condition of low temperature stress in condition with various consentrotions of 2,6 *di-tert-butyl phenol* under intense doses of UV-B light: 1- control : 2- 25 mkM of 2,6 *di-tert-butyl phenol*: 2- 50 mkM of 2,6 *di-tert-butyl phenol*. Temperature of 40°C , with light intensity of 100Wt/m^2

Последующее увеличение острой дозы УФ-В излучения $18 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$ приводит к более глубокому подавлению (33%) функции фотосинтетического выделения кислорода контрольных клеток (рисунок 4,1). Острые дозы $21 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$ существенно увеличивают подавление показателей фотосинтетического выделения кислорода (60%) по сравнению с дозой $18 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$. Клетки, модифицированные 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом с концентрацией 25 мкМ при действии острой дозы УФ-В излучения $15 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$ проявляют высокую функциональную устойчивость (87%) и эта доза существенно влияет на функциональную активность модифицированных клеток. Увеличение острой дозы до $18 \cdot 10^3 \text{Эрг/мм}^2$ значительно снижают показатели (76%)

фотосинтетического выделения кислорода модифицированными клетками (рисунок 4,2), а острая доза $21 \cdot 10^3$ Эрг/мм² подавляет функциональную активность клеток до 59%. Увеличение концентрации (50 мкМ) синтетического антиоксиданта 2,6 ди-*трет*-бутил фенола при модификации клеток в течение 24 часов при интенсивном культивировании в условиях низкотемпературного стресса и высокой солености показало, что устойчивость функциональной активности остается на достаточно высоком уровне при острых дозах $15 \cdot 10^3$ Эрг/мм² УФ-В излучения (90%), а затем характер подавления сохраняется (рисунок 4,3) и существенно отличается от концентраций 25 мкМ. Острые дозы $18 \cdot 10^3$ Эрг/мм² УФ-В излучения подавляют функцию клеток до уровня 88%, а доза $21 \cdot 10^3$ Эрг/мм² УФ-В излучения всего до 68%.

Таким образом, клетки, выращенные при низкотемпературном режиме культивирования, проявляют более высокие показатели устойчивости функциональной активности при действии различных острых доз УФ-В излучения. Показатели функциональной устойчивости клеток при действии высокой солености, низкотемпературного стресса могут быть интерпретированы двумя механизмами: первое увеличение эндогенных антиоксидантных систем при действии низкотемпературного стресса за счет увеличения количества активных форм кислорода; второе как известное кросс адаптация клеток при последовательных действиях различных стрессоров (Ali-zadeh *et al.*, 2014; Ali-zadeh *et al.*, 2016).

Литература

- Alizadeh G.I., Zeynalova, N.M., Aliyeva, I.I., Magerramova, Kh.Kh. (2014). Adaptive response of Dunaliella cells to the action of stressors of different nature. *Proceedings of the Azerbaijan National Academy of Sciences*, 69(1), 128-133 (in Russian).
- Burlakova, E.B. (2007). Bioantioxidants. *Russian Chemical Journal*, 51(1), 3-12 (in Russian).
- Drozdov, S.N., Kurets, V.K., Titov, A.A. (1984). Thermal resistance of actively growing plants. L, Nauka, 168 p. (in Russian).
- Ershov, V.V., Nikiforov, G.A., Volodkin, A.A. (1972). Spatially obstructed phenols. Moscow, Khimiya, 351p. (in Russian).
- Burlakova, E.B., Krashakov, S.A. & Khrapova, N.G. (1998). The role of tocopherols in lipid peroxidation of biomembranes. *Biological membranes*, 15(2), 137-167 (in Russian).
- Raduk, M.S., Domanskaya, I.N., Sherbakova, R.A. & Shalygo, N.V. (2009). Low temperature impact on low-molecular antioxidants content and activity of antioxidant ferments of green barley leaves. *Plants physiology*, 56(2), 193-199 (in Russian).
- Shirshikova, G.N., Kreslavskii, V.D., Ladygin, V.G., Zharmukhamedov, S.K., & Ignat'ev, A.R. (2001). Effect of choline chloride on photosynthetic oxygen release and variable and delayed fluorescence of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biophysics*, 46(4), 647-651 (in Russian).
- Ali-zadeh, G.I., Magerramova, Kh.Kh., Aliev, I.I., Jalilova, A.R. (2016). Unsolicited antioxidants, modified by synthetic antioxidants. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 4(10), 34-38.
- Heath, R.L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A. & Hamilton, R.I. (1996). Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 685-692.