

КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* IPPASD-294, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИОНОЛОМ ПРИ ОПТИМАЛЬНОМ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А.Р. Джалилова*, И.И. Алиев, Х.Х. Магеррамова, Г.И. Али-заде

Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан

THE CATALYTIC ACTIVITY IN *DUNALIELLA SALINA* IPPAS D-294 CELLS, MODIFIED BY IONOL IN OPTIMUM AND LOW-TEMPERATURE CULTIVATING CONDITIONS

A.R. Jalilova, I.I. Aliev, Kh.Kh. Magerramov, G.I. Alizadeh (Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. В работе представлены результаты изучения биопродуктивности, каталазной активности в клетках, выращенных при оптимальном и низкотемпературном режимах культивирования. Показано, что в условиях низкотемпературного стресса биопродуктивность клеток снижается на 25% по отношению к оптимальному режиму культивирования. Модификация клеток ионолом приводит к стимуляции роста культуры *Dunaliella* в оптимальном режиме: (25мкМ и 50мкМ) 2,5% и 4,2% соответственно и в условиях низкотемпературного стресса в интервале концентраций (25 - 250 мкМ) 3%. Установлено, что увеличение концентрации ионола приводит к повышению 60- 65% каталазной активности в клетках в диапазоне концентраций (25-150 мкМ) в оптимальном и 15-50% при низкотемпературных режимах.

Abstract. In this work, the results of the investigations of bioproductivity and catalytic activity in *Dunaliella* cells grown in optimum and low-temperature cultivating conditions have been presented. It was shown that, under the low-temperature stress condition bioproductivity of cells decreases by 25% present in regard to optimum cultivating condition. Cell modification by ionol leads to growth stimulation of *Dunaliella* culture in an optimal condition: (25mkM and 50mkM) 2,5% and 4,2% respectively, under the low-temperature stress condition in concentration range of 3% (25mkM-250mkM). It was established that in case of ionol concentration in mineral the condition (25 mkM-250 mkM) leads to 65% increase of catalytic activity in cells optimum condition in of range (25 mkM-250 mkM) and 15-50% under the low-temperature cultivating conditions.

Ключевые слова: *Dunaliella*, биопродуктивность, низкотемпературный стресс, каталазная активность.

Keywords: *Dunaliella*, bioproductivity, low temperature stress, catalytic activity.

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

Received: 08 January 2019;

Accepted: 22 May 2019;

Published: 10 August 2019.

1. Введение

Адаптация растений к низким температурам связана с восстановлением нарушенного баланса между такими важнейшими физиологическими процессами, как рост, дыхание, фотосинтез (Klimov, 2009; Trunova, 2007). Причем сохранение фотосинтетического аппарата в условиях холода предается особое значение. Так, гибель чувствительных к холоду растений считают результатом окислительного

стресса, развивающегося при усиленном образовании активных форм кислорода (АФК) в результате активации процессов перекисного окисления липидов (Allen & Ort, 2001; Perkin *et al.*, 1989; Suzuki & Mitter, 2006). Однако природа окислительного повреждения при низкотемпературном стрессе до сих пор остается изученной недостаточно (Alizadeh *et al.*, 2017). АФК занимает особое место среди стрессовых метаболитов. Важная роль АФК в запуске защитных реакций на абиогены ныне не вызывает сомнений (Liu *et al.*, 2013; Navaux & Kloppstech, 2001; Suzuki & Mitter, 2006). При выращивании проростков в присутствии ионола сильно угнетается и образование АФК и, в частности супероксида (Paciolla *et al.*, 2016). Известно, что наряду с образованием и инактивацией АФК антиоксидант ионол может ингибировать вызываемый АФК выход из митохондрий в цитоплазму цитохрома С (Abdullaeva & Magomedova, 2007).

Рядом исследователей было отмечено, что окислительный стресс развивается в клетках растений при действии на них низких положительных температур. Повреждения в этом случае могло быть сопряжено с ингибированием каталазы, в результате чего в тканях накапливалась H_2O_2 (Paciolla *et al.*, 2016). Для клетки в состоянии стресса характерно увеличение содержания антиоксидантов. Низкие положительные температуры вызывали многократное увеличение концентрации токоферола у *Euglena*, возрастание активности пероксидазы (Zykov *et al.*, 2002). Таким образом, накопление антиоксидантов можно отнести к проявлению общей неспецифической защитной реакции клетки на низкотемпературный стресс (Kulikov *et al.*, 1988; Zykov *et al.*, 2002).

Существенно уменьшить окислительный стресс и его последствия возможно при добавлении в минеральную среду синтетических антиоксидантов, таких как ионол и его производные, относящиеся к классу пространственно-затрудненных фенолов (Alizadeh *et al.*, 2017; Allen & Ort, 2001).

Целью работы являлось изучение каталазной активности в клетках *D. salina* в интенсивно-накопительном режиме культивирования в течение 24 часов в оптимальном режиме и в условиях низкотемпературного стресса при модификации с различными концентрациями ионола.

2. Материалы и методы

Объектом исследования служила галофильная зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* IPPASD-294, выделенная из соленого озера Масазыр расположенного на северо-западе территории города Баку. Водоросли культивировали при температуре 27°C в стеклянных фотореакторах, объемом 250 мл, на установке для выращивания культур одноклеточных водорослей. Минеральная среда содержала (г/л): NaCl – 87,5; KNO₃ – 5,0; KH₂PO₄ – 1,25; MgSO₄ – 50; FeSO₄ – 0,009 и раствор микроэлементов: 1 мл/л - (мг/л); Ca(NO₃)₂ • 4H₂O – 735, H₃BO₃ -125, ZnSO₄ – 615, (NH₄)₂MoO₄ – 100, MnCl₂ • 4H₂O – 180. Суспензию клеток в фотореакторах круглосуточно освещали белым светом (16 Вт/м²) и непрерывно продували смесью (воздух+1,0% CO₂) с температурой 27°C в оптимальном и низкотемпературном режиме (низкотемпературный стресс). Темп роста культуры определяли периодическим подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом MotiсB1 или нефелометрически, измерением оптической плотности суспензии. В работе использовали спиртовые растворы

синтетического антиоксиданта ионола (2,6 ди-*трет*-бутил крезол) с конечной концентрацией 25-500 мкМ.

Клеточную суспензию (35 мл), подготовленную для измерения каталазной активности, доводили до 10^6 кл/мл (оптическая плотность, OD=0,8). Суспензию осаждали центрифугированием (3000 об/мин.). Осадок переносили в ступку с 0,5г CaCO₃, добавляли 5 мл дистиллированной воды и растирали до однородной массы. После этого полученную массу количественно переносили в стакан емкостью 50 мл до метки и настаивали при периодическом взбалтывании 3-4 часа (4⁰С). В течение этого времени идет экстракция фермента из растительного материала. После настаивания суспензию фильтровали в сухой стакан. Активность каталазы измеряли газометрическим методом, который основан на определении объема кислорода после прибавления к водному экстракту из растений, содержащему каталазу, перекиси водорода (Alizadeh *et al.*, 2016).

3. Результаты и обсуждение

На рисунке 1 (кривая 1) представлены результаты динамики роста культуры микроводоросли *D.salina* при оптимальных условиях (температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м², содержание CO₂ 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 25⁰С в интенсивно - накопительном режиме культивирования в течение 24 часов показали, что число клеток клеточной суспензии увеличивается в 3,5-4 раза.

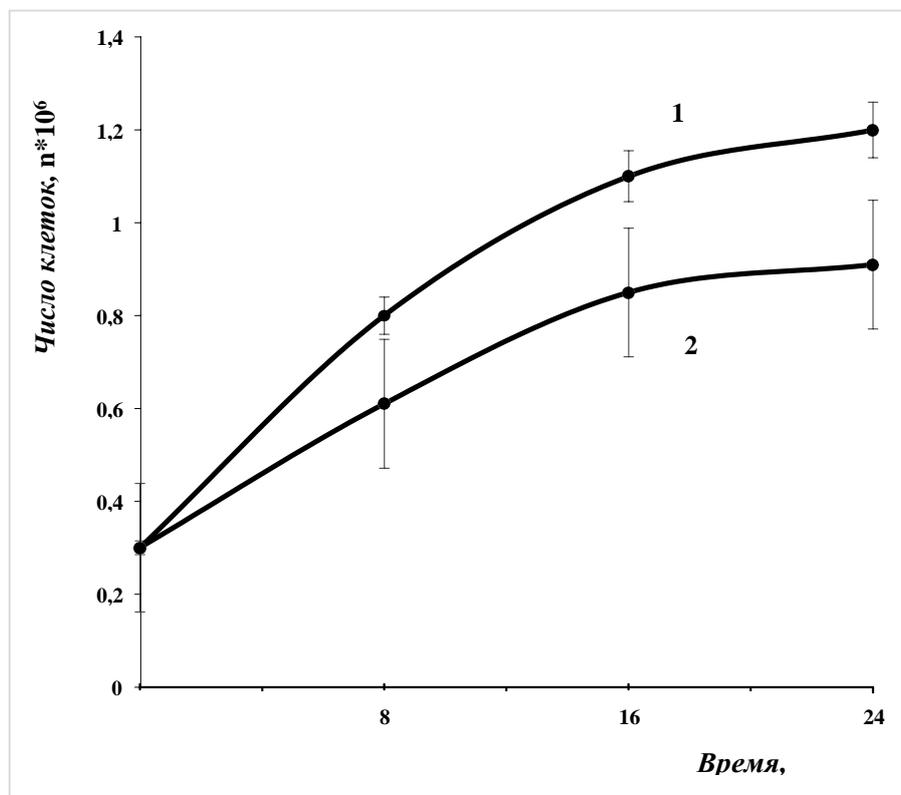


Рис.1. Динамика роста популяции клеток *D.salina* при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования. Температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м²

Такая тенденция роста популяции продолжается и в последующих повторных вариантах выращивания контрольных суспензий. Подача в фотореакторы воздушной смеси с температурой 5⁰С (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 число клеток в 3 раза). В начале 24 часового культивирования в минеральную среду добавляли синтетический антиоксидант 2,6 ди-*трет*-бутил крезол (ионол) в различных концентрациях и прослеживали динамику роста культуры в оптимальном и низкотемпературном режимах (рис.2).

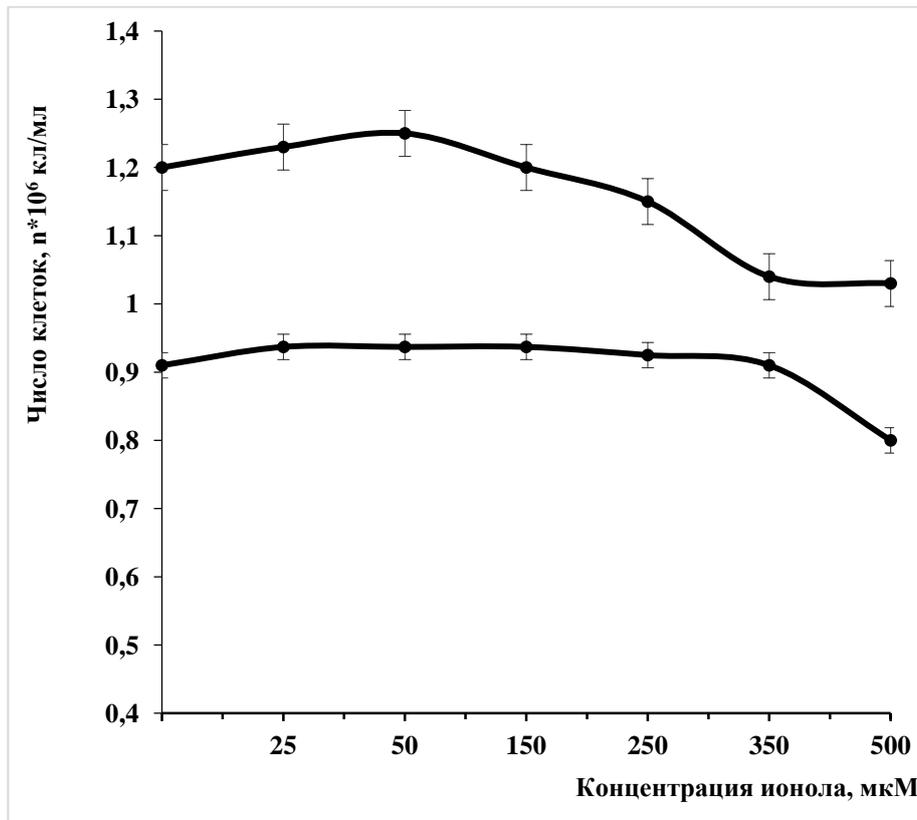


Рис.2. Зависимость динамики роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPASD-294 от различных концентраций 2,6-ди-*трет*-бутил крезола (ионола) в минеральной среде при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования. Температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м²

На рисунке 2 представлена зависимость роста клеток *D. salina* в интенсивно-накопительном режиме культивирования от различных концентраций ионола в минеральной среде. Как видно из рисунка, присутствие его в среде выращивания при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования заметно влияет на рост клеток *D. salina*. Так, при концентрациях 25мкМ и 50мкМ ионола в минеральной среде в оптимальном (1) режиме культивирования наблюдается стимуляция роста культуры клеток на 2,5 % и 4,2 % соответственно, по отношению к контрольным суспензиям (водоросли, культивированные без добавления синтетических антиоксидантов).

Значит, что при низких концентрациях ионола (25 мкМ и 50 мкМ) его действие сопоставимо с активностью обычных фитогормонов (Shorning *et al.*, 1999). При концентрациях 150-250 мкМ в минеральной среде ростостимулирующее его действие заметно уменьшается (100-96%). При повышении содержания ионола в минеральной среде примерно на порядок (350-500 мкМ) оно приобретает обратный знак, наблюдается подавление до (13-15%) соответственно роста культуры в течение 24 часового культивирования в интенсивно- накопительном режиме. Под влиянием этого синтетического антиоксиданта максимальная дифференцировка наблюдается при концентрации 50 мкМ (4,2%) по сравнению с контрольными клетками.

Сравнительное изучение зависимости роста популяции клеток *D.salina* от различных концентраций ионола в минеральной среде, в условиях низкотемпературного стресса показало, что его присутствие в среде выращивания заметно влияет на рост культуры (рис. 2, кривая 2). Так, в диапазоне концентраций 25-150 мкМ в минеральной среде наблюдается стимуляция роста культуры, которая превышает на 3 % контрольные суспензии клеток. Увеличение концентрации до 250 мкМ в минеральной среде ростостимулирующее действие его устанавливается на уровне (102%). При повышении содержания в минеральной среде (350 мкМ) рост культуры в течение 24 часового культивирования в интенсивно- накопительном режиме, в условиях низкотемпературного стресса устанавливается на уровне контрольных клеток (100%). Последующее повышение концентрации синтетического антиоксиданта (500 мкМ) подавляет рост популяции клеток *D.salina* до уровня 88%. В данном эксперименте видно, что присутствие различных концентраций ионола в минеральной среде в диапазоне 25-350 мкМ сильно не сказывается (подавление роста 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 ионолом. 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 *D. salina*.

На рисунке 3 представлены зависимости показателей каталазной активности в клетках *D.salina* от различных концентраций ионола в минеральной среде при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования.

Как видно из рисунка, различные концентрации синтетического антиоксиданта ионола сильно влияют на каталазную активность в клетках, так при оптимальном режиме культивирования (рис.3 кривая 1), где наблюдается ее повышение до 55-65% в интервале концентрации 25-500мкМ ионола при 24 часовом культивировании. Дальнейшее увеличение концентраций приводит к установлению стационарного уровня каталазной активности в клетках *Dunaliella*. Сравнительное изучение количественных показателей каталазной активности в условиях низкотемпературного стресса и различных концентраций ионола показало, что, несмотря на увеличение в клетках активных формы кислорода (низкотемпературный стресс) наблюдается повышение каталазной активности с

увеличением концентрации ионола в среде выращивания. В этих условиях концентрации 25-150 мкМ ионола повышают каталазную активность в клетках лишь на 15- 50%. Концентрации 250:350 и 500 мкМ ионола сохраняют активность фермента каталазы на уровне 40-42% от контроля в условиях низкотемпературного стресса.

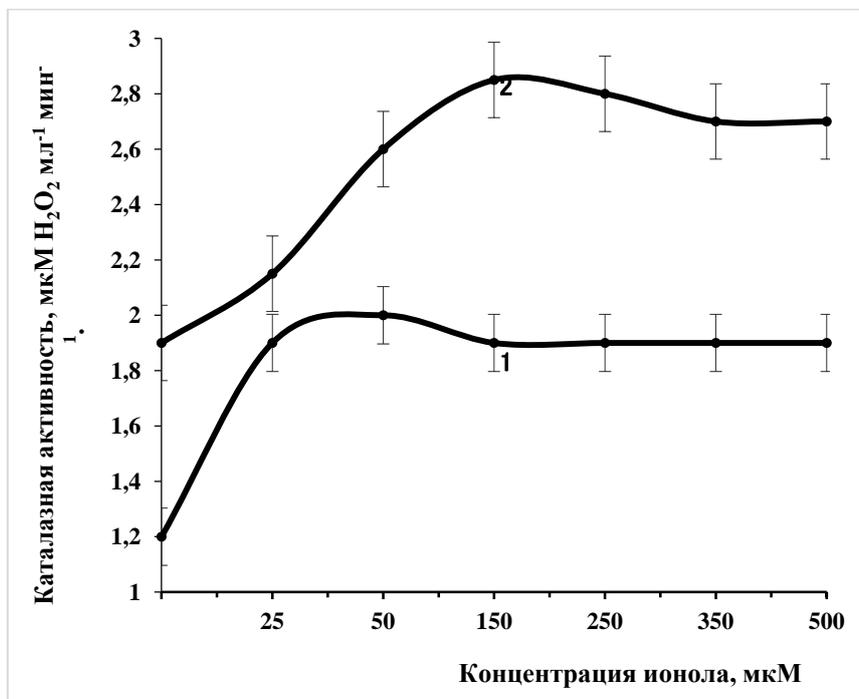


Рис 3. Зависимость каталазной активности в клетках *D.salina* от различных концентраций 2,6-ди-*трет*-бутил крезола (ионол) минеральной среде при оптимальном (1) и низкотемпературном (2) режимах культивирования. Температура 27⁰С, интенсивность света 16Вт/м²

Таким образом, 24 часовая модификация клеток *D.salina* ионолом значительно снижает количество активных формы кислорода, что сказывается на повышении каталазной активности и, в конечном счете, на биопродуктивности водорослей. А повышение каталазной активности можно отнести к проявлению общей неспецифической защитной реакции клетки на присутствие ионола в оптимальных условиях выращивания и на низкотемпературный стресс со значительным повышением активных форм кислорода (Kulikov *et al.*, 1988).

Литература

- Abdullaeva, T.M., Magomedova, MA. (2007). Effects of phytohormones and antioxidants on plant apoptosis, *Ecology of plants*, 4, 44-47 (in Russian).
- Alizadeh, G.I., Jalilova, A.R., Aliev, I.I., Magerramov, Kh.Kh. (2017) Functional activity and UV-B tolerance of *Dunaliella* cells modified with synthetic antioxidants under low temperature stress, *Reports of Azerbaijan National Academy of Sciences*, 72(2), 106-113 (in Russian).
- Alizadeh, G.I., Jalilova, A.R., Maharramova, Kh.Kh., Aliyev, I.I. (2016). The stability of functional activity in *Dunaliella* cells against the acute doses of UV-B irradiation,

- modified by synthetic antioxidants. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 4(10), 34-38 (in Russian).
- Allen, D.J., Ort, D.R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warmclimate plants. *Trends Plants Sci.*, 6, 36-42.
- Havaux, M., Klopstech, K. (2001). The protective functions of carotenoid and flavonoids pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants, *Planta*, 213, 953-966.
- Klimov, S.V. (2009). The frost resistance of winter wheat plants depends on the adaptation of photosynthesis and respiration in different time intervals. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Biology*, 3, 313-322 (in Russian).
- Kulikov, V.Y., Semenyuk, A.V., Kolesnikova, L.I. (1988). *Lipid peroxidation and cold factor*. Novosibirsk, Nauka, 192 p. (in Russian).
- Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D., Liu, J. (2013). The low temperature induced physiological responses of *Avenanuda L.*, a cold-tolerant plant species. *Sci. World J.*, Article ID 658793, doi.org/10.1155/2013/658793.
- Perkin, K.L., Morangoni, A., Jackman, R., Yada, R., Stanley, D. (1989). Effects of high oxygen concentration on pro-and anti-oxidant enzymes in peach fruit during postharvest periods. *Food Biochemistry*, 3, 127-153.
- Paciolla, C., Paradiso, A., de Pinto, M.C. (2016). *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Eds. D.K. Gupta et al., Springer, Switzerland, 1-23.
- Shorning, B.Y., Poleshchuk, S.V., Gorbatenko, I.Y., Vanyushin, B.F. (1999). The effect of antioxidants on plant growth and development. *Plant Physiology*, 1, 30-38 (in Russian).
- Suzuki, N., Mitter, R. (2006). Reactiveoxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plantarum*, 1(1), 45-51.
- Trunova, T.I. (2007). *Plants and low temperature stress*, Moscow, Nauka, 54 p. (in Russian).
- Theocharis, A., Clement, C., Barka, E.A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures, *Planta*, 235, 1091-1105.
- Zykov, V.V., Kolesnochenko, A.V., Voynokov, V.K. (2002). Participation of reactive oxygen species in the reactions of plant mitochondria to low temperature stress. *Plant physiology*. 45(2), 302-310.