

## СТАТЬЯ

УДК 576.3

**БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* IPPAS D-294, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИОНОЛОМ ПРИ УФ-В ОБЛУЧЕНИИ****Али-Заде Г.И., Джалилова А.Р., Магеррамова Х.Х., Алиев И.И., Гасанова Г.А.***Бакинский государственный университет, Баку, e-mail: cayimhu@mail.ru*

В результате проведенных исследований представлена динамика роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294, при различных хронических дозах ( $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> –  $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup>) УФ-В облучения. Показано, что различные хронические дозы УФ-В излучения при интенсивно накопительном режиме культивирования в течение 24 часов значительно подавляют биопродуктивность водорослей – на 78–46%. Хронические дозы УФ-В излучения влияют на биосинтез пигментов в клетках, так, при дозах  $8,9 \cdot 10^3$  и  $11,8 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> наблюдается повышение содержания хлорофилла *a* на 26% и 16% соответственно, и подавляется до уровня 66% при дозе  $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup>. В этих условиях в основном подавляется хлорофилл *b*, биосинтез суммы каротиноидов при этом увеличивается на 23% и 10% соответственно. Исследованы различные спиртовые растворы ионола и экспериментально установлено, что концентрации ионола 25 и 50 мкМ существенно не влияют на ростовые процессы популяции. Выявлено, что исследованный синтетический антиоксидант ионол (2,6 ди-*tert*-бутил крезол) является эффективным и перспективным препаратом для защиты популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от хронических доз УФ-В излучения. Ионол в концентрациях 25 и 50 мкМ проявляет защитную функцию (восстанавливает жизнеспособность и биопродуктивность водорослей), стимулирует биосинтез пигментов при выращивании клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 в условиях хронических доз УФ-В излучения. Несмотря на восстановление биопродуктивности в присутствии ионола, функциональная активность клеток, по показателям Хл*a*+Хл*b* / Кар, подавляется по отношению к контрольным клеткам.

**Ключевые слова:** зеленая микроводоросль *Dunaliella*, УФ-В излучение, биосинтез пигментов, биопродуктивность, синтетический антиоксидант ионол

**PIGMENT BIOSYNTHESIS IN *DUNALIELLA SALINA* IPPAS D-294 CELLS MODIFIED BY IONOL UNDER UV-B IRRADIATION****Ali-Zade G.I., Dzhaliilova A.R., Magerramova Kh.Kh., Aliev I.I., Gasanova G.A.***Baku State University, Baku, e-mail: cayimhu@mail.ru*

As a result of the studies, the growth dynamics of the *Dunaliella salina* IPPAS D-294 cell population is presented, at various chronic doses ( $8,9 \cdot 10^3$  Erg / mm<sup>2</sup> –  $18 \cdot 10^3$  Erg / mm<sup>2</sup>) of UV-B irradiation. It has been shown that various chronic doses of UV-B radiation in the intensively accumulative regime of cultivation for 24 hours significantly suppress the bio-productivity of algae 78-46%. Chromatic doses of UV-B radiation affect the biosynthesis of pigments in cells, for example, at doses of  $8,9 \cdot 10^3$  Erg / mm<sup>2</sup> and  $11,8 \cdot 10^3$  Erg / mm<sup>2</sup>, an increase in the chlorophyll content is observed by 26% and 16%, respectively, and is suppressed to 66% at a dose of  $18 \cdot 10^3$  Erg / mm<sup>2</sup>. Under these conditions, chlorophyll B is mainly suppressed, while the biosynthesis of the sum of carotenoids in this case increases by 23% and 10%, respectively. Various alcohol solutions of ionol were studied and it was experimentally established that ionol concentrations of 25 mkM and 50 mkM did not significantly affect the population growth processes. It was revealed that the studied synthetic antioxidant ionol (2.6 di-*tert*-butyl cresol) is an effective and promising drug for protecting the *Dunaliella salina* IPPAS D-294 cell population from chronic doses of UV-B radiation. Ionol, at concentrations of 25 mkM and 50 mkM, exhibits a protective function (restores the viability and bio-productivity of algae) and stimulates the biosynthesis of pigments when growing *Dunaliella salina* IPPAS D-294 cells under conditions of chronic doses of UV-B radiation. Despite the restoration of bioproductivity in the presence of ionol, the functional activity of cells, in terms of chl*a* + chl*b* / car, is suppressed in relation to control cells.

**Keywords:** *Dunaliella* green microalgae, UV-B radiation, pigment biosynthesis, bio-productivity, synthetic antioxidant ionol

Под воздействием экстремальных условий у различных представителей рода *Dunaliella* абсолютное содержание всех пигментов в клетках при увеличении концентрации осмотически действующих солей, недостатке биогенных элементов, повышении и понижении температуры, как правило, увеличивается [1–3]. В экстремальных условиях существования в клетках всех видов *Dunaliella* наблюдается тенденция уменьшения абсолютного содержания хлорофиллов *a* и *b* и их суммы.

Стражалка К. и др. (2003) экспериментально доказали, что количество и соотно-

шение пигментов в биомассе изменяется в процессе роста культуры. При этом в период интенсивного роста микроводорослей синтезируется максимальное количество всех пигментов [4]. По данным Alizadeh G.I. et al. (2019) и Ejaz A. et al. (2017), абсолютное содержание каротинов в клетках *Dunaliella salina* уменьшается во время логарифмической фазы роста культуры [5; 6]. В своих исследованиях Масюк Н.П. (1973) накопление каротинов обнаружил лишь при переходе культуры в стационарную фазу [1]. Поэтому мы эксперименты проводили в течение 24 часов в интенсивно накопительном ре-

жиме культивирования, где только достигается стационарная фаза роста.

Группой исследователей было показано, что растения обычно обладают высоким уровнем антиокислительной активности и, как правило, содержат большое количество антиоксидантов различной химической природы [7–9], нам хотелось также исследовать в какой степени ионол (классический синтетический антиоксидант) минеральной среды выращивания может влиять на биосинтез каротиноидов и хлорофиллов в клетках *Dunaliella salina* в условиях хронических доз УФ-В облучения [10–12].

Цель исследования: изучение влияния различных хронических доз УФ-В на рост и биосинтез пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, а также модифицированных ионолом в интенсивно накопительном режиме культивирования.

#### Материалы и методы исследования

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

В условиях хронических доз УФ-В излучения водоросли выращивали при 27 °С в фотореакторах (250 мл), из обычного (контрольные суспензии) и кварцевого (опытные суспензии) стекла, на установке типа УВКВ (установка для выращивания культур одноклеточных водорослей). Источником УФ-В излучения служила ртутная лампа СВД-120. Хроническое УФ-В облучение клеток проводили круглосуточно, с помощью часового механизма. Минеральная среда содержала (г/л): NaCl – 87,5 (1,5 М); KNO<sub>3</sub> – 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,25; MgSO<sub>4</sub> – 50; FeSO<sub>4</sub> – 0,009 раствор микроэлементов (мг/л) – Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O – 735; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 735; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 615; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 100; MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O – 180. Суспензию клеток в фотореакторах в течение 24 часов освещали белым светом (16 Вт/м<sup>2</sup>) и непрерывно продували смесью (воздух + 1,0% CO<sub>2</sub>) с температурой 25 °С. 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 нефелометрически, измерением оптической плотности суспензии на фотозлектроколориметре.

Для определения пигментов брали 10 мл (с точно определенной оптической плотностью) суспензии, центрифугировали при 6000 об/мин в течение 4–5 минут. Осадок ресуспендировали в 5 мл 100% ацетона,

вытяжка была прозрачной, а на дне пробирки выпадал белый осадок. Определение концентрации хлорофиллов *a* и *b* и суммы каротиноидов в общей смеси пигментов проводили на спектрофотометре.

Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре и рассчитывали на основании коэффициентов Ветштейна [12].

В работе был использован синтетический антиоксидант 2,6 ди-*трет*-бутил крезол (ионол) в концентрациях 25 и 50 мкМ.

Ионол (М.в. 220,35 г/моль) в чистом виде порошок белого цвета, хорошо растворим в этиловом спирте. В суспензию клеток добавляли синтетический антиоксидант с фиксированной концентрацией (25 мкМ; 50 мкМ) и выращивали в течение 24 часов.

#### Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлены результаты динамики роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных в интенсивной культуре при различных хронических дозах (8,9\*10<sup>3</sup> – 18\*10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup>) УФ-В облучения. Как видно из рисунка, хронические дозы 8,9\*10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения подавляют рост культуры до 78% от контрольных суспензий. Увеличение хронической дозы УФ-В излучения до 11,8\*10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> снижает показатели роста и конечной биопродуктивности до 71%. Хронические дозы УФ-В излучения 18\*10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> приводят к резкому снижению 46% роста культуры водорослей. На основании полученных результатов установлено, что различные хронические дозы УФ-В излучения при интенсивно накопительном режиме культивирования в течение 24 часов значительно подавляют биопродуктивность водорослей в исследованных условиях.

Интересно было установить количественные показатели биосинтеза пигментов клетками *Dunaliella* в этих условиях выращивания. На рис. 2 представлены показатели биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при различных хронических дозах УФ-В облучения.

Как видно из рис. 2, УФ-В излучение влияет на биосинтез пигментов в клетках, так, при хронических дозах 8,9\*10<sup>3</sup> и 11,8\*10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> наблюдается повышение содержания хлорофилла *a* на 26% и 16% соответственно, и подавляется до уровня 66% при дозе 18\*10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup>. В этих условиях в основном подавляется хлорофилл *b*, биосинтез суммы каротиноидов при этом увеличивается на 23% и 10% соответственно. Показатели биосинтеза суммы

каротиноидов согласуются с нашими ранее полученными данными [2]. Параметр, характеризующий энергизацию фотосинтетических мембран [13]  $X_{ла} + X_{лв} / K_{ар}$  при увеличении дозы хронического УФ-В излучения уменьшается. Уменьшение этого параметра свидетельствует о подавлении фотосинтетической активности водорослей при действии хронического УФ-В излучения. Защита популяции клеток *Dunaliella* от хронических доз УФ-В излучения различными синтетическими антиоксидантами и их участие в резистентности популяции является актуальной. Для выявления пригодности синтетического антиоксиданта ионола для защиты популяции клеток от хронических доз УФ-В излучения были проведены следующие предварительные экспериментальные работы. Исследованы различные спиртовые растворы ионола, которые не влияли на темп роста и биопродуктивность культуры в интенсивно накопительном режиме. Экспериментально установлено, что концентрации ионола 25 и 50 мкМ существенно не влияют на ростовые процессы популяции. В присутствии каждой 25 мкМ и 50 мкМ в отдельности концентрации синтетического антиоксиданта в минеральной среде проведены исследования по выращиванию водорослей в течение 24 часов при хронической дозе  $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> (рис. 3).

Как видно из рис. 3, динамика роста культуры при хронической дозе УФ-В из-

лучения ( $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup>) подавляется до 78% (К). В присутствии ионола (25 мкМ) рост популяции через 24 часа устанавливается на уровне 97% (19%-ное увеличение биопродуктивности). Увеличение концентрации синтетического антиоксиданта (50 мкМ) сохраняет биопродуктивность на уровне 87% (9%-ное увеличение биопродуктивности). Таким образом, исследованный синтетический антиоксидант ионол (2,6 ди-*m*-*tert*-бутил крезол) является эффективным и перспективным препаратом для защиты популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от хронических доз УФ-В излучения. Интересным было выявление количественных показателей биосинтеза пигментов клетками в присутствии синтетических антиоксидантов в минеральной среде.

На рис. 4 представлены результаты показателей биосинтеза пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при различных хронических дозах УФ-В облучения в присутствии 25 мкМ ионола. Как видно из рисунка, в присутствии синтетического антиоксиданта хлорофилл *a* в клетках остается на высоком уровне по отношению к клеткам, выращенным в отсутствие ионола (рис. 2). Хлорофилл *b* в этих условиях увеличивается с повышением хронической дозы УФ-В излучения. Без синтетического антиоксиданта в клетках подавляется синтез хлорофилла *b* (рис. 2).

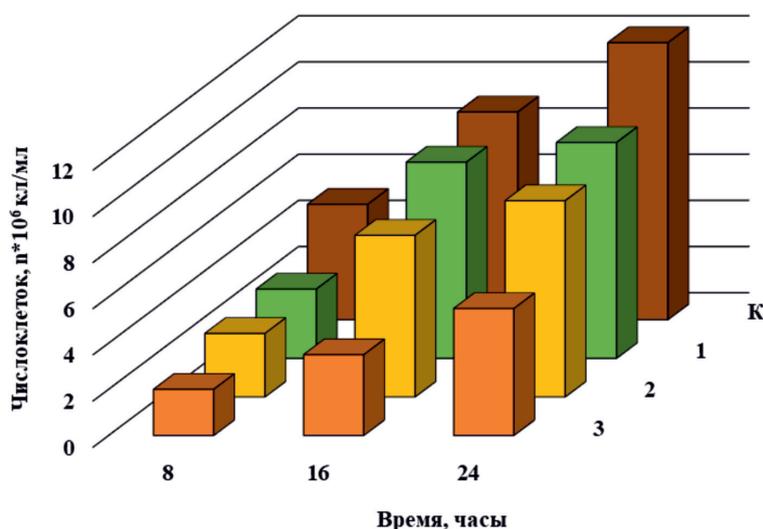


Рис. 1. Динамика роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при различных хронических дозах УФ-В облучения:

1.  $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.
2.  $11,8 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.
3.  $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.

Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>

Сумма каротиноидов также увеличиваются во всех экспериментах с хроническими дозами УФ-В излучения и в присутствии ионола. Параметр, характеризующий энер-

гизацию фотосинтетических мембран Хла + Хлв / Кар, подавляется при увеличении хронической дозы УФ-В излучения в присутствии ионола.

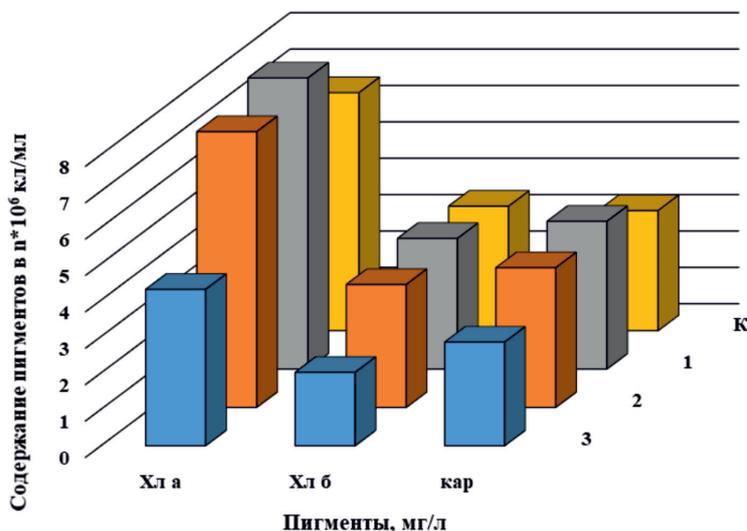


Рис. 2. Содержание пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при различных хронических дозах УФ-В облучения:

1.  $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.
2.  $11,8 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.
3.  $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.

Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>

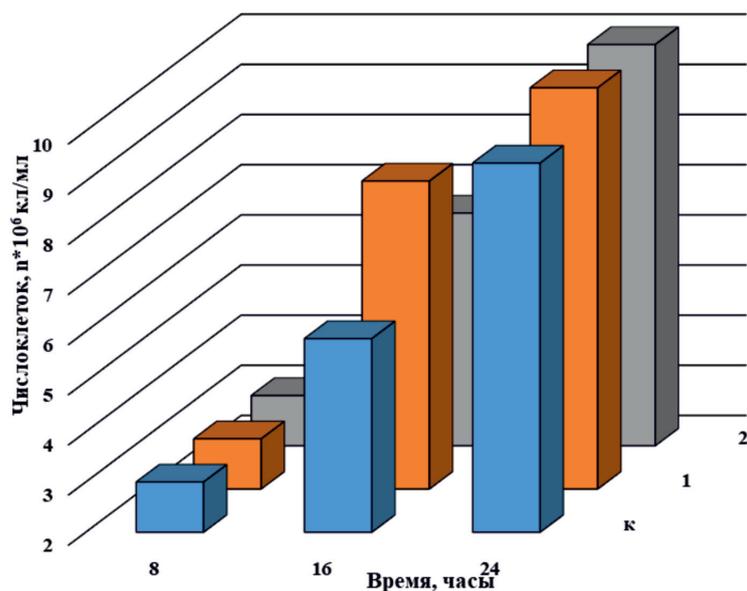


Рис. 3. Динамика роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при хронической дозе  $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В облучения и в присутствии различных концентраций синтетического антиоксиданта ионола:

1. 25 мкМ ионола.
2. 50 мкМ ионола.

Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>

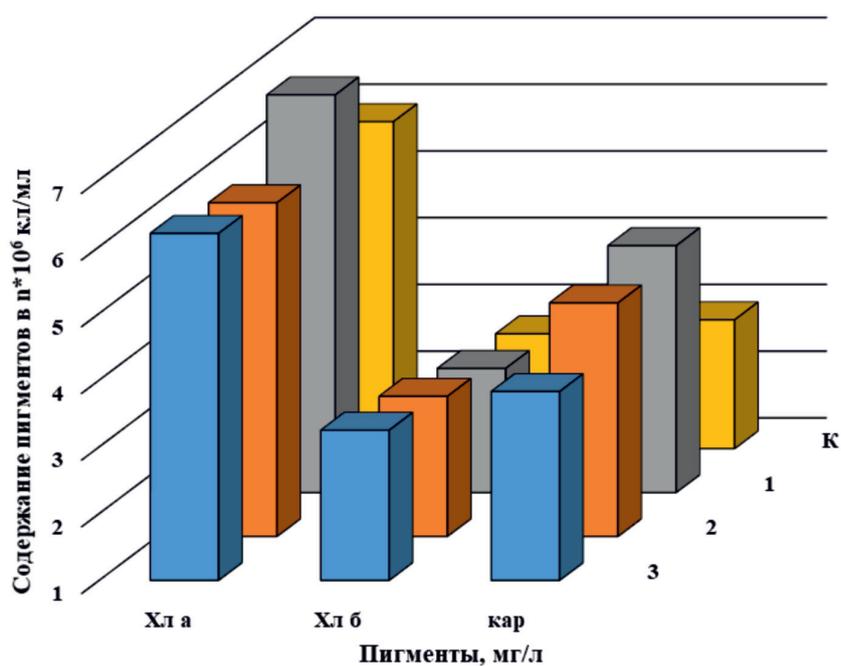


Рис. 4. Содержание пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при различных хронических дозах УФ-В облучения в присутствии 25 мкМ ионола:

1.  $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.
2.  $11,8 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.
3.  $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения.

Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>

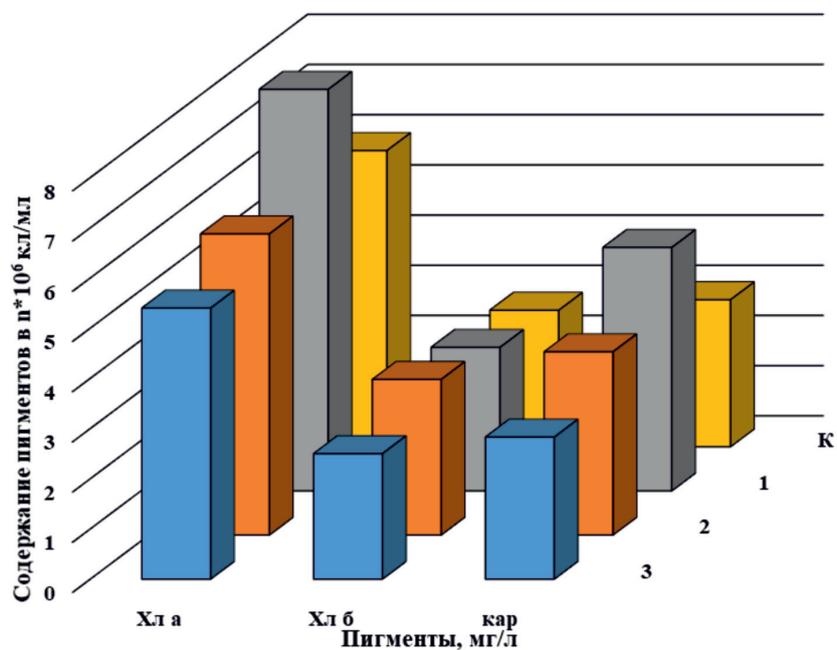


Рис. 5. Содержание пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при различных хронических дозах УФ-В облучения в присутствии 50 мкМ ионола:

1.  $8,9 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В.
2.  $11,8 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В.
3.  $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В.

Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>

Данные содержания пигментов в клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенных при различных хронических дозах УФ-В облучения в присутствии 50 мкМ ионола, представлены на рис. 5. Как видно из рисунка, увеличение концентрации синтетического антиоксиданта заметно проявляет защитную функцию популяции клеток от хронического действия УФ-В излучения при дозах  $8,9 \cdot 10^3$  –  $11,8 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения, при высокой ( $18 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup>) хронической дозе УФ-В излучения биосинтез пигментов подавляется.

Таким образом, синтетический антиоксидант ионол, в концентрациях 25 и 50 мкМ, проявляет защитную функцию (восстанавливает жизнеспособность и биопродуктивность водорослей), стимулирует биосинтез пигментов при выращивании клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 в условиях хронических доз УФ-В излучения. Несмотря на восстановление биопродуктивности в присутствии ионола, функциональная активность клеток, по показателям Хла + Хлв / Кар, подавляется по отношению к контрольным клеткам.

#### Список литературы

1. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. // Киев: Наукова думка, 1973. 244 с.
2. Али-заде Г.И., Зейналова Н.М. Алиев И.И. Магеррамова Х.Х. Адаптивная реакция клеток *Dunaliella* на действие стрессоров разной природы // Известия НАНА, серия биологическая. 2014. № 69 (1). С. 128–133.
3. Сарбаева Е.В., Воскресенская О.Л. Некоторые аспекты устойчивости туи западной в городских экосистемах. 2008. [Электронный ресурс]. URL: <https://marsu.ru/science/libr/resours/thuja/g15.html> (дата обращения 22.05.2020).
4. Стражалка К., Костецка-Гугула А., Латовски Д. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 188–193.
5. Alizadeh G.I., Suleymanova Z.M., Jalilova A.R., Aliev I.I., Kh.Kh. Magerramova. The stability of functional activity in *Dunaliella Salina* IPPAS-294 cells modified by synthetic antioxidants in conditions of low temperature stress and high salinity. European Journal of Biotechnology and Bioscience. 2019. Vol 7. Issue 5. P. 16–20.
6. Ejaz A., Arshad M., Zakriyya Khan M., Shoaib Amjad M., Mehreen Sadaf H., Riaz I., Sabir S., Ahmad N., Sabaon «Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life». Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017. Vol. 6. № 2. P. 205–214.
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. Volume 2018. Article ID 7532897. 11 p.
8. Hamid S., Sibi G. Antioxidant System Response in Green Microalga *Chlorococcopsis minuta* Against Nutrient Stress in Growth Media. Asian Journal of Biological Sciences. 2018. Vol. 11 (4). P. 210–216.
9. Andrea L. White, Leland S. Jahnke. Contrasting Effects of UV-A and UV-B on Photosynthesis and Photoprotection of  $\beta$ -carotene in two *Dunaliella* spp. Plant and Cell Physiology. 2002. Vol. 43. Issue 8. P. 877–884. DOI: 10.1093/pcp/pcf105.
10. 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.
11. Kirst H., Gabilly S.T., Niyogi K.K., Lemaux P.G., Melis A. Photosynthetic antenna engineering to improve crop yields. Planta. 2017. № 245. P. 1009–1020. DOI: 10.1007/s00425-017-2659-y.
12. Kolupaev Yu.E., Gorelova E.Y., Hawk T.A. Bulletin of Kharkiv national agrarian University series biology. Mechanisms of plant adaptation to hypothermia: the role of the antioxidant system. 2018. vol. 1 (43). P. 6–33.
13. Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B. et al. The phylogeny of prokaryotes. Science. 1980. № 309. P. 457–463.