

УДК 581.132:577.152.1

Д. Р. Алиева<sup>1</sup>, Г. Г. Бабаев<sup>1,2</sup>, И. В. Азизов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт ботаники НАНА, Баку, Азербайджан

<sup>2</sup>Бакинський філіал Дніпропетровського національного університету, Баку, Азербайджан

## ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ *NaCl* НА ФОТОСИНТЕЗ И АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ КЛЕТОК *DUNALIELLA SALINA*

Досліджено вплив підвищення концентрації *NaCl* (від 0,5 до 4,0 М) на пігментний склад, кисневий обмін і активність каталази клітин зеленої водорості *Dunaliella salina*. Встановлено оптимальну концентрацію *NaCl* (2,0 М), за якої відмічено інтенсивний біосинтез зелених пігментів і функціонування фотосинтетичного апарату. При підвищених концентраціях *NaCl* (3,0 та 4,0 М) зростає активність каталази у 5,8 раза у перерахунку на 1 мг білка порівняно з контролем, що становило 0,5703 мкмоль/хв. на мг білка. Активність каталази може бути використана як показник стійкості клітин водорості до умов сольового стресу.

D. R. Aliyeva, H. G. Babayev, I. V. Azizov

<sup>1</sup>Institute of Botany of Azerbaijan National Academy of Sciences, Azerbaijan

<sup>2</sup>Baku Branch of the Dnipropetrovsk National University, Azerbaijan

## EFFECT OF ELEVATED *NaCl* CONCENTRATION TO THE PHOTOSYNTHESIS AND ACTIVITY OF CATALASE IN *DUNALIELLA SALINA* CELLS

The effect of elevated *NaCl* concentration (from 0.5 to 4.0 M) to the pigment content,  $O_2$  exchange and activities of some oxidative stress enzymes in the green alga *Dunaliella salina* was investigated. The optimum *NaCl* concentration (2.0 M) for the intensive biosynthesis of green pigments and function of the photosynthetic apparatus were established. The catalase activity increased up to 5.8 times and reached 0.5703  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$  after 7 days of exposure to high salt concentration (3.0 and 4.0 M). The activity of catalase can be used as an indicator of alga cells' resistance to salinity stress.

### Введение

Увеличение содержания соли в среде вызывает значительные изменения большинства физиологических процессов у растений: изменяется ионный состав клеток, перестраиваются гормональная и ферментная системы, в большинстве случаев снижается суммарный фотосинтез. Приспособление организма к неблагоприятным условиям достигается за счет специальных механизмов.

При избыточном содержании солей в почве у растений развивается солевой стресс. На этом фоне повышение активности супероксиддисмутазы (СОД) является защитным механизмом, предотвращающим отрицательный эффект избыточного накопления свободных радикалов в клетках с образованием  $H_2O_2$ . В ликвидацию  $H_2O_2$  включен комплекс ферментов: каталаза, аскорбатпероксидаза и глутатионредуктаза [15; 17]. Каталаза (КАТ, КФ 1.11.1.6) играет важную роль в аскорбат-глутатионовом цикле, регулирующем окислительно-восстановительное равновесие. Регулируя содержание пе-

роксида водорода и супероксидного радикала, можно контролировать скорость биодegradативных процессов.

Одноклеточные зеленые водоросли рода *Dunaliella* являются наиболее солеустойчивыми среди эукариотических фотосинтезирующих организмов, которые способны к выживанию в крайне различающихся соленостях (0,05–5 М NaCl). С увеличением солености окружающей среды в клетках *Dunaliella* происходит перестройка пигментного аппарата, дыхательного и фотосинтетического метаболизма, а также нуклеинового обмена. По последним данным, при повышении концентрации NaCl от 0,5 М до 3,0 М в клетках *Dunaliella salina* обнаруживаются 76 солеиндуцируемых белков [9]. Методами двумерного гель-электрофореза и масс спектрометрии (MS) 80 % из этих белков было полностью идентифицировано, определена их локализация и функции. К ним относятся ферменты центральных метаболических путей, таких как ферменты фотосинтеза, производства энергии, синтеза и деградации белка, биосинтеза аминокислот, шапероны, антиоксиданты и др. Ранее некоторыми авторами было показано, что увеличение концентрации NaCl вызывает смену активности многих ферментов в клетках *D. salina*. Эти данные говорят о том, что *D. salina* обладает множеством метаболических путей, которые хорошо сопряжены, лабильны и тесно связаны с функционированием фотосинтетического аппарата [5].

Цель настоящего исследования – оценить влияние повышенной концентрации NaCl в культивируемой среде на пигментный состав, кислородный обмен и активность каталазы клеток зеленой водоросли *D. salina*.

### Материал и методы исследований

Объектом исследования служила одноклеточная зеленая водоросль *Dunaliella salina* (штамм 1). Водоросли выращивали в плоскодонных колбах на качалке в жидкой питательной среде при круглосуточном освещении 20 Вт/м<sup>2</sup> и температуре воздуха +23±1 °С. Клетки выращивали в среде, содержащей 0,5 М NaCl, затем их переносили в среду, содержащую 1, 2, 3 и 4 М NaCl, соответственно.

Для получения ферментного экстракта культуру клеток центрифугировали 15 минут при 6000 g и +4 °С. Клетки гомогенизировали в 5 мл охлажденного 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 2 мМ ЭДТА, 1 % PVP (Sigma-Aldrich, Германия) и 1 мМ PMSF (Serva, Германия). Гомогенат центрифугировали 20 мин при 16000 g и +4 °С. Супернатант использовали для определения активности фермента.

Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли по методу Великова и др. [21]. Оптическую плотность супернатанта определяли спектрофотометрически при длине волны 390 нм на спектрофотометре Ultrospec 3300 Pro ("Amersham Biosciences", США).

Активность КАТ определяли спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 240 нм в результате разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E = 45,2 мМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>), согласно [16]. Реакционная среда содержала 60 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0), 15 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 100 мкл ферментного экстракта. Реакцию начинали добавлением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Измерение оптической плотности проводили в течение 1 мин.

Качественное изменение активности КАТ исследовали путем электрофореза в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лаеммли [11] с некоторыми модификациями. Для электрофореза использовали 7 % ПААГ. Электрофорез был проведен при +4 °С, 3 часа при стабильном токе 30 мА, используя прибор SE 250 (Amersham Biosciences, США). Для визуализации линий КАТ гель окрашивали в растворе, содержащем 0,1 % K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и 0,1 % FeCl<sub>3</sub> [6].

Количество клеток в суспензии определяли прямым подсчетом числа клеток под микроскопом в счетной камере Горяева. Содержание хлорофиллов и каротиноидов в общей смеси пигментов определяли в 80 % ацетоновом экстракте [20]. Содержание белка в ферментном экстракте определяли по методу Лоури [14]. В качестве стандарта использовали БСА (SERVA, Германия). Фотосинтетическую активность клеток измеряли полярографическим методом в замкнутой амперометрической ячейке с платиновым электродом по выделению кислорода при освещенности 300 Вт/м<sup>2</sup>. Дыхание определяли в темноте, по поглощению кислорода [2].

Данные по определению пигментов и ферментативной активности представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения из двух независимых опытов, выполненных в трех биологических повторностях.

### Результаты и их обсуждение

Повышение концентрации *NaCl* в культивируемой среде вызывает деструктивные изменения у водорослей: угнетение фотосинтеза, перестройку пигментного аппарата, замедление роста и развития клеток, образование в клетках организма избытка  $H_2O_2$ , приводящего к изменению проницаемости биомембран, что может вызвать гибель клеток. Клетки, адаптированные к 0,5 М и 2,0 М *NaCl*, были перенесены в среду, содержащую 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 и 4,0 М *NaCl* соответственно. Через 7 суток измеряли некоторые биохимические параметры. Темп изменения режима выращивания оказывал значительное влияние на выживаемость клеток. Клетки, выращенные в среде, содержащей 2,0 М *NaCl*, а затем перенесенные в среду, содержащую 3,0 и 4,0 М *NaCl*, не меняли окраску и оставались зелеными во время адаптации. Но клетки, выращенные в среде, содержащей 0,5 М *NaCl*, а затем перенесенные в среду, содержащую 4,0 М *NaCl*, через 5–6 дней обретали желто-бурую окраску.

Ростовые кривые для клеток *D. salina*, культивируемых при пяти различных концентрациях *NaCl*, представлены на рисунке 1. Основными различиями между культурами являются продолжительность лаг-периода и конечная плотность клеток. В течение 18 дней непрерывного культивирования плотность суспензии постоянно увеличивалась. На 18-й день культивирования плотность суспензии вышла на стационарный уровень, после чего плотность культуры начинала постепенно снижаться. Предполагается, что данное явление наблюдалось из-за лимитирования в образовавшихся условиях биогенных элементов. Замедление роста *D. salina* при повышении концентрации *NaCl* в среде описывалось ранее [3; 12]. Полученные данные свидетельствуют о том, что повышение концентрации соли в среде культивирования вызывает замедление и даже прекращение деления клеток *D. salina*. Анализ кривых роста водорослей показал, что оптимальной концентрацией *NaCl* в среде для роста и развития *D. salina* является 2,0 М.

При повышении концентрации *NaCl* в среде происходит заметное изменение содержания хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов в расчете на одну клетку (табл. 1). При повышении концентрации *NaCl* в среде от 0,5 до 2,0 М количество хлорофиллов *a* и *b* постепенно увеличивается и достигает своего максимума при 2,0 М. Результаты, полученные нами, согласуются с литературными данными, полученными ранее Масюк и Абдуллаевым [1; 3]. Авторы показали, что оптимальной концентрацией *NaCl* в среде для роста и развития *Dunaliella* в культуре является 2,0 М. При повышении концентрации *NaCl* от 2,0 до 4,0 М количество хлорофиллов *a* и *b* уменьшается. Как показали эксперименты, увеличение концентрации *NaCl* приводит к повышению содержания каротиноидов. Содержание каротиноидов увеличивается в 5,8 раза в расчете на одну клетку и в 1,8 раза – на 1 мл суспензии водорослей по сравнению с контролем (0,5 М *NaCl*).

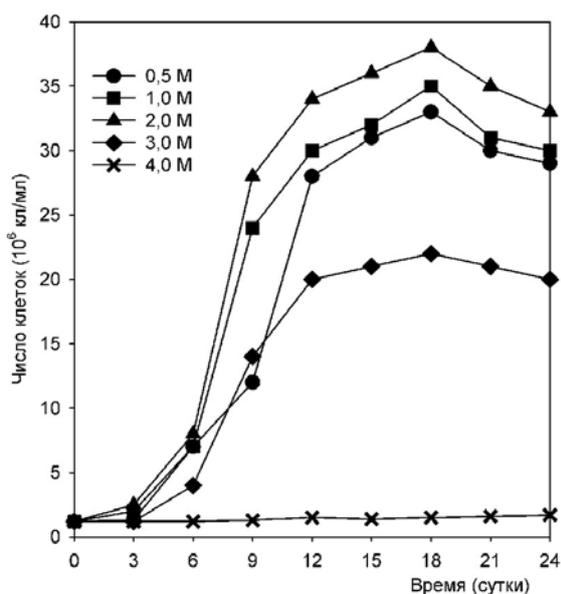


Рис. 1. Ростые кривые клеток *D. salina*, культивируемых при различных концентрациях NaCl

Таблица 1

Содержание пигментов *D. salina*, культивируемых в условиях различных концентраций NaCl

Концентрация NaCl в среде, М	Единица измерения	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл ( <i>a+b</i> )	Каротиноиды
0,5	мг/клетка	$2,41 \times 10^{-9}$	$1,08 \times 10^{-9}$	$3,49 \times 10^{-9}$	$0,27 \times 10^{-9}$
	мг/мл	$9,26 \times 10^{-3}$	$4,19 \times 10^{-3}$	$13,45 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-3}$
1,0	мг/клетка	$2,44 \times 10^{-9}$	$1,03 \times 10^{-9}$	$3,47 \times 10^{-9}$	$0,32 \times 10^{-9}$
	мг/мл	$8,91 \times 10^{-3}$	$3,77 \times 10^{-3}$	$12,68 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-3}$
2,0	мг/клетка	$2,96 \times 10^{-9}$	$1,29 \times 10^{-9}$	$4,25 \times 10^{-9}$	$0,40 \times 10^{-9}$
	мг/мл	$8,46 \times 10^{-3}$	$3,69 \times 10^{-3}$	$12,15 \times 10^{-3}$	$1,13 \times 10^{-3}$
3,0	мг/клетка	$2,67 \times 10^{-9}$	$1,25 \times 10^{-9}$	$3,92 \times 10^{-9}$	$1,47 \times 10^{-9}$
	мг/мл	$6,56 \times 10^{-3}$	$3,08 \times 10^{-3}$	$9,64 \times 10^{-3}$	$3,61 \times 10^{-3}$
4,0	мг/клетка	$0,71 \times 10^{-9}$	$0,65 \times 10^{-9}$	$1,36 \times 10^{-9}$	$1,56 \times 10^{-9}$
	мг/мл	$0,91 \times 10^{-3}$	$0,83 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-3}$

Таблица 2

Интенсивность выделения и поглощения кислорода клетками *D. salina* в питательных средах с разным содержанием NaCl

Концентрация NaCl в среде, М	Единица измерения	Выделение $O_2$ на свету	Поглощение $O_2$ в темноте
0,5	мкмоль $O_2$ /час на мг хл	$191 \pm 7$	$14 \pm 2$
	% к контролю	100	100
1,0	мкмоль $O_2$ /час на мг хл	$281 \pm 9$	$78 \pm 2$
	% к контролю	147	530
2,0	мкмоль $O_2$ /час на мг хл	$293 \pm 11$	$81 \pm 1$
	% к контролю	153	553
3,0	мкмоль $O_2$ /час на мг хл	$184 \pm 8$	$86 \pm 2$
	% к контролю	97	585
4,0	мкмоль $O_2$ /час на мг хл	$45 \pm 5$	$38 \pm 4$
	% к контролю	24	262

Предполагают, что каротиноиды осуществляют передачу энергии хлорофиллу, участвуют в транспорте электронов и кислорода, выполняют функции защиты клеток от фотоокисления [4]. Ранее было показано, что интенсивность фотосинтеза у *D. salina* снижается под влиянием высоких концентраций *NaCl* в результате уменьшения соотношения хлорофиллы/каротиноиды [3; 7]. Результаты опытов по влиянию высокой концентрации соли на интенсивность фотосинтеза и дыхания *D. salina* представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, при повышении содержания *NaCl* в культивируемой среде до 2,0 М интенсивность фотосинтеза достигает максимума. Дальнейшее увеличение концентрации соли до 3,0 и 4,0 М приводит к резкому подавлению фотосинтеза. Если поглощение кислорода в пределах 1,0–3,0 М *NaCl* остается практически без изменений, то при увеличении концентрации до 4,0 М приводит к более резкому подавлению как выделения, так и поглощения кислорода. Сравнивая динамику кислородного обмена с динамикой пигментов в зависимости от концентрации *NaCl* в среде, можно заключить, что имеется определенная связь между интенсивностью фотосинтеза и содержанием пигментов.

Замечательным свойством растений является их способность к индукции активности своих антиоксидантных систем в неблагоприятных условиях. Обычно это происходит за счет увеличения активности отдельных компонентов этой системы, но иногда индуцируется сразу несколькими компонентами. Нами исследовалось изменение активности и множественных молекулярных форм каталазы при различных концентрациях соли.

Большое количество  $H_2O_2$  генерировалось в клетках *D. salina*, выращенных в среде, содержащей 3,0 и 4,0 М *NaCl* (рис. 2). Предполагается, что  $H_2O_2$  выполняет в тканях растений роль вторичного мессенджера [13; 19]. В детоксикации  $H_2O_2$  важную роль играют КАТ и ферменты аскорбат-глутатионового цикла (АПО, АР и ГТР).

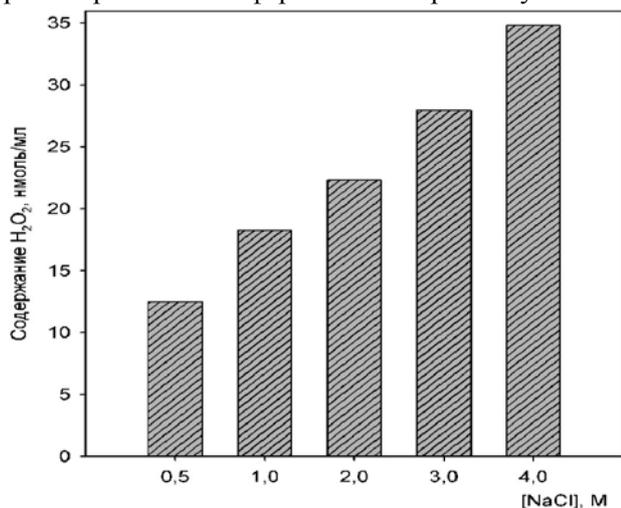
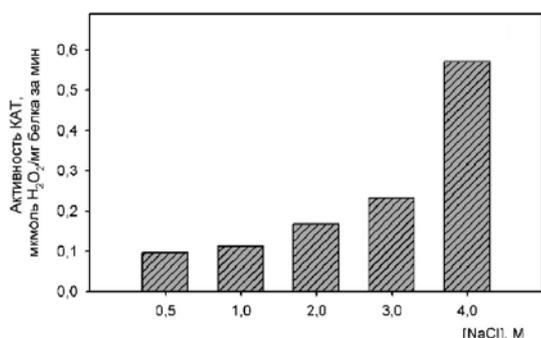


Рис. 2. Содержание  $H_2O_2$  клеток *D. salina*, выращенных в условиях различной концентрации *NaCl*

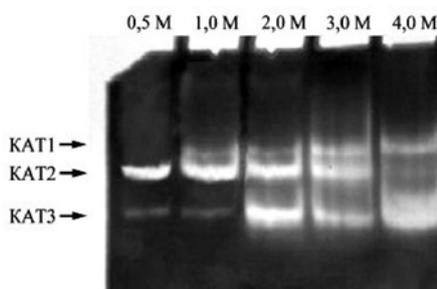
В результате стресса в клетках *D. salina* возростала активность КАТ (рис. 3). В клетках, растущих в условиях 0,5 М *NaCl*, обнаруживается некоторая активность каталазы, но очень низкая (0,0972 мкмоль/мин в расчете на 1 мг белка), а в клетках, растущих в условиях 4,0 М концентрации *NaCl*, активность КАТ увеличивается более чем в 5,8 раза (0,5703 мкмоль/мин в расчете на 1 мг белка).

Повышение активности фермента в условиях засоления можно объяснить повышением содержания  $H_2O_2$ . КАТ, осуществляя согласованный механизм детоксикации на клеточном уровне, разрушает в организмах избыточное количество  $H_2O_2$ . В этом процессе осуществляется важная защитная функция КАТ для живых организмов. Ранее в неко-

торых работах изучалось влияние засухи и солевого стресса на активность каталазы. Так, в условиях солевого стресса отмечено увеличение активности КАТ в листьях толерантного сорта ягоды (*Morus sp.*), в корнях и листьях риса (*Oryza sativa*), в митохондриях и пероксисомах листьев толерантного сорта томатов (*Lycopersion pennellii*) [10; 17; 18]. Таким образом, устойчивые растения имеют более эффективную систему защиты, что обеспечивает возможность функционирования в условиях стресса.



**Рис. 3.** Изменение активности каталазы клеток *D. salina*, выращенных в условиях различной концентрации *NaCl*



**Рис. 4.** Электрофоретические спектры каталазы клеток *D. salina*, выращенных в условиях различной концентрации *NaCl*

По литературным и нашим данным, повышение концентрации соли в среде культивирования сопровождалось изменением не только активности ферментов, но и их электрофоретических спектров. По электрофоретическим спектрам каталазы клеток *D. salina* выявлены три формы фермента (рис. 4). Анализ множественных форм КАТ показал, что повышение концентрации *NaCl* в культивируемой среде приводит к уменьшению интенсивности линии КАТ 2, к усилению интенсивности линий КАТ 1 и КАТ 3. Высокая гетерогенность каталазы наблюдается при более высоких концентрациях *NaCl*. Это свидетельствует о том, что количественные и качественные изменения множественных молекулярных форм каталазы в клетках *D. salina* обеспечивают способность растительного организма сохранять жизненные функции даже в экстремальных условиях [8].

### Выводы

Биохимические исследования позволили оценить энзиматическую активность КАТ в клетках, культивируемых при различных концентрациях *NaCl*, сопоставить изменения этого показателя с физиологическими и морфологическими процессами. Каталаза играет важную роль в защите клеток от окислительных повреждений в условиях роста и развития растений, а также при действии неблагоприятных факторов окружающей среды. Значительная вариабельность в изменении активности КАТ в стрессовых условиях может быть использована в качестве «белковых маркеров» на стресс-устойчивость.

### Библиографические ссылки

1. **Абдуллаев А. А.** Интенсивная культура *Dunaliella salina* Teod., некоторые ее физиологические характеристики / А. А. Абдуллаев, В. Е. Семенов // Физиол. растений. – 1974. – Т. 21, вып. 6. – С. 1145–1151.
2. **Гришина Г. С.** Биофизические методы в физиологии. – М. : Наука, 1971. – С. 38–43.

3. **Масюк Н. П.** Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Теод. и перспективы его практического использования. – К. : Наукова думка, 1973.
4. **Миронюк В. И.** Особенности некоторых окислительно-восстановительных систем зеленой водоросли *Dunaliella salina* Теод. : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1969.
5. **Abd El-Baky H. H.** Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. / H. H. Abd El-Baky, F. K. El Baz, G. S. El-Baroty // Int. J. Agri. Biol. – 2004. – Vol. 6. – P. 49–57.
6. **Anderson M.** Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glytathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings / M. Anderson, T. K. Prasad, C. R. Stewart // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 109. – P. 1247–1257.
7. **Cifuentes A. S.** The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco / A. S. Cifuentes, M. Gonzalez, O. Parra // Biol. Res. – 1996. – Vol. 29. – P. 227–236.
8. **Drought controls** on  $H_2O_2$  accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat / C. M. Luna, G. M. Pastori, S. Driscoll et al. // J. of Exp. Botany. – 2004. – Vol. 56. – P. 417–423.
9. **Enhanced photosynthesis** and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella salina* as revealed by homology-based proteomics / A. Liska, A. Shevchenko, U. Pick, A. Katz // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 136. – P. 2806–2817.
10. **Khan M. H.** Changes in antioxidant levels in *Oruza sativa* L. roots subjected to *NaCl*-salinity stress / M. H. Khan, K. L. B. Singha, S. K. Panda // Acta Physiol. Plantarum. – 2002. – Vol. 24. – P. 145–148.
11. **Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage *T4* // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
12. **Nikookar K.** Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt lake in Shiraz / K. Nikookar, A. Moradshahi, M. Knarati // Iranian J. of Sci and Techn. – 2004. – Vol. 28. – P. 117–125.
13. **Orozco-Cardenas M. L.** Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defence genes in tomato plants in response to wounding systemin and methyl jasmonate / M. L. Orozco-Cardenas, J. Narvaez-Vasquez, C. A. Ryan // Plant Cell. – 2001. – Vol. 13. – P. 179–191.
14. **Protein measurement** with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Roserbrough, A. J. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
15. **Relationships** between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum* / M. P. Benavides, P. L. Marconi, S. M. Gallego et al. // Aust. J. Plant Physiol. – 2000. – Vol. 27. – P. 273–278.
16. **Rios-Gonzales K.** The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources / K. Rios-Gonzales, L. Erdei, S. H. Lips // Plant Sci. – 2002. – Vol. 162. – P. 923–930.
17. **Salinity effects** of antioxidant enzymes in Mulberry cultivar / P. Harinasut, D. Poonsopa, K. Roengmongkol, R. Charoensataporn // Science-Asia. – 2003. – Vol. 29. – P. 109–113.
18. **Salinity up-regulates** the antioxidative systems in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersion pennellii* / V. Mittova, M. Guy, M. Tal, M. Volokita // J. of Exp. Botany. – 2004. – Vol. 55. – P. 1105–1113.
19. **Shin R.** Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation / R. Shin, D. P. Schachtman // PNAS. – 2004. – Vol. 101. – P. 8827–8832.
20. **Sims D. A.** Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages / D. A. Sims, Y. A. Gamon // Remote Sensing of Environment. – 2002. – Vol. 81. – P. 337–354.
21. **Velikova V.** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain – treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines / V. Velikova, I. Yordanov, A. Edreva // Plant Sci. – 2000. – Vol. 151. – P. 59–66.

Надійшла до редколегії 12.04.2009