

# ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ И ЕЁ РОЛЬ В РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК *DUNALIELLA SALINA* ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ УФ-С ИЗЛУЧЕНИЯ

## OSMOREGULATION AND ITS ROLE IN RESISTANCE OF *DUNALIELLA SALINA* CELLS UNDER THE ACTION OF DIFFERENT DOSES OF UV-C RADIATION

**M. Najafi  
A. Gadimov  
S. Rasulova**

*Summary.* In *Dunaliella salina* IPPAS D-294 cells which isolated from Absheron salt lakes and introduced into the culture, the regulation of functional activity and the state of the primary light reactions of photosynthesis of *Dunaliella* cells grown with 1.5 m NaCl and transferred to a medium with 3.0 m NaCl and on the contrary, the state of initial light reactions of photosynthesis in the cells of *Dunaliella salina* IPPAS D-294. It was shown that increasing the concentration of sodium chloride in the growth condition stimulates the biosynthesis of carotenoids, which exhibit increased resistance of *Dunaliella salina* IPPASD-294 cells to UV-C radiation, and glycerin, in addition to the main osmoregular function also acts as a protector at extremely elevated temperatures.

*Keywords:* *dunaliella salina* IPPASD-294, carotenoid biosynthesis, photosynthetic activity, delayed fluorescence, UV-C radiation, glycerin biosynthesis.

**Наджафли Махаббат Гумбат оглы**

Доктор философии по биологии, доцент, Бакинский  
Государственный Университет  
Mohobbatnecefli@gmail.com

**Гадимов Аладдин Гасан оглы**

Доктор философии по биологии, доцент, Институт  
Ботаники НАНА  
agadimov@mail.ru

**Расулова Садагат Мирбаба гызы**

Доктор философии по биологии, доцент, Институт  
Ботаники НАНА  
Sadaqat65@mail.ru

*Аннотация.* В клетках *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выделенных из соленых озер Апшерона и введенных в культуру исследована регуляция функциональной активности, и состояние первичных световых реакций фотосинтеза клеток *Dunaliella*, выращенных при 1,5 м NaCl и перенесенных в среду с 3,0 м NaCl и наоборот, а также выявление устойчивости клеток к острому облучению различными дозами УФ-С света. Показано, что повышения концентрации хлористого натрия в среде выращивания, стимулируют биосинтез каротиноидов, которые проявляют повышенную резистентность клеток *Dunaliella salina* IPPASD-294 к УФ-С излучению, а глицерин кроме основной осморегулярной функции, выполняет также роль протектора в экстремально повышенных температурах.

*Ключевые слова:* *dunaliella salina* IPPASD-294, биосинтез каротиноидов, Фотосинтетическая активность, замедленная флуоресценция, УФ-С излучения, биосинтез глицерина.

Описанные настоящему времени механизмы осморегуляции у водорослей можно условно разделить на два основных типа: «метаболический» связанный с синтезом и расщеплением в клетках целого ряда специфических осмотически активных органических соединений, и «ионный» осуществляемый за счет поглощения и выделения клетками тех или иных неорганических ионов [1,3,6]. Механизмы первого типа локализованы в цитоплазматических структурах, так как синтез органических осмолитов непосредственно связан с общими процессами метаболизма. Подобные осмолиты осуществляют протекторную функцию, предотвращая

инактивацию внутриклеточных структур при обезвоживании клеток, вызываемым повышением осмотического давления среды. «Ионный» же тип осморегуляции осуществляется, по-видимому, только в вокуолярных полостях, а механизмы его связаны с действием трансмембранных насосов.

Разумеется, изменение внутриклеточной концентрации глицерина или катионов, вызванное изменением общей концентрации солей в среде, сдвигает практически все физико-химические параметры клетки [4]. Поэтому лишь весьма условно, упрощая реальную кар-

тину происходящих изменений, можно выделить из всей этой цепи взаимосвязанных реакции изменения внутриклеточного осмотического давления. В принципе у каждого организма должны существовать оба типа осморегуляции и что они могут функционировать одновременно. Однако данных об относительной роли, каждого из этих типов осморегуляции в общем осморегуляторном процессе организма очень немного. К тому же в зависимости от морфологической структуры клеток функционирование одного из типов осморегуляции всегда в той или иной мере маскируется действием механизма другого типа. Поэтому функционирование механизмов «метаболического» типа исследуют, как правило, на таких водорослях, как *Dunaliella*, тогда как исследования механизмов «ионного» типа проводят в основном на гигантских одноклеточных водорослях типа *Valonia*, у которых центральная вакуолярная полость может занимать до 99% общего объема организма. Во всех известных нам исследованиях процесс адаптации различных видов *Dunaliella* к изменению солености (осмотического давления) среды всегда сопровождался большим или меньшим осмотическим шоком при перенесении водорослей в иную среду [3]. В сочетании с нежелательным воздействием на клетки процессов центрифугирования и отмывки в изотоническом растворе иного состава осмотический шок приводит к торможению в течение некоторого периода процессов роста и размножения водорослей (лаг период). При этом вследствие гетерогенности популяции водорослей как по ее генетическому, так и по возрастному составу обратимое торможение процессов жизнедеятельности наблюдается не у всех клеток-часть из них погибает. Несомненно, что соотношение между числом погибших клеток и числом клеток, процессы жизнедеятельности в которых только на время заторможены, зависит как от физиологических особенностей самой культуры, так и от характера воздействия на нее при перенесении клеток в иную среду [2,5].

Целью настоящей работы является исследования регуляции функциональной активности, и состояния первичных световых реакций фотосинтеза клеток *Dunaliella*, выращенных при 1,5 м NaCl и перенесении в среду с 3,0 м NaCl и наоборот, а также выявлении устойчивости клеток к острому облучению различными дозами УФ-С света.

#### Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила клетки *Dunaliellasalina* IPPAS D- 294, выделенные из соленых озер Апшерона и введенная в культуру. Культуру водорослей выращивали на установке типа «УВКВ» (установка для выращивания культур микроводорослей). Водоросли

выращивали при 27° С в 1-литровых цилиндрах, наполовину заполненных средой следующего состава (г/л): 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; ЭДТА, раствор микроэлементов в количестве 1 мл/л. Среда кроме того содержала 1,5 М и 3М NaCl. Культуры непрерывно продували смесью воздуха с 1,5% O<sub>2</sub> и освещали белым светом люминесцентных ламп (24вт/м<sup>2</sup>) 24 часа в сутки.

Темп роста культуры определяли периодическим подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом и нефелометрические, измерением оптической плотности суспензии клеток на фотоэлектроколориметре КФК-2. Фотосинтетическую активность клеток измеряли на полярографической установке с применением платинового электрода Кларка, освещая суспензию в термостатированной ячейке белым светом насыщающей интенсивности 100 вт/м<sup>2</sup>.

Регистрацию индукционных кривых замедленной флуоресценции (ЗФ) в миллисекундной диапозоне проводили на квантометрической установке с фосфороскопом. В работе даны результаты быстрых и медленных компонент индукционных кривых замедленной флуоресценции и рассчитаны амплитуды индукционного максимума ЗФ ( $A_m$ ), стационарного уровня ЗФ ( $I_{cm}$ ) и параметра ( $A_m / I_{cm}$ ) клеток галофильной зеленой микроводоросли *Dunaliellasalina*.

#### Получение модифицированных клеток *Dunaliella* и их облучение УФ-С светом

В работе были использованы также модифицированные клетки *Dunaliella* после гипер- и гипоосмотического солевого шока. Клетки, выращенные в среде с 1,5 М NaCl, осаждали центрифугированием и суспендировали в среде с 3 М NaCl (1,5→3М, гиперосмотический солевой шок) и наоборот, выращенные в 3 М NaCl суспендировали в 1,5 М NaCl (3→1,5М, гипоосмотический солевой шок). После гипер- и гипоосмотического солевого шока и 90 минутной инкубации [1] в темноте (необходимое и достаточное время для частичного восстановления функции клеток) измеряли скорость выделения кислорода модифицированных контрольных и облученных непосредственно прямыми УФ-С лучами клеток.

Для этого по 25 мл суспензии брали для каждой дозы УФ-С облучения, переносили в термостатированную кварцевую емкость, которая обхватывает поверхность УФ лампы (БУВ- 30). Толщина слоя суспензии в кварцевой емкости для облучения составляла 3 мм, а расстояние между поверхностью суспензии и лампой 5 мм. Облучение проводили в затемненном боксе (7,10,11). Облученная суспензия переносилась в термостатированную ячейку полярографической установки, где измеряли

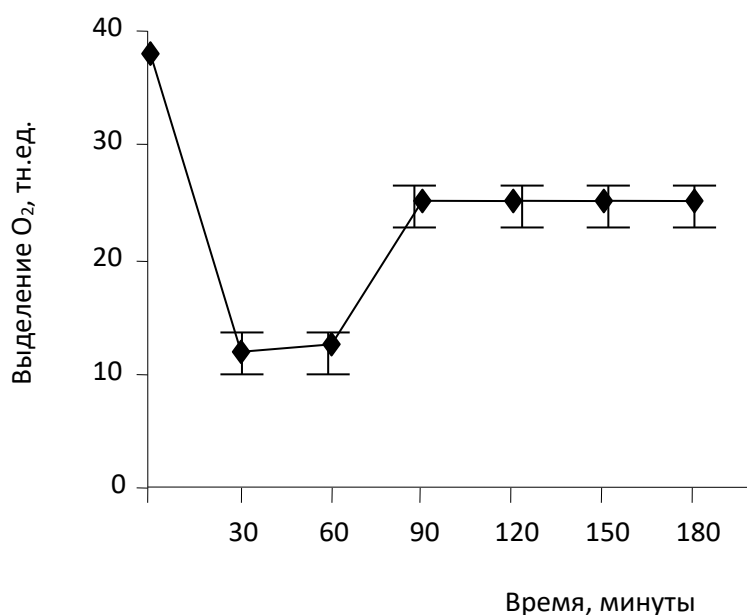


Рис. 1. Зависимость скорости выделения кислорода клетками *DunaliellasalinalPPASD-294* при гипеоосмотическом солевом шоке от времени инкубации в темноте. Температура 40°C, интенсивность света 100 Вт/м<sup>2</sup>

скорость выделения кислорода. Контролем служили необлученные модифицированные клетки.

### Результаты и обсуждение

По полученным нами ранее данным клетки *DunaliellasalinalPPASD-294* могут выдерживать резкие концентрационные сдвиги NaCl в обоих направлениях (1M ↔ 5M) и размножаться в широких пределах концентраций (0,5–5 M) NaCl в среде (2,3).

Также известно, что при гиперосмотическом солевом шоке (повышение в среде концентраций NaCl и соответственно наружного осмотического давления) в клетках *Dunaliella* стимулируются процессы, направленные на биосинтез глицерина, выполняющего осморегуляторную и протекторную функции, а при гипеоосмотическом солевом шоке (понижение в среде концентраций NaCl и наружного осмотического давления) снижение концентраций глицерина в цитоплазме [9]. Резкие перепады наружного осмотического давления вызывают соответствующие изменения в цитоплазме в связи с гидратацией и дегидратацией последней, а это в свою очередь может сказываться на фотосинтетической активности клеток.

На рисунке 1 представлены зависимость фотосинтетической активности клеток *Dunaliella* при гиперосмотическом солевом шоке от времени инкубации в темноте. Как видно из рисунка при гиперосмотическом

солевым шоке впервые 30 минут, фотосинтетическая активность клеток резко падает до 30–35%. В интервале 30–60 минут, фотосинтетическая активность клеток остается в пределах 35–40%. Начиная с 60 минут и выше в отобранных пробах наблюдается процесс восстановления фотосинтетической активности клеток, которая заканчивается через 30 минут. Последующая инкубация 90–180 минут сохраняет уровень фотосинтетической активности модифицированных клеток на уровне 68–70% от контроля. Динамику фотосинтетической активности клеток.

*Dunaliella* при гиперосмотическом солевом шоке от времени инкубации в темноте можно разделить на четыре фазы. Первая фаза, быстрая до 30 минут, связанная с дегидратацией клеток, проникновения ионов внутрь, увеличения внутриклеточного осмотического давления и которая показывает на сколько глубоко подвергается

Фотосинтетическая активность клеток гиперосмотическому солевому шоку. Глубина подавления фотосинтетической активности быстрой фазы зависит от состояния и активности первоначально выращенных клеток. Вторая фаза, 30–60 минут, в основном вероятно, связанная с биосинтезом глицерина, который необходим для увеличения внутриклеточного осмотического давления в ответ на гиперосмотический солевой шок.

Эта фаза проявляется на кривой фотосинтетической активности клеток как нижний стационарный уровень.

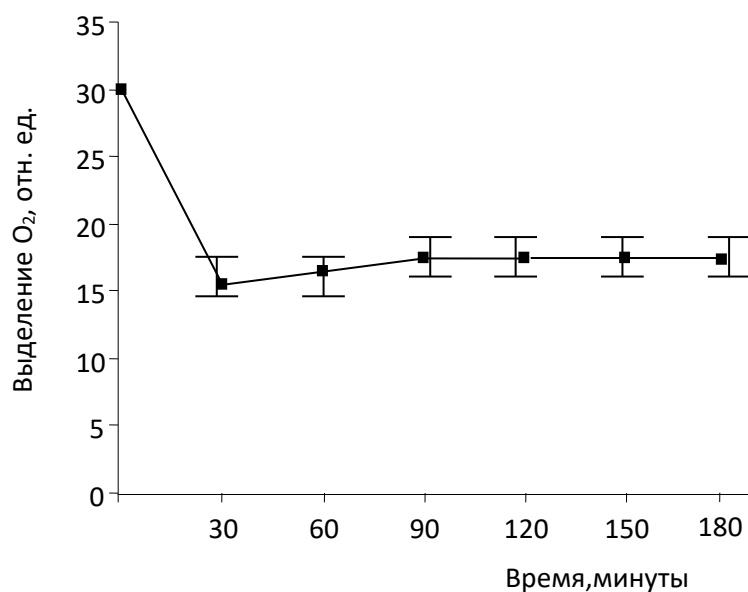


Рис. 2. Зависимость фотосинтетической активности клеток *Dunaliellasalinal*PPASD-294 от времени инкубации в темноте, после гипоосмотического солевого шока. Температура 40°C, интенсивность света 100 Вт/м<sup>2</sup>

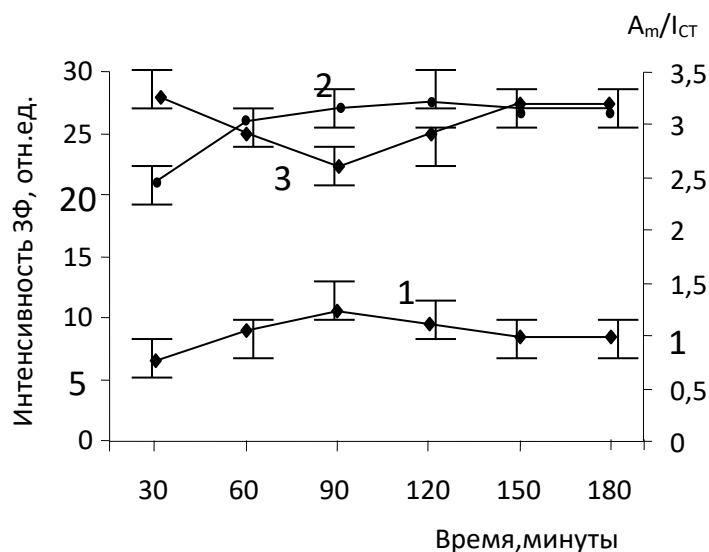


Рис. 3. Изменение параметров (3Ф), от времени инкубации в темноте, клеток *Dunaliellasalinal*PPASD-294 после гиперосмотического солевого шока.

- 1 — стационарный уровень 3Ф (I<sub>ст</sub>);
- 2 — амплитуда индукционного максимума 3Ф (A<sub>m</sub>);
- 3 — показатель энергизации фотосинтетических мембран (A<sub>m</sub>/I<sub>ст</sub>)

Третья фаза, 60–90 минут по мере накопления глицерина, поглощенные в быстрой фазе, ионы транспортируются обратно в наружную среду, и мы наблюдаем рост фотосинтетической активности модифицированных клеток. Четвертая фаза, 90–180 минут, верхний стационарный уровень фотосинтетической активности, которая на наш

взгляд является фазой стабилизации адаптивных реакций модифицированных клеток на гиперосмотический солевой шок.

На рисунке 2 представлены результаты фотосинтетической активности клеток *Dunaliella* при гипоосмотиче-

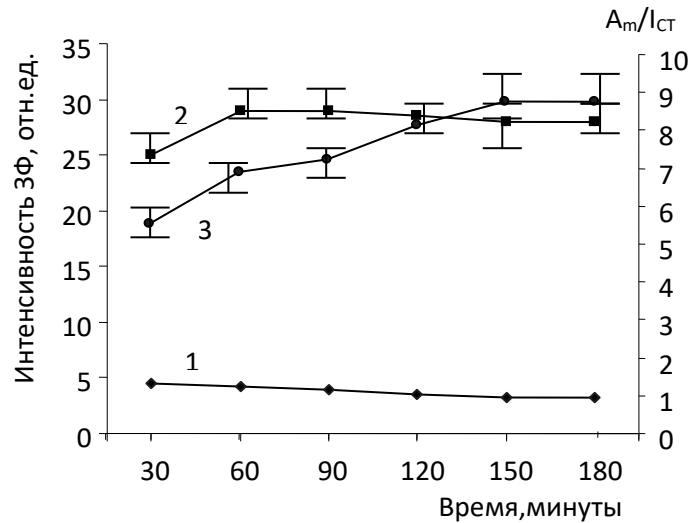


Рис. 4. Изменение параметров замедленной флуоресценции (ЗФ), от времени инкубации в темноте, клеток *Dunaliellasalinal*PPASD-294 после гипоосмотического солевого шока.  
 1 — стационарный уровень ЗФ ( $I_{ct}$ );  
 2 — амплитуда индукционного максимума ЗФ ( $A_m$ );  
 3 — показатель энергизации фотосинтетических мембран ( $A_m/I_{ct}$ ).

ском солевым шоке. Как видно из рисунка, на кривой зависимости фотосинтетическая активность первой фазы (до 30 минут, связанная с гидратацией клеток и выходом ионов наружу) претерпевает менее глубокому спаду 50–55% от контроля. Стационарный уровень фотосинтетической активности клеток устанавливается, в третьей фазе 60–90 минут по мере деградации глицерина. Следует отметить, что фотосинтетическая активность модифицированных клеток после гипоосмотического солевого шока была на уровне 58–60% от контрольных. Сравнение стационарных уровней при гипер- и гипоосмотическом солевым шоке показали, что в первом случае фотосинтетическая активность после глубокого спада (30–35%) устанавливается на уровне 68–70%, а во втором при менее глубоком спаде 50–55% устанавливается на сравнительно низком стационарном уровне 58–60% модифицированных клеток. Несмотря на это, время 60 минут инкубации в темноте является необходимым и достаточным для достижения стационарного уровня фотосинтетической активности модифицированных клеток после обоих солевых шоков.

В отличие от характерного изменения фотосинтетической активности клеток, в первые 90 минут инкубации в темноте после гиперосмотического солевого шока, стационарный уровень на кривой замедленной флуоресценции ( $I_{ct}$ ) значительно увеличивается, по сравнению с контролем (рис. 3).

Последующие 90 минут инкубации в темноте приводит к незначительному снижению стационарного уров-

ня. Как видно из рисунка 4, амплитуда индукционного максимума ( $A_m$ ) замедленной флуоресценции изменяется практически со стационарным уровнем и после 90 минут инкубации в темноте достигается определенный стационарный уровень индукционного максимума  $A_m$ . Параметр, характеризующий относительные изменения индукционного максимума ЗФ ( $A_m/I_{ct}$ ), медленно уменьшается до 70% в течение 90 минут, затем восстанавливается до определенного уровня, что указывает на снижение и дальнейший рост энергизации фотосинтетических мембран.

Иная картина наблюдается при гипоосмотическом солевым шоке, так стационарный уровень замедленной флуоресценции ( $I_{ct}$ ) монотонно уменьшается при инкубации в темноте (рис. 4) Амплитуда индукционного максимума  $A_m$  при этом резко уменьшается в первые 30 минут, по сравнению с контрольными клетками, но по мере увеличения времени инкубации в темноте наблюдается рост с последующим выходом на стационарный уровень. В условиях гипоосмотического солевого шока параметр  $A_m/I_{ct}$  уменьшаясь в первые 30 минут не только восстанавливаются, но и превышает на 40% контрольные клетки. Поскольку усиление энергизации фотосинтетических мембран  $A_m/I_{ct}$  происходит на фоне уменьшения нециклического потока электронов в электрон-транспортной цепи (фотосинтетическая активность модифицированных клеток была ниже контрольных), то оно может быть связано с замедлением потребления АТФ в результате торможения темновых процессов фотосинтеза.

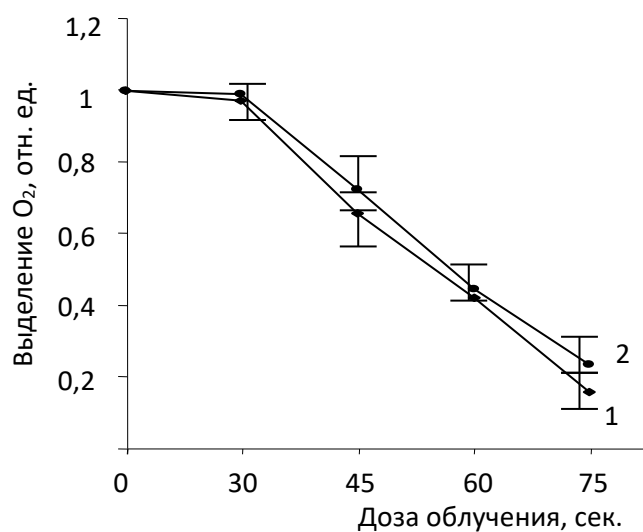


Рис. 5. Зависимость фотосинтетической активности клеток *Dunaliellasalinal*PPASD-294 от дозы УФ-С облучения.

1 — выращенных в 1,5 М NaCl

2 — выращенных в 3,0 М NaCl

3 — Температура 400С, интенсивность света 100 Вт/м<sup>2</sup>.

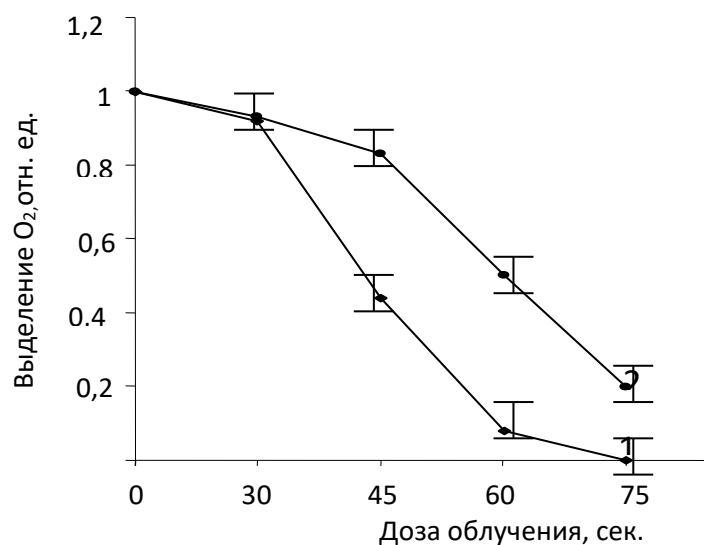


Рис. 6. Зависимость фотосинтетической активности модифицированных после гиперосмотического (1) и гипоосмотического (2) солевого шока, клеток *Dunaliellasalinal*PPASD-294 от дозы УФ-С облучения.

Таким образом, при гипер- и гипоосмотическом солевым шоке происходит изменение световых реакций фотосинтеза в клетках *Dunaliella*, в частности изменяется скорость транспорта электронов на акцепторной части фотосистемы II, усиливается энергизация тилакоидных мембран и ингибирование фотосинтеза. Инкубирование клеток в темноте позволяет выявить время (90 минут), при котором частично восстанавливаются первичные

реакции фотосинтеза, являющиеся частью и кусковым механизмом всей разветвленной системы метаболизма фотосинтезирующих организмов.

Увеличение концентрации хлористого натрия в среде при интенсивно-накопительном режиме культивирования в клетках *Dunaliella* повышает содержание глицерина и каротиноидов [3,8]. Это приводит к умень-

шению соотношения хлорофиллы/каротиноиды и в конечном счете, снижению фотосинтетической активности клеток [2]. Несмотря на снижение фотосинтетической активности и скорости роста культуры, повышается устойчивость клеток к УФ-С излучению (рис. 5).

На рисунке 5 представлены кривые зависимости фотосинтетической активности клеток, выращенных в среде с 1,5 М (кривая 1) и 3 М (кривая 2) хлористого натрия и с последующим облучением различными дозами УФ-С излучения [10,11]. Как видно из рисунка, устойчивость клеток УФ-С излучению заметно отличаются друг от друга. Так при малых дозах (30 сек) фотосинтетическое выделение кислорода клетками (кривая 2) не подвергается существенному изменению.

Иная картина с клетками, выращенными в среде с 1,5 М NaCl, малые дозы заметно подавляют фотосинтетическое выделение кислорода (кривая 1). По мере увеличения дозы функции клеток подавляются и при дозах (60 сек) на кривых снова наблюдается граница устойчивости. Разная резистентность к УФ-С излучению на наш взгляд, вероятно, связано с количеством синтезированных каротиноидов и глицерина клетками, в ответ на повышение концентрации хлористого натрия. Это можно объяснить следующим предположением: а) наблюдаемый эффект обусловлен участием каротиноидов клетки, определяющих их устойчивость; б) участие в метаболических процессах клетки глицерина, который выполняет осморегуляторные и протекторные функции. Для исключения возможного вклада глицерина были использованы модифицированные клетки, полученные после гипер- и гипоосмотического солевого шока.

Клетки *Dunaliella* синтезируют (60–90 минут) глицерин (после гиперосмотического солевого шока 1,5 → 3 М) или теряют его (после гипоосмотического соле-

вого шока 3 М → 1,5 М). Пигментный состав модифицированных клеток после гиперосмотического солевого шока остаются неизменными и идентичны клеткам, выращенным в среде с 1,5 М NaCl, и пигментный состав модифицированных клеток после гипоосмотического солевого шока соответствует выращенным в среде с 3 М NaCl.

На рисунке 6 представлены дозовые зависимости действия УФ-С излучения на фотосинтетическую активность модифицированных клеток. Как видно из рисунка, устойчивость модифицированных клеток при малых дозах УФ-С излучения в обоих случаях снизилась, но корреляция между кривыми 1 и 2 с увеличением дозы сохранилась. Модифицированные клетки 3 М → 1,5 М оказались и в данном случае устойчивее, чем модифицированные клетки (1,5 М 3 М). Полученные данные говорят о том, что внутриклеточный и вновь синтезированный глицерин в клетках не проявляют протекторные функции по отношению к УФ-С лучам.

Влияние экстремальных температур на фотосинтетическую активность модифицированных клеток показали, что синтезированный глицерин после гиперосмотического солевого шока, смещает температурный максимум фотосинтетического выделения кислорода с 400С до 42,50С, это дает нам основание считать, что глицерин в клетках *Dunaliella* выполняет роль протектора, при экстремально повышенных температурах.

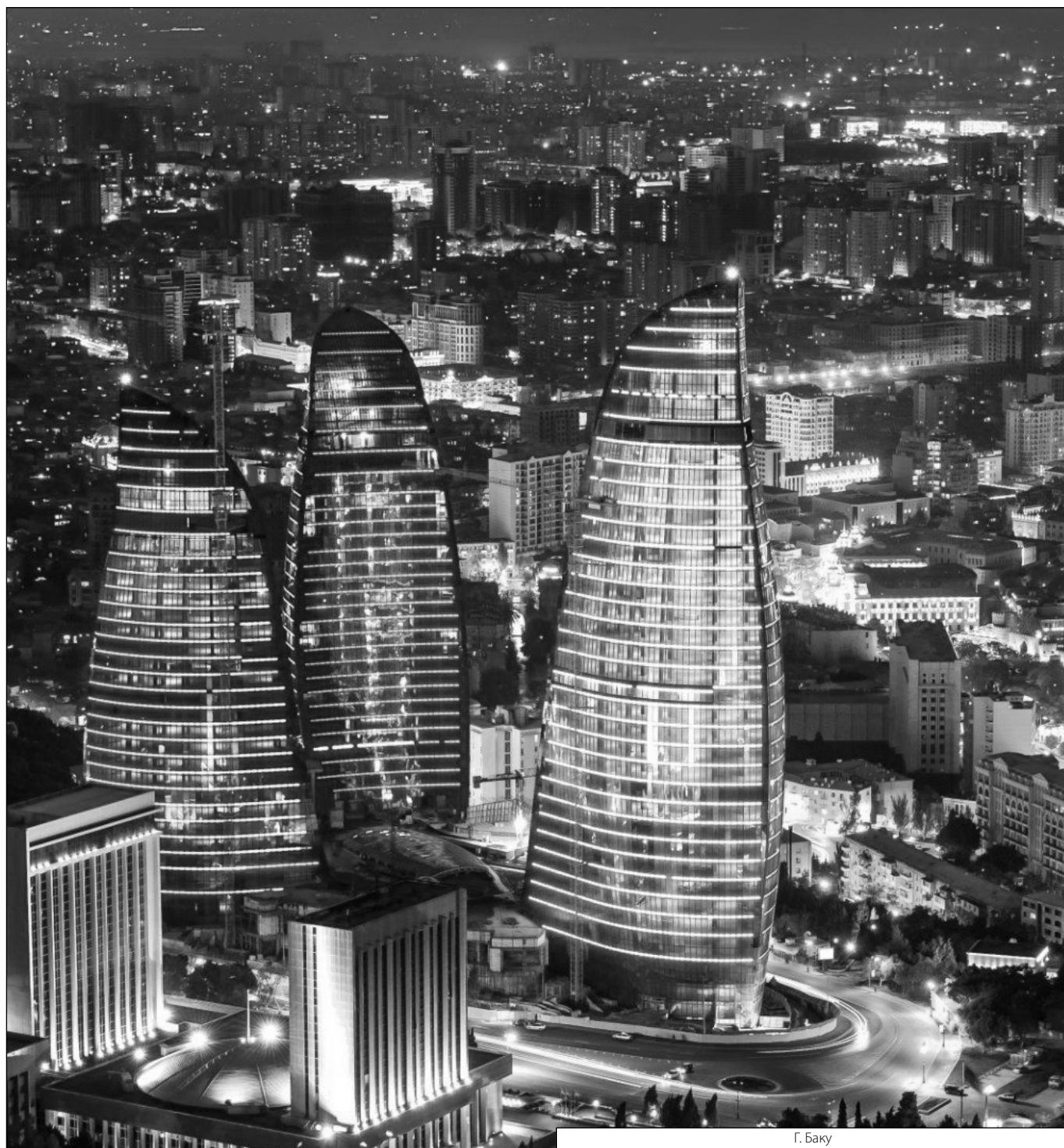
Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что повышение концентрации хлористого натрия в среде выращивания, стимулируют биосинтез каротиноидов, которые проявляют повышенную резистентность клеток *Dunaliellasalinal*PPASD-294 к УФ-С излучению, а глицерин кроме основной осморегуляторной функции, выполняет также роль протектора в экстремально повышенных температурах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ализде Г.И., Абдуллаев Х. Д., Наджафов М. Г. Ответные реакции клеток галофильной водоросли *Dunaliellasalinal*PPASD-294 на гипер- и гипоосмотический солевой шок. //Вестник Бакинского Университета, № 2, 2002, стр. 71–77
2. Наджафли М. Г. Влияние солености среды на рост, пигментный состав и функциональную активность клеток *Dunaliella salina*.// Научно-технический и производственный журнал, Экология и водное хозяйство. № 5, декабрь, 2011, стр.18–22.
3. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliellasalina*. //Наумова думка, Киев, 1973, стр. 242
4. Масюк Н.П., Посудин Ю. И., Лилицкая Г. Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella*Teod. (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*). — Киев, 2007. — 264 с.
5. Карнаухов В. Н. Функции каротиноидов — объект биофизических исследований. //Биофизика, 2000, том 45, вып. 1. с. 364–384.
6. Курочкина В. А. Внутрипопуляционная изменчивость функциональных и морфологических параметров водорослей *Conticribraweissflogi*и *Attheya*ussurensisпри осмотическом стрессе.Дисс. на соиск. Уч. Степ. Кандид. Биол. Наук. Москва, МГУ- 2019. 135 с.
7. Ладьгин В.Г., Ширишкова Г. Н. Влияние состава каротинов на устойчивость клеток водорослей к действию УФ-С излучению. //Физиология растений, т. 40, № 4, 1993, стр. 644–649
8. Ларсен Х. Биохимические факторы влияющие на галотолерантность у *Dunaliella*. //Сб. научных трудов «Фототрофные микроорганизмы», Пущино, 1988, стр. 28–35

9. Najafli M.H., A. G. Gadimov, Z. I. Abbasova, S. M. Rasulova and Gani-zade, S.I. 2019. Effect of Low Positive Temperature and Salinity on the Catalase Ferments Activity and Proliferation of *Dunaliella Salina* Ippas D-294 Cells. *Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.* 7(7), 45–50.
10. Hollosy F. Effect of ultraviolet radiation on plant cells. // *J.Micron* 33, 2002, pp. 179–197
11. Kovacs E, Keresztes A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. // *J. Micron* 33, 2002, pp. 199–210

© Наджафли Махаббат Гумбат оглы ( Mohobbatnecefli@gmail.com ),  
Гадимов Аладдин Гасан оглы ( agadimov@mail.ru ), Расулова Садагат Мирбаба гызы ( Sadaqat65@mail.ru ).  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Баку