

УДК 581.1

**ВЛИЯНИЕ УФ-С И УФ-В ИЗЛУЧЕНИЙ НА ПЕРВИЧНЫЕ
ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА И КАТАЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ
В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA***

Али-заде Г.И.

*Бакинский Государственный Университет,
Баку, Азербайджан*

В работе представлены результаты изучения индукционных кривых замедленной флуоресценции, биосинтеза каротиноидов и каталазной активности в клетках *Dunaliella*, выращенных при различных хронических дозах УФ-С и УФ-В излучения в интенсивной культуре. Показано, что клетки, выращенные в интенсивной культуре проявляют различную функциональную устойчивость к острым и хроническим дозам УФ-С и УФ-В излучения. Выявлено, что острые дозы (60 сек.) УФ-С излучения снижают параметры индукционных кривых замедленной флуоресценции до уровня 63% и каталазную активность до 20%, а острые дозы (30 мин.) УФ-В излучения до 50% и 2 раза соответственно. Установлено, что в интенсивной культуре, несмотря на снижение жизнеспособности (80%) и подавления биосинтеза каротиноидов до уровня (78%), каталазная активность клеток в изученных интервалах хронических доз УФ-С излучения повышается (15-17%). При хронических дозах УФ-В излучения наблюдается снижение до 95% жизнеспособности, увеличение биосинтеза каротиноидов и каталазной активности на (70%) и (15%) соответственно.

Ключевые слова: УФ- излучение, выживаемость, зеленые водоросли, каротиноиды, каталазная активность, замедленная флуоресценция

Для клетки в состоянии стресса характерна перестройка метаболических и физиологических процессов, которые должны приводить к адаптации растительного организма к изменившимся условиям [6,7].

Исследовалось влияние токсического хрома (VI) на рост, содержание хлорофилла и активность каталазы растения пшеницы. Заметное увеличение активности каталазы наблюдали в побегах при обработке хрома (VI) [9]. Авторами [2] исследовалась роль каталазы в ответе дрожжей на окислительный стресс, индуцированный пероксидом водорода в культурах, находящиеся в середине экспоненциальной фазы роста. Показано, что в этих условиях при отсутствии цитозольной и пероксисомной форм каталазы жиз-

неспособность клеток дрожжей при обработке пероксидом водорода существенно уменьшается. При действии 0,5 мМ H_2O_2 в течение 30 минут в клетках дрожжей возрастает активность обеих каталаз [2]. Однофакторный УФ-В и комбинированный (УФ-В и кислый дождь) стресс оказывали различное влияние на активность каталазы и фотосинтез у рапса. УФ-излучение и кислый дождь повышали активность каталазы, снижали содержание хлорофилла, интенсивность нетто-фотосинтеза. Хотя тенденции изменений были одинаковы при однофакторном и комбинированном стрессе, степень изменений была различна. Ингибиторные эффекты комбинированного стресса были сильнее и по-разному влияли на каждый из показателей. В отношении активности

катализы проявлялись аддитивные эффекты, а в отношении фотосинтеза - синергетические [8].

Данная работа посвящена регистрации индукционных кривых замедленной флуоресценции, биосинтеза каротиноидов и каталазной активности в клетках *Dunaliella*, выращенных при различных хронических дозах УФ-С и УФ-В излучения в интенсивной культуре и обработанных различными их остройми дозами.

Материалы и методы

Объектом исследования служила зеленая галофильная одноклеточная водоросль *Dunaliella salina* IPPAS D-294.

Водоросли выращивали при 27°C в фотопреакторах (250 мл), из обычного (контрольные суспензии) и кварцевого (опытные суспензии) стекла, на установке для выращивания культур одноклеточных водорослей «УВКВ» [1]. Минеральная среда содержала (г/л): NaCl – 87,5 (1,5 M); KNO₃ – 5,0; KH₂PO₄-1,25; MgSO₄ – 50; FeSO₄-0,009 раствор микроэлементов, 1 мл/л. Суспензию клеток в фотопреакторах круглосуточно освещали белым светом люминесцентных ламп (16 Вт/м²), и непрерывно продували воздушной смесью (воздух + 1,5% CO₂).

В качестве источника УФ-С излучения была использована бактерицидная лампа БУВ-30. По 25 мл клеточной суспензии (оптическая плотность D=0,8) переносили в кварцевую емкость, которая охватывает поверхность УФ лампы, и облучали в затемненном боксе острой дозой УФ-С излучения.

Источником УФ-В излучения служила ртутная лампа СВД-120, снабженная светофильтром УФС-2. Хроническое УФ-С, УФ-В облучение клеток проводили круглосуточно, с помощью часового механизма. Клетки выращивали в течение 24 часов, в интенсивно-накопительном режиме культивирования.

Темп роста культуры определяли периодическим подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом или не-

фелометрическим измерением оптической плотности суспензии на КФК-2.

Клеточную суспензию, подготовленную к измерению содержания пигментов, каталазной активности и замедленной флуоресценции, доводили до 10⁶ кл/мл (оптическая плотность D=0,8).

Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре СФ-46 и рассчитывали на основании коэффициентов Ветштейна [3].

Регистрацию замедленной флуоресценции (ЗФ) в миллисекундном диапазоне проводили на квантометрической установке с фосфороскопом.

Для измерения каталазной активности клеток, суспензию осаждали центрифугированием (3000 об/мин). Осадок переносили в ступку с 0,5 г 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. 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 [5].

Результаты и обсуждение

На рисунке 1, представлены результаты изучения зависимости жизнеспособности, количества синтезированных каротиноидов и каталазной активности в клетках *Dunaliella* от хронических доз УФ-С излучения в интенсивной культуре. Как видно из рисунка, кривая доза-эффект описывается одновершинной кривой, с максимумом в интервале 5-10 сек/час хронических доз УФ-С излучения (рис.1,1). Ранее нами была показана [4] стимуляция клеточного деления при дей-

ствии хронически малых доз УФ-С излучения на популяцию клеток микроводорослей. Увеличение хронической дозы УФ-С излучения выше 10 сек/час приводит к снижению жизнеспособности популяции клеток *Dunaliella*, и при хронической дозе 20 сек/час наблюдается подавление роста, которое составляет 80% от

контроля. Измерение количества каротиноидов в клетках показали, что биосинтез последних при облучении снижается до 78% по отношению к контрольным популяциям (рис.1,2). Катализная активность клеток в этих условиях по мере увеличения хронических доз УФ-С излучения повышается (рис.1,3).

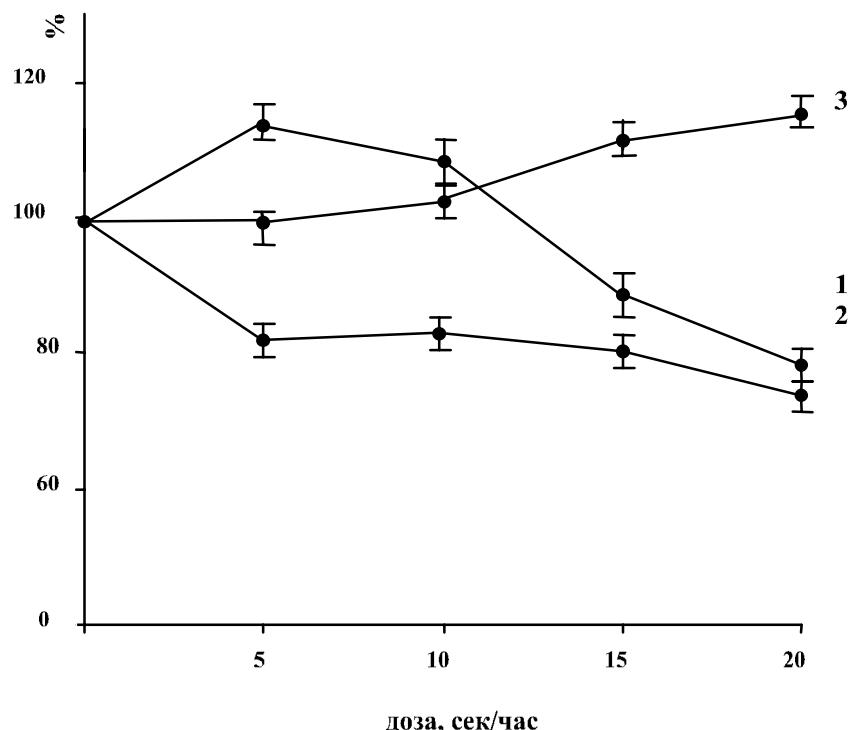


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности водорослей (1), количества синтезированных каротиноидов (2) и каталазной активности (3) в клетках *Dunaliella* от хронических доз УФ-С излучения.

Так, при хронически малых дозах 5 сек/час, наблюдается плато с постепенным увеличением каталазной активности в последующих хронических дозах УФ-С облучения. Измерение индукционных кривых замедленной флуоресценции хлорофилла клеток *Dunaliella* показало, что амплитуда индукционного максимума A_m (рис.2,1) ЗФ с увеличением острой дозы УФ-С излучения уменьшается. Так, при острой дозе (60 сек.) подавление индукционного максимума составляет 80% от контроля. Стационарный уровень I_{ct} индукционной кривой ЗФ хлорофилла с

повышением острой дозы УФ-С излучения увеличивается (рис.2,2). При острой дозе (60 сек.) превышение величины I_{ct} составляет 30% от контрольного стационарного уровня. Параметр A_m/I_{ct} , характеризующий энергизацию фотосинтетических мембран, с увеличением острой дозы снижается (рис.2,3) и составляет 63% от контрольной величины. При постановке опытов по влиянию УФ-С лучей на непрерывно растущие культуры учитывались некоторые специфические особенности действия малых доз на клеточную популяцию. При малых мощностях дозы было

обнаружено стимуляция деления и некоторое увеличение каталазной активности клеток. Изучение специфических особенностей влияния острый доз УФ-С излучения на каталазную активность клеток, позволило получить информацию о сильном

угнетающем его действии. На рисунке 3, представлены данные зависимости каталазной активности в клетках от острой дозы УФ-С излучения. Как видно из рисунка, острые дозы УФ-С излучения подавляют каталазную активность клеток.

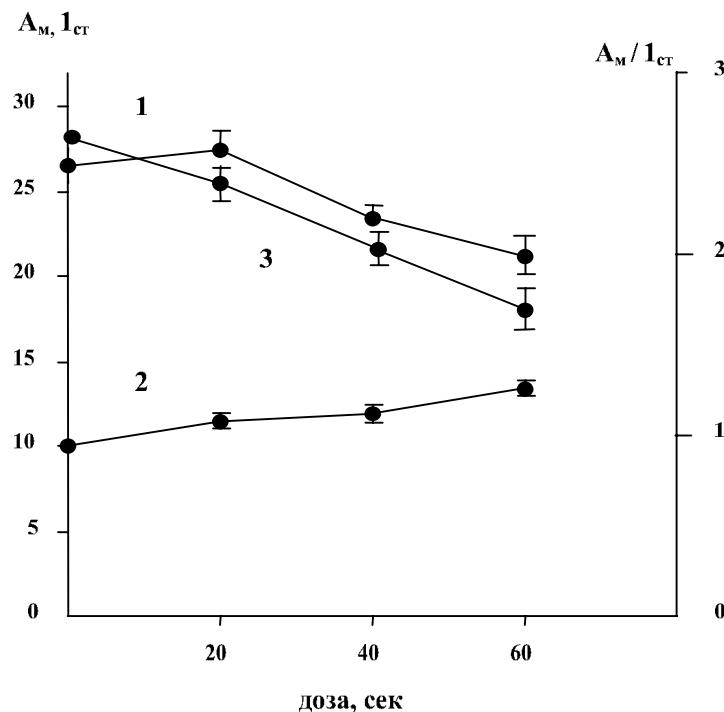


Рис. 2. Зависимость амплитуды индукционного максимума A_m (1), стационарного уровня I_{ct} (2) и параметра A_m/I_{ct} (3) замедленной флуоресценции хлорофилла клеток *Dunaliella* от острый доз УФ-С излучения

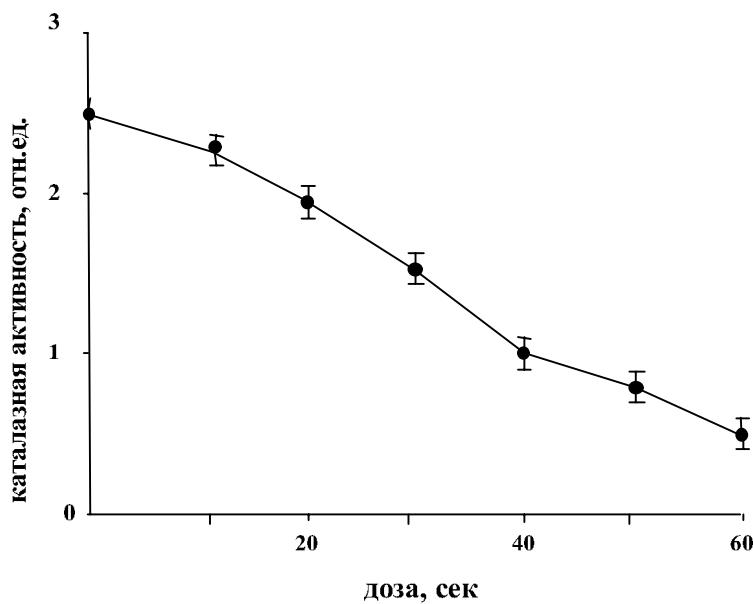


Рис. 3. Зависимость каталазной активности в клетках *Dunaliella* от острой дозы УФ-С излучения

На рисунке 4, представлены результаты изучения зависимости жизнеспособности, количества синтезированных каротиноидов и каталазной активности в клетках *Dunaliella* от хронических доз УФ-В излучения в интенсивной культуре.

На кривой зависимости доза-эффект наблюдается некоторая устойчивость популяции клеток микроводорослей (рис.4,1). Увеличение дозы УФ-В излучения мало влияет на выживаемость популяции, так при хронической дозе 1080 сек/час она составляет 95% от контроля. Причем биосинтез каротиноидов с увеличением хронической дозы УФ-В излучения повышается (рис.4,2). Повышение количества каротиноидов в клетках, связано с их защитной функци-

ей фотосинтетического аппарата при УФ-В облучении. Максимальное количество их синтезируется, при хронической дозе 210 сек/час, с увеличением продолжительности облучения биосинтез каротиноидов уменьшается. При хронической дозе 1080 сек/час их количества на 10% выше, чем в контрольных клетках. Каталазная активность в клетках с увеличением хронической дозы УФ-В излучения повышается (рис.4,3). Только при хронической дозе 1080 сек/час, каталазная активность снижается до уровня 105% от контрольной величины. Подавление первичных реакций фотосинтеза при острой дозе УФ-В излучения оказывается на индукционных кривых замедленной флуоресценции хлорофилла клеток.

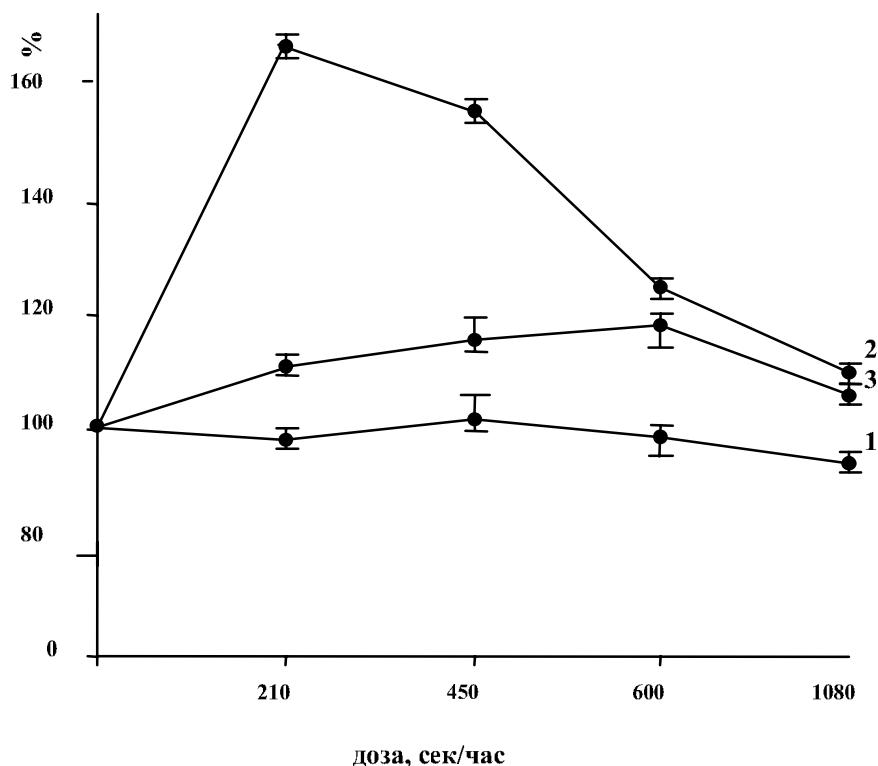


Рис. 4. Зависимость жизнеспособности водорослей (1), количества синтезированных каротиноидов (2) и каталазной активности (3) в клетках *Dunaliella* от хронических доз УФ-В излучения

На рисунке 5 представлена, зависимость параметров индукционной кривой ЗФ от острой дозы УФ-В излучения. Как видно, амплитуда индукционного максимума A_m спонтанно повышается, и максимальная ее величина наблюдается при 15 минутном облучении, а затем плавно снижается и устанавливается чуть выше контрольного уровня (рис.5,1). Стационарный уровень I_{ct} индукционной кривой

ЗФ с увеличением острой дозы после некоторого плато, возрастает и устанавливается на значениях превышающих контрольные в 2 раза (рис.5,2). Причем, параметр, характеризующий энергизацию фотосинтетических мембран A_m/I_{ct} снижается (рис.5,3). Это снижение говорит о подавлении первичных реакций фотосинтеза и фотосинтетической активности клеток.

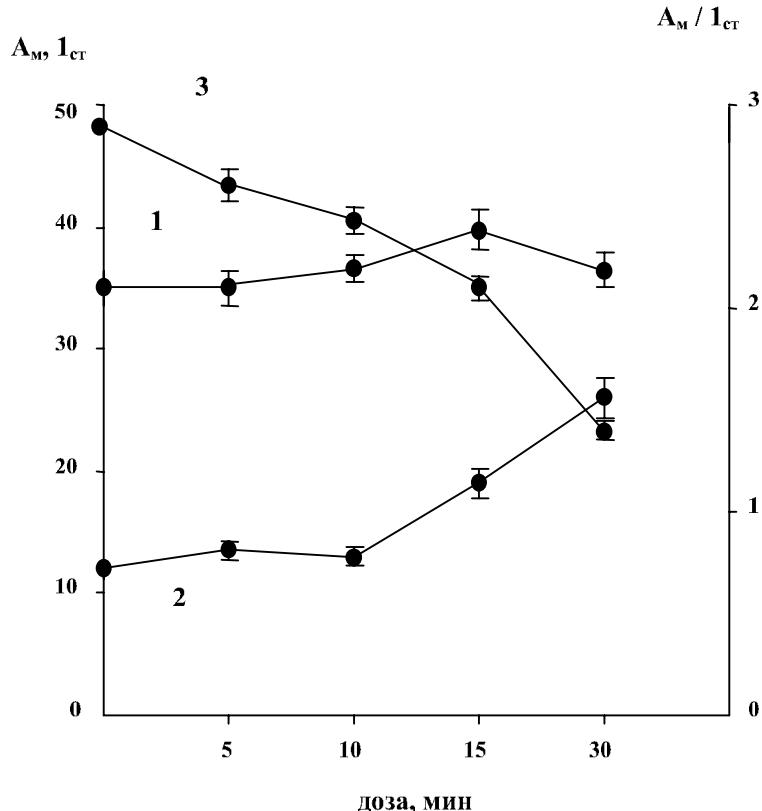


Рис. 5. Зависимость амплитуды индукционного максимума A_m (1), стационарного уровня I_{ct} (2) и параметра A_m/I_{ct} (3) замедленной флуоресценции хлорофилла клеток *Dunaliella* от острой дозы УФ-В излучения

Катализная активность в клетках облученных острой дозой УФ-В света, описывается одновершинной кривой (рис.6). Так, при острой дозе УФ-В излучения 10 минут наблюдается максимальная каталазная активность, затем по мере увеличения продолжительности облучения ее активность несколько подавляется. Несмотря на снижение каталазной активности в клетках облученных при высоких

дозах УФ-В света, ее активность выше, чем в контрольных суспензиях.

Таким образом, на основании полученных данных, можно сказать следующее, ЗФ позволяет получить уникальную информацию о величине электрохимического протонного градиента на мемbrane тилакоида в целой клетке. УФ-С и УФ-В излучение, препятствует образованию электрохимического градиента про-

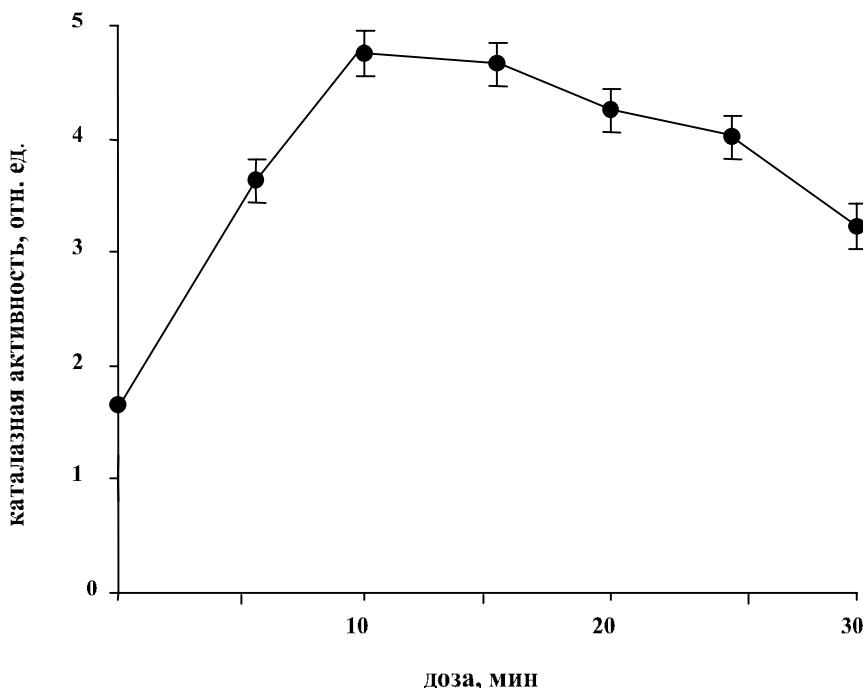


Рис. 6. Зависимость каталазной активности в клетках *Dunaliella* от острой дозы УФ-В излучения

тонов на мемbrane, что в свою очередь вызывает соответственно подавление электронного транспорта в реакционных центрах фотосистемы II и параметра A_m/I_{ct} замедленной флуоресценции. Влияние острых доз УФ излучения на клетки *Dunaliella* показали, что каталазная активность при определенных дозах УФ-В излучения возрастает, повышая уровень защитной антиоксидантной активности водоросли, а затем с увеличением продолжительности облучения снижается. Жесткие УФ-С лучи подавляют каталазную активность уже при малых дозах и не дают антиоксидантной системе реализации компенсаторных механизмов защиты. В ответ на действие хронических доз УФ излучения активируются системы неспецифической защиты организма, компонентами которой в основном являются низкомолекулярные антиоксидантные системы (каротиноиды) водоросли и оксидазные ферменты (каталаза и др.). Данные полученные в работе не оставляют сомнения в том, что реактивность и устойчивость любой биологиче-

ской системы в ответ на УФ излучение зависит от интенсивности и продолжительности их действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Али-заде Г.И., Абдуллаев Х.Д., Наджафов М.Г. // Известия БГУ, серия естественных наук, 1999, № 2, стр.80-85.
2. Байляк М.М., Семчишин Г.М., Лущак В.И. // Укр. биохим. журнал, 2006, т.78, № 2, стр.79-85
3. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. // Большой практикум по физиологии растений, М. «Высшая школа», 1975, 392 с.
4. Магеррамов А.М., Гусейнова А.Р., Али-заде Г.И. и др. //Доклады НАН Азербайджана, 2003, N3-4, стр.172-177
5. Плешков Б.П. // Практикум по биохимии растений, М., 1976, 255 с.
6. Liang Chan-juan, Shi Da-gang. // Res. Arid.Areas, 2006, V.24, N3, p.108-110
7. Liang Chan-juan, Xu Qing, Tao Wen-yi et all. // J. Agro. Environ. Sci., 2004, V.23, N 4, p.642-645

8. Wang Li-hong, Huang Xiao-hua // Environ. Sci., 2005, V. 26, N6, p.123-125
9. Mohanty M., Jena H., Patra H. // Indian J. Agr. Biochem., 2005, V.18, N1, p.25-29

**THE INFLUENCE OF UV-RADIATION TO THE PRIMARY PROCESSES
OF PHOTOSYNTHESIS AND CATALASE ACTIVITY OF DUNALIELLA CELLS**

Ali-zadeh G.I.

*Baku State University,
Baku, Azerbaijan*

In the present work the results of the inductional curves in delayed fluorescence, biosynthesis of carotenoids and catalase activity in Dunaliella cells, grown at various chronic dozes of UV-C and UV-B radiations in an intensive culture are presented. It has been shown that cells, grown in intensive culture manifest various functional resistance against acute and chronic dozes of UV radiations. It has also been shown that acute dozes (60 sek.) UV-C radiation decreases the parameters of inductional curves of delayed fluorescence to 63% of the initial and the catalase activity to 20%, and acute dozes (30 min.) in UV-B radiation to 50% and twice, respectively. In spite of that in an intensive culture, decrease in vitality (80%) and low biosynthesis of carotenoids (78%) were observed, catalase activity at chronic dozes UV-C radiation was increased (15-17%). 95% decrease in vitality, the increase of biosynthesis of carotenoids (70%) and catalase activity (15%) were observed under chronic dozes of UV-B radiation.

Key words: UV- radiation, survival, green algae, carotenoids, catalase activity, delayed fluorescence.