

Предварительная адаптация *Dunaliella viridis* к серноокислой меди влияет на термоустойчивость культуры

Божков А.И., Ковалева М.К., Голтвянский А.В., Ушакова Е.О.,
Цапко Г.Е., Гавриш А.А.

НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина,
площадь Свободы, 4, Харьков 61022, Украина
bozhkov@univer.kharkov.ua

Реферат

Изучена способность двух штаммов *Dunaliella viridis* Teodor. (*Chlorophyta*) – медь-чувствительного (CuS *D. v.*) и медь-резистентного (CuR *D. v.* 75), к росту при высокой температуре (35 °С) для определения зависимости между индуцированной резистентностью к ионам меди и устойчивостью к высокой температуре среды. Исследовано влияние ступенчатого повышения температуры 24–29–35 °С с интервалом 7 сут на интенсивность роста культур CuS *D. v.* и CuR *D. v.* 75 и состав их биомассы (содержание ДНК, РНК, белка, триацилглицеридов (ТГ), каротиноидов и хлорофилла). Установлено, что перевод культуры CuS *D. v.* на начальной стадии роста на температурный режим 35 °С замедляет ее рост, а культура CuR *D. v.* 75 при таких же условиях погибает. При ступенчатом повышении температуры культивирования (24–29–35 °С) культура CuR *D. v.* 75 выживает, у клеток формируется термоустойчивость, а интенсивность ее роста немного выше, чем у CuS *D. v.* Обнаружено, что CuR *D. v.* 75 содержит большее количество белка, ДНК, ТГ, и особенно β-каротина, по сравнению с CuS *D. v.* При температуре 35 °С содержание белка, ДНК, ТГ в клетках CuS *D. v.* также возрастает. Установлено, что между резистентностью к ионам меди и устойчивостью к высокой температуре существует сложная зависимость, которая определяется темпоральным характером изменения температуры.

Ключевые слова: резистентность к ионам меди, эпигентотип, метаболизм, *Dunaliella viridis*, повышенная температура

Введение

Биологические системы способны адаптироваться к экстремальным условиям окружающей среды. В лаборатории НИИ биологии Харьковского национального университета был получен штамм микроводорослей *Dunaliella viridis*, который обладает резистентностью к среде, содержащей 20 мг/л сернокислой меди (Божков, Голтвянский, 1998). Культивирование *D. viridis* на этой среде не оказывало существенного влияния на динамику роста микроводорослей по сравнению с контрольной группой, при этом у резистентного к ионам меди штамма CuR *D. v.* 20 формировался специфический эпигенотип – метаболический паттерн, обеспечивающий жизнеспособность культуры в экстремальных условиях (Божков и др., 2010; Bozhkov et al., 2018). Индуцированная резистентность к среде, содержащей 20 мг/л сернокислой меди, сохранялась в ряду клеточных поколений (Bozhkov et al., 2018). Как отмечал И.И. Шмальгаузен, лабильные модификации нормы стабилизируют первично неустойчивые типы онтогенетических реакций (1946). Устойчивость – это не свойство генов, а свойство метаболических систем формировать новые взаимосвязи между метаболическими звеньями системы (Jian-Kang Zhu, 2016; Yeon et al., 2018). Поскольку в природе наблюдается адаптация к различным сочетаниям факторов среды, интересно было изучить перестройки метаболизма клеток водорослей при действии на них нескольких таких факторов (Prasch, Sonnewald, 2015). Для этого мы использовали два штамма *D. viridis*: стандартный штамм – условно медь-чувствительный (CuS *D. v.*) и резистентный к сернокислой меди штамм (CuR *D. v.*), а также реакцию их метаболических систем на действие высокой температуры. При определении способности микроводорослей адаптироваться к высокой температуре мы изучили ступенчатое повышение температуры от оптимальной (24–29 °C) до летальной (35 °C).

Микроводоросли, адаптированные к росту на среде, содержащей 20 мг/л сернокислой меди, проявляли повышенную устойчивость к краткосрочному действию высокой температуры (42–45 °C) по сравнению с контрольной культурой (Божков и др., 2010). Это можно объяснить тем, что в результате экстремального воздействия (высокая концентрация ионов меди и повышенная температура) в клетках микроводорослей индуцируются механизмы неспецифической защиты (синтез стресс-белков и др.). В исследовании механизмов адаптации к ионам тяжелых металлов большую роль играют дозо-временные характеристики действия стресс-факторов. Был изучен штамм *D. viridis*, резистентный к летальным концентрациям сернокислой меди (75 г/л) CuR *D. v.* 75 (Kovalova et al., 2012), оптимальная температура роста для этих микроводорослей 24–26 °C.

В данной работе исследовано влияние различной температуры: оптимальной (24–25 °C), высокой (35 °C), а также ступенчатое ее повышение (24–29–35 °C) на интенсивность роста двух штаммов *D. viridis*. На 21-е сутки роста (выход на стационарную фазу роста) в этих культурах определяли содержание ДНК, РНК, белков, каротиноидов и триглицеридов (ТГ).

Материалы и методы

Культивирование микроводоросли *D. viridis*

Объектом исследования служила микроводоросль *D. viridis*, штамм IBASU-A N29, которая на протяжении многих лет культивируется в режиме накопительного культивирования на среде Артари при температуре 22–24 °С и круглосуточном освещении 2,5 лк (Bozhkov et al., 2018). Пересев культур осуществляли на 21–22-й день культивирования, исходная концентрация клеток составляла 1,3 млн кл/мл. Эта стандартная культура обозначалась как культура, чувствительная к сернокислой меди (CuS *D. v.*).

Резистентный к токсическому действию сернокислой меди штамм *D. viridis*, полученный методом ступенчатой адаптации к CuSO_4 , культивируется в нашей лаборатории более 15 лет на среде Артари с постоянным внесением в культуральную среду 75 мг/л сернокислой меди при пересадке (CuR *D. v.* 75). Условия посева и культивирования такие же, как и для CuS *D. v.* Культивирование осуществляли в конических колбах (250 см³), объем культуральной среды 20 мл.

Различные температуры режимов культивирования

Для исследования механизмов адаптации *D. viridis* к изменению температуры выбирали следующие температуры культивирования:

1. Стандартная медь-чувствительная и медь-резистентная культуры *D. viridis* поддерживались при температуре 24 °С в течение 21 сут (рис. 1).
2. Стандартная медь-чувствительная и медь-резистентная культуры *D. viridis* культивировали при температуре 35 °С в течение 21 сут.
3. Ступенчатый вариант увеличения температуры культивирования штаммов CuS *D. v.* и CuR *D. v.* 75 (24–29–35 °С) с интервалом 7 сут.

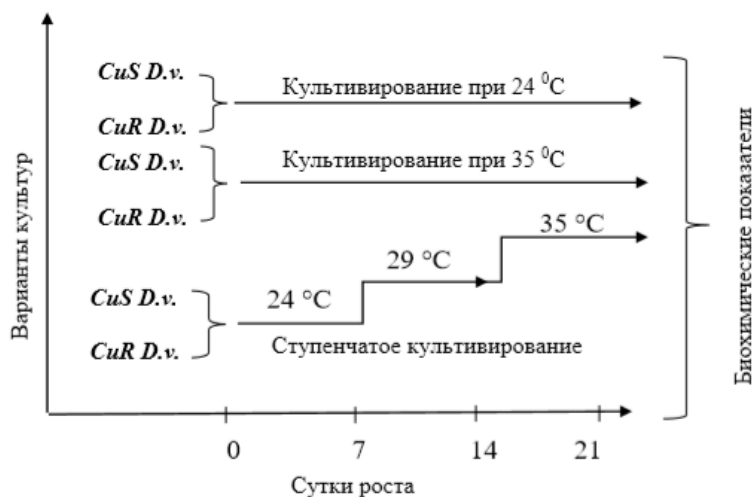


Рис. 1. Схема культивирования CuS *D. v.* и CuR *D. v.* 75 при температурах 24 °С, 35 °С и ступенчатом ее повышении с 24 °С через 7 сут до 29 °С и еще через 7 сут до 35 °С

После выхода культур на стационарный уровень роста (21 сут) определяли их биохимические показатели: содержание ДНК, РНК, белка, ТГ, каротиноидов, хлорофиллов *a* и *b*).

Динамику роста культур *D. viridis* определяли по количеству клеток в культуре (млн кл/мл), которое подсчитывали в камере Горяева.

*Экстракция общих липидов и β -каротина из клеток микроводорослей *D. viridis**

Перед экстракцией липидов клетки микроводорослей дважды промывали в среде Артари. Для этого суспензию клеток центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Липиды экстрагировали в смеси хлороформ : метанол (2 : 1) и хлороформ : метанол : вода (1 : 2 : 0,8). Разделение липидов на фракции осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагелевых пластинах, как описано ранее (Bozhkov, Menzyanova, 1997).

Содержание β -каротина определяли на спектрофотометре СФ-46 при $\lambda = 440$ нм, содержание триацилглицеридов устанавливали после минерализации биомассы клеток в серной кислоте (96%) при 180 °С в течение 20 мин. Оптическую плотность раствора образцов (мкг/млн·кл.) определяли на спектрофотометре СФ-46 при $\lambda = 400$ нм (Bozhkov, Menzyanova, 1997).

После экстракции липидов и каротиноидов биомассу клеток трижды промывали 2 мл 5%-й хлорной кислоты для удаления свободных нуклеотидов. Гидролиз РНК проводили в 0,3 н. КОН на водяной бане при 37 °С в течение 1,5 ч. Содержание РНК (мкг РНК/млн·кл.) определяли спектрофотометрически, как описано в литературе (Спирин, 1958).

После удаления РНК из клеток осуществляли кислотный гидролиз ДНК на водяной бане при 100 °С в течение 20 мин. Содержание ДНК (мкг ДНК/млн·кл.) устанавливали при $\lambda = 270$ и 290 нм (Спирин, 1958).

После удаления ДНК и РНК в осадке определяли содержание общих белков по методу Лоури (Lowry et al., 1957).

Содержание хлорофиллов *a*, *b* и общих каротиноидов в клетках (мкг/млн·кл.) устанавливали по методике, описанной в литературе (Dere et al., 1998). Для этого клетки микроводорослей дважды промывали чистой средой Артари, к осадкам добавляли по 4 мл 80%-го ацетона и проводили экстракцию пигментов при температуре 4 °С в течение 24 ч. Затем пробы центрифугировали и определяли оптическую плотность при $\lambda = 440$, 649 и 665 нм.

Статистическая обработка данных

Все эксперименты повторяли трижды, с тремя аналитическими повторностями. Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием *t*-теста Стьюдента (Гублер, Генкин, 1973).

Результаты и обсуждение

Динамика роста медь-чувствительного и медь-резистентного штаммов *D. viridis* и их биохимические характеристики при оптимальной температуре культивирования 24–25 °С

Стандартная медь-чувствительная культура *D. viridis* (CuS *D. v.*) при оптимальной температуре достигала стационарного уровня роста на 19–21-й день при концентрации 23–24 млн кл/мл (рис. 2). Количество клеток за это время увеличивалось в 18–20 раз, при исходном 1,3 млн кл/мл.

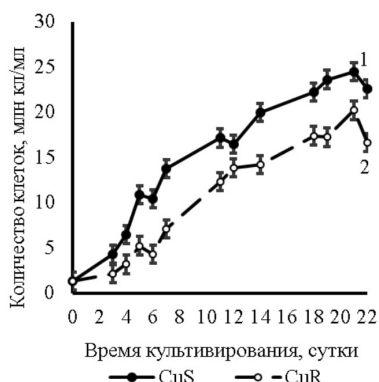


Рис. 2. Концентрация клеток CuS *D. v.* (1) и CuR *D. v.* 75 (2) при температуре культивирования 24 °C

Обычно при построении кривых роста используют прием линеаризации, однако если строить кривые по экспериментальным значениям, то динамика изменения количества клеток, которые различаются по скорости роста, будет иметь выраженный нелинейный характер.

Резистентная к летальным концентрациям сернокислой меди (75 мг/л) CuR *D. v.* 75 отставала по интенсивности роста от CuS *D. v.* (см. рис. 2). CuR *D. v.* 75 имела такой же нелинейный характер динамики роста, как и CuS *D. v.*; различия в количестве клеток у этих культур были наибольшими в начале культивирования, позднее они уменьшались. Если на 3–6-е сутки культивирования разница в количестве клеток у них составляла 200%, то на 19–20-е сутки – только 20%. Такое различие в интенсивности роста клеток в одном пассаже можно объяснить особенностью внесения сернокислой меди в среду культивирования. Медь в среду Артари вносили однократно до конечной концентрации 75 мг/л в начале культивирования. Такие результаты свидетельствуют о реализации на протяжении одного пассажа механизмов «экстренной» адаптации культур *D. viridis* к высоким концентрациям меди.

На 21-й день культивирования содержание ДНК и белка в клетках CuR *D. v.* 75 возрастало по сравнению с CuS *D. v.*, а содержание ТГ не изменялось (см. табл. 1). В наибольшей степени культура CuR *D. v.* 75 отличалась от CuS *D. v.* по содержанию β-каротина. Содержание РНК в резистентных клетках уменьшилось по сравнению с CuS *D. v.*

Следовательно, в клетках CuR *D. v.* 75 изменяется метаболизм нуклеиновых кислот, возрастает интенсивность каротиногенеза по сравнению с клетками CuS *D. v.*, что свидетельствует об их адаптивной перестройке к экстремальным условиям культивирования (высокая концентрация сернокислой меди). Эти данные согласуются с литературными (Bozhkov et al., 2008, 2009; Kovalova et al., 2012).

Таблица 1. Биохимические показатели клеток культур *Dunaliella viridis* на 21-й день культивирования при 24 °С

Культура	Содержание, мкг/млн·кл.				
	ДНК	РНК	Белок	β-каротин	ТГ
CuS <i>D. v.</i>	0,07*± 0,01	0,95± 0,05	3,27± 0,53	0,072± 0,006	0,25± 0,04
CuR <i>D. v. 75</i>	0,11± 0,01	0,59*± 0,02	4,09*± 0,13	0,178*± 0,008	0,29± 0,07
Различия, %					
Соотношение CuR : CuS	+57	-38	+25	+147	+16

Здесь и в табл. 2, 3: «+» – увеличение показателя, «-» – его уменьшение. * $P \leq 0,05$.

Важнейшим показателем продуктивности клеточной культуры является характеристика фотосинтетического аппарата клеток (Sutherland et al., 2015; Grama et al., 2016). У *D. viridis* присутствуют две формы хлорофилла – *a* и *b*. Их соотношение является информативным показателем реакции растений на стресс-условия (Davis et al., 2015; Fachet et al., 2016; Varati et al., 2018).

Эти соотношения у CuS *D. v.* и CuR *D. v. 75* одинаковы и достаточно высокие (2,6) (рис. 3).

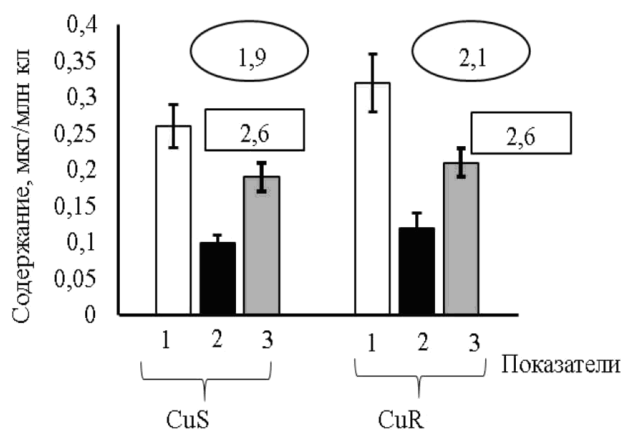


Рис. 3. Содержание хлорофиллов *a* (1) и *b* (2), общих каротиноидов (3); соотношения *a/b* (□) и (*a+b*)/общие каротиноиды (○) у CuS *D. v.* и CuR *D. v. 75* при температуре 24 °С

Важную вспомогательную роль в процессе фотосинтеза и стабилизации мембран играют каротиноиды. Они принимают участие в защите фотосинтетического аппарата от повреждающих факторов, в

частности от высокой температуры (Camejo, 2005; Varati et al., 2018). Отношение суммы хлорофиллов ($a+b$) к общим каротиноидам клетки является показателем стресс-устойчивости (Camejo, 2005; Varati et al., 2018). Чем меньше это соотношение ($a+b/\text{кар}$), тем выше устойчивость микроводорослей к экстремальным воздействиям.

Оказалось, что соотношение суммы хлорофиллов ($a+b$)/общие каротиноиды у CuS *D. v.* составляет 1,9, а у CuR *D. v.* 75 – 2,1, это на 10% выше, чем у CuS *D. v.* (см. рис. 3).

Следовательно, пигментный аппарат клеток у обеих культур на 21-е сутки роста при 24 °С практически не изменялся.

Динамика роста медь-чувствительного (CuS *D. v.*) и медь-резистентного (CuR *D. v.* 75) штаммов *D. viridis* и их биохимические характеристики при температуре среды 35 °С

Культивирование контрольной культуры CuS *D. v.* при 35 °С угнетало ее рост (рис. 4). Так, с 4 по 13-е сутки роста количество клеток было меньше в 2,0–2,5 раза по сравнению с культивированием при 24 °С, а с 12-х по 22-е сутки – в 2,5–3,0 раза (см. рис. 4). Это свидетельствует об относительно высокой гетерогенности клеток *D. viridis* к высокой температуре.

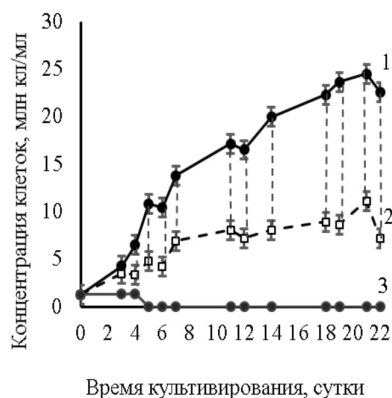


Рис. 4. Концентрация клеток культур CuS *D. v.* (1, 2) и CuR *D. v.* 75 (3), растущих при температурах 24 °С (1) и 35 °С (2, 3)

Культивирование CuR *D. v.* 75 при температуре 35 °С приводило к гибели культуры. Так, на 6–7-е сутки роста клеток в культуре не выявлено (см. рис. 4, 3). Для определения способности культур адаптироваться к температуре 35 °С исследовали состав биомассы микроводоросли CuS *D. v.* через 21 день культивирования при температуре 35 °С. На 21-й день культивирования CuS *D. v.* при 35 °С содержание ДНК в клетках увеличивалось на 114% по сравнению с культурой, росшей при 24–25 °С (табл. 2). Содержание белков в клетках увеличилось на 66%, ТГ – на 48%, а содержание, β -каротина, напротив, уменьшилось на 43%, по сравнению с культурой CuS *D. v.*

Следовательно, температурный стресс и высокая концентрация серноокислой меди индуцировали формирование нового метаболического паттерна.

Таблица 2. Биохимические показатели клеток культуры CuS *D. v.* при разной температуре культивирования

Культура	Содержание, мкг/млн*кл.				
	ДНК	РНК	Белок	β-каротин	ТГ
CuS <i>D. v.</i> 24 °С	0,07± 0,01	0,95± 0,05	3,27± 0,53	0,072± 0,006	0,25± 0,04
CuS <i>D. v.</i> 35 °С	0,15*± 0,02	0,85± 0,03	5,44*± 0,43	0,041*± 0,014	0,37*± 0,05
Содержание, %					
CuS <i>D. v.</i> 35 °С : CuS <i>D. v.</i> 24 °С	+114%	-11%	+66%	-43%	+48%

Соотношение хлорофилла *a/b* составляло 1,9, т.е. по сравнению с культурой, которая содержалась при 24 °С, оно уменьшилось на 27%, а соотношение хлорофилла (*a + b*)/общие каротиноиды, напротив, увеличилось на 36% (рис. 5).

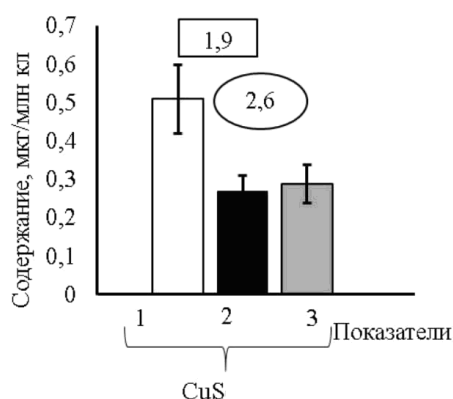


Рис. 5. Содержание хлорофиллов *a* (1) и *b* (2), общих каротиноидов (3) и соотношение *a/b* (□) и (*a+b*)/общие каротиноиды (○) у CuS *D. v.* на 21-е сутки роста при ступенчатом повышении температуры до 35 °С

Следовательно, изменение пигментного состава в клетках CuS *D. v.* при температуре 35 °С происходило при задержке роста культуры. При этом увеличивалось содержание ДНК, белков, ТГ, незначительно уменьшалось содержание РНК и β-каротина (см. табл. 2), что свидетельствует о переходе клеток в метаболически неактивное состояние.

Динамика роста культур CuS *D. v.* и CuR *D. v.* 75, их состав и характеристика пигментного аппарата при ступенчатом повышении температуры среды культивирования (25–29–35 °С)

Если культура CuS *D. v.* в течение 7 сут содержалась при оптимальной температуре среды 24 °С, а затем увеличении до 29 °С, то скорость ее роста не отличалась от культуры, росшей при 24 °С (рис. 6А, 2). На 14-е сутки культивирования температуру среды повышали до 35 °С, количество клеток при этом оставалось неизменным до 18 сут роста, в дальнейшем оно незначительно увеличивалось (см. рис. 6А, 2).



Рис. 6. Концентрация клеток CuS *D. v.* (А) при температуре роста 24 °С (1), 35 °С (3) и последовательном ее повышении (24–29–35 °С) (2); концентрация клеток CuR *D. v.* 75 (В) при температуре роста 24 °С (4), 35 °С (6) и последовательном ее повышении (24–29–35 °С) (5). Стрелками обозначен момент изменения температуры культивирования

Динамика роста CuS *D. v.* при ступенчатом повышении температуры (24–29–35 °С) и при 35 °С была сходной (см. рис. 6А, 2, 3).

Если резистентную к ионам меди CuR *D. v.* 75 выращивали в условиях ступенчатого повышения температуры (25–29–35 °С), то при достижении 35 °С ее рост замедлялся на 2–3-и сутки культивирования, после чего скорость деления клеток возрастала и прирост биомассы достигал уровня оптимального культивирования (24 °С) (см. рис. 6В, 4, 5).

Если CuR *D. v.* 75 погибала при 35 °С с момента посева на новую среду, можно полагать, что ступенчатое повышение температуры обеспечивало адаптацию CuR *D. v.* 75 к летальной для нее температуре. В условиях ступенчатого повышения температуры культура CuR *D. v.* 75 росла лучше, чем CuS *D. v.*

Основные различия в составе биомассы CuS *D. v.* и CuR *D. v.* 75, зафиксированные при их культивировании при 24 °С, сохранялись при ступенчатом культивировании (25–29–35 °С). Так, содержание РНК у CuR *D. v.* 75 уменьшилось на 33%, а содержание β-каротина увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с CuS *D. v.* (табл. 3). При этом содержание ДНК

не отличалось, а содержание ТГ отличалось от содержания в клетках CuR *D. v.* 75 при ступенчатом культивировании.

Соотношение хлорофилла *a/b* у CuS *D. v.* и CuR *D. v.* при оптимальной температуре и ступенчатом ее повышении было одинаковым по сравнению с оптимальной температурой роста, соотношение хлорофилл (*a+b*)/каротиноиды незначительно увеличилось при 25–29–35 °С на 15%, у CuR *D. v.* – на 23% по сравнению с CuS *D. v.* и CuR *D. v.* после роста при температуре 24 °С (рис. 7).

Таблица 3. Биохимические показатели клеток культур *Dunaliella viridis* на 21-е сутки роста при ступенчатом повышении температуры среды (24–29–35 °С)

Культура	Содержание, мкг/млн кл.				
	ДНК	РНК	Белок	β-каротин	ТГ
CuS <i>D. v.</i>	0,08± 0,01	0,97± 0,04	2,65± 0,26	0,046± 0,008	0,34± 0,07
CuR <i>D. v.</i> 75	0,09± 0,01	0,65*± 0,02	4,64*± 0,22	0,181*± 0,015	0,26± 0,04
Содержание, %					
CuR <i>D. v.</i> 75 : CuS	–	–33	+75	+293	–24

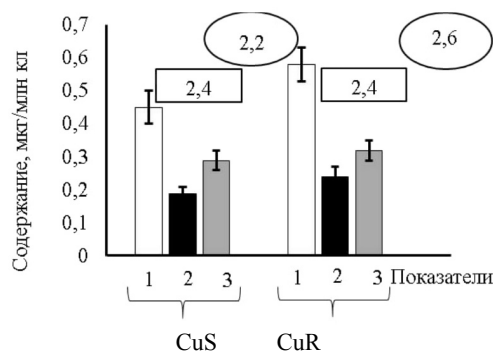


Рис. 7. Содержание хлорофиллов *a* (1) и *b* (2), общих каротиноидов (3) и соотношение *a/b* (□) и (*a+b*)/общие каротиноиды (○) у CuS *D. v.* и CuR *D. v.* 75 на 21-е сутки роста при последовательном повышении температуры до 35 °С

Следовательно, устойчивость к высокой температуре резистентной к ионам меди культуры *D. viridis* зависит от характера изменения температуры.

Ранее была высказана гипотеза о том, что длительные адаптивные модификации в культуре *D. viridis* сопровождаются формированием специфических метаболических паттернов (эпигенотипов), которые могут обеспечивать существование клеток в экстремальных условиях. Если эпигенотипы поддерживаются, то метаболические состояния могут

«запоминаться» на уровне метаболических систем и обеспечивать эволюцию вида (Bozhkov et al., 2018). Однако не ясно, какой может быть реакция метаболических систем на новые экстремальные условия среды, т.е. какой адаптивный потенциал у представителей видов, уже адаптированных к каким-либо экстремальным условиям среды.

Так, если культура *D. viridis*, адаптированная к росту на среде с высокой для нее концентрацией сернокислой меди, будет подвергаться новым экстремальным воздействиям (например, высокой температуре), то возникает вопрос: какой ее адаптивный потенциал и отличается ли он от адаптивного потенциала культуры, которая находилась в оптимальных условиях (без добавления меди в среду). Это необходимо знать для понимания механизмов регуляции метаболической пластичности вида и формирования его эволюционной стратегии.

Если же адаптированная к росту в экстремальных условиях (сернокислая медь) культура окажется в новых для нее экстремальных условиях (высокая температура среды), она: 1 – погибнет; 2 – перепрограммирует свой метаболизм и адаптируется к новым условиям, т.е. проявит пластичность; 3 – станет устойчивой к новым условиям без перестройки метаболизма, т.е. сможет приобрести «перекрестную» устойчивость.

Результаты наших исследований показали, что адаптация *D. viridis* к новым экстремальным условиям зависит не только от характеристик фактора, но и от временных характеристик действия негативных факторов. Так, если культуру CuR *D. v.* 75, предварительно адаптированную к росту в экстремальных условиях (высокая концентрация сернокислой меди в среде культивирования), перевести в условия культивирования при температуре 35 °C (дополнительный экстремальный фактор), она погибнет за несколько дней. Но если повышать температуру ступенчато, с интервалом 7 дней, клетки приобретают устойчивость к экстремальной температуре. Смену температурного режима осуществляли в пределах одного пассажа. Мы полагаем, что такая устойчивость обеспечивалась перепрограммированием метаболизма, т.е. эпигенетическими, а не генетическими изменениями.

Для культуры CuR *D. v.* 75 характерно высокое содержание ДНК, что связано с полиплоидизацией части клеток (Bagheri, Mansouri, 2014; Nezhad, Mansouri, 2017). Высокое содержание белка, и особенно β-каротина, свидетельствует о пребывании клеток в стрессовом состоянии (Fachet et al., 2016; Singh et al., 2016), при этом содержание РНК в этих клетках меньше, чем в контроле. Такая культура поддерживается на среде, содержащей 75 мг/л сернокислой меди около 15 лет и прошла около 350 пассажей. Индуцированная резистентность к ионам меди сохранялась в ряду клеточных поколений даже после перевода культуры на среду без меди (Bozhkov et al., 2018). Если такой специфический эпигенотип запоминается и после резкого перевода культуры, резистентной к сернокислой меди, в условия повышенной температуры (35 °C), она погибает, метаболизм этой культуры пребывает в критическом состоянии. Для него характерно нарушение функций отдельных элементов метаболической системы,

которое невозможно скорректировать путем саморегуляции. Из этого следует, что если на систему, находящуюся в критическом или близком к критическому состоянию, оказать новое стресс-воздействие, она не сможет перепрограммировать метаболизм. Но если обеспечить постепенное повышение температуры (24–29–35 °С), то метаболическая система сможет перестроить метаболизм в ответ на изменение условий среды.

Такое коррегирование метаболизма в пределах одного пассажа может быть реализовано не столько перепрограммированием экспрессии генома, сколько «переключением» метаболизма на новые альтернативные пути.

Выводы

1. Культура *Dunaliella viridis*, адаптированная к росту на среде, содержащей 75 мг/л серноокислой меди, отставала в росте от стандартной CuS *D. v.* при оптимальной температуре культивирования. Различия в интенсивности роста CuR *D. v.* 75 и CuS *D. v.* уменьшались с первых по 24-е сутки роста, т.е. наблюдалась адаптация в пределах одного пассажа к избытку серноокислой меди.

2. В адаптированных к высоким концентрациям серноокислой меди культурах повышалось содержание ДНК (на 57%), белка и ТГ (на 16%), β-каротина (в 2,5 раза) и уменьшалось содержание РНК (на 38%) по сравнению с контролем.

3. При переводе стандартной культуры на температурный режим с 24 на 35 °С, ее рост прекращался, увеличивалось содержание ДНК (на 114%), белка (на 66%), ТГ (на 48%) и уменьшалось содержание β-каротина (на 43%). Перевод культуры CuR *D. v.* 75 на такой температурный режим приводит к ее гибели в течение нескольких суток.

4. Перевод культуры CuR *D. v.* 75 на температурный режим с 24 °С на 29 °С с интервалом 7 сут, а затем на 35 °С обеспечивает ее выживание в критических для нее условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Божков А.И., Голтвянский А.В. 1998. Индукция резистентности к серноокислой меди у *Dunaliella viridis* Teod. *Альгология*. 8(2): 162–169.
- Божков А.И., Мензянова Н.Г., Седова К.В., Голтвянский А.В. 2010. Влияние высокой температуры на чувствительные и резистентные к ионам меди клетки *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*). *Альгология*. 20(4): 413–431.
- Гублер Е.В., Генкин А.А. 1973. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*. Л.: Медицина. 141 с.
- Спирин А.С. 1958. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. *Биохимия*. 23: 656–662.
- Шмальгаузен И.И. 1946. *Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора)*. М.: Полиграфкнига. 396 с.
- Bagheri M., Mansouri H. 2014. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 175(5): 2366–2375.

- Barati B., Lim P.E., Gan S.Y., Sze-Wan Poong, Siew-Moi Phang, Beardall J. 2018. Effect of elevated temperature on the physiological responses of marine *Chlorella strains* from different latitudes. *J. Appl. Phycol.* 30(1): 1–13.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G. 1997. Age dependence of lipid metabolism and beta-carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. *Hydrobiol. J.* 33(6): 132–138.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kovalyova M.K. 2008. Annual rhythm of growth intensity of microalgal culture *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) and fluctuations of some heliophysical factors. *Int. J. Algae.* 10(4): 350–364. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v10.i4.50>
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kovalova M.K. 2009. Seasonal peculiarities of the epigenotype formation in the copper-sensitive and copper-resistant strain of *Dunaliella viridis* Teod. in the process of accumulative cultivation. *Int. J. Algae.* 11(2): 128–140. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v11.i2.30>
- Bozhkov A.I., Goltvianskiy A.V., Kovalova M.K., Menzyanova N.G. 2018. On the inheritance of induced resistance to toxic concentrations of sulfur acid of copper by subsequent cell generations of *Dunaliella viridis* Teod. *Algologia.* 28(4): 387–408. <https://doi.org/10.15407/alg28.04.387>
- Camejo D., Rodríguez P., Morales M.A., Dell'Amico J.M., Torrecillas A., Alarcón J.J. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.* 162(3): 281–228.
- Davis R.W., Carvalho B.J., Jones H.D. T., Singh S. 2015. The role of photo-osmotic adaptation in semi-continuous culture and lipid particle release from *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 27: 109–123.
- Dere Ş., Güneş T., Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of Chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Tr. J. Bot.* 22: 13–17.
- Fachet M., Hermsdorf D., Rihko-Struckmann L., Sundmacher K. 2016. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Algal Res.* 13: 227–234.
- Grama B.S., Agathos S.N., Jeffryes C.S. 2016. Balancing photosynthesis and respiration increases microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4(3): 1611–1618.
- Jian-Kang Zhu. 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell.* 167(2): 313–324.
- Kovalova M.K., Menzyanova N.G., Jain A., Yadav A., Flora S.J.S., Bozhkov A.I. 2012. Effect of hormesis in *Dunaliella viridis* Teodor. (*Chlorophyta*) under the influence of copper sulfate. *Int. J. Algae.* 14(1): 44–61. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v14.i1.40>
- Lowry O.B., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J. 1957. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 93: 265–273.
- Nezhad F.S., Mansouri H. 2017. Effects of polyploidy on response of *Dunaliella salina* to salinity. *bioRxiv.* 15: 1–29.
- Prasch Ch.M., Sonnewald U. 2015. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environ. and Exp. Bot.* 114: 4–14.
- Singh P., Baranwal M., Reddy S.M. 2016. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharm. Biol.* 54(10): 2269–2275.
- Sutherland D.L., Howard-Williams C., Turnbull M.H., Broady P.A., Craggs R.J. 2015. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Biores. Technol.* 184: 222–229.

- Yeon A., You S., Kim M., Gupta A., Park M.H., Weisenberger D.J., Liang G., Kim J. 2018. Rewiring of cisplatin-resistant bladder cancer cells through epigenetic regulation of genes involved in amino acid metabolism. *Theranostics*. 8(16): 4520–4534.

Поступила 08.05.2019

Подписала в печать Е.К. Золотарева

REFERENCES

- Bagheri M., Mansouri H. 2014. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 175(5): 2366–2375.
- Barati B., Lim P.E., Gan S.Y., Sze-Wan Poong, Siew-Moi Phang, Beardall J. 2018. Effect of elevated temperature on the physiological responses of marine *Chlorella strains* from different latitudes. *J. Appl. Phycol.* 30(1): 1–13.
- Bozhkov A.I., Goltvianskiy A.V. 1998. Induction of resistance to copper sulfate in *Dunaliella viridis* Teod. *Algologia*. 8(2): 162–169.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G. 1997. Age dependence of lipid metabolism and beta-carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. *Hydrobiol. J.* 33(6): 132–138.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kovalova M.K. 2008. Annual rhythm of growth intensity of microalgal culture *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) and fluctuations of some heliophysical factors. *Int. J. Algae*. 10(4): 350–364. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v10.i4.50>
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kovalova M.K. 2009. Seasonal peculiarities of the epigenotype formation in the copper-sensitive and copper-resistant strain of *Dunaliella viridis* Teod. in the process of accumulative cultivation. *Int. J. Algae*. 11(2): 128–140. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v11.i2.30>
- Bozhkov A.I., Goltvianskiy A.V., Kovalova M.K., Menzyanova N.G. 2018. On the inheritance of induced resistance to toxic concentrations of sulfur acid of copper by subsequent cell generations of *Dunaliella viridis* Teod. *Algologia*. 28(4): 387–408. <https://doi.org/10.15407/alg28.04.387>
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Sedova K.V., Goltvianskiy A.V. 2010. The effect of high temperature on cell sensitive and resistant to copper ions *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*). *Algologia*. 20(4): 413–431.
- Camejo D., Rodríguez P., Morales M.A., Dell'Amico J.M., Torrecillas A., Alarcón J.J. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.* 162(3): 281–228.
- Davis R.W., Carvalho B.J., Jones H.D.T., Singh S. 2015. The role of photo-osmotic adaptation in semi-continuous culture and lipid particle release from *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 27: 109–123.
- Dere Ş., Güneş T., Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of Chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Tr. J. Bot.* 22: 13–17.
- Fachet M., Hermsdorf D., Rihko-Struckmann L., Sundmacher K. 2016. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Algal Res.* 13: 227–234.

- Gramma B.S., Agathos S.N., Jeffryes C.S. 2016. Balancing photosynthesis and respiration increases microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4(3): 1611–1618.
- Gubler E.V., Genkin A.A. 1973. *Application of non-parametric statistical criteria in biomedical research*. Leningrad: Medicine. 141 p. [Rus.]
- Jian-Kang Zhu. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. 167(2): 313–324.
- Kovalova M.K., Menzyanova N.G., Jain A., Yadav A., Flora S.J.S., Bozhkov A.I. 2012. Effect of hormesis in *Dunaliella viridis* Teodor. (*Chlorophyta*) under the influence of copper sulfate. *Int. J. Algae*. 14(1): 44–61. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v14.i1.40>
- Lowry O.B., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J. 1957. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 93: 265–273.
- Nezhad F.S., Mansouri H. 2017. Effects of polyploidy on response of *Dunaliella salina* to salinity. *bioRxiv*. 15: 1–29.
- Prasch Ch.M., Sonnewald U. 2015. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environ. and Exp. Bot.* 114: 4–14.
- Schmalhausen I.I. 1946. *Evolution factors (stabilizing selection theory)*. Moscow: Polygraph Book. 396 p. [Rus.]
- Singh P., Baranwal M., Reddy S.M. 2016. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharm. Biol.* 54(10): 2269–2275.
- Spirin A.S. 1958. Spectrophotometric determination of the total amount of nucleic acids. *Biochemistry*. 23: 656–662.
- Sutherland D.L., Howard-Williams C., Turnbull M.H., Broady P.A., Craggs R.J. 2015. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Biores. Technol.* 184: 222–229.
- Yeon A., You S., Kim M., Gupta A., Park M.H., Weisenberger D.J., Liang G., Kim J. 2018. Rewiring of cisplatin-resistant bladder cancer cells through epigenetic regulation of genes involved in amino acid metabolism. *Theranostics*. 8(16): 4520–4534.

Bozhkov A.I., Kovalova M.K., Goltvianskiy A. V., Ushakova E.O.,
Tsapko H.Ye., Gavrish A.O.

Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkov National University,
4 Svobody Sq., Kharkov 61022, Ukraine

Preliminary adaptation of *Dunaliella viridis* strains to copper sulfate affects the thermal stability of the culture

We studied the growth of copper-sensitive (CuS *D. v.*) and copper-resistant (CuR *D. v.* 75) strains of the green microalga *Dunaliella viridis* Teodoresco at 35 °C to determine the relationship between the induced resistance to copper ions and resistance to high temperature of the environment. The effect of stepwise temperature increasing from 24→29→35 °C with an interval of 7 days on the growth rate and biomass composition (content of DNA, RNA, protein, triacylglycerides (TG), carotenoids and chlorophyll) of CuS *D. v.* and CuR *D. v.* cultures was examined. It was revealed that a temperature increase of up to 35° in the culture of CuS *D. v.* at the initial stage of growth slows its growth; the culture CuR *D. v.* 75 dies under the same conditions.

With a stepwise increase in the temperature of cultivation (24 → 29 → 35 °C), the culture CuR *D. v.* 75 survives, its growth rate is slightly higher than in CuS *D. v.* proving the thermal stability of its cells. In addition, biomass of CuR *D. v.* 75 contains more protein, DNA, TG, and especially β -carotene, compared to CuS *D. v.* At a temperature of 35 °C, the content of protein, DNA, TG, and β -carotene in cells of CuS *D. v.* also increased. It has been found that there is a complex relationship between resistance to copper ions and resistance to high temperature, which is determined by the temporal nature of the temperature change.

Key words: copper ion resistance, epigenotype, metabolism, *Dunaliella viridis*, high temperature