

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 58.03:581.1:535.31

ВОЗДЕЙСТВИЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Л.С. ГАБРИЕЛЯН, Дж.М. ДЖАВРШЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 375025

Исследовали действие высоких температур и ультрафиолетового излучения на кривые индукции флуоресценции хлорофилла *a* микроводорослей и рассчитанные по ним параметры. Изменение этих параметров указывает на подавление активности фотосинтетического аппарата (ФСА). Причем ФСА хлореллы более подвержен действию стресс-факторов, чем ФСА спироулины. Изменения ФСА на функциональном уровне сопровождаются существенными изменениями пигментного комплекса водорослей. У хлореллы наиболее чувствительными пигментами являются хлорофилл *b* и каротиноиды. В ФСА спироулины основной мишенью стрессового воздействия является фикоцианин.

Ուսումնասիրվել է բարձր ջերմաստիճանների և ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման ազդեցությունը միկրոօրգանիզմների քլորոֆիլ *a*-ի ֆլուորեսցենցիայի ինդուկցիոն կորերի և դրանց հիման վրա հաշվարկված պարամետրերի վրա: Այդ պարամետրերի փոփոխությունը ցույց է տալիս ֆոտոսինթետիկ ապարատի (ՖՍԱ) ակտիվության նվազումը: Ընդ որում, քլորելայի ՖՍԱ-ն ավելի ենթակա է ստրես-գործոնների ազդեցությանը, քան սպիրուլինայինը: ՖՍԱ-ի ֆունկցիոնալ փոփոխությունները ուղեկցվում են օրգանիզմների պիգմենտային համալիրի զգալի փոփոխություններով: Քլորոֆիլ *b*-ն և կարոտինոիդները քլորելայի առավել զգայուն պիգմենտներն են: Սպիրուլինայի ՖՍԱ-ում ստրեսային ազդեցության թիրախ է հանդիսանում ֆիկոցիանինը:

We have studied the effects of high temperatures and ultraviolet radiation on the curves of chlorophyll *a* fluorescence induction in microalgae and the parameters designed on them. The changes of these parameters indicate a suppression of photosynthetic apparatus (PSA) activity. PSA of *Chlorella* is more subject to stress-factors influence, than PSA of *Spirulina*. The changes of PSA at a functional level are accompanied by essential changes of algae pigments complex. Chlorophyll *b* and carotenoids are the more sensitive pigments of *Chlorella*. Phycocyanin of *Spirulina* is the main target of stressful influence.

Микроводоросли — индукция флуоресценции — пигменты — высокие температуры — УФ излучение

За последнее время опубликован ряд работ по влиянию стресс-факторов на первичные процессы фотосинтеза [1-4, 11-16]. Воздействие как высоких температур, так и ультрафиолетового (УФ) излучения приводит к значительным изменениям в структуре и функции фотосинтетического аппарата (ФСА) фотосинтезирующих организмов [1-4, 11-16]. При этом фотосистема 2 (ФС2) является одним из чувствительных компонентов ФСА

[1, 3, 11, 15]. Фогосистема I (ФС1) более устойчива к действию стрессовых факторов, чем ФС2 [3, 4, 15].

Кроме того, у цианобактерий высокие температуры и УФ излучение вызывают изменения в пигмент-белковом взаимодействии и нарушения переноса энергии в пределах ФБС [12, 15, 16]. Показано, что ФБС являются основной мишенью для термо- и УФ-индуцированного повреждения ФСА цианобактерий [12, 16].

Ранее нами было показано неблагоприятное влияние высоких температур на ФСА цианобактерии *Spirulina platensis* и зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* [6-9].

В настоящее время большой интерес представляет изучение комбинированного действия высоких температур и УФ излучения на первичные процессы фотосинтеза. Данных о взаимном влиянии высоких температур и УФ излучения на фотосинтезирующие организмы мало, и они противоречивы. Есть сведения о том, что после теплового стресса повышалась устойчивость к УФ радиации [2], или, наоборот, УФ облучение растений повышало их устойчивость к тепловому шоку [14].

Материал и методика Объектами исследования служили одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella pyrenoidosa* и цианобактерия *Spirulina platensis*. Хлореллу выращивали на стандартной питательной среде Тамия, а спиролину – на среде Заррука при комнатной температуре ($25 \pm 2^\circ$) и естественном освещении (500-800 лк). Для исследования последовательного действия температуры и УФ излучения водоросли, предварительно прогретые при определенной температуре (экспозиция – 15 мин), облучали УФ лучами в течение 15 мин. Для тепловой обработки водоросли помещали в термостат УТ-1 с водой различной температуры (25-50°). Для облучения их использовали ртутно-кварцевый облучатель с лампой ПРК-2, доза УФ излучения $3,5 \cdot 10^7$ Дж·м⁻². Регистрацию медленной индукции флуоресценции проводили на флуориметре-фосфороскопе, разработанном Джавришяном [10]. Коэффициент нефотохимического тушения определяли по $qN = (F_p - F_p')/F_p$, где F_p' – интенсивность флуоресценции полностью закрытых реакционных центров (РЦ), подвергнутых действию факторов объекта.

Количественный анализ фотосинтетических пигментов хлореллы проводили спектрофотометрически на СФ-10 в ацетоновой вытяжке. Концентрации хлорофиллов а и b рассчитывали по уравнениям Вернона [5]. При определении концентрации каротиноидов в суммарной вытяжке пигментов использовалась формула Веттштейна [5].

Пигменты спиролины определяли в суспензии водоросли по спектрам поглощения на СФ-10. Содержание хлорофилла и фикоцианина на единицу оптической плотности суспензии рассчитывали по формулам Джонса и Майерса, учитывающим перекрытие спектров поглощения этих пигментов [13]. Содержание каротиноидов в спиролине оценивали по отношению оптических плотностей в их максимумах поглощения в области 490-500 нм и в максимуме поглощения хлорофилла при 680 нм. Полученные данные подвергали статистической обработке. Биологическая повторность опытов трехкратная.

Результаты и обсуждение. Было исследовано влияние различных температур (25-50°) и УФ излучения на кинетику медленной индукции флуоресценции (МИФ) хлорофилла микроводорослей и рассчитанные по ним флуоресцентные параметры. Флуоресцентные параметры, а также время нарастания и спада индукционных кривых используются как показатели изменений состояния ФСА и прежде всего реакций в ФС2 при действии различных факторов [1, 3, 4, 7-9, 11]. При этом наиболее часто используются соотношения F_p/F_T , F_M/F_T , где F_p , F_M , F_T – интенсивность флуоресценции в точках P, M, T кривой индукции флуоресценции [4]. Соотношение F_p/F_T

связано со скоростью электронного транспорта, а F_M/F_T отражает эффективность фотосинтеза [4].

При действии УФ на суспензию хлореллы при 25° наблюдается резкое падение интенсивности флуоресценции по всей индукционной кривой (рис. 1а, кривая 2). Максимум P уменьшается приблизительно на 32 %, что свидетельствует о нарушении функционирования реакционного центра (РЦ) ФС2. Минимум S уменьшается на 34%, время появления второго максимума M замедляется до 6.24 сек, а интенсивность этого пика уменьшается на 31% по сравнению с контролем. Стационарный уровень T изменяется незначительно (уменьшается на 11%), что свидетельствует о замедлении тушения флуоресценции на участке $M-T$.

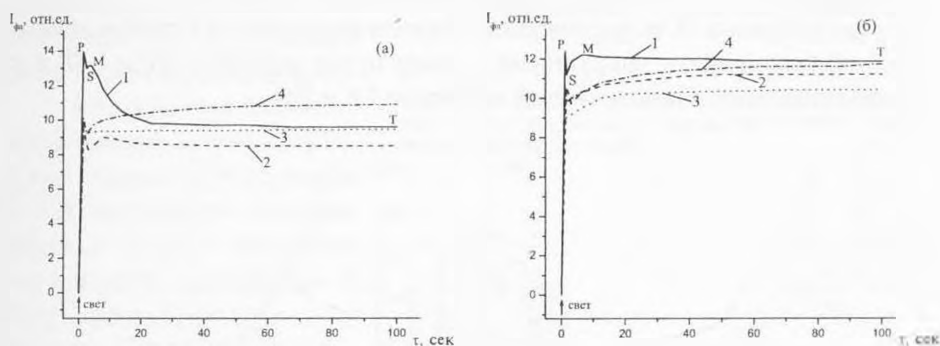


Рис. 1. Кривые индукции флуоресценции хлореллы (а) и спироулины (б) при последовательном действии температуры и УФ излучения: 1 — контроль (25°); 2 — контроль, подвергнутый действию УФ излучения; 3, 4 — объекты, подвергнутые последовательному действию температур 45°, 50° и УФ излучения.

При действии УФ излучения на прогретую при 45° хлореллу наблюдается суммирование воздействий и происходит падение интенсивности флуоресценции в точках P и S на 29 и 31% и замедление времени достижения максимумов P и M (кривая 3).

Действие УФ излучения на прогретую при 50° хлореллу приводит к исчезновению пика M и замедлению тушения флуоресценции на $M-T$ участке (кривая 4), вследствие роста стационарного уровня T приблизительно на 13% по сравнению с контрольным образцом, и на 16% по сравнению с хлореллой, подвергнутой действию 45° и УФ. Стационарный уровень характеризует долю хлорофилла, не передающего энергию в фотосинтетические процессы [4]. Возрастание F_T обычно обусловлено нарушением механизма переноса энергии от светособирающих пигментов в РЦ [1].

У спироулины действие УФ излучения приводит к резкому падению интенсивности флуоресценции на всем $PSMT$ участке при 25° (рис. 1б, кривая 2). Действие УФ приводит к исчезновению второго максимума M и замедлению тушения флуоресценции на участке $M-T$. Максимум P уменьшается приблизительно на 15%, минимум S — на 13%. Время появления второго максимума M замедляется до 14 сек, а интенсивность этого пика уменьшается на 11% по сравнению с контролем, стационарный уровень T

изменяется незначительно, что свидетельствует о замедлении тушения флуоресценции на участке $M-T$.

При действии УФ излучения у спироулины, как и у хлореллы, при 45° наблюдается суммирование воздействий (кривая 3). Значительно снижается интенсивность флуоресценции в точках P и S на 20 и 19% соответственно. Исчезает пик M , стационарный уровень T уменьшается на 12%, также замедляется процесс тушения флуоресценции на участке $M-T$.

Воздействие УФ на прогретую при 50° спироулину также приводит к некоторому росту интенсивности флуоресценции (по сравнению с действием УФ на прогретые при 25 и 45° образцы). Последовательное действие температуры (50°) и УФ приводит к росту интенсивности флуоресценции первого максимума P , исчезновению пика M и замедлению процесса тушения флуоресценции на $M-T$ участке (кривая 4), вследствие роста стационарного уровня T приблизительно на 5% по сравнению с спироулиной, подвергнутой действию 25° и УФ, и на 12% по сравнению с подвергнутой действию 45° и УФ.

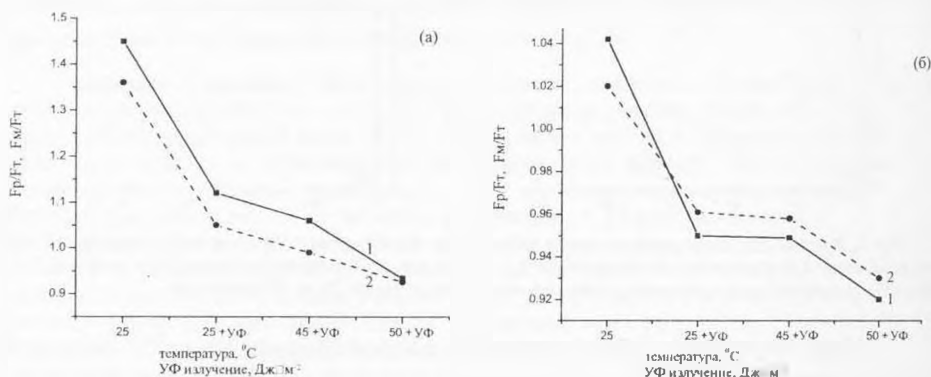


Рис. 2. Зависимость отношений параметров F_p/F_t (1) и F_m/F_t (2) от последовательного действия температуры и УФ излучения у хлореллы (а) и спироулины (б).

На рис. 2а приведены зависимости отношений F_p/F_t и F_m/F_t хлореллы от последовательного действия температуры и УФ. F_p/F_t уменьшается приблизительно на 23, 27 и 36%, а соотношение F_m/F_t — на 23, 27 и 32% (при действии УФ и 25°, 45°, 50° соответственно) по сравнению с контролем. Зависимость отношений F_p/F_t и F_m/F_t спироулины от последовательного действия температуры и УФ приведены на рис. 2б. Соотношения интенсивности F_p/F_t и F_m/F_t уменьшается параллельно действию температур и УФ излучения. F_p/F_t уменьшается приблизительно на 9, 9 и 12%, соотношение F_m/F_t — на 6, 6 и 9% соответственно. Большой скорости электронного транспорта соответствует высокая скорость PT -тушения флуоресценции, а величина тушения коррелирует со скоростью ассимиляции CO_2 [1, 4]. Таким образом, при последовательном действии температуры и УФ излучения происходит снижение скорости электронного транспорта.

Изменения коэффициента нефотохимического тушения qN у хлореллы и у спироулины приведены на рис. 3. При совместном действии УФ излучения и температуры (25°, 45° и 50°) у хлореллы наблюдается рост qN на 32, 29 и

27%, а у спирулины — на 15, 20 и 13%. Увеличение qN можно объяснить уменьшением диссипации световой энергии в светособиравшем комплексе (ССК).

Для объяснения нарушения работы фотосинтетической цепи электронного транспорта нами было исследовано влияние вышеуказанных факторов на состояние пигмент-белкового комплекса микроводорослей.

Изменения в пигментном комплексе хлореллы (рис. 4) под влиянием температуры и УФ происходят главным образом за счет снижения содержания хлорофилла b (Хл b), количество же хлорофилла a (Хл a) снижается в меньшей степени. Так, при действии температуры (25°, 45° и 50°) и УФ излучения концентрация Хл a уменьшается на 8, 12 и 17%, а Хл b — на 20, 21 и 28% по сравнению с контролем. О преобладающем разрушении Хл b свидетельствует и соотношение Хл a /Хл b , которое увеличилось на 15, 12 и 17% по сравнению с контролем. Это в свою очередь свидетельствует об относительном уменьшении ССК (Хл b в основном входит в состав ССК, функционально сопряженного с ФС2), что в свою очередь ухудшает условия светосбора в ФС2. Каротиноиды защищают хлорофилл от фотоокислительной деструкции, в связи

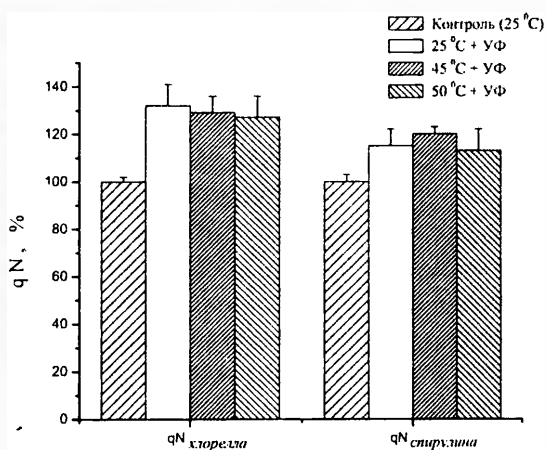


Рис. 3. Зависимость нефотохимического тушения qN хлореллы и спирулины от последовательного действия температуры и УФ излучения.

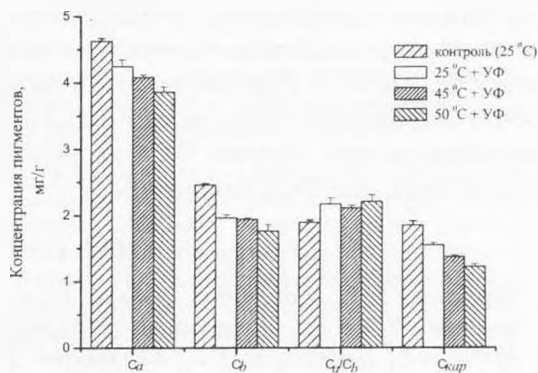


Рис. 4. Зависимость концентрации пигментов хлореллы от последовательного действия температуры и УФ излучения.

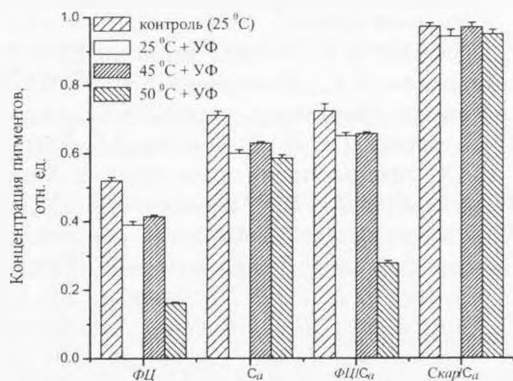


Рис. 5. Зависимость концентрации пигментов спирулины от последовательного действия температуры и УФ излучения.

с чем изменения их концентрации более выражены: количество уменьшается на 16, 27 и 35% по сравнению с контролем.

Изменения в пигментной системе спироулины при действии температур и УФ излучения приведены на рис. 5. Содержание каротиноидов на протяжении опыта оставалось практически неизменным. При действии температуры (25°, 45°, 50°) и УФ излучения содержание фикоцианина (ФЦ) изменялось приблизительно на 25, 20 и 70%, в то время как количество Хл *a* – на 16, 12 и 18% соответственно. Это свидетельствует о том, что наиболее чувствительным к стрессовому воздействию оказался ФЦ. Так как ФЦ является основным светособирающим пигментом спироулины, то снижение его содержания нарушает процесс переноса энергии как в пределах ФБС, так и к Хл*a* фотосистем. Соотношение ФЦ/Хл*a* также уменьшалось приблизительно на 60% (при совместном действии температуры 50° и УФ) по сравнению с контролем.

Таким образом, совместное действие повышенных температур и УФ излучения вызывало закономерное снижение интенсивности фотосинтеза, которое сопровождалось указанными изменениями параметров МИФ. Причем, основной эффект совместного действия температур и УФ излучения заключается в увеличении безызлучательной диссипации поглощенной световой энергии, а также в снижении скорости электронного транспорта между ФС2 и ФС1. Перечисленные изменения ФСА на функциональном уровне сопровождаются существенными изменениями пигментного состава микроводорослей. Причем ФСА хлореллы более подвержен стрессовому воздействию, чем ФСА спироулины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бордапова О.С. и др. Биол. науки, 11, с. 27-33, 1988.
2. Борисова Т.А. и др. Физиология растений, 48, 4, 589-595, 2001.
3. Бухов Н.Г., Джигладзе Т.Г., Карапетян Н.В. Физиология растений, 34, 3, 435-444, 1987.
4. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. М.: "Наука", 200 с, 1990.
5. Гавриленко В.Ф. и др. Большой практикум по физиологии растений. М.: "Высшая школа", 392 с, 1975.
6. Габриелян Л.С. Ученые записки ЕГУ, 3, 91-94, 2004.
7. Габриелян Л.С., Джавришян Дж.М. Мат-лы 7-й Пушкинской конф. молодых ученых: "Биология - наука XXI века", Пушкино, 56-57, 2003.
8. Джавришян Дж.М., Габриелян Л.С. Мат-лы III респ. молод. научной конф.: "XXI век: экологическая наука в Армении", Ереван, 80-85, 2002.
9. Джавришян Дж.М., Габриелян Л.С. Ученые записки ЕГУ, 1, 86-93, 2004.
10. Джавришян Дж.М. Автореф. док.дисс., Минск, 1991.
11. Креславский В.Д., Хрустин М.С. Биофизика, 48, 5, 865-872, 2003.
12. Лебедев Н.Н. и др. Биофизика, 35, 1, 62-68, 1990.
13. Сулейманова Ш.С., Минеева Л.А. Вестник МГУ, сер. биол., 1, 42-47, 1981.
14. Caldwell C.R. Plant Physiology, 104 (2), 395-399, 1994.
15. Rajagopal S. et al. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 54, 61-66, 2000.
16. Sah J.F. et al. Biochem. Mol. Biol. Int, 44 (2), 245-257, 1998.

Поступила 02.XII.2004