

**ЗМІНИ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ, ПЕРОКСИДАЗИ
ТА ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ *DESMODESMUS ARMATUS*
(CHOD.) HEGEW. ЗА ІНДУКЦІЇ КАРОТИНОГЕНЕЗУ**

І. В. Маліщук, М. М. Марченко

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
E-mail: Umwelt@ukr.net

Каротиноїди є невід'ємною частиною неферментативної системи антиоксидантного захисту клітин мікроводоростей від пошкоджень. Їх накопичення у великих кількостях є характерною особливістю екстремофільних видів мікроводоростей, які переживають різкі зміни умов зовнішнього середовища. Відомо, що в індукції синтезу вторинних каротиноїдів беруть участь активні форми кисню. Вони накопичуються також і в умовах осмотичного стресу чи при зниженні ефективності фіксації вуглекислого газу. Найімовірніше, активні форми кисню діють як вторинні месенджери, активуючи шляхи біосинтезу вторинних каротиноїдів, зокрема астаксантину та його ефірів через активацію відповідних ферментів чи індукуючи експресію генів, які їх кодують [4]. У попередній роботі нами було показано, що внесення у середовище сполук – генераторів активних форм кисню ($\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) та промоторів осмотичного стресу (NaCl) призводило до збільшення виходу каротиноїдів у 4 рази на фоні збереження вихідної чисельності клітин та перерозподілу профілю основних нутрієнтів [3]. При цьому відомо, що вплив індукторів каротиногенезу може призводити також і до зниження активності ферментативних механізмів антиоксидантного захисту, зокрема впливати на активність каталази, пероксидази та на накопичення каротиноїдів в якості компенсаторної реакції [1,2].

При активації каротиногенезу важливо також контролювати фізіологічний стан та ростову активність культури. Одним із ключових ферментів, що відповідають за генерацію

Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів та дослідження біорізноманіття

енергії у клітині є цитохромоксидаза. Його активність є одним із показників метаболічної активності культури.

Тому метою роботи було дослідження активності каталази, пероксидази та цитохромоксидази в клітинах *D. armatus*, вирощених в умовах індукції каротиногенезу за використання промоторів вільнорадикального окислення (Fe^{2+} з H_2O_2) та осмотичного стресу (NaCl).

Дослідження проводили з використанням альгологічно чистої культури зеленої водорості *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew (IBASH-A), отриманої з колекції Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Культуру *D. armatus* вирощували на стерильній скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання в умовах кліматичної кімнати [5].

Кількість біомаси визначали за густиною культури з використанням оптичного показника при 750 нм на CaryWin UV 60 (Agilent, США) [11]. Морфологічні параметри аналізували мікроскопічно за використання камери Горяєва, тринокулярного мікроскопа MicroMed-3300 (x1000) (Україна) та комп'ютерної програми *Micam* 2.0. (http://science4all.nl/?Microscopy_and_Photography).

Фізіологічний стан клітин оцінювали за цитохромоксидазним тестом.

Активність каталази визначали спектрофотометрично за зменшенням оптичної густини при довжині хвилі 450 нм на CaryWin UV 60 (Agilent, США) в результаті розщеплення H_2O_2 . Активність пероксидази визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 470 нм в результаті окислення гваяколу у присутності пероксиду водню.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програмного забезпечення *Microsoft Excel*. Відмінності отриманих результатів вірогідні при рівні значимості $p \leq 0,05$ за критерієм Стюдента.

Одним із показників стану альгокультури за умов внесення у середовище сполук – генераторів активних форм кисню ($\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) та промоторів осмотичного стресу (NaCl) є її виживаність, яку можна оцінити за накопиченням первинної

Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів та дослідження біорізноманіття

біомаси. Так, протягом всього терміну культивування *D. armatus* на середовищі із індукторами спостерігали низьку ростову активність культури. При цьому масової загибелі клітин не відмічалось. За цей період кількість біомаси знаходилася на рівні першого дня культивування в межах 12-14 г/л.

Показником виживаності культури при стресових умовах є також ефективність функціонування їх метаболічних систем. Так, за результатами цитохромоксидазного тесту відмічено, що на фоні низької ростової активності відбувається також пригнічення метаболічної активності культури. Дія FeSO_4 з H_2O_2 призводила до зниження активності цитохромоксидази до 9 доби культивування втричі. А вплив NaCl - до зниження такої активності вдвічі уже на 3 добу культивування. Найімовірніше, порушення осмотичної рівноваги має такий же вплив на біосинтетичні процеси, як і накопичення активних форм кисню.

Відомо, що накопичення каротиноїдів може бути компенсаторною реакцією на фоні активізації процесів антиоксидантного захисту. Зазвичай це відбувається за рахунок збільшення активності окремих компонентів цієї системи. Одним із маркерних ферментів, який практично першим активується у відповідь на стрес, є каталаза. Її активність починає збільшуватися уже при внесенні у середовище 50 мМ FeSO_4 з H_2O_2 та NaCl , а при концентрації 200 мМ даних індукторів активність збільшується практично на 75% в обох випадках. Підвищення активності каталази може бути зумовлено збільшенням концентрації пероксиду водню у клітинах.

При збільшенні концентрації індукуючих агентів збільшується також і активність пероксидази. Оскільки пероксидаза бере участь також і в метаболізмі фенольних сполук, така висока її активність може бути зумовлена як участю її в процесах лігніфікації при ущільненні клітинних стінок, так і активізацією систем антиоксидантного захисту.

Отже, на фоні морфологічних змін та зниження ростової активності культури, що є наслідком внесення індукторів каротиногенезу (сульфату феруму з пероксидом водню та хлориду натрію) показано зниження активності

**Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів
та дослідження біорізноманіття**

цитохромоксидази як показника метаболічної активності культури. Крім того показано, що за таких умов на фоні посиленого каротиногенезу активуються також антиоксидантні системи за рахунок збільшення активності каталази та пероксидази.

Література

1. *Алиева Д. Р.* Активность и изоферментный состав пероксидазы клеток *Dunaliella salina* при солевом стрессе / Д. Р. Алиева, Г. Г. Бабаев, И. В. Азизов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. — 2010. — Вип. 1, Т. 1. — С. 16—21.
2. *Антоненко С.П.* Активность каталазы у микроводоросли *Dunaliella salina* Теод. при индукции каротиногенеза дефицитом азота и фосфора / С.П. Антоненко, В.П. Комаристая // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. — 2010. — Вип. 3(21). — С. 63—69.
3. *Маліщук І.В.* Індукція вторинного каротиногенезу у *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew в умовах двостадійного культивування / І.В. Маліщук, Л.М. Чебан // Ukr. Biochem. J. — 2016. — Vol. 88, № 4. — Р. 106.
4. *Минюк Г.С.* Особенности вторичного каротиногенеза у *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) в условиях двухстадийной культуры / Г.С. Минюк, Э.С. Челебиева, И.Н. Чубчикова // Альгология. — 2015. — 25(1). — С. 21—34.
5. *Пат. №101103* Метод культивування фітопланктону. Марченко М.М., Худий О.І., Чебан Л.М., Худа Л.В., Маліщук І.В., публ. 25.08.2015, Бюлетень. № 16.