

**ИЗМЕНЕНИЯ В ОБЩАТА КИСЕЛИННОСТ НА КЛЕТКИТЕ НА *PLECTONEMA BORYANUM* В ОТГОВОР НА ОКИСЛИТЕЛЕН СТРЕС**

**Ганка Чанева, Пламен Пиларски\***

*Катедра „Физиология на растенията”*

*Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”*

*бул. „Драган Цанков” 8, София 1164*

*e-mail: [gchaneva@abv.bg](mailto:gchaneva@abv.bg)*

*\*Секция „Експериментална алгология”*

*Институт по физиология на растенията и генетика - БАН*

*ул. „Акад. Георги Бончев”, бл. 21, София 1113*

**CHANGES IN TOTAL ACIDITY OF *PLECTONEMA BORYANUM* CELLS RESPONDING TO OXIDATIVE STRESS**

**Ganka Chaneva, Plamen Pilarski\***

*Department of Plant Physiology*

*Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”*

*8 Dragan Tzankov Blvd. 1164 Sofia*

*e-mail: [gchaneva@abv.bg](mailto:gchaneva@abv.bg)*

*\*Section of Experimental Algology, Institute of Plant Physiology and Genetics,*

*Bulgarian Academy of Sciences,*

*Acad. G. Bontchev Str., bl.21, 1113 Sofia, Bulgaria*

**ABSTRACT**

We investigated the alterations of total acidity and MDA (malone dialdehyde) in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* under various temperatures, light intensities and iron concentrations in nutrition medium. It was found that combination of high light intensity and high temperature led to an increase of total acidity - 225% as compared to the optimum. At low temperature and low light its value increased up to 190%. The largest increase of total organic acids (318%) was measured in the variants cultured with an excess of iron, while in Fe-deficient cells the increase was only about 45%.

Changes in MDA content followed the same trend of increase. Iron toxicity induced the highest levels of oxidative stress in *Plectonema boryanum* cells.

**Key words:** *Plectonema boryanum, organic acids, MDA*

**УВОД**

Нарастването на нивото на листната титруема киселинност е добре известна реакция на физиологичния отговор на висшите растения към стресови въздействия - осмотичен, воден, солеви стрес и др. (Timra et al., 1986). Наблюдавано е увеличаване на общата киселинност при третиране на висши растения с голям брой тежки метали (Каменова и др., 1981). Адаптацията на цианобактериите към стресови фактори включва механизми на натрупване на осморегулаторни съединения в клетките и поддържане на ниско вътрешно съдържание на неорганични йони (Nagasathya and Thajuddin, 2008).

Влиянието на екстремните температури и светлинна интензивност върху растителните организми, замърсяването на почвите и водоемите с хербициди и тежки метали обуславя нуждата от изясняване на механизмите, чрез които действат посочените стресови фактори.

В достъпната литература отсъстват данни за общата киселинност на клетките на цианобактериите и нейното изменение при неблагоприятни въздействия. Целта на настоящото изследване е да се проследят промените в нивото на органичните киселини в клетките на *Pl. boryanum* в условия на окислителен стрес.

### Материал и методи

*Plectonema boryanum* Gom. (*Leptolyngbya boryana*, Gomont), Anagnostidis et Komarek, щам 594 (с начален инокулат 0,4 mg/ml абсолютно сухо вещество) е култивирана интензивно в култивационни съдове от 200 ml, при непрекъснато продухване със стерилен въздух (100 l/h), обогатен с 2% CO<sub>2</sub> (vol/vol). Водорасловата суспензия е осветявана с луминесцентни лампи (BG-40) при две интензивности на светлината 150 и 300  $\mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . За изследване на температурния диапазон на растеж на *Pl. boryanum* е използван метален блок с температурен градиент (Дилов, 1985). Желязото е добавяно в средата като Fe-EDTA: 9,4 mg/l в контролния вариант и 188 mg/l (сублетална концентрация). Резултатите са отчитани след 48-часово култивиране, в края на експоненциалната фаза на растеж на културата. Общата киселинност на водорасловата биомаса е определяна след пропускане през колонка с катионит КУ-1 (Солдатенков, 1971) и е привеждана към 1 mg малат. Съдържанието на МДА е определено по метода на Heath & Packer (1968).

Всички експерименти са проведени минимум в 3 повторения. Получените резултати са обработени вариационно-статистически по Student t-тест, при  $p \leq 0,05$ .

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Екстремните температури и високият светлинен интензитет повишават нивото на общата киселинност в клетките на *Pl. boryanum*. Най-високи стойности са измерени при 44,5 °C и 300  $\mu\text{mol phot m}^{-2} \text{s}^{-1}$  - 225% спрямо оптимума, приет за контрола. При ниска култивационна температура и ниска осветеност също се наблюдава повишаване на стойността на изследвания показател - 190% в сравнение с клетки, култивирани при оптимални условия (Фиг. 1 А, В). От съществено значение е да се отбележи, че съдържанието на органични киселини при *Pl. boryanum* (несъдържаща хетероцисти цианобактерия), при оптимални условия е около 4 пъти по-ниско (~120 mg малат/100 g въздушно сухо вещество), в сравнение с измереното при *Anabaena variabilis* (цианобактерия, съдържаща хетероцисти) (Dragolova et al., 2002).

Една възможна интерпретация на получените резултати е, че увеличаването на общата киселинност в клетките на *Pl. boryanum* може да се дължи на инхибиране или блокиране на някои от дихателните ензими, което от своя страна би довело до натрупване на органични киселини.

Количеството на МДА е изследвано като критерий за прекисното окисление на липидите и респективно за степента на увреждане на клетъчните мембрани (Ashton and Crafts, 1981). При проведените експерименти е установено, че високата осветеност на културата, сама по себе си, предизвиква увеличение на МДА. И при двете светлинни интензивности количеството на МДА нараства по-значително при високите култивационни температури (Фиг. 2А, В). Тъй като температурният стрес нарушава интегритета на мембраните (Bergu and Bjorkman, 1980), вероятно е подтискането на мембранно асоциираните реакции при ниски температури и високо осветяване да бъде свързано с повишената пропускливост на мембраните.

Генерирането на свободни радикали при тежкометален стрес и индукцията на защитни механизми при цианобактериите не е добре проучено. Фиг. 3 А отразява измененията на общата киселинност в клетките на *Pl. boryanum* при култивиране в условия на железен дефицит и излишък на желязо. При Fe-дефицитните клетки е измерено повишение от около 45% спрямо контролата, докато при варианта с излишък на Fe това увеличение е много силно изразено - 318%. Този резултат е сходен с резултатите, получени при третиране на *Pl. boryanum* с високи температури и висок светлинен интензитет.

При много растения е доказано участието на органичните киселини в толерантността към тежки метали, при което йоните на тежките метали се комплексираат и преминават в нетоксични форми (Ma et al. 2001).

Увеличението на МДА при варианта с излишък на Fe (Фиг. 3 В) е индикатор за висока степен на пероксидация на клетъчните липиди. Възможно е Fe да индуцира прекисно окисление на липидите пряко и независимо от супероксидните радикали. Слабото понижаване на количеството на МДА в условия на железен дефицит вероятно се дължи на липса или силно намаление на каталитично активно Fe (обикновено свързано с нискомолекулни съединения) в клетките на *Pl. boryanum* при прилагане на този вид стрес.

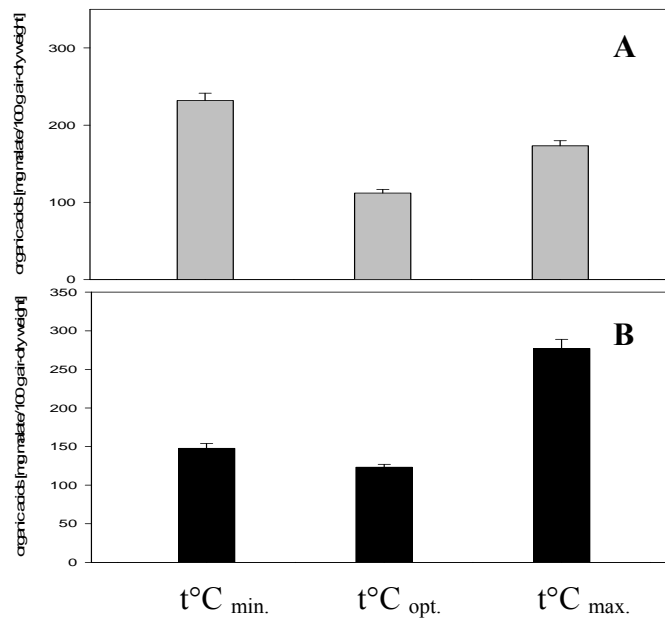
Като се има пред вид промяната в титруемата киселинност при *Pl. boryanum*, третирана с паракват, където е измерено слабо нарастване на общата киселинност – само 125% при сублетална концентрация на хербицида, то количествените изменения на този показател по-скоро не могат да се използват като индикатор за оксидативен стрес в клетките на *Pl. boryanum*.

Общата киселинност на *Pl. boryanum* се увеличава при екстремни температури и висока осветеност, както и при третиране със сублетални концентрации желязо. Получените данни потвърждават схващането за ролята на повишената обща киселинност на клетките като неспецифичен стресов отговор спрямо прилагането на различни стресови фактори. Повишената киселинност може да се интерпретира и като резултативно-остатъчна величина от нарушен клетъчен метаболизъм в отговор на вече възникнал стрес.

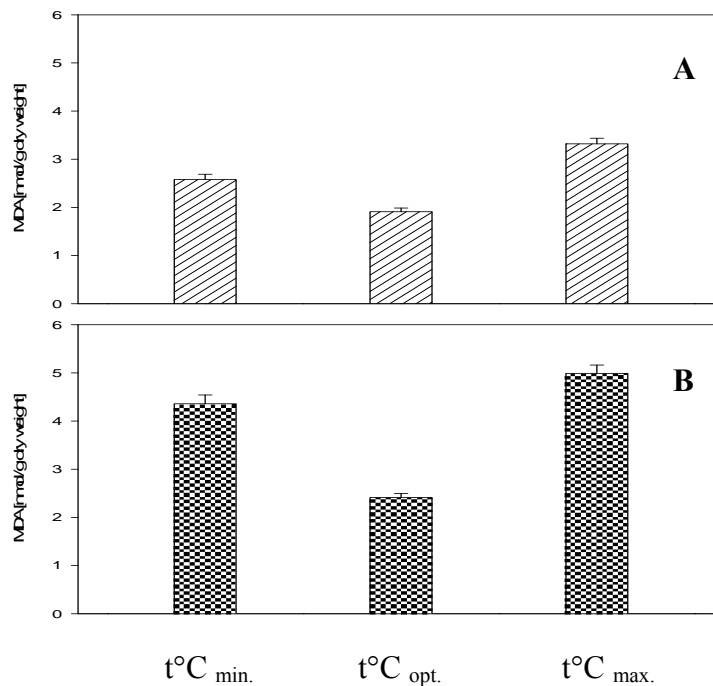
**Благодарности:** Настоящата разработка е субсидирана от Договор № ДО02-299/18.12.2008, НФ „Научни изследвания”.

#### ЛИТЕРАТУРА:

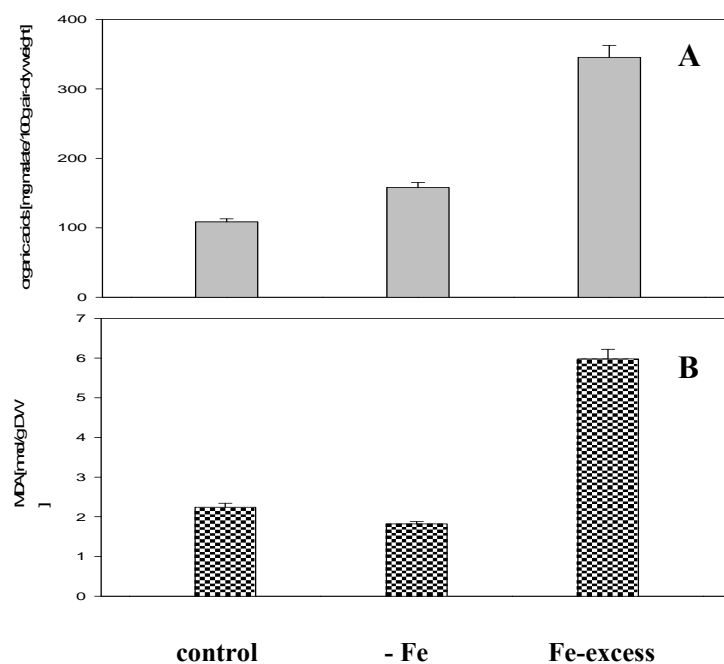
1. Дилов, Х., 1985, Микроводорасли – масово култивиране и приложение, София, БАН, стр. 16-28
2. Каменова-Юхименко, С., Т. Къдрев, Л. Апостолова, 1981. Влияние на някои тежки метали върху съдържанието на органични киселини в млади царевични растения, Физиология на растенията, 6(2), 41-45
3. Солдатенков, С. В., 1971, Биохимия органических кислот растений, Изд. Ленингр. Университета, стр. 139
4. Ashton, F. M. and Crafts, A., 1981, Bipiridiliums, In: Mode of Action on Herbicides, (Feldtke, ed.), pp. 164-179
5. Berry, J. A. and Bjorkman, O., 1980, Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants, Ann. Rev. Plant Physiol., 31, 491-543
6. Dragolova, D., G. Chaneva, T. Gemishev, 2002. Physiological changes in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Plectonema boryanum* caused by paraquat toxicity, Compt. Rend. Acad. Sci. Bulg., 55 (5), 85-88
7. Heath, L., H. Packer, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. - Arch. Biochem. Biophys., 125, 189-198
8. Jócsák, I., G. Végvári, M. Droppa, 2005. Heavy metal detoxification by organic acids in barley seedlings, Acta Biologica Szegediensis, 49(1-2), 99-101
9. Ma, J., 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. Plant Cell Physiol, 41, 383-390
10. Nagasathya, A. and N. Thajuddin, 2008. Cyanobacterial diversity in the hypersaline environment of the saltpans of southeastern coast of India. Asian J. Plant Sci., 7: 473-478
11. Timpa, J., J. Burke, J. Quisenberry, W. Charles, 1986, Effects of Water Stress on the Organic Acid and Carbohydrate Compositions of Cotton Plants, Plant Physiol. 82(3), 724-728



**Фиг. 1.** Промяна на общата киселинност в клетките на *Pl. boryanum* при екстремни температури, нисък светлинен интензитет -  $150 \mu\text{mol phot m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A) и висок светлинен интензитет -  $300 \mu\text{mol phot m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B).



**Фиг. 2.** Промяна на количеството на МДА в клетките на *Pl. boryanum* при екстремни температури и нисък светлинен интензитет,  $150 \mu\text{mol phot m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A) и висок светлинен интензитет,  $300 \mu\text{mol phot m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B).



**Фиг. 3.** Промяна на общата киселинност (A) и количеството на МДА (B) в клетките на *Pl. boryanum*, култивирана при Fe-дефицит и излишък на Fe в средата.