

# ГІДРОБІОЛОГІЯ

УДК 577.122.3: 582.26+(691.74;691.75)

О.І. БОДНАР, А.І. ГОРДА, В.В. ГРУБІНКО

Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

## РОЛЬ АЗОТНОГО ОБМІНУ В АДАПТАЦІЇ ВОДОРОСТЕЙ ДО ІОНІВ МЕТАЛІВ

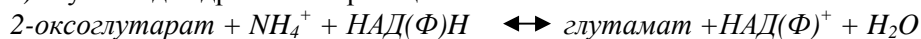
---

*Ключові слова:* прісноводні водорості, азотний метаболізм, глутаматдегідрогеназа, глутамінсинтетаза, іони цинку і свинцю.

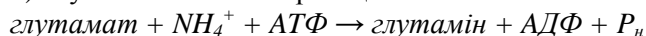
В екологічному метаболізмі водойм важливу роль відіграють водорості, клітини яких здатні ефективно засвоювати різні форми молекулярного, неорганічного та органічного азоту [10]. Для включення азоту у клітинні органічні сполуки необхідно його перетворення в іон амонію. Разом з тим, вільний аміак є отруйним, тому потрапляючи у середину клітин, він не накопичується, а відразу використовується у біосинтетичних процесах [28, 32]. Стан окремих ланок біохімічних перетворень та спрямованість обміну речовин, швидкість перетворення потоку інтерметаболітів та метаболічну інтенсивність окремих видів і фітопланктону в цілому можна оцінити на основі активності взаємопов'язаних ферментних систем клітин [2; 5].

На сьогодні відомо, що у рослин, включно і у водоростей, найефективнішими системами зв'язування аміаку є [11]:

а) глутаматдегідрогеназна реакція:



б) глутамінсинтетазна реакція:



Глутаматдегідрогеназа (ГДГ) – КФ 1.4.1.2 каталізує взаємоперетворення  $\alpha$ -кетоглутарату і глутамату, при якому відбувається трансформація неорганічного іону амонію та органічного  $\alpha$ -амінного азоту. Роль відновника може відігравати НАДН або НАДФН [22]. Далі за дії трансаміназ азот глутамінової кислоти перерозподіляється, включаючись до складу інших амінокислот [17].

Глутамінсинтетаза (ГС) – КФ 6.3.1.2, каталізує ключову реакцію асиміляції аміаку, а продукт реакції – глутамін бере участь у синтезі усіх найважливіших азотовмісних метаболітів клітини (аденозинмонофосфат, цитидинтрифосфат, *para*-амінобензойна кислота, НАД<sup>+</sup>, триптофан, гістидин, аспарагін та ін.) [7].

Значною модифікуючою здатністю щодо азотного обміну у водоростей володіють різні токсиканти, насамперед іони металів, включно важких ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  тощо), що можуть заміщати в активних центрах цих ферментів іони-кофактори ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) або видозмінювати молекули ферментів, оскільки ті є складними ферментами [2, 3, 8, 19, 22].

Виходячи з зазначеного, метою дослідження було вивчення активності даних ферментів (ГДГ-НАД(Ф)Н і ГС) у водоростей різного систематичного положення – *Anabaena cylindrica* (Cyanophyta), *Desmodesmus communis* (Chlorophyta) і *Navicula atomus* (Bacillariophyta), та вміст аміаку у середовищі культивування при фізіологічних умовах вирощування та за дії металів  $\text{Zn}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$ .

**Матеріал і методи досліджень**

Об'єктами лабораторних досліджень були альгологічно чисті культури зелених (*Desmodesmus communis* (Hegew.), синьозелених (*Anabaena cylindrica* Lemm.) та діатомових (*Navicula atomus* (Näg.) Grun.) водоростей, отриманих із колекцій Інститутів ботаніки та гідробіології НАН України.

Зелені та синьозелені водорості культивували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горема №11 при температурі  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  та освітленні лампами денного світла [16]. Діатомею *N. atomus* вирощували на середовищі Болда при температурі  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  за природного освітлення (північна експозиція) [26].

В експериментальних умовах у культуральне середовище водоростей додавали водні розчини солей  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  у розрахунку на кількість іонів  $\text{Zn}^{2+}$  – 1,0 мг/дм<sup>3</sup>, 2,0 мг/дм<sup>3</sup> і 5,0 мг/дм<sup>3</sup> та іонів  $\text{Pb}^{2+}$  – 0,03 мг/дм<sup>3</sup>, 0,06 мг/дм<sup>3</sup> та 0,15 мг/дм<sup>3</sup>, що відповідає 1, 2 і 5 ГДК санітарно-токсикологічної шкідливості.

Відбір біомаси водоростей здійснювали на початку досліду (через 2 години після внесення металу) і на 1, 3, 5, 10 та 15-ту доби експерименту. Як контроль використовували культури водоростей, вирощених у відсутності солей цинку (крім наявного у складі самого живильного середовища) та свинцю.

Активність глутамінсинтетази досліджували в синтетазній реакції фосфатним методом [9]. Реакційна суміш при цьому містила: 25 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,2); 16 мМ глутамату натрію; 6 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 6 мМ  $\text{MgSO}_4$ ; 15 мМ АТФ та гомогенат клітин водоростей, отриманий на розчині культивування в гомогенізаторі при 2 000 об./хв., в кількості, необхідній для утворення 1-10 мкмоль глутаміну протягом 45 хв. при  $35 - 37^\circ\text{C}$ . Реакцію зупиняли додаванням визначених кількостей суміші 1,8%  $\text{FeSO}_4$  у 0,3 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  та 6,6 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  у 7,5М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  і отриманий розчин фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при 700 нм проти контролю. Ферментну активність виражали в мкмоль  $\text{P}_n$ /мг білку·хв.

Активність глутаматдегідрогенази визначали спектрофотометричним методом за швидкістю окиснення НАДН або НАДФН в реакційній суміші, що містила: 50 мМ трис-НСІ буфера (рН 7,2 або 8,3); 10 мМ  $\alpha$ -кетоглутарату; 0,025 мМ НАДН або НАДФН; 20 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  і гомогенат клітин водоростей. Ферментну активність виражали в мкмоль НАДН (НАДФН)/мг білку·хв [20].

Вміст білків в усіх дослідженнях визначали згідно методики Лоурі [30]. Вміст амонійного азоту встановлювали колориметрично за методом Неслера [15]. Одержані дані опрацьовані методами варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [14].

**Результати досліджень та їх обговорення**

У результаті проведених досліджень встановлено роль окремих ферментів азотного обміну у водоростей залежно від їх систематичного положення (табл. 1).

Таблиця 1

Активність ферментів азотного обміну у водоростей та вміст іонів  $\text{NH}_4^+$  у середовищі їх культивування, ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Активність ферментів	Види водоростей		
	<i>A. cylindrica</i>	<i>D. communis</i>	<i>N. atomus</i>
НАДН-глутаматдегідрогеназа, мкмоль НАДН / мг білку·хв	$(2,57 \pm 0,21) \cdot 10^{-3}$	$(10,25 \pm 0,23) \cdot 10^{-3}$	–
НАДФН-глутаматдегідрогеназа, мкмоль НАДФН / мг білку·хв	$(2,23 \pm 0,28) \cdot 10^{-3}$	$(14,51 \pm 0,53) \cdot 10^{-3}$	–
Глутамінсинтетаза, мкмоль $\text{P}_n$ / мг білку·хв	$(32,20 \pm 2,87) \cdot 10^{-3}$	$(8,87 \pm 0,15) \cdot 10^{-1}$	$(2,50 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$
$[\text{NH}_4^+]$ , мг N/дм <sup>3</sup>	$0,283 \pm 0,014$	$0,134 \pm 0,012$	$0,029 \pm 0,001$
рН	9,45 – 9,50	9,35 – 9,45	7,25 – 7,30

Примітка. “—” – активність ферменту не визначали

*Роль глутаматдегідрогенази.* Глутаматдегідрогеназа є одним з найпоширеніших ферментів у всіх організмів [23]. Вона один з основних ферментів метаболізму амонійного азоту і, як правило, НАДФН-ГДГ є анаболічним ферментом та здійснює амінування 2-

оксоглутарату, а НАДН-ГДГ – катаболічним ферментом і здійснює дезамінування глутамату [12, 23]. Глутаматдегідрогеназа водоростей активна як з НАДН, так і НАДФН. Для здійснення окислювального дезамінування глутамінової кислоти з наступним перетворенням  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти в циклі трикарбонових кислот використовується НАДН, а відновне амінування  $\alpha$ -кетоглутару здійснюється за участю НАДФН [11, 17, 22]. Отже, спрямування реакції та активність ферменту визначається як коферментом, так і концентрацією субстратів [22]. Тому, відсутність результатів щодо активності ГДГ у діатомової водорості *N. atomus*, можливо, зумовлена її низькою активністю, бо, як зазначено у деяких роботах [12, 27], за нормальних умов ГДГ може бути репресованою (неактивною), а ефективно брати участь в асиміляції амонію лише при високій його концентрації. У нашому випадку це підтверджується найнижчим вмістом аміаку у середовищі культивування. Для синьозелених і зелених водоростей виявлена досить низька активність обох глутаматдегідрогеназ, що насамперед обумовлено її низькою спорідненістю до іону амонію [19, 33] та, відповідно, невисоким вмістом аміаку у середовищі. Разом з тим, активності обох форм ГДГ у зелених водоростей є у кілька разів вищі порівняно із ціанеями, що зумовлене вищою фізіологічною активністю та еукаріотичною клітинною будовою хлорококових [6, 22], оскільки глутаматдегідрогеназа є мітохондріальним ферментом [23]. При цьому, активність амонійзв'язуючих ферментів у *A. cylindrica* та *N. atomus* була лише у кілька разів нижчою, ніж у *D. communis*, що вказує на еволюційну, біохімічну та фізіологічну близькість організації азотного обміну у водоростей.

На дію надлишкової кількості металів у водних організмів виробляються специфічні захисні реакції, які дозволяють їм протидіяти впливу токсикантів [5]. Очевидно, що основний вплив цинку на азотний обмін здійснюється через глутаматдегідрогеназу, яка може містити у складі молекули цинк [24]. Доведено, що дефіцит металу у середовищі знижує активність ГДГ та зменшує кількість глутамінової кислоти у клітинах рослин [22, 24].

Найменша концентрація іонів цинку (1,0 мг/л) зумовлювала активацію ферменту *A. cylindrica* протягом усього періоду експозиції.

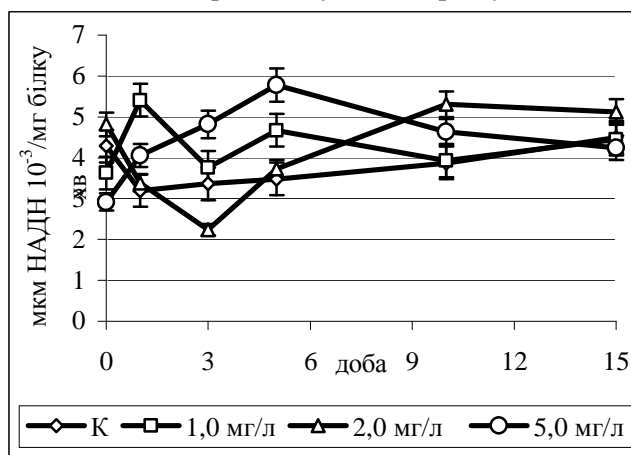


Рис. 1. Активність НАДН – залежної ГДГ *A. cylindrica* за дії  $Zn^{2+}$

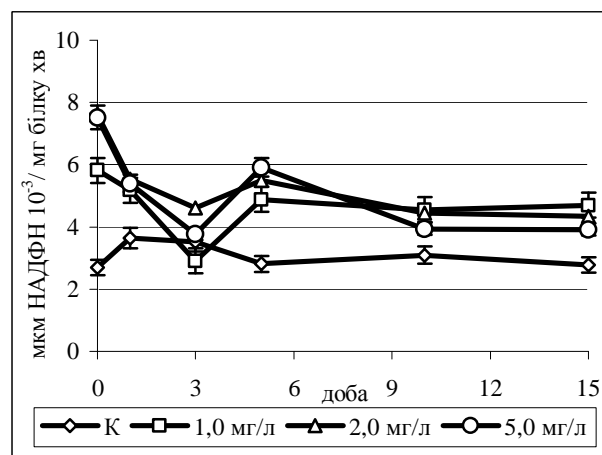


Рис. 2. Активність НАДФН – залежної ГДГ *A. cylindrica* за дії  $Zn^{2+}$

Поряд з цим, коливання значень були суттєвими, але не перевищували контрольні величини. Щодо вищих концентрацій іонів  $Zn^{2+}$  (2,0 і 5,0 мг/дм<sup>3</sup>), то вони виявляли протилежний вплив на активність НАДН-ГДГ синьозеленої водорості. Загалом, максимальна концентрація металу викликала підвищення функціональної активності ферменту, яка на кінець досліджу була такою ж як в контролі. Поряд з цим, вплив цинку в кількостях, що відповідали 2 і 5 ГДК, на активність НАДФН-ГДГ *A. cylindrica* був практично однаковим – спочатку активність ферменту зростала майже у 2,7 рази, а потім знижувалася, однак на закінчення експерименту залишалася вищою від контрольних значень відповідно на 50% і 35%. Щодо до дії свинцю, то встановлено, що активності амінуючої та дезамінуючої форм ферменту у клітинах синьозеленої водорості *A. cylindrica* є досить низькими, що може свідчити про

незначний рівень каталітичної активності та високу чутливість до присутності іонів цього металу (рис 3, 4).

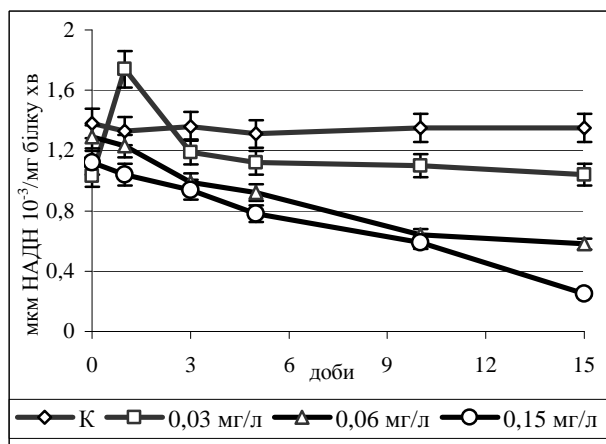


Рис. 3. Активність НАДН – залежної ГДГ *A. cylindrica* за дії Pb<sup>2+</sup>

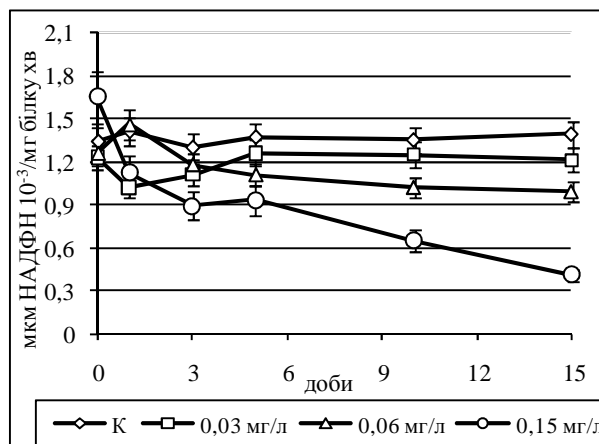


Рис. 4. Активність НАДФН – залежної ГДГ *A. cylindrica* за дії Pb<sup>2+</sup>

Загалом, за дії свинцю активність НАДФН-залежної ГДГ була дещо вищою, ніж активність НАДН-форми. На початку досліду мінімальна концентрація свинцю у середовищі викликала активацію НАД-глутаматдегідрогенази та інгібування другої, проте на кінець досліду її величини стали близькими до контролю, але не перевищували його. За дії підвищених концентрацій іонів Pb<sup>2+</sup> (0,06 мг/дм<sup>3</sup> і 0,15 мг/дм<sup>3</sup>) функціонування НАД-ГДГ знижується від моменту внесення токсиканту у середовище і до кінця експозиції. Разом з цим, НАДФ-ГДГ лише протягом першої доби активно здійснює функцію амінування, однак далі активність ферменту у *A. cylindrica* поступово знижувалася. Інгібуючий вплив свинцю при концентрації 5 ГДК був яскравіше виражений, ніж при 2 ГДК – на 15 добу експозиції активність НАДФН-ГДГ була відповідно нижчою у 3,4 та у 1,2 рази від контрольного значення.

Щодо дії іонів цинку на зелену водорість *D. communis*, то їх наявність зумовлювала, загалом, подібний вплив на обидві форми глутаматдегідрогенази (рис. 5, 6.).

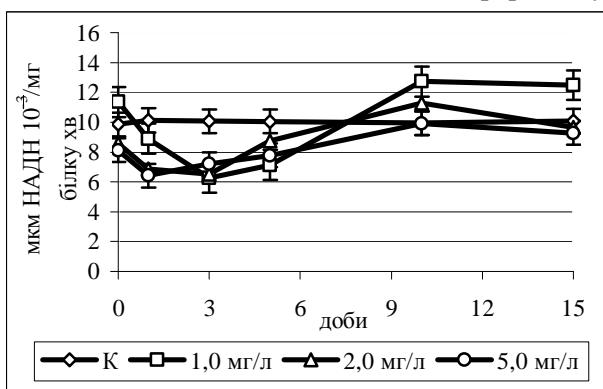


Рис. 5. Активність НАДН – залежної ГДГ *D. communis* за дії Zn<sup>2+</sup>

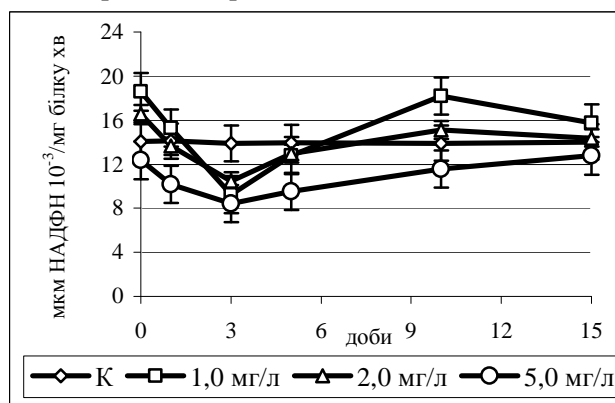


Рис. 6. Активність НАДФН – залежної ГДГ *D. communis* за дії Zn<sup>2+</sup>

Так, зокрема, внесення іонів Zn<sup>2+</sup> у концентрації 1,0 мг/дм<sup>3</sup> стимулювало активність ферменту, і більшою мірою це стосувалося анаболічної форми. Упродовж наступних трьох діб за дії всіх концентрацій іонів Zn<sup>2+</sup> спостерігалася зниження активності, яке стосувалося як НАДН- так і НАДФН-ГДГ. Разом з тим, починаючи з другої половини досліду за дії цинку на рівні 1,0 мг/дм<sup>3</sup> та 2,0 мг/дм<sup>3</sup> величини активності анаболічної та катаболічної форм ферменту у *D. communis* наближалися до контрольних значень і до кінця експозиції залишалися незмінними для досліду з 2 ГДК металу, а для досліду з 1 ГДК – збільшилися у середньому на 25%. Максимальна концентрація цинку, в цілому, зумовила інгібування НАДН-ГДГ і НАДФН-

ГДГ зеленої водорості. Зниження активності амінування у *D. communis* було більшим. Так, на третю добу експозиції значення НАДН-ГДГ було на 30%, а НАДФН-ГДГ – на 40% меншим від контрольного варіанту.

Слід відмітити, що на завершення досліду активність НАДН- і НАДФН- залежних глутаматдегідрогеназ за дії всіх концентрацій  $Zn^{2+}$  набула практичного однакового значення з контрольними величинами. У цьому випадку можна відзначити скоріше регулюючий вплив іонів цинку на *D. communis*, ніж токсичний, оскільки змін деструктивного характеру не виявлено і обидві форми ферменту протягом інкубації відновили свої активності.

Дещо іншим виявився вплив свинцю на досліджуваний фермент у зеленої водорості (рис. 7, 8.).

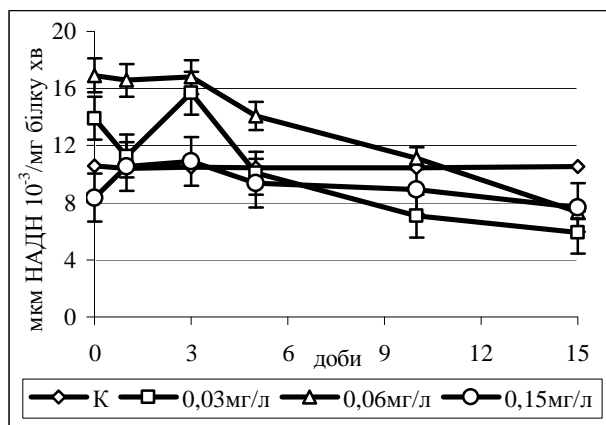


Рис. 7. Активність НАДН – залежної ГДГ *D. communis* за дії  $Pb^{2+}$

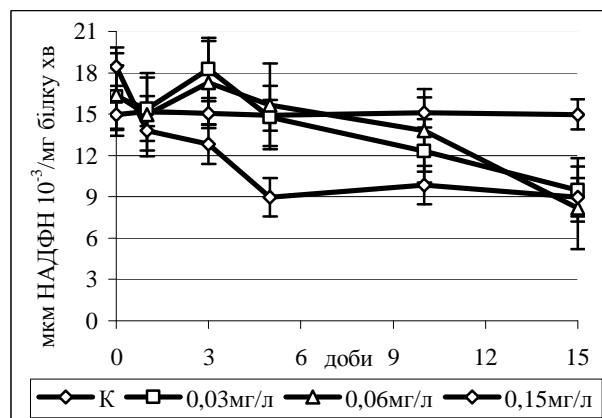


Рис. 8. Активність НАДФН – залежної ГДГ *D. communis* за дії  $Pb^{2+}$

Аналіз отриманих даних показує, що цей метал загалом стимулюючий активність НАДН – та НАДФН – ГДГ. Так, при внесенні у середовище  $Pb^{2+}$  у концентрації 0,03 мг/дм<sup>3</sup> і 0,06 мг/дм<sup>3</sup> підвищувалася активність як анаболічної, так і катаболічної форм глутаматдегідрогенази. Максимальна концентрація свинцю (0,15 мг/дм<sup>3</sup>) пригнічувала як дезамінування, так і амінування, хоча на початку експозиції спостерігалася загальна спрямованість метаболізму в бік амінування. Разом з тим, дія іонів  $Pb^{2+}$  викликала помітне зниження НАДФН-ГДГ, яке на 15-ту добу досліду було в 1,7 рази меншим відносно контрольної величини. Разом з тим, активність НАДН-ГДГ меншою мірою піддавалася токсичному впливу свинцю. Її значення були близькими до контрольних, майже до десятої доби і лише упродовж останніх п'яти діб дії металу зменшилися на 27% відносно контрольних показників. Достатня активність НАДН-глутаматдегідрогенази, скоріш за все, забезпечує цикл Кребса необхідними інтермедіатами [11, 17].

Отже, за рахунок функціонування зворотної глутаматдегідрогеназної системи у клітинах може здійснюватися первинна детоксикація надлишкового аміаку, який утворюється за дії важких металів, а також забезпечується необхідним субстратом ферментна система синтезу амідів при зміщенні рівноваги в бік утворення глутамату. Зміна інтенсивності і спрямування ферментних реакцій основних процесів життєдіяльності свідчить про активацію захисних та пристосувальних реакцій організму у відповідь на токсичний вплив [2, 4, 5]. Разом з тим, встановлено, що у деяких зелених одноклітинних водоростей неспецифічна до коферменту ГДГ знаходиться у мітохондріях, де вона відповідає за дезамінування глутамату, постачаючи на дихальний ланцюг відновлений НАДН і частково регулює енергетичний баланс мітохондрій [23, 29, 31]. Окрім цього, численними дослідженнями на вищих рослинах, водоростях та бактеріях не виявлено універсального механізму регуляції активності глутаматдегідрогенази. Вона визначається типом обміну речовин конкретного організму, органу або тканини, фізіологічною стадією їх розвитку і станом метаболізму у визначений час [12, 22, 27]. Також відзначають, що складніший регуляції підлягає глутаматдегідрогеназа, яка здійснює в клітині катаболічну реакцію [29].

*Роль глутамінсинтетази.* Включення іону амонію в органічні сполуки шляхом реакції глутамінової кислоти і  $\text{NH}_4^+$  з утворенням глутаміну, що каталізується глутамінсинтетазою з використанням енергії АТФ, є базовою реакцією більшості організмів [7, 8, 11, 12]. В подальшому використання глутаміну різноспрямоване, однак у глутаматсинтезній реакції одна з аміногруп переноситься на  $\alpha$ -кетоглутарат і утворюються дві молекули глутамату, унаслідок чого одна з молекул знову включається в цикл, а друга використовується для утворення амінокислот за рахунок реакцій трансамінування [17, 27, 32]. Цей механізм досить ефективний, бо одна молекула субстрату може включити у білки дві молекули амонію, що є енергетично і метаболічно вигідним [21].

Для одноклітинних водоростей встановлено [8, 10], що максимальна активність глутамінсинтетази (в межах фізіологічної норми) спостерігається при тій мінімальній концентрації амонію, яка забезпечує нормальний ріст і розвиток культури. Відповідно і активність НАДФН-глутаматдегідрогенази буде збільшуватися з метою забезпечення необхідної кількості субстрату для ГС, бо обидва ферменти функціонують спряжено. При концентрації аміаку в клітині до 50 мкмоль першою протікає глутамінсинтезна реакція, а при вищих значеннях вмісту аміаку активується глутаматдегідрогеназа [8, 20, 22]. Це запобігає інтоксикації клітини, а також, ймовірно, є еволюційно сформованим механізмом регуляції асиміляції амонію, який допомагає зберегти клітині необхідне співвідношення концентрацій АТФ/(АДФ+АМФ), що порушується при інтенсивному синтезі глутаміну [7, 22].

Відомо, що активність глутамінсинтетази регулюється за принципом негативного зворотного зв'язку («ретроінгібування»), тобто фермент інгібується надлишком продукту реакції – глутаміном, а також сполуками, що є продуктами його метаболізму – аланіном, гліцином, гістидином, триптофаном, тощо [3, 8, 18]. Разом з тим, доведено, що включення аміаку до глутаміну протікає набагато інтенсивніше, ніж до складу інших амінокислот [12].

Встановлено, що основним фактором, який регулює активність глутамінсинтетази, є амоній. Оскільки, фермент характеризується високою спорідненістю до амонію, тому при його значних концентраціях швидко втрачається функціональна активність ферменту [6, 12]. Не менш важливу роль в регуляції активності ГС відіграють двовалентні іони металів, бо вони виконують роль кофакторів і забезпечують активну конформацію ферменту [3, 12], бо активність глутамінсинтетази є оптимальною при співвідношенні  $\text{Me}^{2+}:\text{АТФ} = 3:1$  [7]. Отже, амоній є не тільки єдиною та універсальною вихідною формою неорганічного азоту для біосинтезу білків і кінцевим продуктом їх розпаду, але і ефективним регулятором клітинної активності [8, 23].

Глутамінсинтезна активність в синтезній реакції, як первинна і визначальна детоксуюча гілка через синтез глутаміну, є значно вищою, ніж глутаматдегідрогеназна, у всіх досліджуваних нами видів водоростей.

*Desmodesmus communis* характеризувалася найвищою активністю глутамінсинтетази (табл. 1.), що обумовлено активними метаболічними процесами, які притаманні зеленим водоростям. Серед досліджуваних водоростей ціанобактерія мала найнижчу активність ГС, але вищу, ніж ГДГ, що підтверджує її первинність у процесах асиміляції аміаку. Активність глутамінсинтетази *N. atomus*, скоріш за все, зумовлена наявністю та утилізацією метаболічно утвореного ендogenous аміаку.

Дослідження впливу іонів на активність ГС цинку та свинцю, перший з яких є фізіологічно необхідним, а другий – токсичним, показали, що  $\text{Zn}^{2+}$  загалом стимулює глутамінсинтезу в синьозеленій водорості *A. cylindrica*. Так, мінімальний вміст металу викликав зростання активності ГС протягом перших трьох діб, надалі – зниження, з п'ятої доби дії і до кінця експозиції реакційна здатність ферменту була близька до контрольних значень (рис. 9).

Дія іонів  $\text{Zn}^{2+}$  на рівні 2,0 мг/дм<sup>3</sup> і 5,0 мг/дм<sup>3</sup> була аналогічною. Зокрема, протягом першої доби відмічалася суттєве зростання активності глутамінсинтетази. В подальшому активність ферменту знижувалася до фізіологічної норми, а наступне її збільшення до кінця експозиції на 22% за дії цинку в кількості 2,0 мг/дм<sup>3</sup> та зниження на 30% за дії металу в кількості 5,0 мг/дм<sup>3</sup>, очевидно, вказують на токсичний вплив іонів  $\text{Zn}^{2+}$  у вказаних кількостях. Разом з тим, це може

бути пов'язано з зростанням активності НАДФН-глутаматдегідрогенази, яка постачає глутамат для ГС. Завдяки цьому, відповідно, активний синтез глутаміну на початку експозиції і зумовлює часткове пригнічення глутамінсинтезної реакції у кінці досліджу.

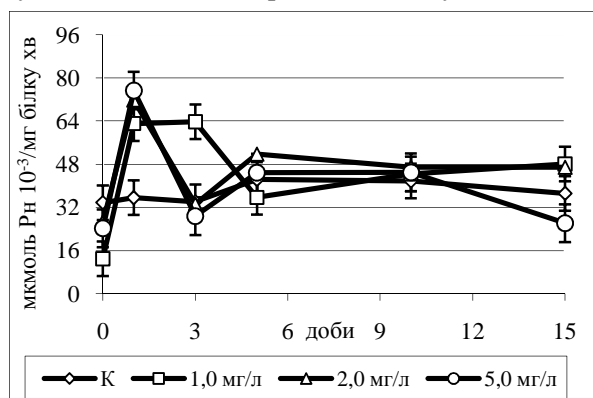


Рис. 9. Активність глутамінсинтезази *A. cylindrica* за дії  $Zn^{2+}$

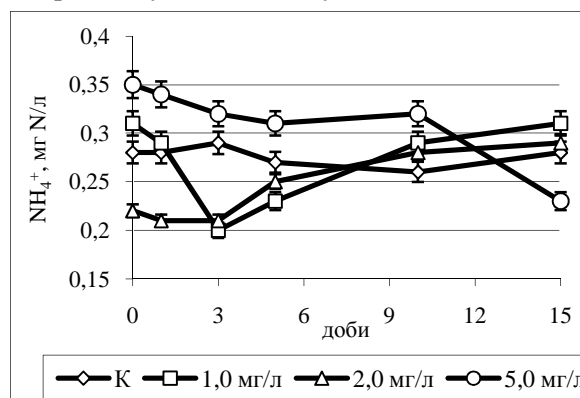


Рис.10. Динаміка вмісту амонійного азоту у культуральному середовищі *A. cylindrica* за дії  $Zn^{2+}$

Як вже зазначалося, активність глутаматдегідрогенази та глутамінсинтезази залежить від вмісту аміаку у середовищі, що є субстратом реакцій, які вони каналізують (рис. 10) [11]. При збільшенні концентрації аміаку у середовищі синьозеленої водорості з іонами цинку на рівні 1,0 мг/дм<sup>3</sup> протягом першої доби, а також на 10-ту та 15-ту добу активність НАДФН-глутаматдегідрогенази у *A. cylindrica* значно зростала. Аналогічним було зростання активності ферменту за дії іонів  $Zn^{2+}$  у кількості 5,0 мг/дм<sup>3</sup>. Активність глутамінсинтезази одразу після внесення іонів металу також дещо зменшувалася. Отже, зміна почерговості амонійзв'язуючих процесів у клітині має певне функціональне і фізіологічне значення. Асиміляція аміаку у глутаматдегідрогеназній реакції з продовженням амідування в глутамін у глутамінсинтезній реакції є дуже ефективним шляхом знешкодження та детоксикації аміаку при його надлишкових токсичних рівнях у клітині (зовнішньому середовищі) [5, 21].

Глутамінсинтезаза зеленої водорості *D. communis* була менш чутливою до дії іонів цинку (рис. 11).

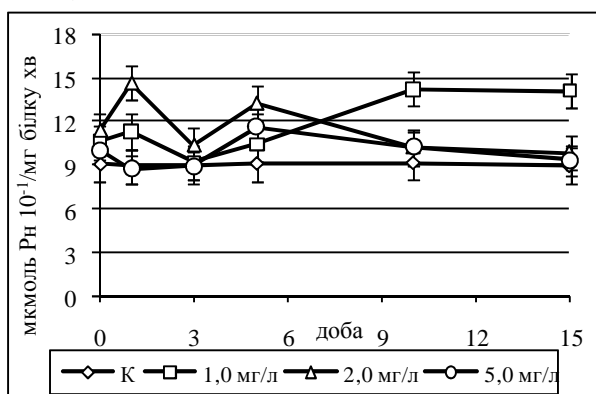


Рис.11. Активність глутамінсинтезази *D. communis* за дії  $Zn^{2+}$

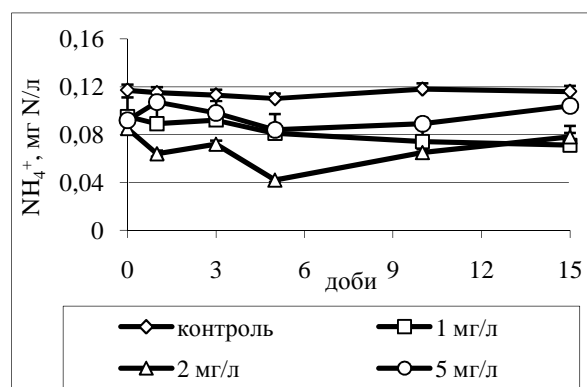


Рис.12. Динаміка вмісту амонійного азоту у культуральному середовищі *D. communis* за дії  $Zn^{2+}$

Помітно, що, активність ферменту збільшувалася за дії металу у всіх досліджуваних концентраціях. Мінімальний вміст цинку (1,0 мг/ дм<sup>3</sup>) зумовлював протягом першої доби зростання ГС на 25%. Надалі значення активності були близькими до норми, і лише на останньому етапі досліджу спостерігали значне збільшення активності, яке перевищувало контрольне майже на 45%. Таке зростання активності глутамінсинтезази у *D. communis*

співпадало з зростанням НАДФН-глутаматдегідрогенази, яка забезпечує першу реакцію субстратом – глутаматом. Дія іонів  $Zn^{2+}$  в концентрації  $2,0 \text{ мг/дм}^3$  призводила до фазового ефекту зміни активності глутамінсинтетази *D. communis* за дії несприятливого чинника. За наявності у культуральному середовищі *D. communis* максимальної концентрації іонів  $Zn^{2+}$  ( $5,0 \text{ мг/дм}^3$ ) суттєвого коливання значень активності не спостерігали.

Аналізуючи дані рис. 12, можна стверджувати, що за дії всіх концентрацій іонів цинку, динаміка аміаку у середовищі культивування зеленої водорості майже співпадала з показниками зростання та зниження активності глутамінсинтетази. Враховуючи ще і активне функціонування амінуючої форми глутаматдегідрогенази, стає цілком зрозумілим зниження концентрації аміаку у середовищі *D. communis* порівняно з контролем.

За інтоксикації іонами цинку культурального середовища діатомової водорості *N. atomus* істотної токсичної дії, пов'язаної з інгібуванням активності глутамінсинтетази, не відмічено (рис. 13.). Спостерігалось лише незначне зниження активності ферменту за дії максимальної концентрації металу, тоді як при мінімальному вмісті іонів  $Zn^{2+}$  змін не виявлено. Лише за дії іонів цинку на рівні  $5,0 \text{ мг/дм}^3$  упродовж другої половини досліду відзначили поступову втрату функціональної активності глутамінсинтетази, а на 15-ту добу експозиції значення активності ГС *N. atomus* виявилось тільки на 12% меншим від контрольного.

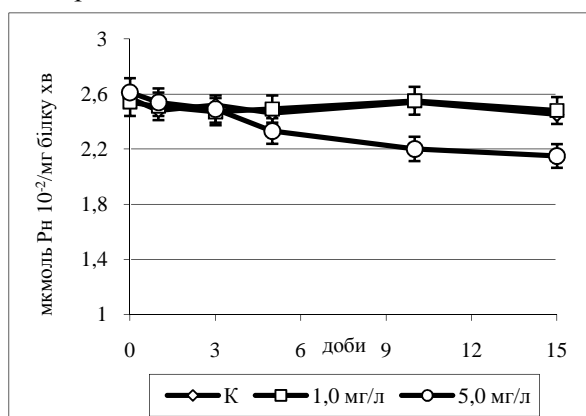


Рис.13. Активність глутамінсинтетази *N. atomus* за дії  $Zn^{2+}$

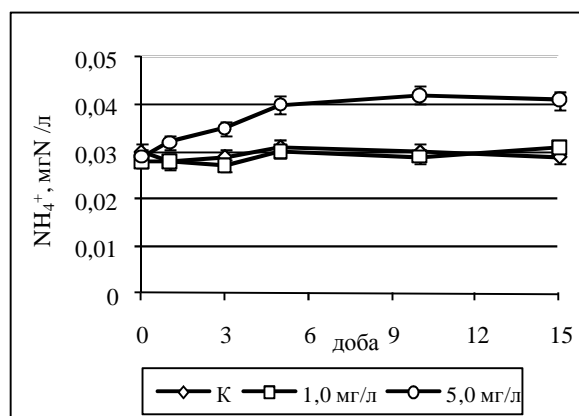


Рис.14. Динаміка вмісту амонійного азоту у культуральному середовищі *N. atomus* за дії  $Zn^{2+}$

Таку ж закономірність спостерігали і щодо вмісту аміаку у культуральному середовищі досліджуваної діатомової водорості, яка співпадала з активністю глутамінсинтетази (рис.14).

Щодо результатів дослідження впливу іонів свинцю (рис. 15) на функціонування глутамінсинтетази у синьозеленої водорості *A. cylindrica*, то можна зазначити, що зміни активності ферменту мають характер, подібний до інтоксикації середовища іонами цинку. За дії іонів  $Pb^{2+}$  виявлено активне зв'язування аміаку ферментом упродовж всього періоду експозиції. Слід відмітити, що дія підвищених концентрацій мала суттєвіший вплив, ніж мінімальна, однак їх вплив на ГС був аналогічним.

Так, зокрема, за концентрації іонів  $Pb^{2+}$   $0,03 \text{ мг/дм}^3$  спостерігалось збільшення активності глутамінсинтетази *A. cylindrica* майже у 2,5 рази протягом перших трьох діб експозиції, тоді як у подальшому відмічали пригнічення ферментної активності. На 15-ту добу досліду вона становила 65% від активності ГС при нормальних фізіологічних умовах культивування. Щодо впливу металу в концентраціях  $0,06 \text{ мг/дм}^3$  та  $0,15 \text{ мг/дм}^3$ , то їх дія зумовила майже 5-тиразове зростання активності ГС упродовж перших п'яти діб експозиції. Однак, з другої половини експозиції спостерігалось поступове інгібування активності ГС і на кінець досліду значення активності ферменту були меншими від контрольних на 20% і 30% відповідно для рівня іонів металу 2 і 5 ГДК, що може бути обумовлено накопиченням у клітині продукту реакції – глутаміну, яке викликає кумулятивне інгібування ферменту [8, 18].



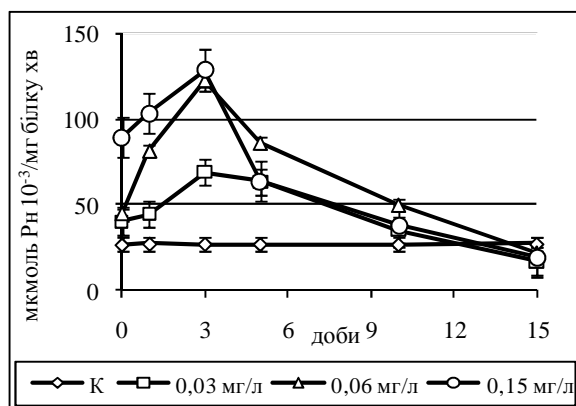


Рис.15. Активність глутамінсинтетази *A. cylindrica* за дії  $Pb^{2+}$

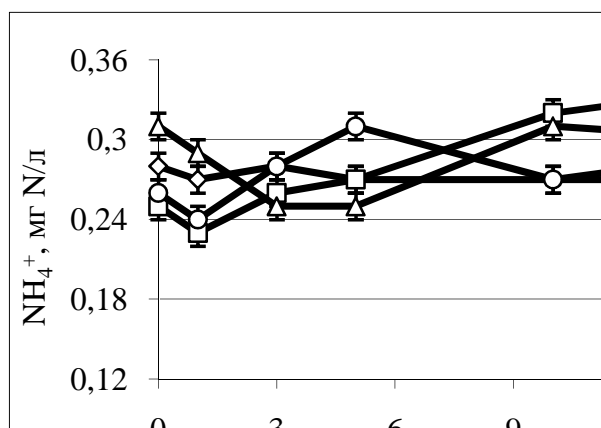


Рис.16. Динаміка вмісту амонійного азоту у культуральному середовищі *A. cylindrica* за дії  $Pb^{2+}$

Порівнюючи отримані дані щодо вмісту аміаку (рис. 16) у середовищі з активністю глутамінсинтетази і глутаматдегідрогенази, можна зазначити, що вирішального значення концентрація аміаку на функціонування зазначених ферментів *A. cylindrica* не мала, оскільки, ні при інгібуванні ГС, ні при значній втраті активності ГДГ, суттєвого зростання концентрації аміаку не спостерігали. До певної міри справджувалося співвідношення між втратою активності ферментами *A. cylindrica* і збільшенням вмісту аміаку лише за дії мінімальної концентрації свинцю.

Отримані результати про активність глутамінсинтетази зеленої водорості *D. communis* в інтоксикованому середовищі свідчать про те, що іони свинцю здійснювали загалом стимулюючу дію (рис. 17). Так, внесення іонів металу в концентраціях відповідно 1, 2 і 5 ГДК протягом першої доби активувало фермент у 1,6, 1,4 і 1,8 рази відповідно. При вмісті металу 2 ГДК глутамінсинтетаза швидко втрачала активність, тоді як за дії 1 і 5 ГДК активно функціонувала до п'ятої доби.

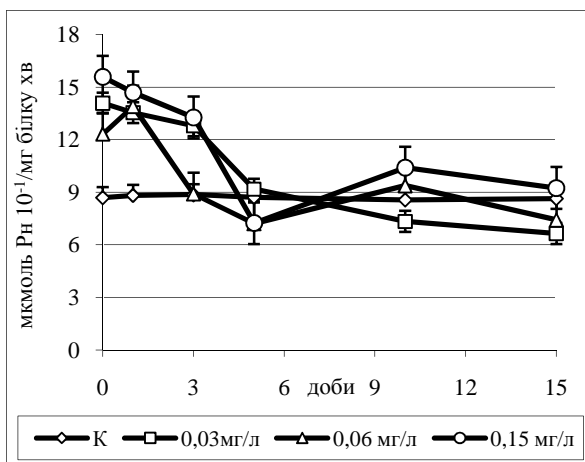


Рис.17. Активність глутамінсинтетази *D. communis* за дії  $Pb^{2+}$

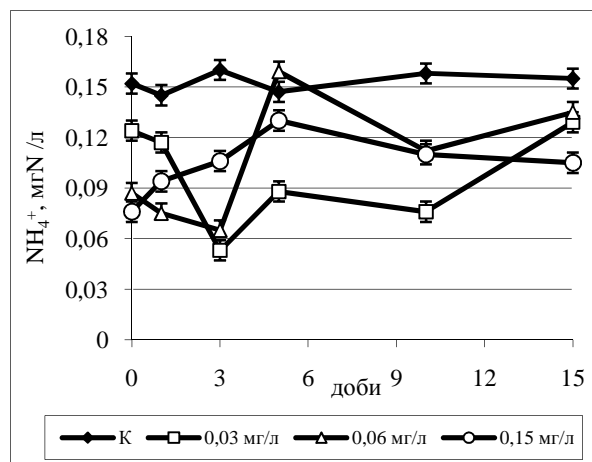


Рис.18. Динаміка вмісту амонійного азоту у культуральному середовищі *D. communis* за дії  $Pb^{2+}$

При вивченні активного центру глутамінсинтетази у зеленої водорості *Chlorella pyrenoidosa* – 82 Т була виявлена присутність значної кількості SH-груп [18], що беруть участь у зв'язуванні АТФ, і які ефективно зв'язують та детоксикують іони важких металів. Очевидно, іони свинцю швидше та ефективніше з ними зв'язуються, що зумовлює значно менший токсичний вплив на фермент.

Як і у випадку з цинком, динаміка вмісту аміаку у культуральному середовищі *D. communis* за дії іонів свинцю була тісно пов'язана з функціонуванням глутамінсинтетази та глутаматдегідрогенази (рис. 18). При високій активності ферментів, які інтенсивно асимілювали амоній, його вміст у середовищі значно зменшувався (у 1,5–3 рази). Слід відмітити, що у даному випадку концентрація аміаку постійно була меншою від концентрації у середовищі контрольних культур.

При дослідженні асиміляції амонію у діатомової водорості *N. atomus* за дії свинцю виявили, що фермент, як і у випадку з цинком, практично не реагує на присутність іонів металу (рис. 19). Ні мінімальна (0,03 мг/дм<sup>3</sup>), ні максимальна (0,15 мг/дм<sup>3</sup>) концентрації іонів Pb<sup>2+</sup> не викликали підвищення чи пригнічення активності глутамінсинтетази. Упродовж всього дослідження функціональні значення ГС практично відповідали контрольним величинам.

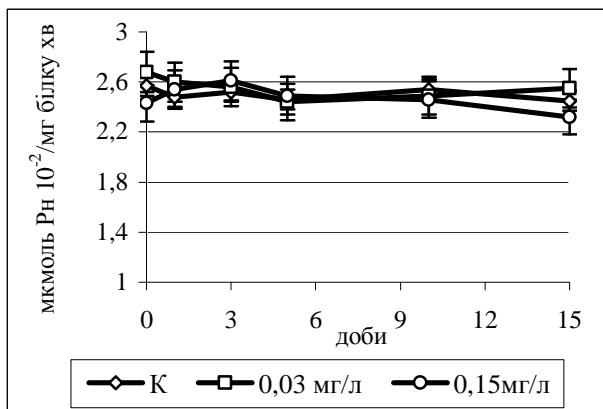


Рис.19. Активність глутамінсинтетази *N. atomus* за дії Pb<sup>2+</sup>

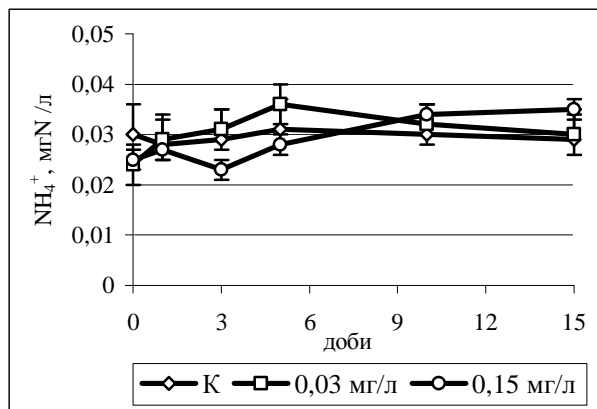


Рис. 20. Динаміка вмісту амонійного азоту у культуральному середовищі *N. atomus* за дії Pb<sup>2+</sup>

Дещо іншою була динаміка вмісту аміаку у культуральному середовищі *N. atomus* відносно виявленої активності глутамінсинтетази (рис. 20). Так, за дії свинцю на рівні 1 ГДК одразу після внесення металу спостерігали зниження вмісту аміаку. Надалі реєструвалося його поступове зростання, а на завершення експозиції вміст аміаку контрольного і дослідного середовища був однаковий. За дії максимальної концентрації іонів Pb<sup>2+</sup> (0,15 мг/дм<sup>3</sup>) у середовищі *N. atomus* відмічали зворотній ефект: зниження вмісту аміаку на початку експозиції, а з другої половини дослідження зростання його вмісту. На 15-ту добу концентрація аміаку у середовищі перевищувала контроль на 20%.

Зазначимо, що за фізіологічних умов концентрація амонійного азоту у культуральному середовищі діатомеї була надзвичайно низькою. Отже, коливання вмісту аміаку у ньому не можуть спричиняти суттєвого впливу на активність амонійзв'язуючих ферментів.

Отже, вплив як біогенного цинку, так і токсичного свинцю у досліджуваному діапазоні концентрацій на водорості проявлявся, здебільшого, у збільшенні активності глутамінсинтетази у першій половині дослідження, що, загалом, спричиняло у другій половині пригнічення синтезу ферменту під дією накопиченого глутаміну та токсичного впливу підвищеної кількості іонів металів.

Отже, підтверджуємо основну роль глутамінсинтетази в асиміляції амонію у даних видів водоростей. В жодному із досліджуваних варіантів не виявлено деструктивного впливу іонів Pb<sup>2+</sup> та Zn<sup>2+</sup> на функціональну активність ферменту, що, можливо, обумовлено складною будовою ферменту та його тонкою регуляцією [3, 4, 7, 12]. Вивчення характеру інгібування ферменту дозволило встановити, що воно розглядається більшою мірою як кумулятивне. Щодо інгібуючого впливу амонію на активність ГС, то він, скоріш за все, є опосередкованим: накопичення синтезованих амінокислот та збільшення кількості АМФ та АДФ змінює енергетичний статус клітини, і за таких умов асиміляційний процес з глутамінсинтетазного перемикається на глутаматдегідрогеназний шлях [18, 20].

Ще одним важливим аспектом регуляції активності глутамінсинтетази є наявність великої кількості множинних молекулярних форм ферменту, які володіють однаковою каталітичною функцією, але мають різну локалізацію у клітині – цитозольну і хлоропластну або мітохондріальну, що, у свою чергу, передбачається особливостями метаболізму клітин чи організмів у його регуляції [8]. В іншому дослідженні було виявлено, що у клітинах зеленої водорості *Stichococcus bacillaris* присутні дві ізоформи глутамінсинтетази [25]. У риб також знайдено дві ізоформи глутамінсинтетази (цитоплазматична і мітохондріальна) у відповідь на дію температури і підвищених концентрацій аміаку у воді [4]. Тому ці ефекти дозволяють припустити можливість мультиферментної відповіді на дію іонів металів безпосередньо або опосередковано через підвищення рівня аміаку [5].

*Комплексна метаболічна адаптація.* Як відомо, біохімічна адаптація здійснюється на трьох рівнях: шляхом зміни функціональної активності метаболічних систем; через підтримання необхідної кількості функціональних макромолекул та шляхом синтезу їх нових типів [2, 21]. У змінюваному водному середовищі організм гідробіонтів для забезпечення виживання насамперед намагається підтримати на необхідному рівні метаболічну активність. За дії іонів металів у підвищених концентраціях у середовищі культивування у клітинах водоростей виявляються певні зміни в різних ланках метаболізму, які зумовлюють активізацію, пригнічення чи функціональні перебудови останніх. Насамперед, вони пов'язані з функціонуванням клітинних мембран. Далі, з зростанням в клітинах концентрації важких металів, змінюється функціонування ферментативних систем в цілому, але не завжди у бік інгібування та деструкції. Зміна іонного гомеостазу, ймовірно, зумовлює синтез макромолекул, що частково компенсують вплив металів та забезпечують нормальне функціонування клітин водоростей [5].

Адаптивна відповідь організму визначається, насамперед, ступенем акумулювання металу у клітинах, а також його природою та фізіологічною роллю в організмі, оскільки кожний ксенобіотик володіє певними механізмами дії та обумовлює специфічні реакції – відповіді на зміни, що ним викликані. Тому досить важливо було з'ясувати те, як клітини водоростей реалізують системи захисту за значного накопичення металів. Проведені дослідження дозволили підтвердити існування певних адаптивних механізмів як окремо, так і в їх взаємозв'язку [1].

В табл. 2 наведено узагальнені ефекти щодо впливу іонів цинку та свинцю на активність ферментів азотного метаболізму та ймовірність формування загальних адаптаційних процесів на тлі змін і перебудов метаболічних систем у клітинах водоростей.

Таблиця 2

Зміни спрямування азотного метаболізму у водоростей за дії іонів  $Zn^{2+}$  та  $Pb^{2+}$

Види водоростей	Зміна активності					
	НАДН – ГДГ		НАДФН – ГДГ		ГС	
	$Zn^{2+}$	$Pb^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Pb^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Pb^{2+}$
<i>A. cylindrica</i>	↑→	↗↘	↑↑	↓↓	↑→	↑→
<i>D. communis</i>	↓→	↗↘	↓→	↗↘	↑→	↑→
<i>N. atomus</i>	–	–	–	–	↔	↔

Примітки: ↑↑ – значення показника постійно зростає порівняно з контрольним значенням за впливу всіх концентрацій металів; ↓↓ – значення показника знижується порівняно з контрольним значенням; ↑→ – значення показника зростає при низьких концентраціях токсиканту і знижується, наближуючись до контрольного значення при його високих концентраціях; ↓→ – значення показника знижується і зростає, наближуючись до контрольного значення; ↔ – значення показників близькі до контрольних значень протягом всього експерименту; ↗↘ – значення показника зростає, а потім знижується відносно контрольних значень.

Відомо, що амінокислоти та білки завдяки метаболічній активності можуть впливати на активність багатьох небілкових компонентів [6]. За рахунок активного функціонування системи оборотної глутаматдегідрогенази у клітинах водоростей може здійснюватися первинна детоксикація надлишкового аміаку, який інтенсивно утворюється за дії важких металів, а також забезпечуватися необхідними субстратом ферментна система синтезу амідів. Крім того, певну роль глутаматдегідрогеназа відіграє у підтриманні гомеостазу метаболітів та регуляції швидкості аеробної системи окислення у циклі трикарбонових кислот, де важливе місце займає  $\alpha$ -кетоглутарат, що є субстратом цієї реакції. Це більшою мірою стосується НАД-ГДГ, яка перетворює глутамат в  $\alpha$ -кетоглутарат та відновлює НАД<sup>+</sup>. Іони обох металів активують розщеплення глутамінової кислоти у ціаней *A. cylindrica* на початку експозиції, що відповідає збільшенню активності цитохромоксидази за дії іонів Zn<sup>2+</sup>, яка використовує відновлені нуклеотиди. Pb<sup>2+</sup> виявляє подібну дію на процес дезамінування як у зеленої водорості *D. communis*, так і в синьо-зеленої: зростання функціональної активності та поступове її пригнічення протягом експозиції, що обумовлено, скоріш за все, структурно-функціональними порушеннями у клітинах водоростей впливом свинцю [1].

Підвищення у водоростей за дії низьких концентрацій цинку та свинцю активності НАДФ-ГДГ, що здійснює амінування, з ймовірним наступним трансамінуванням у аланін- та аспартат- амінотрансферазних реакціях, спричинено, скоріш за все, використанням вільних амінокислот у синтезі адаптивних захисних білків – металотіонеїнів [13]. Важливо, що у жодному випадку ми не спостерігали визначальної ролі НАДФ – ГДГ у *A. cylindrica* та *D. communis*, що свідчить про неефективність зв'язування аміаку цим шляхом. Це, ймовірно, забезпечується певними механізмами, які викликають репресію синтезу ферменту або пригнічення його активності, оскільки за здійснення основної функції анаболічної форми ГДГ можливе вичерпання внутрішньоклітинного фонду  $\alpha$ -кетоглутарату, нестача якого здатна порушити функціонування окисних процесів у ЦТК, а відтак – енергетичне забезпечення клітини [6, 11, 17]. Можливо, що для активного функціонування НАДФ – ГДГ необхідні вищі концентрації аміаку, не тільки у середовищі, а й у середині клітини, які лише можуть утворюватися при патологічних катаболічних процесах [1].

У результатах досліджень можна відзначити скоріше регулюючий вплив іонів цинку на синьо-зелені і зелені водорості, ніж токсичний, оскільки змін деструктивного характеру не виявлено і обидві форми глутаматдегідрогенази за період інкубації відновили активність, і перебіг каталізуючих ними реакцій був на рівні фізіологічної норми. Щодо іонів свинцю, то його інгібуючий вплив на фермент водоростей був значніший, особливо у високих концентраціях, що, можливо, є наслідком пошкодження та перебудов клітинних структур, з якими пов'язана локалізація глутаматдегідрогенази.

Як вже зазначалося, активність глутамінсинтетази піддається дуже складній регуляції, що не дозволяє зробити однозначного висновку щодо зміни та регуляції активності ферменту у клітинах водоростей. Можемо лише підтвердити основну роль глутамінсинтетази в асиміляції амонію та його амідуванні для всіх видів водоростей, відмітити досить високу активність та стабільність функціонування ферменту. Адже, в жодному із досліджуваних варіантів не виявлено деструктивного впливу іонів металів Pb<sup>2+</sup> та Zn<sup>2+</sup> на функціональну активності глутамінсинтетази.

## Висновки

Адаптаційний потенціал прісноводних водоростей в нормальних фізіологічних умовах характеризується загальними принципами, однак є видоспецифічним та спрямованим на реалізацію стратегій адаптації до умов існування, що підтверджується реакціями на дію підвищених концентрацій іонів металів, змінами у функціонуванні основних метаболічних систем та активацію компенсаторних систем зменшення їх деструктивного впливу.

Адаптаційні перебудови азотого метаболізму за участю глутаматдегідрогенази та глутамінсинтетази в умовах дії іонів металів мають фазовий характер, що проявляється у зміні активності залежно від концентрації металів та виду водоростей.

1. Боднар О.І. Адаптивні властивості водоростей за дії іонів металів : автореф. ... канд. біол. наук. : 03.00.17 – гідробіологія / О.І. Боднар. – К., 2009. – 24 с.
2. Гандзюра В.П. Поняття шкодочинності в екології / В.П. Гандзюра, В.В. Грубінко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2007. – № 1 (31). – С. 11 – 31.
3. Громько Е.А. Глутамінсинтетаза растений: свойства, регуляция и роль в ассимиляции аммиака : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.00.04 – биохимия / Е.А. Громько. – М., 1992. – 40 с.
4. Грубінко В.В. Адаптивні реакції риб до дії аміаку водного середовища : автореф. дис. ... докт. біол. наук : 03.00.17, 03.00.04 – гідробіологія, біохімія / В.В. Грубінко. – К., 1995. – 44 с.
5. Грубінко В.В. Інтегральна оцінка токсичного ураження у біологічних системах / В.В. Грубінко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – Спецвипуск «Гідроекологія». – 2005. – № 3 (26). – С. 111 – 114.
6. Гудвин Т. Введение в биохимию растений. Т. 1 / Т. Гудвин, Э. Мерсер ; под ред. В.Л. Кретовича. – М. : Мир, 1986. – 392 [1] с.
7. Евстигнеева З.Г. Глутаминсинтетаза растений: ее роль в метаболизме, регуляция, структура, механизм реакции // Энзимология ассимиляции аммония у растений : сб. научн. трудов / З.Г. Евстигнеева / Итоги науки и техники. Серия «Биологическая химия». – М.:ВИНИТИ, 1987. – Т. 24. – С. 105–146.
8. Евстигнеева З.Г. Глутаминсинтетаза: роль в азотном метаболизме растений, регуляция и структура / З.Г. Евстигнеева / Мат. 41-го Баховского чтения. – М. : Наука, 1988. – 64 с.
9. Евстигнеева З.Г. Определение активности глутаминсинтетазы / З.Г. Евстигнеева, Е.А. Громько, К.Б. Асеева // Биохимические методы. – М. : Наука, 1980. – С. 84 – 86.
10. Клоченко П.Д. Метаболізм азоту у прісноводних водоростей та його роль у формуванні їх угруповань і якості води : автореф. дис. ... докт. біол. наук : 03.00.17 – гідробіологія / П.Д. Клоченко. – К., 2002. – 42 с.
11. Кретович В.Л. Биохимия растений : учеб. пособие для студ. биол. спец. / В.Л. Кретович. – М. : Высш. школа, 1980. – 445 с.
12. Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота в растениях / В.Л. Кретович. – М.: Наука, 1987. – 486 с.
13. Курант В.З. Роль білкового обміну в адаптації риб до дії іонів важких металів : автореф. дис. ... докт. біол. наук : 03.00.10 – іхтіологія / В.З. Курант. – К., 2003. – 42, [2] с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : Высш. школа, 1990. – 352 с.
15. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбникова. – М. : Химия, 1974. – 336 с.
16. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / [Сирено Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др.] ; под ред. А.В. Топачевского. – К. : Наук. думка, 1975. – 247 с.
17. Мецлер Д. Биохимия. Химическая реакция в живой клетке / Д. Мецлер. – М. : Мир, 1990. – Т. 2. – 367 с.
18. Расулов А.С. Глутаминсинтетаза одноклеточных зеленых водорослей и ее регуляция : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.00.04 – биохимия / А.С. Расулов. – М., 1990. – 43 с.
19. Софьин А.В. Глутаматдегідрогеназа и регуляция ферментов ассимиляции аммония в одноклеточной зелёной водоросли : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 – биохимия / А.В. Софьин. – М., 1984. – 28 с.
20. Софьин А.В. Глутаматдегідрогеназы одноклеточной зелёной водоросли *Ankistrodesmus braunii*. Кинетические свойства / А.В. Софьин, В.Р. Шатилов, В.Л. Кретович // Биохимия. – 1984. – Т. 49, № 2. – С. 334 – 343.
21. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро – М. : Мир, 1988. – 568 с.
22. Шатилов В.Р. Глутаматдегідрогеназы // Энзимология ассимиляция аммония у растений : сб. научн. трудов / В.Р. Шатилов / Итоги науки и техники. Серия «Биологическая химия»– М.:ВИНИТИ, 1987. – Т. 24. – С. 4 – 104.

23. Шатилов В.Р. Энзимология ассимиляции аммония в одноклеточных зеленых водорослей : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.00.04 – биохимия / В.Р. Шатилов. – М., 1986. – 46 с.
24. Школьник М.Я. Растения в экстремальных условиях минерального питания / М.Я. Школьник. – Л. : Наука, 1983. – 176 с.
25. Ahmad Iftikhar, Hellebust J.A. Glutamine synthetase isoenzymes in the green soil alga *Stichococcus bacillaris* Naeg // Plant physiology. – 1987. – Vol. 83, № 2. – P. 259 – 261.
26. Beakes G., Canter H.M., Jaworski G.H.M. Zoospores ultrastructure of *Zygorhizidium affluences* Canter and *Z. planktonicum* Canter, two chytrids parasitizing the diatom *Asterionella formosa* Hassall. // Can. J. Bot. – 1988. – Vol. 66, № 6. – P. 1054 – 1067.
27. Brown C.M., Cole J.A. Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi / In: Payne J.W. Microorganisms and nitrogen sources. – Wiley, New York, 1980. – P. 511 – 535.
28. De Boer J.A. Nutrients. In: The Biology of Seaweeds / Eds. Lobban C.S., Wynne M.J. – Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981. – P. 356 – 392.
29. Hemmings B.A. Phosphorylation and proteolysis regulate the NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 1980. – Vol. 122, № 2. – P. 297 – 302.
30. Lowry O. H., Rosenbroug N. I., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265 – 275.
31. Mifflin B.J., Habash D.Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in nitrogen utilization of crops // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53, № 370. – P. 979 – 987.
32. Syrett P.J. Nitrogen metabolism of microalgae // Can. Bull. Fish. and Aquatic Sci. – 1981. – Vol. 210. – P. 182 – 210.
33. Wootton J.C. Re-assessment of ammonium-ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases. Activation of the *Neurospora crassa* enzyme by ammonium and rubidium ions // Biochem J. – 1983. – Vol. 209, № 2. – P. 527 – 531.

*О.И. Боднар, А.И. Горда, В.В. Грубинко*

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка  
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь, 46027

#### РОЛЬ АЗОТНОГО ОБМЕНА В АДАПТАЦИИ ВОДОРΟΣЛЕЙ К ИОНАМ МЕТАЛЛОВ

Адаптационный потенциал водорослей в нормальных физиологических условиях характеризуется общими принципами, однако видоспецифичен и направлен на реализацию стратегий адаптации к условиям существования, что подтверждается реакциями на действие повышенных концентраций ионов металлов, изменениями в функционировании основных метаболических систем и активацией компенсаторных систем уменьшения их деструктивного влияния. Адаптационные перестройки азотного метаболизма при участии глутаматдегидрогеназы и глутаминсинтетазы в условиях действия ионов металлов носят фазовый характер, который проявляется в изменении их активности в зависимости от концентрации металлов и вида водорослей.

*Ключевые слова:* пресноводные водоросли, азотный метаболизм, глутаматдегидрогеназа, глутаминсинтетаза, ионы цинка и свинца

*O.I. Bodnar, A.I. Gorda, V.V. Grubinko*

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

#### A ROLE OF NITRIC METABOLISM IN THE ADAPTATION OF FRESHWATER ALGAE TO IONS OF METALS

The thesis is dealt with the study of the peculiarities of nitrogen metabolism in representatives of freshwater algae (*Cyanophyta*, *Chlorophyta*, *Bacillariophyta*) under normal conditions and under the influence of the ions of zinc and lead in the concentrations equal to 1, 2, and 5 their limiting permissible concentrations, and also with the study of their physiological and biochemical response to the influence of the above mentioned metals.

It has been found that in all the studied species of algae enzymatic systems of their are more sensitive to the influence of high concentrations of zinc and lead as compared to the enzymes of nitrogen metabolism (glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase, which proved to be of crucial importance in ammonium assimilation).

*Keywords: nitrogen metabolism, freshwater algae (Cyanophyta, Chlorophyta, Bacillariophyta), zinc, lead, glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase*

Рекомендує до друку  
В.З. Курант

Надійшла 25.02.2010

УДК [579.68:582.23/26]:574.6

Н.І. КІРПЕНКО

Інститут гідробіології НАН України  
пр-т Героїв Сталінграду, 12, Київ, 04210

## **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ВОДОРОСТЕЙ У ЗМІШАНИХ КУЛЬТУРАХ**

Досліджено фізіолого-біохімічні особливості функціонування водоростей у змішаних культурах. Спільне вирощування зелених водоростей *Desmodesmus communis* та *Tetraedron caudatum* не супроводжувалось істотними змінами інтенсивності ростових процесів. Водночас інші фізіолого-біохімічні показники водоростей у змішаній культурі помітно відрізнялись порівняно з монокультурами. Найбільш суттєвими були зміни інтенсивності нагромадження позаклітинних органічних речовин, кількості ендогенних білків, активності каталази та інтенсивності хемілюмінесценції, яка характеризує прооксидатно-антиоксидантний баланс досліджуваної системи. Отже, незважаючи на відсутність вираженого антагонізму, взаємодія водоростей супроводжується значними порушеннями їхніх метаболічних процесів.

*Ключові слова: мікрowodорості, змішані культури, кількість клітин, інтенсивність фотосинтезу*

Функціонування водоростей, як основа біологічної продуктивності водойм формується під впливом різноманітних чинників, що зумовлюють як структуру, так і продукційні характеристики альгоугруповань. Незважаючи на важливість цього напряму гідробіологічних досліджень та значну кількість публікацій з цього питання закономірності формування складу й метаболічної активності угруповань водоростей досі остаточно не з'ясовані. Зокрема, нема достатньо повних уявлень щодо ролі та механізмів аллопатичних взаємовпливів. Якщо вплив вищих водяних рослин на розвиток представників альгофлори досить часто аналізують у літературі [13, 14, 24], то взаємовідносини мікрowodоростей вивчені недостатньо.

Основним методом з'ясування особливостей і закономірностей взаємовпливу водоростей є дослідження на культурах. В лабораторних експериментах, стабілізувавши всі інші параметри вирощування, можна простежити реакцію водоростей саме на появу в середовищі їхнього росту клітин іншого виду. В літературі досить часто наводяться дані щодо змін інтенсивності й характеру росту водоростей в змішаних культурах [15, 20, 21]. Водночас цей показник залежить від інших фізіологічних процесів клітин – фотосинтезу, дихання, екскреції тощо. В зв'язку з цим метою цієї роботи було вивчення змін фізіолого-біохімічних показників водоростей у змішаній культурі порівняно з монокультурами тих самих видів.

### **Матеріал і методи досліджень**

Досліди проведені на зелених хлорококових водоростях *Desmodesmus communis* (Hegew.) Hegew. HPDP-109 та *Tetraedron caudatum* (Corda) Hansg. IBASU-A 277. Культури вирощували