

ВЛИЯНИЕ ФУЛЬВОКИСЛОТ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ, АЗОТНЫЙ И ФОСФОРНЫЙ ОБМЕН У СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

О. В. Василенко¹, П. Д. Клоченко², Т. А. Васильчук², Ю. В. Синюк¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка, г. Тернополь, Украина,

²Институт гидробиологии НАН Украины, г. Киев, Украина,
e-mail: VasylenkoO@mail.ru

Введение

Одной из наиболее распространенных групп органических соединений в поверхностных водах являются гумусовые вещества (Перминова, 2000). Преобладающую их часть составляют фульвокислоты (ФК). Последние оказывают значительное влияние на жизнедеятельность и биопродуктивность гидробионтов, поэтому важной задачей является установление механизмов этого воздействия.

Материалы и методы

Целью наших исследований было изучение влияния ФК на азотный, фосфорный и энергетический обмен у синезеленой водоросли *Calothrix braunii* Born. et Flah. HPDP-16, которую культивировали на среде Фитцджеральда при температуре 25 ± 1 °C и освещении лампами дневного света (2500 лк). Изучали активность ключевых ферментов: НАДН-глутаматдегидрогеназы, щелочной фосфатазы (ЩФ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) при воздействии на них ФК в концентрациях 30 и 80 мг/дм³. Образцы для анализов отбирали на 1, 3, 7 и 14-е сутки выращивания. В качестве контроля использовали культуру без ФК в питательной среде.

Для изучения активности ферментов готовили гомогенаты их биомассы (клетки отделяли от среды с помощью мембранных фильтров Сынпор № 4). Биомассу водорослей гомогенизировали в охлажденном буферном растворе (рН 7,4) следующего состава: 0,5 М сахара, 0,005 М ЕДТА, 0,01 М КСl и 0,001 М MgCl₂ в соотношении 1:5 (сырая масса : буфер).

Активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) определяли ферроцианатным методом (Методы..., 1982). При этом инкубационная

смесь содержала 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,8), 0,1 М янтарной кислоты, 0,025 М ЕДТА и 25 мМ K₃[Fe(CN)₆]. Реакцию останавливали внесением 20% трихлоруксусной кислоты. Спектрофотометрию осуществляли при длине волны 420 нм.

Активность НАДН-глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2) определяли спектрофотометрически по скорости окисления НАДН при 340 нм (Софин, Шатилов, Кретович, 1984) в реакционной смеси, состоящей из 0,05 М трис-НСl буфера (рН 7,2), 0,01 М 2-оксоглутарата, 0,000025 М НАДН и 0,2 М (NH₄)₂HPO₄.

Активность щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) устанавливали по расщеплению фенолфосфата с образованием фенола, окисленное соединение которого с 4-аминофеназоном образует красную окраску раствора, регистрируемую спектрофотометрически при длине волны 490 нм (Камышников, 2000). В ходе работы использовали Na⁺-Na⁺-карбонатный буфер (рН 10,0).

Содержание белка в клетках водорослей определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Полученные данные обработаны методами вариационной статистики (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

Исследования показали заметное влияние ФК на изучаемые ферменты. СДГ – единственный фермент цикла трикарбоновых кислот, принимающий непосредственное участие в образовании макроэргической фосфатной связи, является наиболее чувствительным звеном дыхательной цепи (Маевский, Кондрашова, 1978). После внесения ФК в среду в концентрации 30 мг/дм³ показатели активности СДГ были выше контрольных в 1,6, 5,2 и 2,5 раза, соответственно, на 1-е, 3-е и 7-е сутки. На 14-е сутки эксперимента

активность фермента была близка к показателям в контрольном варианте. Под влиянием ФК в концентрации 80 мг/дм³ также наблюдали увеличение активности исследуемого фермента: на 1-е сутки – в 3,8 раза, на 3-и – в 3,0 раза и на 7-е сутки – в 3,3 раза (по сравнению с контролем). На 14-е сутки величины активности СДГ лишь незначительно превышали показатели в контрольном варианте, но были ниже, чем при концентрации ФК 30 мг/дм³. Следует также отметить, что в случае действия ФК в концентрации 30 мг/дм³ максимум активности фермента наблюдался на 3-и сутки, а при концентрации 80 мг/дм³ – на 1-е сутки опыта.

Противоположное действие оказали ФК на активность НАДН-глутаматдегидрогеназы, активность которой снижалась уже с 1-х суток эксперимента как при концентрации ФК 30 мг/дм³ (в 10,3 раза), так и при 80 мг/дм³ (в 4,4 раза) по сравнению с контролем. На 3-и и 7-е сутки опыта показатели несколько увеличивались, но при этом были все же меньше контрольных значений в 3,9 и 3,5 раза, соответственно. На 14-е сутки активность фермента несколько повышалась по сравнению с предыдущими показателями при концентрации ФК 30 мг/дм³, однако была ниже контрольного варианта в 1,5 раза, а при 80 мг/дм³ – в 9,3 раза. Следует отметить, что резкое уменьшение активности исследуемого фермента в первый день эксперимента, возможно, связано с увеличением содержания в клетках АТФ – аллостерического ингибитора НАДН-глутаматдегидрогеназы, об усилении синтеза которого свидетельствует увеличение активности СДГ.

Активность ЩФ также ингибировалась под влиянием ФК, однако несколько меньше, чем других изученных ферментов. Так, при действии ФК в концентрации 30 мг/дм³ активность фермента на первые сутки опыта снижалась в 1,5 раза, а на 3-и – в 2,2 раза. В то же время, на 7-е сутки эксперимента наблюдалось небольшое возрастание активности ЩФ, а на 14-е сутки она

снова уменьшалась (в 2,8 раза в сравнении с контролем). При концентрации ФК 80 мг/дм³ отмечалось ингибирование активности фермента на протяжении всего эксперимента. В частности, на первые сутки регистрируемый показатель был ниже контрольного в 1,2 раза, а на 14-е – в 1,9 раза. Возможно, что ФК, благодаря комплексобразующей способности, связывают такие необходимые для функционирования ЩФ ионы, как Zn^{+2} и Mg^{+2} .

Заключение

Таким образом, наличие в водной среде фульвокислот можно расценивать как важный фактор, оказывающий влияние на метаболизм синезеленых водорослей в зависимости от времени воздействия и концентрации в среде. Известно (Гандзюра, Грубинко, 2008), что для адаптации организма к токсичной среде эффективное функционирование метаболических систем является наиболее показательным критерием. В случае с СДГ наблюдаемое повышение ее активности может быть связано с включением компенсаторных механизмов энергообразования при повышенных затратах энергии (Парахонский, 2005), в то время как снижение активности фермента на 14-е сутки воздействия ФК, вероятно, можно объяснить истощением адаптационных механизмов энергетического обмена. Последнее может служить объяснением ингибирования ферментов азотного и фосфорного обмена. Поскольку ЩФ является ферментом широкого спектра действия (участвует в фосфорном, углеводном, липидном и нуклеотидном обмене), изменения ее активности может быть связано с нарушением функционирования любого из этих звеньев метаболизма (Ленинджер, 1985). Ингибирование ЩФ, а также НАДН-глутаматдегидрогеназы, на протяжении всего эксперимента свидетельствует об отсутствии у синезеленых водорослей надежного механизма адаптации к воздействию фульвокислот в исследованных концентрациях.

Литература

Гандзюра В. П., Грубинко В. В. Поняття шкодочинності в екології // Наук. зап. ТНПУ ім. В. Гнатюка. – Серія: Біологія. – 2007. – № 1 (31). – С. 11–31.

Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – С. 395–404.

Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 351 с.

Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – 1022 с.

Маевский Е. И., Кондрашова М. Н. Сукцинатная фракция дыхания – наиболее чувствительная характеристика митохондрий при небольших изменениях физиологического состояния животных // Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности: Мат. Всесоюз. Сем. Регуляция энергетического обмена и фи-

физиологического состояния. – Пушино, 1978. – С. 63.

Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохорова. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 273 с.

Парахонский А. П. Механизмы индукции адаптивных и иммунных реакций // *Современные наукоемкие технологии*. – 2005. – № 9. – С. 63.
Перминова И. В. Анализ, классификация и прогноз

свойств гумусовых кислот: Автореф. дис. ... докт. хим. наук. – М., 2000. – 50 с.

Софин А. В., Шатилов В. Р., Кретович В. Л. Глутаматдегидрогеназы одноклеточной зеленой водоросли. Кинетические свойства // *Биохимия*. – 1984. – 49, № 2. – С. 334–345.

Lowry O. H., Rosenbroug N. I., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.

THE INFLUENCE OF FULVIC ACIDS TO ENERGETIC, NITROGEN AND PHOSPHORUS METABOLISM IN BLUE-GREEN ALGAE

O.V. Vasylenko¹, P.D. Klochenko², T.A. Vasilchuk², Y.V. Synyuk¹

¹ *Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University of Ternopil, Ternopil, Ukraine*

² *Institute of Hydrobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*
e-mail: VasylenkoO@mail.ru

The influence of fulvic acids in concentration of 30 mg/dm³ and 80 mg/dm³ on energetic (succinate dehydrogenase), nitrogen (glutamate dehydrogenase) and phosphorus (alkaline phosphatase) metabolism in blue-green (*Calothrix braunii* Born. et Flah.) algae was investigated. Increased activity of succinate dehydrogenase was detected. In case of fulvic acids influence in concentration 30 mg/dm³ the activity

peak was observed on 3 day, at 80 mg/dm³ – on 1 day. On the 14 day of experiment the activity of succinate dehydrogenase was close to control. Both concentrations of fulvic acids decreased glutamate dehydrogenase and alkaline phosphatase activity. Concluded that the reliable adaptation mechanism of blue-green to fulvic acids influence in investigated concentrations is absent.