

УДК 577.122.3: 582.26+(691.74;691.75)

**О.В. ВАСИЛЕНКО, О.И. БОДНАР, Г.Б. ВИНЯРСКАЯ, Ю.В. СИНЮК, В.В. ГРУБИНКО**

Тернопольский нац. педуниверситет им. В. Гнатюка,

ул. М. Кривоноса, 2, 46027 Тернополь, Украина

e-mail: vasylenkoo@mail.ru

## **ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ И АЗОТИСТЫЙ ОБМЕН У *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ. (*CHLOROPHYTA*) ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ**

Исследована активность ключевых ферментов энергетического и азотистого обмена, а также содержание пигментов у *Chlorella vulgaris* при действии селенита натрия в концентрации  $Se^{4+}$  0,5; 5 и 20 мг/дм<sup>3</sup>. В этих концентрациях  $Se^{4+}$  активность цитохромоксидазы и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы возрастает, а сукцинатдегидрогеназы ( $Se^{4+}$  в концентрации 5 мг/дм<sup>3</sup>) и НАДФН-глутаматдегидрогеназы уменьшается. Увеличивается также количество хлорофилла *a*, *b*, каротиноидов и феофитинов ( $Se^{4+}$  0,5 мг/дм<sup>3</sup>). В целом, селенит активирует энергетический обмен и биосинтетические процессы.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, селенит натрия, пигменты, цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа.

### **Введение**

Селен как микроэлемент участвует во многих метаболических процессах. У растений он регулирует биосинтез пигментов. Поэтому существует проблема достаточности, и особенно доступности определенных форм селена для организмов. Соединения селена в высоких концентрациях оказывают токсическое действие, вызывая нарушения метаболизма, угнетение роста, а иногда и гибель организмов. У водорослей необходимость в селене зависит от видовых особенностей и колеблется от сотых частей микрограмма до десятков миллиграммов (Боднар и др., 2013). Характер ответной реакции на содержание в среде селена зависит не только от концентрации, но и от его химической формы. Например, ингибирование роста водорослей селенатом натрия ( $Se^{6+}$ ) выше, чем селенитом натрия ( $Se^{4+}$ ) (Боднар и др., 2013). Устойчивость водорослей к селену, его накопление и биосинтез ими биотехнологически полезных селенсодержащих веществ при культивировании определяется, в первую очередь, энергетическим статусом клетки (Schmid, Ohlrogge, 2002). Поэтому целью данной работы было исследование влияния селенита натрия на энергетический обмен, а также пигментный комплекс *Ch. vulgaris*.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования была *Ch. vulgaris*, которую выращивали в условиях накопительной культуры на среде Фитцджеральда при освещении лампами дневного света (2500 лк) и 23–25 °С. Селен вносили в виде селенита натрия в концентрации 0,5; 5 и 20 мг/дм<sup>3</sup>. Контролем служила культура, выращиваемая в среде без селена. Отбор проб для анализа осуществляли на 1-е, 3-и и 7-е сутки культивирования.

Активность цитохромоксидазы (ЦО) определяли методом Штрауса по конденсации  $\alpha$ -нафтола и парафенилендиамингидрохлорида с образованием индо-

© О.В. Василенко, О.И. Боднар, Г.Б. Винярская, Ю.В. Синюк, В.В. Грубинко, 2014

фенола синего, который определяли спектрофотометрически при 540 нм (Straus, 1954).

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) устанавливали по окислению сукцината до фумарата феррицианидом калия и регистрировали спектрофотометрически при 420 нм (Методы ..., 1982). Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) определяли спектрофотометрически по скорости окисления НАДН или НАДФН (прямая или обратная реакция) при 340 нм (Софьин и др., 1984), а содержание пигментов – спектрофотометрически (Оцінка ..., 2005).

### Результаты и обсуждение

Цитохромоксидаза и сукцинатдегидрогеназа как регуляторные ферменты определяют функционирование цепи превращений энергетических субстратов (Диксон, Уэбб, 1982). Селенит натрия активирует ЦО на протяжении всего периода эксперимента (табл. 1). Наименьшие изменения были зафиксированы при влиянии  $Se^{4+}$  в концентрации 0,5 мг/дм<sup>3</sup> (на 9,8–73,1 %). При концентрации  $Se^{4+}$  5 мг/дм<sup>3</sup> активность фермента увеличивалась в 2,5 раза на 1-е сутки, в 8,2 раза на 3-и сутки, на 7-е сутки превышала показатели в контроле в 2,4 раза. При концентрации  $Se^{4+}$  20 мг/дм<sup>3</sup> наблюдалось увеличение активности ЦО по сравнению с контролем в 2,5 раза на 1-е сутки, в 1,9 раза на 3-и и в 3,1 раза на 7-е сутки. Активность СДГ при действии  $Se^{4+}$  в концентрации 0,5 мг/дм<sup>3</sup> уменьшилась по сравнению с контролем: на 5,3 % на 1-е сутки, на 32,2 % на 3-и сутки и на 26,5 % на 7-е сутки.  $Se^{4+}$  в концентрации 5 мг/дм<sup>3</sup> активировал СДГ в 4,5; 10,4 и 7,6 раза на 1-е, 3-и и 7-е сутки соответственно по сравнению с контролем.

При концентрации  $Se^{4+}$  20 мг/дм<sup>3</sup> на 1-е и 3-и сутки зафиксировано уменьшение активности СДГ на 10,7 и 12,5 % соответственно, но на 7-е сутки она восстанавливалась, превышая показатель в контроле всего на 9,1 %.

Таблица 1

Активность цитохромоксидазы, сукцинатдегидрогеназы, НАДН- и НАДФН-зависимых глутаматдегидрогеназ *Chlorella vulgaris* при влиянии селенита натрия (% от контроля)

| Фермент   | Время, сут. | Концентрация $Se^{4+}$ , мг/дм <sup>3</sup> |         |        |
|-----------|-------------|---|---------|--------|
|           |             | 0,5   | 5,0     | 20,0   |
| ЦО        | 1           | 109,83                                      | 247,81  | 249,01 |
|           | 3           | 110,66                                      | 824,29  | 196,07 |
|           | 7           | 173,16                                      | 238,66  | 313,71 |
| СДГ       | 1           | 94,77                                       | 445,24  | 89,39  |
|           | 3           | 67,85                                       | 1041,43 | 87,05  |
|           | 7           | 73,58                                       | 765,29  | 109,13 |
| НАДН-ГДГ  | 1           | 105,24                                      | 321,38  | 303,55 |
|           | 3           | 226,38                                      | 476,35  | 333,64 |
|           | 7           | 163,23                                      | 228,71  | 284,86 |
| НАДФН-ГДГ | 1           | 31,04                                       | 73,19   | 42,47  |
|           | 3           | 37,77                                       | 199,57  | 58,44  |
|           | 7           | 29,94                                       | 89,83   | 61,24  |

Таким образом, активация селенитом субстратного фосфорилирования происходит за счет возрастания интенсивности окисления субстратов в цикле Кребса, а активация энергетического обмена в целом свидетельствует о повышении интенсивности метаболизма, что может происходить либо вследствие увеличения биосинтеза и направлено на рост культуры, либо быть реакцией на токсичный стресс. Для выяснения этого вопроса нами исследована активность глутаматдегидрогеназы и содержание пигментов.

Ключевым звеном азотистого обмена является взаимопревращение  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата глутаматдегидрогеназой, при котором одновременно происходит трансформация неорганического азота аммония и  $\alpha$ -аминного азота аминокислот. В качестве восстановителя можно использовать НАДН или НАДФН (Шатилов, 1987). Глутаматдегидрогеназа обеспечивает не только поддержание азотистого гомеостаза в клетках, но и может осуществлять субстратное регулирование ЦТК за счет дезаминирования глутамата. Известно, что у микроорганизмов НАДН-ГДГ является катаболическим ферментом и осуществляет преимущественно дезаминирование, а НАДФН-ГДГ – анаболическим и осуществляет аминирование (Шатилов, 1986; Кретович, 1987). Активность НАДН-глутаматдегидрогеназы увеличивалась во всех случаях действия  $Se^{4+}$ : в концентрации 5 и 20 мг/дм<sup>3</sup> показатели превышали контроль в 2,3–4,8 раза на протяжении всего эксперимента. Наряду с этим активность НАДФН-глутаматдегидрогеназы при действии  $Se^{4+}$  значительно уменьшалась по сравнению с контролем, особенно при концентрации 0,5 мг/дм<sup>3</sup> (в 2,6–3,3 раза). Активность фермента возрастала лишь при воздействии  $Se^{4+}$  в концентрации 5 мг/дм<sup>3</sup> на 3-и сутки экспозиции.

Учитывая метаболическую связь исследованных ферментов (Боднар, 2009), разложение глутамата НАДН-глутаматдегидрогеназой оправдано поставкой  $\alpha$ -кетоглутарата в активизирующийся при действии  $Se^{4+}$  цикл Кребса, соответственно, образование глутамата НАДФН-глутаматдегидрогеназой угнетается. Таким образом, глутамат используется как дополнительный энергетический субстрат у хлореллы (Боднар, 2009).

Система энергообеспечения водорослей, особенно синтез аминокислот, тесно связана с изменениями в фотосинтезе (Боднар, 2009). При влиянии селенита натрия в концентрации  $Se^{4+}$  0,5 мг/дм<sup>3</sup> содержание хлорофилла *a* увеличивается на 36,23 % на 1-е сутки, на 3-и сутки на 68,52 %, а на 7-е – в 3 раза по сравнению с контролем (табл. 2).

При концентрации  $Se^{4+}$  20 мг/дм<sup>3</sup> количество этого пигмента превышало показатели в контроле в 2,7 раза на 1-е и 3-и сутки и в 3,1 раза – на 7-е сутки. При действии  $Se^{4+}$  в концентрации 5 мг/дм<sup>3</sup> наблюдали уменьшение количества хлорофилла *a* на 1-е сутки на 17,7 %, на 3-и – на 28,2 % по сравнению с контролем. На 7-е сутки содержание хлорофилла *a* несколько превышало контрольные показатели. Аналогичная тенденция наблюдалась и относительно феофитинов. При концентрации  $Se^{4+}$  0,5 и 20 мг/дм<sup>3</sup> на 1-е, 3-и и 7-е сутки их содержание превышало показатели в контроле в 1,4; 1,8; 3,1 раза и в 2,7; 2,1; 2,2 раза соответственно. В свою очередь количество хлорофилла *b* и каротиноидов увеличивалось по сравнению с контролем при воздействии всех исследуемых концентраций  $Se^{4+}$ . Наибольшее содержание каротиноидов отмечено при действии  $Se^{4+}$  в концентрации 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, а концентрация  $Se^{4+}$  5 мг/дм<sup>3</sup> вызывала

уменьшение их количества. Увеличение содержания пигментов, кроме феофитинов, при действии  $Se^{4+}$  хотя и происходит в разной степени в зависимости от концентрации селенита и времени действия, свидетельствует об активизации пигментной системы в контексте ускорения всего метаболизма и биосинтеза.

Таблица 2

Содержание пигментов *Chlorella vulgaris* при влиянии селенита натрия (% от контроля)

| Пигмент            | Время, сут. | Концентрация $Se^{4+}$ , мг/дм <sup>3</sup> |       |        |
|--------------------|-------------|---|-------|--------|
|                    |             | 0,5   | 5,0   | 20,0   |
| Хлорофилл <i>a</i> | 1           | 136,23                                      | 82,3  | 269,27 |
|                    | 3           | 168,52                                      | 71,8  | 272,20 |
|                    | 7           | 308,68                                      | 104,2 | 313,12 |
| Хлорофилл <i>b</i> | 1           | 178,70                                      | 125,6 | 169,65 |
|                    | 3           | 233,54                                      | 130,5 | 244,19 |
|                    | 7           | 283,72                                      | 155,0 | 291,92 |
| Каротиноиды        | 1           | 203,71                                      | 92,6  | 132,29 |
|                    | 3           | 208,57                                      | 133,3 | 177,14 |
|                    | 7           | 277,14                                      | 100,0 | 184,00 |
| Феофитины          | 1           | 140,48                                      | 63,8  | 266,82 |
|                    | 3           | 176,24                                      | 60,6  | 206,84 |
|                    | 7           | 308,97                                      | 55,3  | 219,75 |

### Заключение

Под влиянием  $Se^{4+}$  в концентрации 0,5 и 20 мг/дм<sup>3</sup> активность ЦО, СДГ и НАДН-ГДГ увеличивается, а НАДФН-ГДГ – уменьшается. Увеличение активности ферментов обусловлено повышением энергозатрат *Chlorella vulgaris* для обеспечения адаптационных реакций клетки на содержание селенита натрия в среде и активизацией биосинтетических процессов (Мусил и др., 1984). При воздействии 5 мг/дм<sup>3</sup>  $Se^{4+}$  на 3-и сутки энергетический обмен активизируется, а на 7-е его интенсивность снижается, происходит первичное смещение реакции в сторону дезаминирования (активность НАДН-ГДГ вдвое превышала активность НАДФН-ГДГ), которое в дальнейшем выравнивается до соотношения 1:1. Активное функционирование глутаматдегидрогеназной системы при влиянии  $Se^{4+}$  необходимо для перераспределения продуктов аминирования как энергетических субстратов и предшественников других аминокислот, обеспечивающих адаптацию клеток к селениту натрия (Боднар, 2009).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боднар О.І. Адаптивні властивості водоростей за дії іонів металів : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2009. – 22 с.
- Боднар О.І., Вінярська Г.Б., Станіславчук Г.В., Грубінко В.В. Особливості накопичення сполук селену та їх біологічна роль у водоростей // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2013. – 55(2). – С. 94–107.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: В 3-х т. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 392 с.

- Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота в растениях. — М.: Наука, 1987. — 486 с.
- Методы биохимических исследований: Учеб. пособ. / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 273 с.
- Мусил Я., Новакова О., Куц К. Современная биохимия в схемах. — М.: Мир, 1984. — 216 с.
- Оцінка стану водоймищ шляхом визначення пігментів фітопланктону // Методичний посібник з визначення якості води / Ред. В.Д. Романенко. — К.: Ін-т гідробіол. НАН України, 2005. — С. 16–19.
- Софьин А.В., Шатилов В.Р., Кретович В.Л. Глутаматдегидрогеназы одноклеточной зеленой водоросли *Ankistrodesmus braunii*. Кинетические свойства // Биохимия. — 1984. — 49(2). — С. 334–343.
- Шатилов В.Р. Глутаматдегидрогеназы / Энзимология ассимиляция аммония у растений // Итоги науки и техники. Сер. Биол. хим. — 1987. — 24. — С. 5–104.
- Шатилов В.Р. Энзимология ассимиляции аммония в одноклеточных зеленых водорослей: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1986. — 46 с.
- Schmid K.M., Ohlrogge J.B. Lipid metabolism in plants // Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 4<sup>th</sup> ed. / Eds. D.E. Vance, J.E. Vance. — Amsterdam: Elsevier Sci., 2002. — P. 93–126.
- Straus W. Colometric microdetermination of cytochrome c oxidase // J. Biol. Chem. — 1954. — 207(2). — P. 733.

Подписала в печать А.В. Лищук-Курейшевич

O.V. Vasilenko, O.I. Bodnar, G.B. Vinyarskaya, Yu.V. Sinyuk, V.V. Grubinko

V. Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,  
2, M. Krivonis St., 46027 Ternopil, Ukraine  
e-mail: vasylenkoo@mail.ru

ENERGY AND NITROGEN METABOLISM IN *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ.  
(*CHLOROPHYTA*) THE INFLUENCE OF SODIUM GYPSUM

Energy and nitrogen metabolism key enzymes activity and the pigment complex in *Chlorella vulgaris* under the effect of sodium selenite has been investigated. It is shown that in the investigated concentrations  $Se^{4+}$  causes an increase in the amount of chlorophyll *a*, *b*, carotenoids, and pheophytins (except the concentration of  $Se^{4+}$  5 mg/dm<sup>3</sup>). Also activity of cytochromeoxidase and NADH-dependent glutamatedehydrogenase increases. Succinatedehydrogenase (except influence of  $Se^{4+}$  in a concentration of 5 mg/dm<sup>3</sup>) and NADPH-glutamatedehydrogenase is significantly reduced.

Key words: *Chlorella vulgaris*, sodium selenite, pigment, cytochromeoxidase, succinate-dehydrogenase, glutamatedehydrogenase.