УДК 612.392.2:582.26

***И. Н. Незбрицкая, А. В. Курейшевич, А. А. Яровой, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский***

# *ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АММОНИЙНОГО АЗОТА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ CYANOPROKARYOTA, CHLOROPHYTA И EUGLENOPHYTA*

Исследованы закономерности изменения ростовых параметров и активность ферментов азотного обмена — глутаматдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы у некоторых видов цианопрокариот (*Anabaena cylindrica*, *Phormidium autumnale* f. *uncinata*), зеленых (*Scenedesmus obtusus*, *Desmodesmus communis*) и эвгленовых (*Euglena gracilis*) водорослей при воздействии аммонийного азота в концентрации 100 и 200 мг/дм$^3$. В этих условиях наиболее существенные изменения указанных показателей отмечены у *Anabaena cylindrica*, а наименьшие — у *Euglena gracilis*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что представитель Euglenophyta характеризуется наибольшей устойчивостью к избытку аммонийного азота в водной среде по сравнению с другими исследованными водорослями.

***Ключевые слова:*** *водоросли, аммонийный азот, рост, хлорофилл a, глутаматдегидрогеназа, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза.*

Известно, что соединения азота принимают участие в метаболических процессах водных растений [7, 13]. Их количество и состав в значительной степени определяют структуру альгосообществ [18, 30, 31, 36]. В то же время высокая концентрация неорганического азота (в первую очередь аммонийного) может оказывать отрицательное воздействие на жизнедеятельность биоты, особенно в местах поступления стоков, обогащенных биогенными веществами, а также в водоемах с ограниченным водообменом [35]. Значительное количество аммония ($NH_4^+$) в воде может накапливаться из-за интенсивного разложения органического вещества. С повышением температуры процесс разложения остатков растений и животных в донных отложениях протекает значительно быстрее, что приводит к повышению содержания аммонийного азота в пресных водоемах [22].

© И. Н. Незбрицкая, А. В. Курейшевич, А. А. Яровой, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский, 2018

Для водорослей токсичность $NH_4^+$ проявляется при воздействии его высоких концентраций в течение длительного времени [35]. Внутриклеточный уровень аммония в растительных клетках обычно снижается за счет быстрой ассимиляции [5]. Одним из основных ферментов, принимающих участие в ассимиляции аммонийного азота, является глутаматдегидрогеназа (ГДГ). Как известно, этот фермент катализирует взаимопревращения α-кетоглутарата и глутамата в присутствии НАДН или НАДФН, при этом происходит трансформация неорганического иона аммония и органического α-аминного азота [5, 19].

Важными ферментами ассимиляции аммонийного азота являются также аминотрансферазы, катализирующие перенос аминогруппы от соответствующих аминокислот на α-кетокислоты с образованием новых амино- и кетокислот [9, 12]. Они играют ведущую роль в обмене белков, осуществляя окислительное дезаминирование аминокислот через глутаминовую кислоту. Так как образованная глутаминовая кислота дезаминируется ГДГ с высвобождением аммиака и 2-оксоглутаровой кислоты (α-кетоглутарата) — субстрата для цикла Кребса, важна роль этих ферментов и в энергетическом обмене [5, 9].

При воздействии экстремальных факторов изменение биосинтеза белков связано с ферментами переаминирования, прежде всего такими, как аспартатаминотрансфераза (АсАТ) и аланинаминотрансфераза (АлАТ) [8]. Как известно, АсАТ катализирует реакцию трансаминирования между аспартатом и α-кетоглутаратом, а АлАТ — между аланином и α-кетоглутаратом аналогично предыдущей. Установлена важная роль аспарагиновой и глутаминовой аминокислот и их амидов при адаптации растений к неблагоприятным факторам среды, поскольку при изменении белкового метаболизма они являются резервным материалом для биосинтеза других аминокислот и органических соединений, а также непосредственно участвуют в детоксикации путем конъюгации с ксенобиотиком [8, 18]. Учитывая участие ГДГ и аминотрансфераз в азотном и энергетическом обмене растений, существенный интерес представляет характер изменений активности этих ферментов у водорослей разных групп при нагрузке питательной среды аммонийным азотом.

Целью работы было исследовать специфику влияния высоких концентраций аммонийного азота на ростовые процессы и активность ГДГ, АсАТ и АлАТ у некоторых видов Cyanoprokaryota, Chlorophyta та Euglenophyta.

**Материал и методика исследований.** В опытах использовали альгологически чистые культуры Cyanoprokaryota (*Anabaena cylindrica* Lemmerm. HPDP-1, *Phormidium autumnale* (C. Agardh) Gomont f. *uncinata* (C. Agardh) N.V. Kondrat. HPDP-36), Chlorophyta (*Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew. HPDP-109, *Scenedesmus obtusus* Meyen HPDP-113) и Euglenophyta (*Euglena gracilis* Klebs HPDP-114) (табл. 1).

В культуральную среду всех видов вносили аммонийный азот ($N\text{-}NH_4^+$) в форме $NH_4Cl$ в расчете 100 и 200 мг/дм$^3$ $N\text{-}NH_4^+$. Контролем для Cyanoprokaryota и Chlorophyta служили культуры, выращенные на среде Фитцджеральда № 11 в модификации Цендера и Горема, содержащей в качестве источ-

**1. Эколого-географическая характеристика исследуемых видов водорослей**

| Виды водорослей | Приуроченность к среде обитания |
|---|---|
| *Anabaena cylindrica* | Планктон [2], перифитон [4] |
| *Phormidium autumnale* f. *uncinata* | Бентос [2], перифитон [4], |
| *Euglena gracilis* | Планктон, бентос [2, 29] |
| *Scenedesmus obtusus* | Планктон, бентос [2] |
| *Desmodesmus communis* | Планктон, бентос [2, 29] |

ника азота нитраты [14], для *Euglena gracilis* — на среде для культивирования эвгленовых водорослей, в которой источником азота служит аммонийный азот в концентрации 100 мг/дм$^3$ [10, 16]. Поэтому в опытных вариантах с Cyanoprokaryota и Chlorophyta концентрация $N\text{-}NH_4^+$ составляла 100 и 200 мг/дм$^3$, а с *Euglena gracilis* — 200 и 300 мг/дм$^3$. Все исследуемые водоросли культивировали при температуре 23 ± 2°С и освещенности 2,5—3,0 клк с чередованием светового и темнового периодов 16 : 8.

Продолжительность выращивания представителей Chlorophyta и Cyanoprokaryota составляла 21 сут, а *Euglena gracilis* — 14 сут, поскольку она быстрее проходит фазы роста и уже на 29-е сутки культивирования сухая масса эвглены уменьшается почти в шесть раз по сравнению с показателями на 10-е сутки [11].

Интенсивность роста исследуемых культур оценивали по изменению сухой массы, содержание хлорофилла *a* определяли экстрактивным спектрофотометрическим методом [14],а его концентрацию рассчитывали по уравнению [26].

Активность НАДН-ГДГ оценивали по скорости окисления НАДН в реакционной смеси и выражали в мкмоль НАДН/мг белка·ч [17]. Активность АсАТ и АлАТ исследовали согласно методическим указаниям [15]. Содержание белков в биомассе водорослей определяли по методу Лоури [34].

## *Результаты исследований и их обсуждение*

*Влияние экстремально высоких концентраций аммонийного азота на функционирование Cyanoprokaryota.* У представителей Cyanoprokaryota в условиях воздействия экстремально высоких концентраций аммонийного азота происходят существенные изменения активности ГДГ, АсАТ и АлАТ. Характер этих изменений зависел от видовых особенностей, концентрации аммонийного азота в культуральной среде и продолжительности эксперимента (табл. 2, 3).

У нитчатой перифитонной цианопрокариоты *Phormidium autumnale* f. *uncinata* при воздействии 100 мг/дм$^3$ $N\text{-}NH_4^+$ на 14-е сутки активность исследуемых ферментов, особенно аминотрансфераз, возросла (см. табл. 2). Следует отметить, что продукты реакций трансаминирования могут использова-

**2. Активность ферментов азотного обмена у *Phormidium autumnale* f. *uncinata* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота, $M \pm m$, $n = 5$**

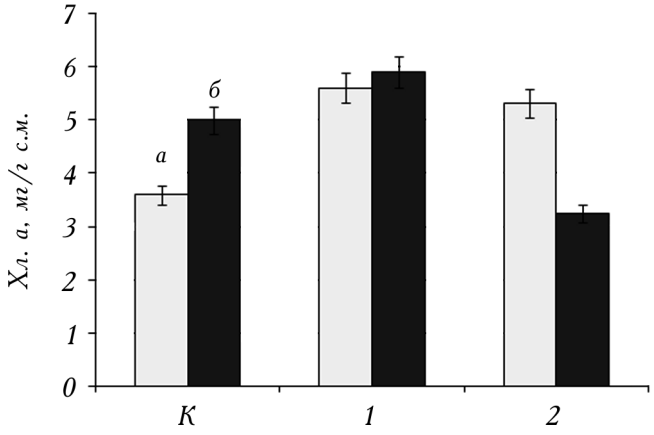
| Варианты опыта | Активность | | |
|---|---|---|---|
| | НАДН-ГДГ, мкмоль НАДН/мг белка·ч | АсАТ, ед/мг белка·ч | АлАТ, ед/мг белка·ч |
| | 14-е сутки | | |
| Контроль | 353 ± 7,12 | 1445 ± 45,22 | 800 ± 25,66 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 475 ± 9,75 | 2185 ± 61,10 | 1451 ± 51,25 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 692 ± 20,03 | 1009 ± 61,55 | 740 ± 20,35 |
| | 21-е сутки | | |
| Контроль | 1039 ± 54,54 | 841 ± 10,98 | 370 ± 12,00 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 889 ± 8,19 | 399 ± 8,59 | 175 ± 6,55 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 483 ± 11,00 | 289 ± 7,17 | 159 ± 3,04 |

**3. Активность ферментов азотного обмена у *Anabaena cylindrica* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота, $M \pm m$, $n = 5$**

| Варианты опыта | Активность | | |
|---|---|---|---|
| | НАДН-ГДГ, мкмоль НАДН/мг белка·ч | АсАТ, ед/мг белка·ч | АлАТ, ед/мг белка·ч |
| | 14-е сутки | | |
| Контроль | 776 ± 11,70 | 1509 ± 47,82 | 1660 ± 51,12 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 667 ± 7,11 | 1296 ± 22,76 | 951 ± 24,25 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 563 ± 10,12 | 982 ± 27,12 | 555 ± 17,00 |
| | 21-е сутки | | |
| Контроль | 461 ± 6,98 | 790 ± 31,35 | 606 ± 10,00 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 296 ± 6,77 | 287 ± 5,19 | 190 ± 7,99 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 330 ± 8,09 | 466 ± 4,88 | 165 ± 4,44 |

ться в нескольких метаболических путях: синтезе белков, новообразовании аминокислот путем аминирования кетокислот, накоплении глутамина и аспарагина, окислении в цикле трикарбоновых кислот с образованием АТФ и восстановительных эквивалентов [6, 33]. В этих условиях содержание хлорофилла *a* увеличилось на 45% по сравнению с контролем, что согласуется с изменением активности исследуемых ферментов и свидетельствует об интенсификации азотного метаболизма в целом (рис. 1).

На 21-е сутки активность ГДГ была практически на уровне контроля, тогда как активность АсАТ и АлАТ уменьшилась в два раза. Содержание хлорофилла *a* несколько превышало контрольное, что указывает на способность



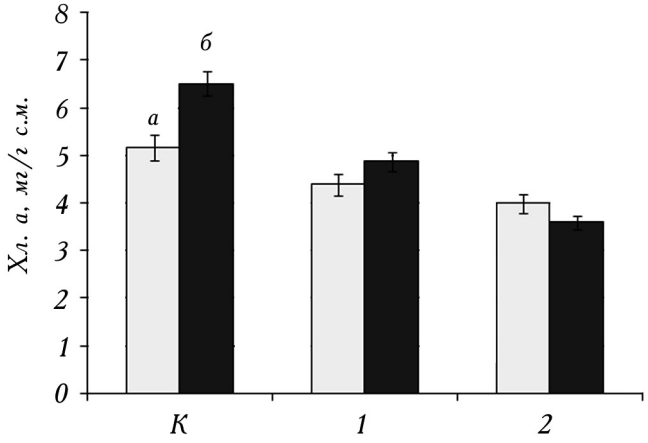

**1.** Содержание хлорофилла *a* в биомассе *Phormidium autumnale* f. *uncinata* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота. Здесь и на рис. 2—5: *а* — на 14-е сутки; *б* — 21-е сутки; *К* — контроль; *1* — +100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$; *2* — +200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$.

цианопрокариоты адаптироваться к этой концентрации аммонийного азота в культуральной среде.

При концентрации N-$NH_4^+$ 200 мг/дм$^3$ на 14-е сутки у *Ph. autumnale* f. *uncinata* активность НАДН-ГДГ возросла на 96%, однако интенсификации реакций трансаминирования при этом не отмечено. Повышение активности НАДН-ГДГ свидетельствует об усилении дезаминирования глутаминовой кислоты и образования α-кетоглутарата — субстрата для цикла Кребса. Видимо, в этих условиях происходит интенсификация функционирования цикла Кребса и усиление дыхания. Содержания хлорофилла *a* на 14-е сутки было в полтора раза выше, чем в контроле, что свидетельствует об интенсификация функционирования фотосинтетического аппарата. Фотосинтез и дыхание являются основными поставщиками энергии для активации механизмов защиты растительных клеток от стрессовых условий [1].

Как известно, аммонийный азот существует в воде в двух физико-химических формах: ионизированный аммоний ($NH_4^+$) и неионизированный аммиак ($NH_3$) [21, 23]. Свободный аммиак является токсичной формой аммонийного азота. Ионизированная форма менее токсична, но в больших концентрациях также опасна. Соотношение между этими формами полностью определяется pH и температурой воды [23, 27, 32]. Согласно литературным данным, при pH 9,0 токсичность аммонийного азота связана преимущественно с $NH_3$, а при pH 8,0 и меньше — с $NH_4^+$ [21, 32].

Показано [27], что при выращивании *Tetraselmis* sp. (Chlorophyta) на среде с добавкой $NH_4Cl$ при температуре 20—25°С в течение эксперимента pH снизилось с 8,3 до 7,8. Это означает, что в таких условиях аммонийный азот находится в виде ионов аммония. Поскольку в наших опытах в качестве источника азота также использован $NH_4Cl$ и температурные условия были



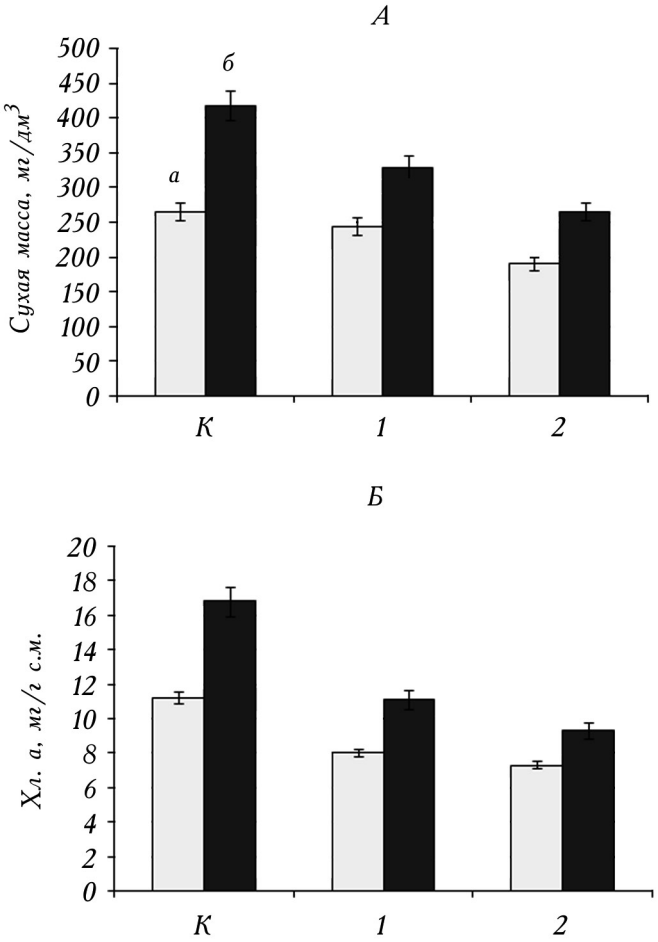

**2.** Содержание хлорофилла *а* в биомассе *Anabaena cylindrica* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота.

идентичны, то можно предполагать, что токсичность аммонийного азота для исследуемых водорослей также связана с высокой концентрацией $NH_4^+$.

На 21-е сутки при концентрации $N\text{-}NH_4^+$ 200 мг/дм$^3$ активность всех ферментов и содержание хлорофилла *а* у *Ph. autumnale* f. *uncinata* заметно уменьшились. Это указывает на значительные изменения в метаболизме в целом и нарушения азотного обмена в частности.

Из литературных источников известно, что ассимиляция аммонийного азота у водных растений замедляется, когда их клетки становятся N-насыщенными или ассимиляция ограничена за счет отсутствия С-скелетов из-за снижения фотосинтеза и/или истощения запасов внутриклеточного углерода [5, 38]. В результате этого происходит избыточное накопление $NH_4^+$, что приводит к изменению pH, кинетики ферментов и нарушению метаболизма растений в целом [38].

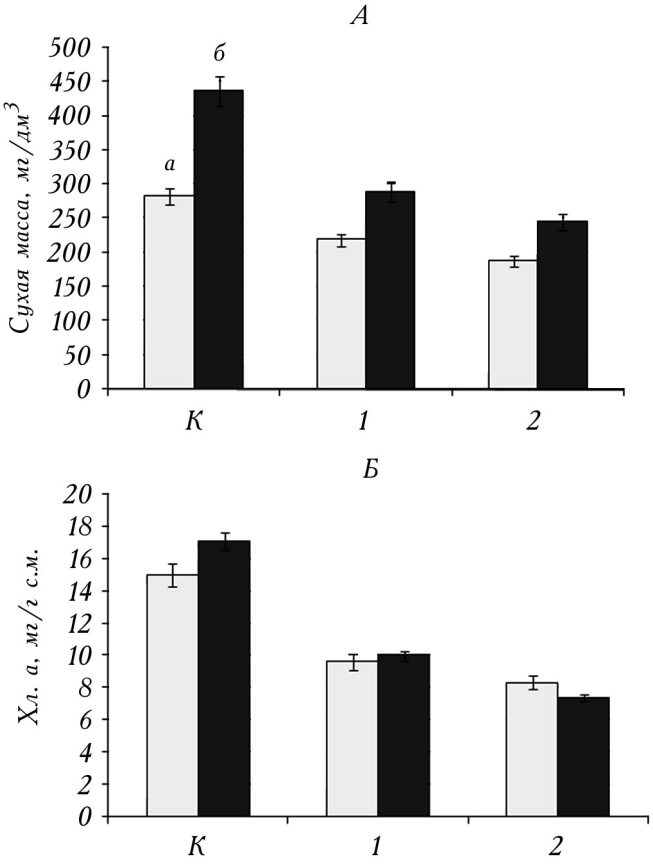
Цианопрокариота *A. cylindrica* оказалась более чувствительной к воздействию высоких концентраций аммонийного азота в водной среде, чем *Ph. autumnale* f. *uncinata*. На 14-е сутки ее культивирования при концентрации $N\text{-}NH_4^+$ 100 мг/дм$^3$ активность НАДН-ГДГ и АсАТ была на 16%, а АлАТ — на 75% ниже, чем в контроле. С увеличением продолжительности эксперимента токсический эффект аммонийного азота на функционирование *A. cylindrica* усиливался (см. табл. 3). Так, на 21-е сутки при 200 мг/дм$^3$ $N\text{-}NH_4^+$ активность НАДН-ГДГ уменьшилась на 56% относительно контроля, а АсАТ и АлАТ — соответственно на 175 и 189%. Важно отметить, что активность АсАТ и АлАТ в условиях экстремально высоких концентраций $N\text{-}NH_4^+$ изменялась больше, чем ГДГ. Это указывает на существенное угнетение процессов трансаминирования аминокислот у *A. cylindrica*. Содержание хлорофилла *а* в течение эксперимента также снижалось (рис. 2).




**3.** Сухая масса (*А*) и содержание хлорофилла *а* (*Б*) у *Scenedesmus obtusus* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота.

*Влияние экстремально высоких концентраций аммонийного азота на функционирование представителей Chlorophyta*. У зеленых водорослей *S. obtusus* и *D. communis* при избытке аммонийного азота в водной среде ростовые процессы угнетались (рис. 3, 4). Однако эти виды, особенно *S. obtusus*, на 21-е сутки эксперимента характеризовались значительно более высокой активностью ферментов азотного метаболизма, чем представители Cyanoprokaryota.

Воздействие 100 и 200 мг/дм$^3$ $N\text{-}NH_4^+$ привело к существенному усилению функционирования глутаматдегидрогеназной ветки азотного обмена у *S. obtusus* (табл. 4). При 100 мг/дм$^3$ $N\text{-}NH_4^+$ активность НАДН-ГДГ на 14-е и 21-е сутки увеличилась соответственно на 85 и 95% относительно контрольных значений, а при 200 мг/дм$^3$ $N\text{-}NH_4^+$ — соответственно на 127 и 109%. Следует отметить, что изменения активности АсАТ и АлАТ были значитель-




**4.** Сухая масса (*А*) и содержание хлорофилла *а* (*Б*) у *Desmodesmus communis* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота.

но меньше, чем ГДГ. При 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ активность АсАТ практически не отличалась от контрольной, при 200 мг/дм$^3$ на 14-е сутки существенных изменений также не отмечено, а на 21-е она возросла на 34%. Активность АлАТ, как и АсАТ, достоверно увеличилась лишь на 21-е сутки, при 100 и 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ соответственно на 47 и 71%.

Важно отметить, что в отличие от цианопрокариот у *S. obtusus* ингибирования активности исследуемых ферментов при 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ не происходило. Полученные нами результаты согласуются с данными [28] о наличии у некоторых видов рода *Scenedesmus* эффективного механизма детоксикации аммиака за счет интенсивного протекания глутаматдегидрогеназной реакций. Также было показано [21], что представители Chlorophyta характеризуются большей толерантностью к высоким концентрациям аммония, чем представители Cyanoprokaryota. Однако цианопрокариоты оказались более устойчивыми к высоким концентраций аммония, чем диатомовые водоросли, примнезиофиты, динофлагелляты и рафидофиты.

**4. Активность ферментов азотного обмена у *Scenedesmus obtusus* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота, $M \pm m$, $n = 5$**

| Варианты опыта | Активность | | |
|---|---|---|---|
| | НАДН-ГДГ, мкмоль НАДН/мг белка·ч | АсАТ, ед/мг белка·ч | АлАТ, ед/мг белка·ч |
| 14-е сутки | | | |
| Контроль | 207 ± 2,18 | 981 ± 9,06 | 601 ± 7,00 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 383 ± 3,34 | 917 ± 15,55 | 631 ± 12,12 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 470 ± 5,61 | 930 ± 20,09 | 409 ± 6,05 |
| 21-е сутки | | | |
| Контроль | 643 ± 7,66 | 2766 ± 69,02 | 1080 ± 19,18 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 1245 ± 16,00 | 3251 ± 72,12 | 1590 ± 17,12 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 1341 ± 27,12 | 3720 ± 75,74 | 1850 ± 50,43 |

**5. Активность ферментов азотного обмена у *Desmodesmus communis* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота, $M \pm m$, $n = 5$**

| Варианты опыта | Активность | | |
|---|---|---|---|
| | НАДН-ГДГ, мкмоль НАДН/мг белка·ч | АсАТ, ед/мг белка·ч | АлАТ, ед/мг белка·ч |
| 14-е сутки | | | |
| Контроль | 604 ± 11,11 | 3129 ± 67,00 | 2316 ± 63,69 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 598 ± 10,99 | 3874 ± 35,14 | 2830 ± 33,33 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 413 ± 5,12 | 3124 ± 44,76 | 1479 ± 22,12 |
| 21-е сутки | | | |
| Контроль | 441 ± 3,13 | 2573 ± 50,00 | 2613 ± 37,88 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 695 ± 13,10 | 3814 ± 22,14 | 1589 ± 29,31 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 400 ± 7,77 | 2197 ± 63,66 | 1320 ± 20,01 |

У *D. communis* изменения активности ферментов отличалась от изменений у *S. obtusus* (см. табл. 4). При 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ в течение эксперимента активность ферментов азотного обмена в целом была выше, чем в контроле (табл. 5). Однако при 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ их активность снизилась, при этом ГДГ и АсАТ несущественно, а АлАТ — на 57 и 98% соответственно на 14-е и 21-е сутки.

Важно отметить, что полученные нами результаты свидетельствуют о высокой видоспецифичности реакции водорослей на воздействие стрессора.

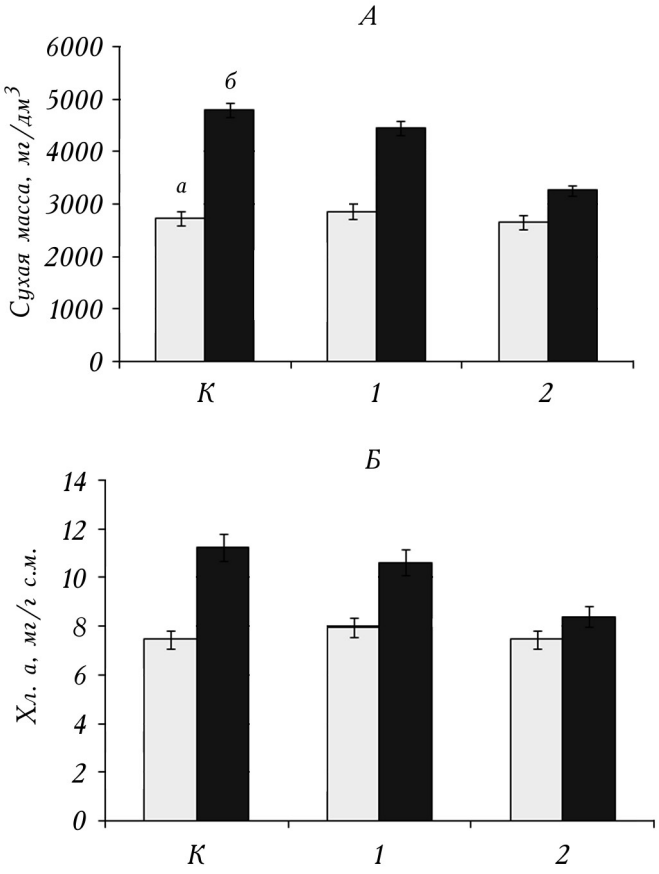
**6. Активность ферментов азотного обмена у *Euglena gracilis* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота, $M \pm m$, $n = 5$**

| Варианты опыта | Активность | | |
|---|---|---|---|
| | НАДН-ГДГ, мкмоль НАДН/мг белка·ч | АсАТ, ед/мг белка·ч | АлАТ, ед/мг белка·ч |
| 7-е сутки | | | |
| Контроль | 283 ± 5,80 | 1101 ± 17,39 | 969 ± 32,12 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 261 ± 7,77 | 912 ± 16,81 | 798 ± 17,12 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 240 ± 4,95 | 724 ± 7,00 | 637 ± 27,55 |
| 14-е сутки | | | |
| Контроль | 365 ± 2,12 | 906 ± 17,39 | 664 ± 14,07 |
| + 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 150 ± 5,54 | 683 ± 15,14 | 513 ± 10,79 |
| + 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ | 130 ± 2,73 | 673 ± 20,33 | 555 ± 9,99 |

*Влияние экстремально высоких концентрации аммонийного азота на функционирование Euglena gracilis.* У представителя Euglenophyta изменения исследуемых функциональных характеристик были наименьшими по сравнению с Cyanoprokaryota и Chlorophyta. Так, активность АсАТ и АлАТ при 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ на протяжении эксперимента снизилась лишь в 1,2—1,5 раза (табл. 6). Активность ГДГ на 7-е сутки также практически не изменилась, а на 14-е при концентрации 100 и 200 мг/дм$^3$ она снизилась соответственно в 2,4 и 2,8 раза. Снижение активности катаболического направления ГДГ-реакций может происходить за счет интенсификации функционирования анаболического (НАДФН-ГДГ), то есть аминирования 2-оксоглутарата [3]. Однако, согласно [25], при выращивании *E. gracilis* на среде с аммонийным азотом происходит инактивация НАДФН-ГДГ, поэтому уменьшение активности НАДН-ГДГ за счет повышения активности НАДФН-ГДГ в этих условиях, по-видимому, не происходит.

Показано, что у *E. gracilis* ассимиляция аммиака происходит глутамин-/глутаматсинтетазным путем (GS/GOGAT) [20, 25]. В то же время в условиях влияния высоких концентраций аммония, активность НАДФН-ГДГ увеличивается, например, у зеленых водорослей *Chlorella sorokiniana* [37] и *Chlorella vulgaris* [24]. На основании этого можно предположить, что у *E. gracilis*, в отличие от зеленых водорослей, ключевая роль в детоксикация аммиака принадлежит глутаминсинтетазе, а не глутаматдегидрогеназе.

Сухая масса и содержание хлорофилла *a* при 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ в течение всего эксперимента практически не отличались от контрольных, а при 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ в конце эксперимента (14-е сутки) уменьшились лишь на 34% (рис. 5). Это указывает на способность эвгленовой водоросли выдерживать высокие концентрации N-$NH_4^+$.




**5.** Сухая масса (*а*) и содержание хлорофилла а (*б*) у *Euglena gracilis* при воздействии высоких концентраций аммонийного азота.

### *Заключение*

Представители Cyanoprokaryota характеризуются значительной чувствительность к экстремально высоким концентрациям аммонийного азота (N-$NH_4^+$) в водной среде, о чем свидетельствуют существенные изменения активности глутаматдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы.

У *Phormidium autumnale* f. *uncinata* при концентрации аммонийного азота 100 мг/дм$^3$ происходит интенсификация азотного метаболизма в целом, на что указывает повышение активности всех исследуемых ферментов и содержания хлорофилла *а*. В то же время, 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ у этого вида уже происходит значительное угнетение функционирования ГДГ, АсАТ и АлАТ, то есть нарушение белкового обмена.

У *Anabaena cylindrica* снижение активности исследуемых ферментов и содержание хлорофилла а происходит при уже при 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ что свидетельствует о ее большей чувствительности по сравнению с *Ph. autumnale* f. *uncinata*.

У зеленых водорослей *Scenedesmus obtusus* и *Desmodesmus communis* в условиях влияния экстремально высокой концентрации аммонийного азота отмечено угнетение ростовых процессов. Однако эти виды характеризуются более высокой активностью исследуемых ферментов, чем представители Cyanoprokaryota. При концентрации 100 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ активность ГДГ, АсАТ и АлАТ у них в целом возрастала. При концентрации 200 мг/дм$^3$ N-$NH_4^+$ у *Desmodesmus communis* отмечено незначительное угнетение функционирования ГДГ и АсАТ, однако у *Scenedesmus obtusus* активность всех исследуемых ферментов значительно возросла, особенно ГДГ. Это указывает на то, что *Scenedesmus obtusus* характеризуется эффективным механизмом детоксикации аммиака за счет интенсивного протекания глутаматдегидрогеназной реакции.

У евгленовой водоросли *Euglena gracilis* в экспериментальных условиях активность исследованных ферментов и содержание хлорофилла *a* изменялись в меньшей степени, чем у представителей других групп, что свидетельствует о ее способности выдерживать высокие концентрации аммонийного азота.

Таким образом, чувствительность исследуемых культур к высокой концентрации аммонийного азота в водной среде изменяется в ряду: *Euglena gracilis* < *Scenedesmus obtusus* < *Desmodesmus communis* < *Phormidium autumnale* f. *uncinata* < *Anabaena cylindrica*.

**

*Досліджено закономірності зміни ростових параметрів, а також активність ферментів азотного обміну — глутаматдегідрогенази, аспартатамінтрансферази і аланінамінотрансферази у деяких видів ціанопрокаріот (Anabaena cylindrica, Phormidium autumnale f. uncinata), зелених (Scenedesmus obtusus, Desmodesmus communis) і евгленових (Euglena gracilis) водоростей за впливу амонійного азоту в концентрації 100 і 200 мг/дм$^3$. У цих умовах найбільш суттєві зміни зазначених показників реєструвалися у A. cylindrica, а найменші — у E. gracilis. Отримані результати свідчать про те, що представник Euglenophyta характеризується найбільшою стійкістю до надлишку амонійного азоту у водному середовищі порівняно з іншими досліджуваними водоростями.*

**

*The regularities of changes in growth parameters and activity of nitrogen metabolism enzymes — glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in some species of Cyanoprokaryota (Anabaena cylindrica, Phormidium autumnale f. uncinata), Chlorophyta (Scenedesmus obtusus, Desmodesmus communis) and Euglenophyta (Euglena gracilis) e were investigated under the impact of elevated ammonium nitrogen concentrations (100 and 200 mg/dm$^3$). The most significant changes of the considered parameters were recorded in A. cylindrica, and minimal – in E. gracilis. The obtained results indicated that the representative of Euglenophyta is the most resistant to excess of ammonium nitrogen in the aquatic environment as compared with other investigated algae.*

**

1. *Астафурова Т.П.* Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания при адаптации растений к условиям гипобарической гипоксии: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — СПб, 1997. — 42 с.
2. *Баринова С.С.*, *Медведева Л.А.*, *Анисимова О.В.* Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. — Тель-Авив, 2006. — 498 с.
3. *Боднар О.І.* Адаптивні властивості водоростей за дії іонів металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2009. — 23 с.
4. *Визначник* прісноводних водоростей Української РСР. І. Синьозелені водорості — Cyanophyta. Ч. 2. Класс гормогонієві — Hormogoniophyceae. — К.: Наук. думка, 1968. — 523 с.
5. *Грубінко В.В.*, *Боднар О.І., Василенко О.В. та ін.* Функціонування глутуматдегідрогеназного шляху зв'язування амонію у прісноводних водоростей // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — № 3. — С. 31—36.
6. *Гудвин Т., Мерсер Э.* Введение в биохимию растений.— М.: Мир, 1986. — Т. 2. — 312 с.
7. *Клоченко П. Д.* Метаболізм азоту у прісноводних водоростей та його роль у формуванні їх угруповань та якості води: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — К., 2002. — 38 с.
8. *Коцюбинская Н.П.* Эколого-физиологические аспекты адаптации культурных растений к антропогенным условиям среды. — Днепропетровск, 1995. — 172 с.
9. *Кретович В.Л.* Усвоение и метаболизм азота у растений. — М.: Наука, 1987. — 486 с.
10. *Культивирование* коллекционных штаммов водорослей / Под ред. проф. Б.В. Громова. — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1983. —150 с.
11. *Курейшевич А.В., Медведь В.А., Потрохов А.С. и др.* Функционирование *Euglena gracilis* Klebs в условиях воздействия биологически активных веществ фенольной природы // Гидробиол. журн. — 2016. — Т. 52, № 2. — С. 71—82.
12. *Макрушин М.М.*, *Макрушина* Є.М., *Петерсон Н. В., Мельников М.М.* Фізіологія рослин / За ред. М.М. Макрушина. — Вінниця: Нова Книга, 2006. — 416 с.
13. *Мережко А.И., Шокодько Т.И., Ляшенко А.Н.* Влияние концентрации водородных ионов в среде на ассимиляцию аммонийного и нитратного азота роголистником и рдестом пронзеннолистным // Гидробиол. журн. — 1986. — Т. 22, № 4. — С. 56—60.
14. *Методы* физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
15. *Павлинова О. А.* Биохимические методы в физиологии растений. — М.: Наука, 1971. — 266 с.
16. *Сиренко Л.А., Рыбак Н.В., Паршикова Т.В., Пахомова М.Н.* Коллекция живых культур микроскопических водорослей (акроним коллекции — HPDP). — Киев: Фитосоциоцентр, 2005. — 53 с.

17. *Софьин А.В., Шатилов В.Р., Кретович В.Л.* Глутаматдегидрогеназы одноклеточной зеленой водоросли. Кинетические свойства // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 2. — С. 334—345.
18. *Харченко Г.В., Шевченко Т.Ф., Клоченко П.Д.* Сравнительная характеристика фитоэпифитона водоемов г. Киева // Гидробиол. журн. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 15—23.
19. *Энзимология* ассимиляции аммония у растений / Под ред. В. Л. Кретовича. — М.: ВИНИТИ, 1987. — 206 с.
20. *Cullimore J.V., Sims A.P.* Glutamine synthetase of *Chlamydomonas*, its role in the control of nitrate assimilation // Planta. — 1981. — Vol. 153. — P. 18—24.
21. *Collos Y., Harrison P.J.* Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae // Mar. Pollut. Bull. — 2014. — Vol. 80. — P. 8—23.
22. *Conley D.J., Carstensen J., Ertebjerg G.* Long term changes and impacts of hypoxia in Danish coastal waters // Ecol. Appl. — 2007. — Vol. 17. — P. 165—184.
23. *Emerson K., Russo R.C., Lund R.E., Thurston R.V.* Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature // J. Fish. Res. Board Can. — 1975. — Vol. 32, N 12. — P. 2379—2383.
24. *Everest S.A.*, *Syrett P.J.* Evidence for the participation of glutamate dehydrogenase in ammonium assimilation by *Stichococcus bacillaris* // New Phytologist. — 1983. — Vol. 93. — P. 581—589.
25. *Fayyaz-Chaudhary M.*, *Javed Q., Merrett M.J.* Effect of growth conditions on NADPH-specific glutamate dehydrogenase activity of *Euglena gracilis* // Ibid. — 1985. — Vol. 101. — P. 367—376.
26. *Jeffrey S.W., Humphrey S.W.* New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a*, *b*, $c_1$ and $c_2$ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanz. — 1975. — Vol. 167. — P. 171—194.
27. *Kim G.R., Mujtaba G., Lee K.* Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production // Algae. — 2016. — Vol. 31, N 3. — P. 257—266.
28. *Klochenko P.D., Grubinko V.V., Gumenyuk G.B., Arsan O.M.* Pecularities of ammonium nitrogen assimilation in green and blue-green algae // Hydrobiol. J. — 2003. — Vol. 39, N 6. — P. 102—108.
29. *Klochenko P.D., Shevchenko T.F., Kharchenko G.V.* Structural organization of phytoplankton and phytoepiphyton of the lakes of Kiev // Ibid. — 2013. — Vol. 49, N 4. — P. 47—63.
30. *Klochenko P.D., Shevchenko T.F., Vasilchuk T.A. et al.* On the ecology of phytoepiphyton of water bodies of the Dnieper river basin // Ibid. — 2014. — Vol. 50, N 3. — P. 41—54.
31. *Klochenko P.D., Shevchenko T.F., Kharchenko G.V.* Structural and functional organization of phytoplankton in the thickets and in the section free of vegetation in the lakes of Kiev // Ibid. — 2015. — Vol. 51, N 3. — P. 45—60.
32. *Konig A.*, *Pearson* H.W., Silva *S.A.* Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds // Water Sci. Technol. — 1987. — Vol. 19, N 12. — P. 115—122.

33. *Lancien M., Gadal P., Hodges M.* Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonia assimilation // Plant Physiol. — 2000. — Vol. 123. — P. 817—824.
34. *Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I.* Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
35. *Moreno-Marin F., Vergara J.J., Pérez-Llorens J.L. et al.* Interaction between ammonium toxicity and green tide development over seagrass meadows: A laboratory study // PLOS ONE. — 2016. — Vol. 11 (4). — P. 1—17.
36. *Shevchenko T.F., Kharchenko G.V., Klochenko P.D.* Cenological analysis of phytoepiphyton of water bodies of Kiev // Hydrobiol. J. — 2010. — Vol. 46, N. 1. — P. 41—55.
37. *Tischner T.* Evidence for the participation of NADP-glutamate dehydrogenase in the ammonium assimilation of *Chlorella sorokiniana* // Plant Sci. Letters. — 1984. — Vol. 34. — P. 73—80.
38. *Von Rückert G., Giani A.* Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria) // Revista Brasil. Bot. — 2004. — Vol. 27, N 2. — P. 325—331.

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев Поступила 23.02.18