

УДК 282.263:582.232(58.036: 581.143.28:577.122)

І. М. Незбрицька, А. В. Курейшевич, О. В. Василенко

**ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ УМОВ НА РОСТОВІ
ПРОЦЕСИ ТА АКТИВНІСТЬ
ГЛУТАМАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У ДЕЯКИХ
ВИДІВ CHLOROPHYTA І CYANOPROKARYOTA**

Вивчено динаміку сухої маси та активності НАДН- та НАДФН-залежної глутаматдегідрогенази у представників Chlorophyta (*Desmodesmus communis*, *Tetradron caudatum*) і Cyanoprokaryota (*Aphanocapsa planctonica*, *Phormidium autumnale* f. *uncinata*) при культивуванні за різної температури. Максимальне накопичення біомаси обох зелених водоростей відбувається при температурі 20°C, а ціанопрокаріоти *Aphanocapsa planctonica* — 26 і 32°C. Виявлено значний інгібуючий вплив найвищої з досліджуваних температур (32°C) на активність НАДН- і НАДФН-ГДГ у представників Chlorophyta. Встановлено, що у перифітонної ціанопрокаріоти *Phormidium autumnale* f. *uncinata* зміни активності обох форм ГДГ за різних температур менші, ніж у інших досліджених водоростей.

Ключові слова: *Chlorophyta, Cyanoprokaryota, температура, азотистий обмін, глутаматдегідрогеназа.*

Несприятлива (зокрема висока) температура є одним з найбільш поширених абіотичних стресорів для водоростей [14]. Через відсутність механізмів теплової регуляції вони змушені постійно адаптуватися до коливань температури середовища [8]. Висока пластичність азотистого обміну — один з найважливіших механізмів пристосування рослин до широкого діапазону дії екологічних чинників, у тому числі й температурного [6, 16, 17]. Провідною компонентою цієї пластичності є зміна швидкості окремих ензиматичних реакцій [6]. Тому дослідження активності ферментів азотистого обміну водоростей необхідне для розуміння їх адаптації до дії несприятливої температури.

Відомо, що ключовою ланкою азотистого обміну є взаємоперетворення α -кетоглутарату і глутамату за участю глутаматдегідрогенази (ГДГ), при якому одночасно відбувається взаємоперетворення неорганічного амонійного та органічного α -амінного азоту. Роль відновника у цих процесах може відігравати НАДН або НАДФН. Глутаматдегідрогеназа не лише забезпечує підтримання азотистого гомеостазу у клітині, але і може здійснювати субстратне регулювання циклу Кребса за рахунок дезамінування глутамату [2, 5]. Відомо, що у рослин і мікроорганізмів НАДН-ГДГ є катаболічним фермен-

© І. М. Незбрицька, А. В. Курейшевич, О. В. Василенко, 2015

том, що здійснює переважно дезамінування глутамату, а НАДФН-ГДГ — анаболічним, що здійснює амінування 2-оксоглутарату [3].

Метою нашої роботи було з'ясувати особливості впливу температурного режиму культивування на накопичення сухої маси та активність ГДГ у деяких видів Chlorophyta та Cyanoprokaryota. Ці дані в літературі відсутні, хоча вони становлять суттєвий інтерес при прогнозуванні видового складу домінуючих комплексів водоростей у зв'язку з глобальними змінами клімату та підвищенням літніх температур водних об'єктів.

Матеріал і методика досліджень. У досліджах використовували альгологічно чисті культури Chlorophyta (*Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew. HPDP-109 і *Tetraedron caudatum* (Corda) Hansg. IBASU-A 277) та Cyanoprokaryota (*Aphanocapsa planctonica* (G.M. Sm.) Komárek et Anagn. (= *Microcystis pulvereae* (Wood) Forti emend. Elenkin) HPDP-30 і *Phormidium autumnale* f. *uncinata* (C. Agardh) N.V. Kondrat. HPDP-36). Водорості вирощували у термостаті на середовищі Фітцджеральда № 11 у модифікації Цендера і Горема [7] за освітленості 3000 лк при температурі 20, 26 і 32°C (з точністю $\pm 0,5^\circ\text{C}$). Тривалість вирощування становила 28 діб. Активність глутамат-дегідрогенази встановлювали спектрофотометричним методом на СФ-46 за швидкістю окиснення НАДН або НАДФН у реакційній суміші і виражали у мкмоль НАДН(НАДФН)/мг білка·хв [9]. Вміст білків у біомасі водоростей визначали за методом Лоурі [11]. Інтенсивність росту культур оцінювали за зміною сухої маси [7]. Вимірювання проводили на 7, 14, 21 і 28-у добу.

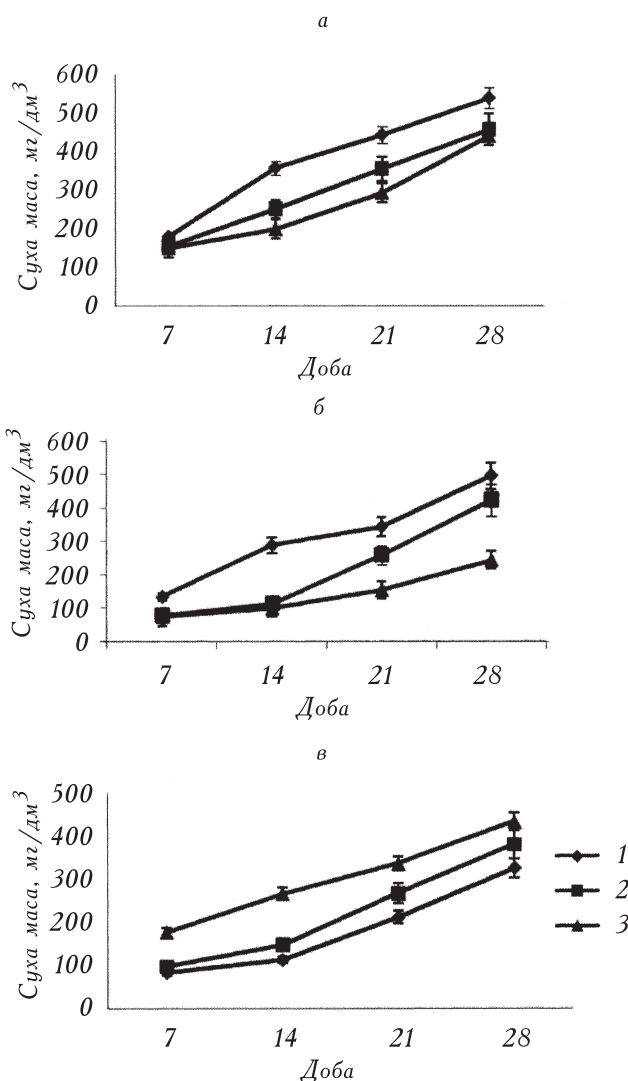
Результати досліджень та їх обговорення

Динаміка сухої маси та активності НАДН- та НАДФН-залежної ГДГ за різної температури середовища (20, 26 та 32°C) у досліджених видів Chlorophyta та Cyanoprokaryota була неоднаковою.

Найбільш сприятлива температура для росту *D. communis* — 20°C (рис. 1, а). При температурі 26°C активність обох форм ГДГ була вищою, ніж при 20°C, протягом усього періоду вирощування, що свідчить про інтенсифікацію азотистого метаболізму (рис. 2). На експоненціальній фазі росту (14-а доба) активність НАДФН-залежної ГДГ була вищою, ніж НАДН-залежної, а на стаціонарній фазі (28-а доба) — навпаки (табл. 1).

Відомо, що у рослин за дії різних несприятливих чинників активування анаболічної (НАДФН-) ГДГ відбувається під впливом ендогенного амонію, концентрація якого значно зростає. В умовах фізіологічних стресів вона виконує важливу роль у детоксикації аміаку [13, 15]. У той же час підвищення активності катаболічної (НАДН-) ГДГ свідчить про її участь у підтриманні вуглеводного метаболізму шляхом утворення субстрату (2-оксоглутарату) для циклу Кребса [12, 13].

Вважають, що рівень експресії генів ГДГ у рослин визначається вуглеводним статусом їх клітин [4]. Показано [15], що коли знижується інтенсивність фотосинтезу і відповідно зменшується кількість вуглецю, активність ГДГ у рослинних клітинах зростає. Збільшення кількості активного



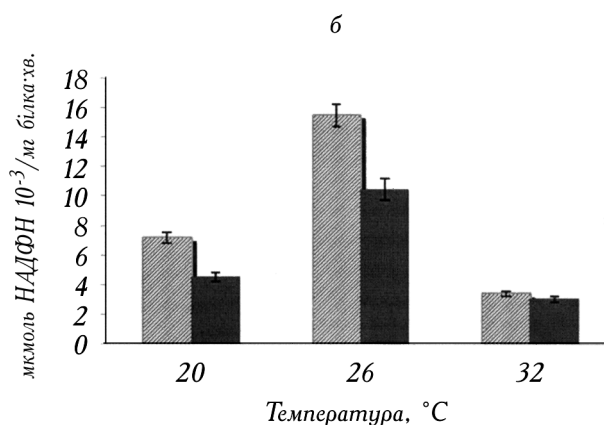
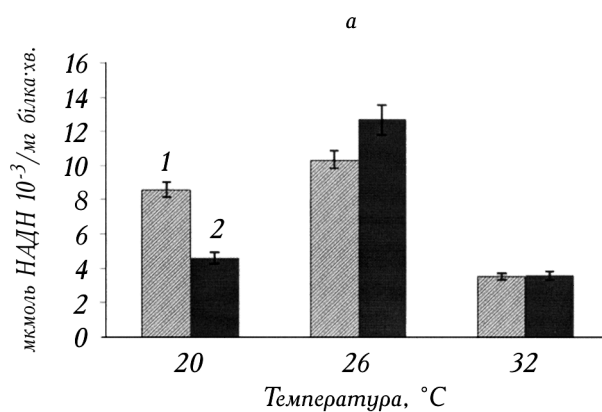
1. Динаміка сухої маси *Desmodesmus communis* (а), *Tetraedron caudatum* (б) і *Aphanocapsa planctonica* (в) при вирощуванні за різної температури: 1 — 20°C; 2 — 26°C; 3 — 32°C.

ферменту дозволяє клітині використовувати глутамат як енергетичний субстрат [4].

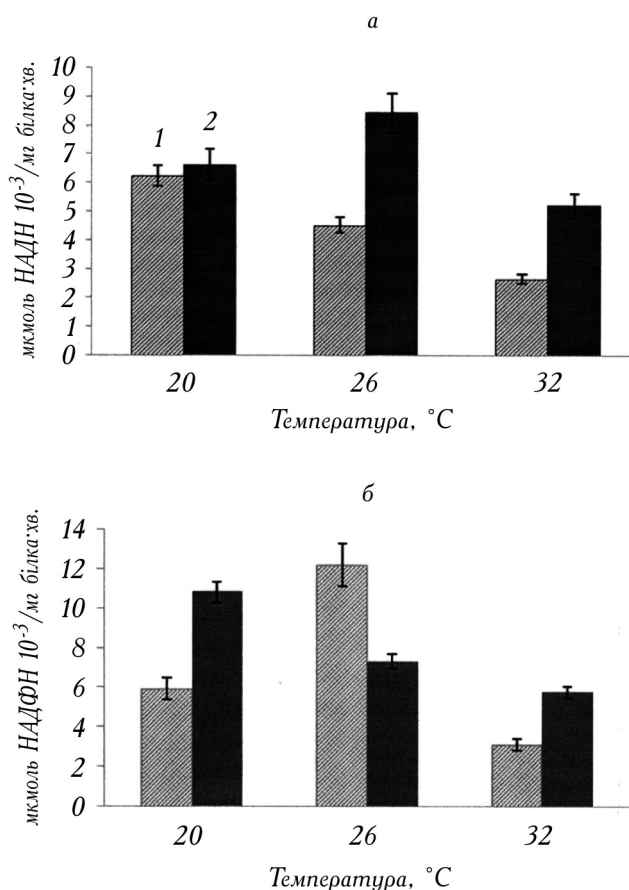
При температурі 32°C у *D. communis* відбувається гальмування ростових процесів та зниження активності обох форм ГДГ порівняно з іншими температурними режимами, особливо на експоненціальній фазі росту культури. Так, на 14-у добу культивування активність НАДФН- і НАДН-ГДГ була меншою, ніж при 20°C відповідно у 2,1 та 2,4 разу, а на 28-у добу — у 1,5 та 1,3 разу. Ймовірно, така температура зумовлює у цієї водорості порушення функціонування глутаматдегідрогеназної системи.

1. Співвідношення активності НАДН- та НАДФН-залежної ГДГ у представників Chlorophyta та Cyanoprokaryota за дії різних температур

Культури водоростей	Тривалість вирощування, діб	НАДН-ГДГ : НАДФН-ГДГ		
		20°C	26°C	32°C
<i>D. communis</i>	14	1 : 0,8	1 : 1,5	1 : 1
	28	1 : 1	1 : 0,8	1 : 0,8
<i>T. caudatum</i>	14	1 : 1	1 : 2,4	1 : 1
	28	1 : 1,6	1 : 0,9	1 : 1,2
<i>Aph. planctonica</i>	14	1 : 1,5	1 : 2,5	1 : 3
	28	1 : 2	1 : 0,8	1 : 2
<i>Ph. autumnale</i> f. <i>uncinata</i>	14	1 : 0,6	1 : 0,9	1 : 0,4
	28	1 : 0,7	1 : 0,3	1 : 0,9



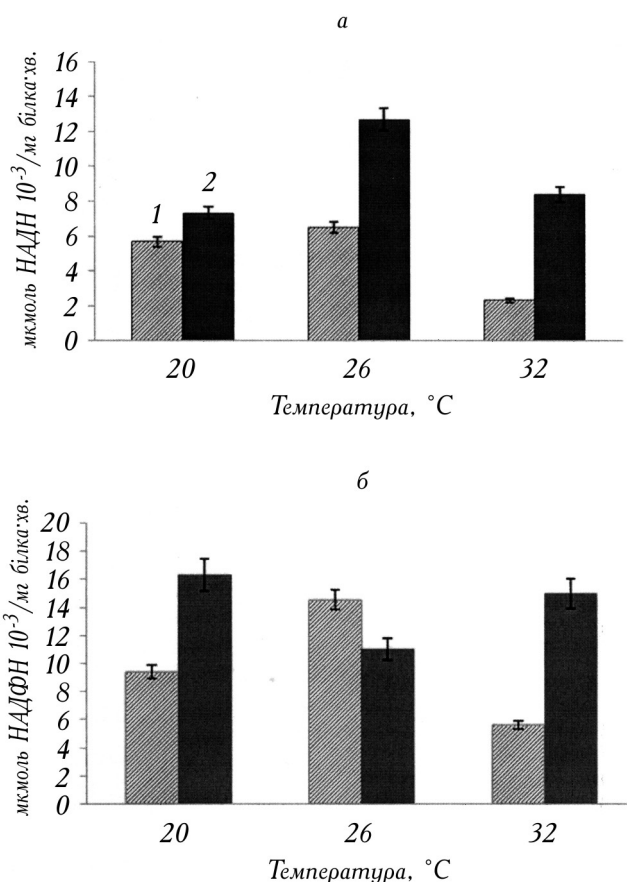
2. Активність НАДН-залежної (а) і НАДФН-залежної (б) глутаматдегідрогенази у *Desmodesmus communis* за дії різних температур. Тут та на рис. 3—5: 1 — 14-а, 2 — 28-а доба культивування.



3. Активність НАДН-залежної (а) і НАДФН-залежної (б) глутаматдегідрогенази у *Tetraedron caudatum* за дії різних температур.

У *T. caudatum*, як і у *D. communis*, найвищі значення сухої маси також відмічені при температурі культивування 20°C, а найнижчі — 32°C (див. рис. 1, б). При 26°C у *T. caudatum* на 14-у добу активність НАДФН-ГДГ була у 2,1 разу вищою, ніж при 20°C, а НАДН-ГДГ — в 1,4 разу нижчою (рис. 3), співвідношення активності НАДН-/НАДФН-ГДГ становило 1,0 : 2,4. Це вказує на зміщення реакції у бік амінування 2-оксоглутарату, що забезпечує більш ефективне виведення аміаку, який за дії підвищеної температури утворюється у значній кількості. На 28-у добу активність НАДН-ГДГ дещо підвищилась, а НАДФН-ГДГ — знизилась, тобто реакція змістилась у бік утворення 2-оксоглутарату.

При найвищій температурі (32°C) активність обох форм ГДГ у *T. caudatum* була значно нижчою, ніж при 20 і 26°C, протягом усього періоду вирощування. Одержані нами результати узгоджуються з літературними даними про зниження активності ГДГ у рослин за впливу несприятливих температур [1].

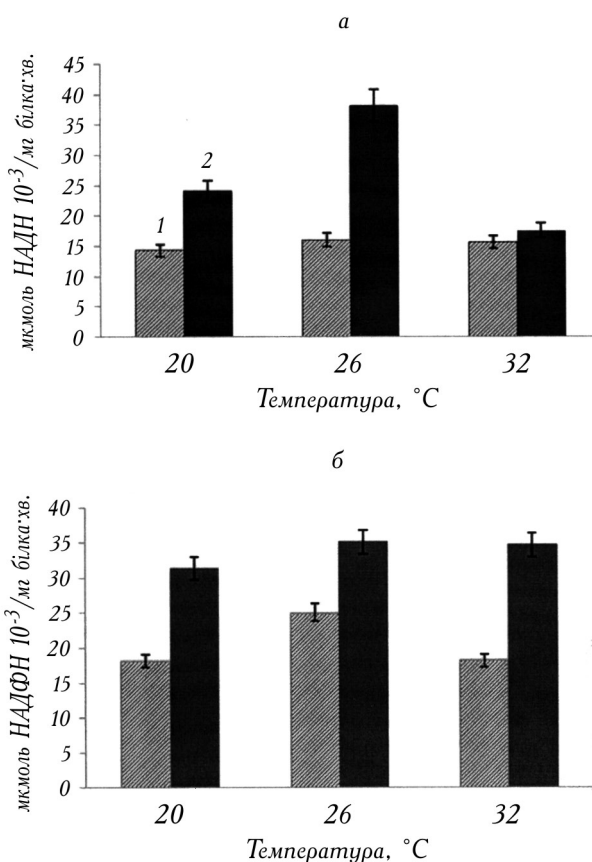


4. Активність НАДН-залежної (а) і НАДФН-залежної (б) глутаматдегідрогенази у *Aphanocapsa planctonica* за дії різних температур.

Ціанопрокаріота *Aph. planctonica* краще росла при температурі 26 і 32°C, ніж при 20°C (див. рис. 1, в). При 32°C суха біомаса була вищою лише на 7-у та 14-у добу культивування, а на 21-у та 28-у добу значення показника наближались до відмічених при 26°C.

При 20°C у *Aph. planctonica* на 14-у добу активність НАДФН-ГДГ була нижчою, а НАДН-ГДГ — не відрізнялась від зареєстрованої при 26°C. На 28-у добу, навпаки, — активність НАДФН-ГДГ була вищою, а НАДН-ГДГ — нижчою ніж при 26°C. Можливо, зміна активності НАДН- і НАДФН-залежних ГДГ у бік амінування пояснюється перерозподілом продуктів амінування для синтезу інших амінокислот, що забезпечують адаптивну реакцію водорості на несприятливий чинник [2].

Температура 32°C у *Aph. planctonica* зумовлює на обидві форми ферменту подібний вплив. На експоненціальній фазі росту (14-а доба) значення активності були помітно нижчими, ніж при 20 і 26°C, а на стаціонарній фазі — наближались до зареєстрованих при 20°C.



5. Активність НАДН-залежної (а) і НАДФН-залежної (б) *Phormidium autumnale* f. *uncinata* за дії різних температур.

У *Ph. autumnale* f. *uncinata* зміни активності НАДН і НАДФН-залежних ГДГ за впливу різних температурних умов були найменш вираженими порівняно з іншими видами водоростей (рис. 5). Максимальні значення зареєстровані при 26°C. Вираженого інгібуючого впливу температури 32°C на активність обох форм ферменту не виявлено. Варто зазначити, що цей вид Суаноргокарыота інтенсивно обростає стіни шлюзів, буї, берегові укоси дніпровських водосховищ [10], тобто є досить стійким до впливу різних екологічних чинників, зокрема і високої температури.

Висновки

Досліджені види Chlorophyta та Суаноргокарыота відрізняються реакцією на вплив різних температурних режимів культивування. Для росту *Desmodesmus communis* та *Tetraedron caudatum* найбільш сприятливою температурою є 20°C. Найвища з досліджуваних температур (32°C) значно пригнічувала ростові процеси у цих видів водоростей, в той же час ціанопрокаріота *Aphanocapsa planctonica* краще росла при температурі 26 і 32°C.

Протягом усього періоду культивування *Desmodemus communis* при 26°C активність ГДГ була вищою, ніж при 20°, що, очевидно, є однією з її адаптивних реакцій на вплив підвищеної температури. У *Tetraedron caudatum* при 26°C зміни активності НАДН- і НАДФН-ГДГ відрізнялися на експоненціальній і стаціонарній фазах росту. Найвища з досліджуваних температур (32°C) суттєво пригнічувала активність обох форм ферменту у Chlorophyta.

У ціанопрокаріот (*Aphanocapsa planctonica* і *Phormidium autumnale f. uncinata*) функціональна активність обох форм ГДГ у цілому максимальна при температурі 26°C. Перифітонна ціанопрокаріота *Phormidium autumnale f. uncinata* характеризується більшою стійкістю до дії найвищої досліджуваної температури (32°C), ніж планктонна *Aphanocapsa planctonica* та зелені водорості *Desmodemus communis* і *Tetraedron caudatum*.

**

Изучена динамика сухой массы и активности глутаматдегидрогеназы (НАДН- и НАДФН-зависимой) у представителей Chlorophyta (Desmodemus communis и Tetraedron caudatum) и Цианопрокарйота (Aphanocapsa planctonica и Phormidium autumnale f. uncinata) при культивировании при разной температуре. Максимальное накопление биомассы зеленых водорослей происходило при 20°C, а цианопрокарйоты Aphanocapsa planctonica — при 26 и 32°C. Температура 32°C подавляла активность обеих форм фермента у представителей Chlorophyta. У перифитонной цианопрокарйоты Phormidium autumnale f. uncinata изменения активности обеих форм ГДГ при разных температурных режимах менее существенны, чем у других исследованных водорослей.

**

The dynamics of growth and activity of glutamate dehydrogenase (NADH- and NADPH-dependent) in Chlorophyta (Desmodemus communis, Tetraedron caudatum) and Cyanoprokaryota (Aphanocapsa planctonica, Phormidium autumnale f. uncinata) under different temperature regimes has been studied. Maximal biomass of green algae was observed at 20°C, and Aphanocapsa planctonica — at 26 and 32°C. At maximal considered temperature 32°C activity NADN- and NADPH-GDH in Chlorophyta was significantly inhibited. Fluctuations of activity of both GDH forms in periphytic Cyanoprokaryota Phormidium autumnale f. uncinata under the influence of different temperature regimes were less pronounced than other considered species.

**

1. Бабенко В.И., Нарийчук Ф.Д. Влияние пониженной температуры на малат- и глутаматдегидрогеназу хлоропластов озимой пшеницы // Докл. АН СССР. — 1976. — Т. 228, № 5. — С. 1252—1255.
2. Богнар О.И., Горга А.И., Грубинко В.В. Роль азотного обміну в адаптації водоростей до іонів металів // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2010. — № 1 (42). — С. 62—76.
3. Василенко О.В., Богнар О.И., Винярская Г.Б. Энергетический и азотистый обмен у *Chlorella vulgaris* Beij. (Chlorophyta) под влиянием селенита натрия // Альгология. — 2014. — Т. 24, № 3. — С. 297—301.
4. Гарник Е.Ю., Бельков В.И., Тарасенко В.И. и др. Экспрессия гена глутаматдегидрогеназы *gdh2* арабидопсиса индуцируется под влиянием инги-

- битора синтеза тетрапирролов норфлуразона // Журн. стресс-физиологии и биохимии. — 2013. — Т. 9, № 4. — С. 299—309.
5. Грубінко В.В., Боднар О.І., Василенко О.В. та ін. Функціонування глутаматдегідрогеназного шляху зв'язування амонію у прісноводних водоростей // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — № 1 (58). — С. 31—36.
 6. Іванченко О.Є. Вплив важких металів на метаболізм азоту рослин // Питання біоіндикації та екології. — 2009. — Вип. 14, № 2. — С. 69—79.
 7. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
 8. Незбрицька І.М., Курейшевич А.В., Потрохов О.С., Зіньківський О.Г. Вплив короточасного теплового шоку на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів представників Cyanoprokaryota та Chlorophyta // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — № 1 (58). — С. 87—91.
 9. Софьин А.В., Шатилов В.Р., Кретович В.А. Глутаматдегидрогеназы одноклеточной зеленой водоросли *Ankistrodesmus braunii*. Кинетические свойства // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 2. — С. 334—343.
 10. Шевченко Т.Ф. Видовой состав водорослей перифитона водохранилищ Днепровского каскада // Гидробиол. журн. — 2007. — Т. 43, № 3. — С. 3—44.
 11. Lowry O.H., Rosenbrough 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.
 12. Kumar R.G., Shah K., Dubey R.S. Salinity induced behavioral changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance // Plant Sci. — 2000. — Vol. 156, N 1. — P. 23—34.
 13. Kwinta J., Cal K. Effects of salinity stress on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in Triticale seedlings // Pol. J. Environ. Studies. — 2005. — Vol. 14, N 1. — P. 125—130.
 14. Ras M., Steyer J.-P., Bernard O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. — 2013. — Vol. 12, N 2. — P. 153—164.
 15. Robinson S.A., Stewart G.R., Phillips R. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures // Plant Physiol. — 1992. — Vol. 98, N 3. — P. 1190—1195.
 16. Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine // Plant Cell. — 2006. — Vol. 18, N 10. — P. 2767—2781.
 17. Zhang L.-l., He X.-j., Chen M. et al. Responses of nitrogen metabolism to copper stress in *Luffa cylindrica* roots // J. Soil Sci. Plant Nutr. — 2014. — Vol. 14, N 3. — P. 616—624.