

МАМТА АВАСТИ, ДЕБАНГШУ НАРАЯН ДАС

Ун-т Арунахал, отделение зоологии
791112 Итанагар, Индия

**ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА
НИТРАТРЕДУКТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ СВОБОДНЫХ И
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ВОДОРОСЛЕЙ**

Ассимиляция нитратов является одним из главных путей обеспечения растений и водорослей неорганическим азотом. Нитратредуктаза представляет собой фермент с комплексной структурой, которая тесно связана с клеточной оболочкой. Она может пребывать как в активной, так и в неактивной форме. Нитратредуктаза является одним из ключевых ферментов, оказывающих влияние на рост водорослей и синтез белка. Установлено, что тяжелые металлы отрицательно влияют на нитратредуктазную активность *Chlorella vulgaris* Beijer. При этом наиболее токсичным по сравнению с цинком и кадмием оказался никель. При добавлении никеля нитратредуктазная активность в иммобилизованных клетках была выше, чем в свободных.

Ключевые слова: тяжелые металлы, *Chlorella vulgaris*, иммобилизация, нитратредуктаза.

Введение

Уровень загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ), а также ущерб, наносимый этими элементами живым организмам, постоянно возрастают. ТМ оказывают отрицательное влияние на биоту, когда их концентрация в окружающей среде превышает пороговые значения (Tam et al., 1998). Это относится, в первую очередь, к таким ТМ, как кадмий, которые не выполняют никаких биологических функций. Данные о токсическом воздействии тяжелых металлов на водоросли, обобщенные ранее (Vyamzal, 1987; Demon et al., 1988), подтверждают их отрицательное влияние на макромолекулы водорослей.

Помимо прочих токсических эффектов Ni, Zn и Cd оказывают токсическое действие на нитратредуктазную активность водорослевых клеток. Процесс восстановления нитратов играет очень важную роль в улучшении качества воды. Ассимилятивное восстановление азота, осуществляемое различными видами бактерий, грибов и водорослей, включает восстановление нитратов и нитритов для дальнейшего синтеза аминокислот. Чаще всего, эти реакции катализируются нитрат- и нитритредуктазой, являющимися флавопротеидами, при активном участии НАДФ (NADPH) как источника электронов. Этот процесс имеет очень важное экологическое значение, поскольку высокие концентрации нитратов отрицательно сказываются на здоровье человека. Нитриты взаимодействуют с гемоглобином и тем самым препятствуют транспорту кислорода в крови, особенно у детей.

Согласно мировым стандартам, предельно допустимая концентрация (ПДК) нитратов в питьевой воде составляет 10 мг N/л или 45 мг N/л (по NO₃). Имеются сведения о влиянии ТМ на нитратредуктазу высших растений

(Muthuchelian et al., 1988), а также на нитратредуктазную активность водорослевых клеток, находящихся в свободном состоянии. В то же время, информация о влиянии ТМ на активность нитратредуктазы водорослевых клеток, находящихся в иммобилизованном состоянии, крайне ограничена.

Иммобилизация клеток водорослей представляет интерес, поскольку она позволяет осуществить иммобилизацию клеток высших растений и служит прекрасной моделью для изучения действия иммобилизации на физиологию растительной клетки. Изучение клеток, находящихся в свободном взвешенном состоянии, может дать ценную информацию при проведении лабораторных экспериментов, тогда как данные по изучению иммобилизованных клеток могут быть использованы при индустриальном выращивании водорослей. Однако сравнительное изучение реакции свободных и иммобилизованных клеток с учетом физиологических и биохимических особенностей поведения водорослей в ответ на воздействие тяжелых металлов практически не проводилось.

Скорость ассимиляции нитратов зависит от уровня активности нитратредуктазы (Lau et al., 1998; Sarma & Khatter, 1994). Азот восстанавливающие ферменты водорослей имеют сходство с таковыми грибов и высших растений. Эта проблема изучалась и ранее (Somasundaram et al., 1994; Muthuchelian, 1988), однако до настоящего времени нет достаточных и однозначных данных о влиянии тяжелых металлов на нитратредуктазу, особенно у водорослей, находящихся в иммобилизованном состоянии. Основная цель настоящей работы состояла в сравнительном изучении токсического действия тяжелых металлов на нитратредуктазную активность свободных и иммобилизованных клеток *Chlorella vulgaris*.

Материалы и методы

Объектом исследований служила одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris* (локальный штамм, ВНУ). Культуральную среду Чу-10 (рН 6.8) (Gerloff et al., 1950) готовили, используя деионизированную фильтрованную и стерильную бидистиллированную воду. При отборе, выделении и клонировании водорослей для получения чистой культуры применяли стандартные микробиологические методики. Выживаемость клеток *Chlorella vulgaris* устанавливали в процессе ее роста на чашках Петри с целью получения LC_{50} для Ni, Zn и Cd. При этом учитывались также такие концентрации, как $< LC_{50}$ и $> LC_{50}$.

При проведении экспериментов 100 мл культуры встряхивали при температуре $25 \pm 1^\circ C$ и интенсивности света 14.4 Вт/м^2 (соотношение светового и темного цикла составляло 18:6 ч). Культуры азиривали 2 % CO_2 при скорости потока примерно 1,5 мл/мл культуры в минуту. Пребывание свободных и иммобилизованных клеток в экспоненциальной фазе роста определяли по плотности белка, равной 500 мкг/мл. Перед добавлением в культуральную среду растворы $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CdSO_4 \cdot H_2O$ стерилизовали и пропускали их через мембранные фильтры Millipore (0,45 мкм). Использовали реактивы компаний Sigma (США) и BDH (Великобритания).

Иммобилизация клеток. Клеточную массу *Chlorella vulgaris*, в экспоненциальной фазе роста (500 мкг белка в 1 мл), полученную центрифугированием,

многократно промывали и помещали в 5 %-й раствор альгината натрия (Sigma). Затем смесь по каплям добавляли в 0,2 М раствор CaCl_2 . Полученные таким образом агрегации (в среднем 5 мм в диаметре), оставляли на 2 ч для застывания, затем неоднократно промывали стерильной деионизированной бидистиллированной водой и помещали в культуральную среду объемом 200 мл для автотрофного роста в лабораторных условиях наряду со свободными клетками.

Количество ингибированных свободных и иммобилизованных клеток рассчитывали в процентах от общего количества необработанных клеток, которые служили контролем. Белок определяли известным методом (Herbert et al., 1971).

Определение активности нитратредуктазы. Водоросли, для которых источник азота являлся фактором, лимитирующим их рост, культивировали на специальной установке, предназначенной для их длительного выращивания. Нитратредуктазную активность определяли известным методом (Camm & Stein, 1974). Активность определяли по общему содержанию нитритов. В культуральную среду вносили Ni, Zn и Cd в определенных концентрациях. Образцы объемом 1,0 мл отбирали через определенные промежутки времени. Содержание образовавшихся нитритов определяли по описанному методу (Lowe & Evans, 1964). Оптическую плотность раствора розовой окраски измеряли при длине волны 540 нм.

Выделение иммобилизованных клеток. Тестирование проводили после растворения плотных агрегаций, полученных с помощью альгината натрия и CaCl_2 , в гексаметофосфате (Bozem et al., 1989).

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали при помощи критерия Стьюдента ($t_{\text{н}}$), а также дисперсионного анализа (факторы: тип металла (Ni, Zn, Cd); учитывали также состояние клеток (свободные и иммобилизованные) и концентрацию металла (< LC_{50} , LC_{50} и > LC_{50}).

Результаты

Данные о нитратредуктазной активности *Chlorella vulgaris* представлены в табл. 1. Активность ферментов уменьшалась с увеличением концентрации металлов. При LC_{50} для Ni, Zn и Cd наблюдалось ингибирование нитратредуктазной активности свободных клеток на 87,2; 50,5 и 72,1 % и иммобилизованных – на 53,6; 34,6 и 38,0 % соответственно. Более токсичным оказался Ni по сравнению с другими металлами как в отношении свободных, так и иммобилизованных клеток.

Результаты дисперсионного анализа представлены в табл. 2. Значительное уменьшение нитратредуктазной активности под воздействием металлов наблюдали как в свободных, так и в иммобилизованных клетках ($t_{\text{н}}$ достоверен при $P < 0,005$). Интенсивность образования нитритов в иммобилизованных клетках была в 1,2 раза выше (при $P < 0,05$), чем в свободных. Даже при LC_{50} для Ni, Zn, Cd содержание нитритов в иммобилизованных клетках было в 3,6; 1,2 и 2,2 раза выше ($P < 0,005$), чем в свободных. Влияние металлов на клетки, находящихся в свободном и иммобилизованном состоянии, было достоверным при $P < 0,01$. Однако разница между характером влияния металлов на свободные и иммобилизованные клетки была незначительной (в иммобилизованных клетках $P < 0,05$).

Таблица 1. Влияние Ni, Zn и Cd на нитратредуктазную активность свободных и иммобилизованных клеток *Chlorella vulgaris* Beijer. (после 72 ч экспозиции)

Концентрация металлов (мкМ)		Нитратредуктазная активность (нг NO ₂ /мкг белка)	
		Свободные клетки	Иммобилизованные клетки
Контроль		98,84 ± 0,03	120,00 ± 0,04(21,4)*
Ni	3,20	40,52 ± 0,02(59,0)	56,80 ± 0,04(42,5)
	4,20	12,65 ± 0,03(87,2)	45,80 ± 0,09(53,6)
	5,30	9,88 ± 0,04(90,0)	31,40 ± 0,06(68,2)
Zn	0,75	59,30 ± 0,04(40,0)	64,60 ± 0,03(34,6)
	1,75	49,42 ± 0,04(50,0)	60,90 ± 0,04(38,3)
	2,75	24,71 ± 0,03(75,0)	35,40 ± 0,05 (64,1)
Cd	0,16	35,00 ± 0,02(64,0)	65,00 ± 0,07(35,1)
	1,16	27,50 ± 0,05(72,1)	61,20 ± 0,07(38,0)
	2,16	15,00 ± 0,05(84,8)	40,20 ± 0,08(59,3)

* Указывает на стимуляцию по сравнению с контролем (для свободных клеток). В скобках указан процент ингибирования. Все экспериментальные данные существенно отличаются от контроля по критерию Стьюдента (t_к) при P < 0,005.

Таблица 2. Дисперсионный анализ данных по влиянию тяжелых металлов на нитратредуктазную активность *Chlorella vulgaris* Beijer.

Факторы	Степень свободы	Сумма квадратов отклонений	Средние квадраты	F-критерий	Уровень достоверности
A	1	2620,87	2620,87	288,28	P < 0,001
Металл	3	21947,97	7315,99	804,73	P < 0,001
C	3	1722,67	861,33	94,74	P < 0,001
A × Металл	3	332,70	110,90	12,19	P < 0,01
A × C	3	49,46	24,73	2,72	P > 0,05
Металл × C	9	773,63	128,93	14,18	P < 0,01
Ошибка	9	34,54		9,90	
В общем	31			27501,86	

Примечание. A – тип клеток (свободные и иммобилизованные); Металлы – Ni, Zn, Cd; C – концентрация металлов (< LC₅₀, LC₅₀, >LC₅₀).

Обсуждение

Установлено, что металлы могут оказывать токсический эффект, не оказывая никакого влияния или положительно воздействовать на водорослевые клетки. Полученные данные свидетельствуют о том, что Ni, Zn и Cd ингибируют

синтез нитратредуктазы. Одной из причин этого явления, может быть замещение иона металла, выполняющего основную функцию в белке фермента (Antipov et al., 1999). Показано также (Nichols et al., 1978; Knobloch & Tischer, 1989), что нитратредуктаза обеспечивает не только восстановление нитратов, но и влияет на их поглощение клетками *Chlamydomonas* и *Chlorella sorokiniana*.

Возможно также взаимодействие ТМ с сульфгидрильными (-SH) группами, которые часто определяют вторичную и третичную структуру белков. Кроме того, недостаточный доступ энергии из-за ингибирования включения $^{14}\text{CO}_2$ (Awasthi & Das, 1991), фотосинтетического транспорта электронов (Prasad et al., 1991) и косвенного ингибирования поглощения NO_3^- может служить еще одной важной причиной этого явления.

Таким образом, менее значительное ингибирование ферментативной активности иммобилизованных клеток по сравнению с клетками, находящимися в свободной суспензии, может быть обусловлено более интенсивным потоком энергии, которая свойственна клеткам, находящимся в иммобилизованном состоянии. Сохранение физиологических свойств в неизменном состоянии в иммобилизованных клетках на протяжении длительного периода времени отмечалось и другими авторами (Lau et al., 1998, Tam et al., 1998). Иммобилизованные клетки находятся в тесной ассоциации друг с другом (Lau et al., 1998), что приводит к химическому и физическому взаимодействию между ними. Кроме того, любая стимуляция пула АТФ и присутствие НАДФ (NADPH) могут активизировать АТФ-зависимые процессы, в частности, нитратредуктазную активность. Таким образом, увеличение фотосинтетической активности может сопровождаться усилением ферментативной активности (Awasthi & Das, 2003).

Благодарности

Авторы выражают благодарность Министерству окружающей среды и лесного хозяйства (Нью Дели) за финансовую поддержку проекта. Мы также благодарны своему руководителю, заведующему отделом ботаники (ун-т Банарас Хинди) за предоставление лаборатории для проведения экспериментов. Кроме того, авторы выражают благодарность консульству по научным и промышленным исследованиям (Нью Дели) за возможность стажировки за границей, а также заведующему отделом зоологии (ун-т Арунахал) за помощь при подготовке рукописи.

Mamta Awasthi & Debangshu Narayan Das

Department of Zoology, Arunachal University, Itanagar, India,
Arunachal University, Itanagar 791 112, India, e-mail: awasthi6@rediffmail.com

HEAVY METAL TOXICITY ON NITRATE REDUCTASE ACTIVITY OF FREE AND IMMOBILIZED ALGAL CELLS

Nitrate assimilation is the principal route for plants and algae to acquire inorganic nitrogen. Nitrate reductase is a multi-enzyme complex bound in the cell membrane in both active and inactive forms. Nitrate reductase is the limiting factor when considering the growth and protein production of algae. Heavy metals interacted negatively with the nitrate reductase (NR) enzyme activity of *Chlorella vulgaris* Beijer. Nickel was

found to be more toxic compared to zinc and cadmium. A highly significant increase in NR activity was observed in the immobilized cells over free cells when supplemented with Ni.

Keywords: heavy metals, *Chlorella, vulgaris*, immobilization, nitrate reductase.

- *Antipov, A.N., N.N. Lyalikova, T.V. Khiznjak & N.P. L'vov. 1999. Some properties of dissimilatory nitrate reductases lacking molybdenum and molybdenum cofactor. *Biochemistry (Moscow)* **64**: 483-487. (Transl. from *Biokhimiya* **64**: 581-586).
- Awasthi, M. & D.N. Das. 2003. Impact of Ni, Zn and Cd on growth rate, photosynthetic activity, nitrate reductase and alkaline phosphatase activity of free and immobilized *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Stud.* (in press).
- Bozemaa, J., B. Koopman & G. Bitton. 1989. Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology* **14**: 345-352.
- Camu, E.L. & J.R. Stein. 1974. Some aspects of nitrogen metabolism of *Nodularia spuigena* (Cyanophyceae). *Can. J. Bot.* **52**: 719-726.
- Demon, A., M. De Bruin & H.T. Wolterbeck. 1988. The influence of pH on trace metal uptake by an alga (*Scenedesmus pannonicus* Subsp. Berlin) and fungus (*Aureobasidium pullulans*). *Environ. Monitor. Assess.* **10**: 165-173.
- Gerioff, G.C., G.P. Fitzgerald & F. Skoog. 1950. The isolation- purification, and culture of blue-green algae. *Amer. J. Bot.* **27**: 216-218.
- Herbert, D., P.J. Phipps & R.E. Strange. 1971. Chemical analysis of microbial cells. Pp. 209-334 in: *Methods in Microbiology* / Eds. J.R. Norris and D.W. Ribbons. Acad. Press, London.
- Knobloch, O. & R. Tischner. 1989. Characterization of nitrate reductase deficient mutants of *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* **89**: 786-791.
- Lau, P.S., N.F.Y. Tarn & Y.S. Wong. 1998. Effect of carrageenan immobilization on the growth, physiology and nitrate reductase activity of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* **63**: 115-121.
- Lowe, R.H. & H.J. Evans. 1964. Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from *Rhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **85**: 377-389.
- Muthuchelian, K., S.M.V. Rani & K. Pallwal. 1988. Differential action of Cu^{2+} and Cd^{2+} on chlorophyll biosynthesis and nitrate reductase activity in *Vigna sinensis* L. (Savi). *Ind. J. Plant Physiol.* **31**: 169-173.
- Nichols, G.L., S.A.M. Shehata & P.J. Syrett. 1978. Nitrate reductase deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemical characteristics. *J. Gen. Microbiol.* **108**: 79-88.
- Prasad, S.M., J.B. Singh, L.C. Rai & H.D. Kumar. 1991. Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 95-100.
- Sarma, T.A. & J.I.S. Khattar. 1994. Photoheterotrophic and chemoheterotrophic dinitrogen fixation and nitrate utilization by the cyanobacterium *Anabaena torulosa*. *Folia Microbiologica* **39**: 404-408.
- Somasundaram, R., K. Muthucheliao & S. Murugesan. 1994. Inhibition of chlorophyll, protein, photosynthesis, nitrate reductase and nitrate content by vanadium in *Oryza sativa* L. *J. Environ. Biology* **15**: 41-48.
- Tarn, N.F.Y., Y.S. Wong & C.G. Simpson. 1998. Repeated removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae. *Biotech. Techniques.* **12**: 187-190.
- Van Assche, F. & H. Clijsters. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* **13**: 195-206.
- Vyamazal, J.C. 1987. Toxicity and accumulation of cadmium with respect to algae and cyanobacteria. A review. *Toxicity Assess.* **2**: 387-415.

Получена 06.04.04

Подписал в печать С.И. Вассер

* Список литературы приведен по авторскому оригиналу.