

E. KRAJEWSKA
Zakład Fizjologii Roślin PAN

METABOLIZM AZOTOWY GLONÓW

I. POBIERANIE I PRYSWAJANIE ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH PRZEZ GLONY

Wzrastające wciąż zapotrzebowanie na żywność, w szczególności na pokarm białkowy, wzmogło zainteresowanie naukowców i praktyków glonami. W ciągu dwudziestolecia powojennego obserwuje się stałe — aczkolwiek może nie w pełni jeszcze dostateczne — nasilenie prac badawczych nad tymi organizmami, w tym również nad ich metabolizmem azotowym.

Inna, techniczna niejako, korzyść jaką otrzymujemy z glonów wynika z faktu, że organizmy te, fotosyntetyzując w obecności $^{14}\text{CO}_2$, stają się źródłem znakowanych ^{14}C L-aminokwasów, na które wzrasta ciągle zapotrzebowanie (Fowden, 1962).

Poza aspektami wąskoutylnymi glony budzą również zainteresowanie jako dogodne obiekty przy rozwiązywaniu wielu zagadnień ogólnofizjologicznych. Można przykładowo wspomnieć, że to właśnie jednokomórkowa zielenica *Chlorella pyrenoidosa* była tym obiektem, na którym Calvin i współpracownicy przebadali cykl przemian związków węgla w fotosyntezie (nagroda Nobla dla Calvina w 1961 roku). Na glonach bada się pierwotną biogenezę aminokwasów i białek podczas fotosyntezy. Wielce dogodnym obiektem w badaniach nad autonomią genetyczną i fizjologiczną organelli komórkowych jest *Acetabularia*.

Aczkolwiek brak systematycznych badań nad metabolizmem azotowym glonów — doniesienia są często fragmentaryczne, niekiedy kontrowersyjne — to jednak liczba opublikowanych materiałów jest na tyle obfita, że kusząca staje się próba uporządkowania i podsumowania dorobku na tym polu.

* * *

Badania nad przyswajaniem związków azotowych przez glony były i są prowadzone głównie z mikroskopijnymi zielenicami, sinicami, okrzemkami. Znikoma liczba prac w tym zakresie z glonami dużymi spowodowana jest przede wszystkim trudnościami w uzyskaniu kultur bezbakteryjnych (Syrett, 1962, Jacobi, 1962).

Nieorganiczne związki azotowe przyswajane przez glony obejmują: azot drobinowy, jony amonowe, jony azotanowe i jony azotynowe (w ograniczonym zakresie).

Wiązanie azotu drobinowego

Jak dotychczas stwierdzono, zdolność taką posiadają wśród glonów jedynie sinice (*Cyanophyta*) i to głównie z rzędu *Nostocales*: *Nostocaceae* (*Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*), niektóre *Rivulariaceae* i pewne *Scytonemataceae*. *Oscillatoriaceae* — należące do tego samego rzędu — zdolności tej nie posiadają. Przedstawiciele innych rzędów byli znacznie słabiej pod tym względem przebadani. Toteż na razie poznano tylko kilka innych sinic zdolnych do użytkowania azotu molekularnego: *Chlorogloea fritschii* spośród *Chroococcales*, *Mastigocladus laminosus* ze *Stigonematales* (Fogg, 1962a), sinice morskie *Nostoc entophyllum* i *Calothrix scopulorum* (Stewart, 1964).

Metoda głodu azotowego

Zastosowanie głodu azotowego okazało się bardzo dogodnym i owocnym zabiegiem wstępnym w badaniach nad pobieraniem i przetwarzaniem związków azotowych przez glony. Efekt ten uzyskuje się bądź przez prowadzenie hodowli w środowisku o niedostatecznej zawartości dostępnego azotu, bądź też (częściej) przez przeniesienie na pewien czas kultury wyrosłej w warunkach dostatecznego zaopatrzenia w związki azotowe na podłoże bezazotowe.

Wpływ głodu azotowego na metabolizm i procesy fizjologiczne aktywnie rosnących komórek glonów, jak też zmiany w tych procesach po ponownym dostarczeniu komórkom związków azotowych, były przedmiotem licznych badań przeprowadzonych głównie z zielenicami (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*), z okrzemką *Navicula* i sinicą *Anabaena* (Fogg, 1959; Holm-Hansen i in., 1959; Reisner i in., 1960; Yaaska, 1964, Morris i Syrett, 1965).

Po przerwaniu głodu azotowego pobieranie soli amonowych przez komórki glonów jest cztero-, pięciokrotnie intensywniejsze niż zazwyczaj w tych warunkach. Ponieważ ani dodatek glukozy do podłoża, ani też dodatkowe oświetlenie nie wpływają na tempo asymilacji, można przyjąć, że komórka zużywa endogenne rezerwy węglowodanowe.

Jeśli N-głodzonym komórkom dostarczyć azotu w postaci azotanów lub azotynów, występują w zasadzie te same zjawiska co przy solach amonowych, tylko mniej gwałtownie i w nie tak silnym natężeniu (Syrett, 1955—1956; Fogg, 1959; Reisner i in., 1960). O istnieniu rezerw węglowodanowych w N-głodzonych komórkach glonów świadczy również fakt przyswajania przez nie azotanów w ciemności. Pobieranie azotanów ustaje jednak zanim zostają całkowicie wyczerpane endogenne rezerwy węglowodanowe, czego nie obserwuje się w przypadku soli amonowych (Syrett, 1956b). Dlaczego tak się dzieje? Warto wspomnieć, że *E. coli* hodowana w ciemności na podłożu z azotanami gromadzi związki pośrednie re-

dukcji cukrów, jak mrówczany i octany, czego nigdy nie obserwuje się na świetle lub w ciemności — ale bez azotanów (Taniguchi, 1961).

Mimo pewnej rozbieżności między wynikami poszczególnych autorów, pozostaje niewątpliwie fakt, że po przerwaniu głodu azotowego obserwuje się prawie natychmiastowy wzrost zawartości w komórkach rozpuszczalnego azotu organicznego, a następnie dopiero wzrost ilości azotu nierozpuszczalnego (Hattori, 1958; Thang, 1961a, b; Syrett, 1962).

* * *

Prawie wszystkie glony zawierające chlorofil mogą przyswajać zarówno sole amonowe, jak i azotanowe (o ile te oczywiście znajdują się w podłożu w odpowiednich stężeniach). Znane jest kilka wyjątków pod tym względem. Otóż nie mogą korzystać z azotanów: *Euglena gracilis var bacillaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* (Syrett, 1962), jak też bezbarwne bruzdnice morskie *Gyrodinium cohnii* i *Oxyrrhis marina* hodowane na syntetycznym podłożu morskim (Provasoli i Gold, 1962).

Friedmann (1962) natomiast opisał sinicę *Chroococidiopsis Kashai* Friedmann występującą w Izraelu jedynie w jaskiniach, w których znajdują się azotany, przy czym w okresie suszy glon ten znosi bardzo wysokie stężenia azotanów.

Glony takie jak *Chlorella* i *Scenedesmus* rosną dobrze na podłożach z solami amonowymi w stężeniu 0,01 mola. To samo obserwuje się w przypadku azotanów. Azotyny są przez wiele glonów tolerowane i mogą być przez nie przyswajane, gdy ich stężenie w podłożu nie przekracza 0,001 mola (Syrett, 1962). Glony planktonowe natomiast wykazują zahamowanie wzrostu już w obecności 0,001 mola jonów NH_4^+ , znoszą one jednak dobrze znacznie wyższe stężenie azotanów (Syrett, 1962; Lewin i in., 1963; Stewart, 1964).

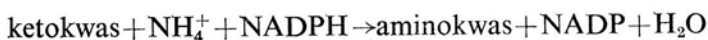
Gdy w podłożu znajdują się jony amonowe łącznie z azotanowymi, niektóre glony jak np. *Pandorina morum* zużywają równocześnie jedno i drugie (Proctor, 1957), *Haematococcus pluvialis* natomiast zużywa wybiórczo jony azotanowe (Proctor, 1957; Stross, 1963). Zjawisko to może być zahamowane przez zakwaszenie środowiska; co więcej, przy niskim pH młode komórki asymilowały wybiórczo jony amonowe (Stross, 1963).

Istnieje jednak sporo doniesień o wybiórczym przyswajaniu przez glony jonów amonowych, gdy te występują wraz z azotanowymi w podłożu (Proctor, 1957; Lewin i in., 1963; Syrett i Morris, 1963; Stewart, 1964). Syrett i Morris (1963) badając bliżej to zjawisko u *Chlorella vulgaris* stwierdzili, że wprowadzenie jonów amonowych powoduje zahamowanie pobierania jonów azotanowych przez komórki, które przedtem jony te pobierały. Wprowadzenie jonów azotynowych też hamowało całkowicie przyswajanie jonów azotanowych, podczas gdy dodanie soli amonowych tylko częściowo hamowało przyswajanie azotanów. W dalszych badaniach *in vitro* autorzy wykazali, że nawet ślady jonów amonowych hamują aktywność reduktazy azotanowej. Sądzą oni, że właściwym represorem nie jest jon amonowy per se, lecz jakiś produkt jego asymilacji (gdyż jony amonowe nie hamują redukcji azotanów w komórkach, które nie mogą przyswajać jonów amonowych, gdy np. brak szkieletów węglowych).

W optymalnych warunkach hodowli, gdy warunki energetyczne nie stanowią czynnika limitującego, tempo wzrostu i nagromadzenia suchej substancji (SS) przez komórki glonów jest w zasadzie jednakowe przy solach amonowych i azotanowych. Szereg autorów ustaliło jednak w sposób niewątpliwy, że wiele glonów przyswaja na ogół łatwiej i w sposób bardziej oszczędny jony amonowe (van Oorschot — Fogg, 1959; Bongers, 1958; Samejima i Myers, 1958; Kowallik, 1962; Meffert, 1964 Tomova i in., 1964; Cain, 1965; Diłova, 1965).

Inkorporacja jonów amonowych

We wcześniejszych doniesieniach za pierwotną drogę asymilacji jonów amonowych przez glony uważano redukcijną aminację kwasów α -ketoglutazarowego i szczawiooctowego w myśl reakcji:



Inne aminokwasy powstawałyby później na drodze transaminacji. Obecność transaminaz i występowanie reakcji transaminacji u glonów stwierdzili Millbank w 1953 i Jacobi w 1957 (Jacobi, 1962).

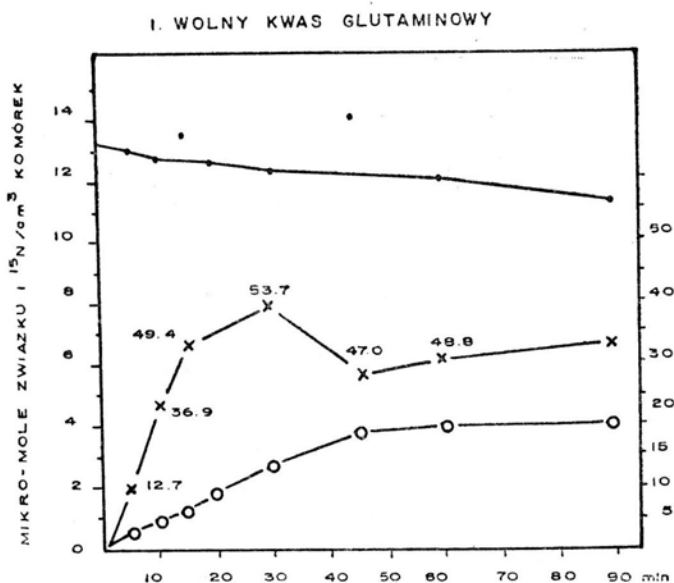
Smith i in. (1961) wykazali, że u *Chlorella pyrenoidosa* miejscem pierwotnej syntezy aminokwasów są chloroplasty. Pierwszymi aminokwasami okazały się: alanina, seryna, kwasy asparaginowy i glutaminowy. Aminokwasy te zawierały ponad 32% węgla związanego w fotosyntezie i około 62% pobranych jonów NH_4^+ (gdy stanowiły jedyne źródło azotu). Czynnikiem redukującym okazał się fotochemicznie powstały NADPH. Ponieważ prawie połowa ^{14}C związanego w aminokwasach znalazła się w alaninie, przy czym aminokwas ten pochłonął dwa razy tyle jonów co kwas glutaminowy i glutamina razem wzięte, autorom wydało się mało prawdopodobne, by alanina powstała w wyniku transaminacji kwasu pirogronowego przez kwas glutaminowy. Przeciw tej hipotezie przemawiałby również fakt, iż autorom nie udało się stwierdzić inkorporacji ^{14}C do kwasu pirogronowego jeszcze długo po nasyceniu nim alaniny. Z drugiej zaś strony nasycenie ^{14}C pierwotnych aminokwasów osiągnęło maksimum po pięciu minutach, tj. wówczas, gdy zostały nim nasycone związki pośrednie cyklu przemian węgla w fotosyntezie. Toteż autorzy przyjęli, że alanina powstaje w wyniku redukcyjnej aminacji kwasu fosfoenolopirogronowego, natomiast seryna w wyniku nie redukcyjnej aminacji kwasu 2-fosfoglicerynowego. Kwas asparaginowy zaś powstawałby na drodze redukcyjnej aminacji kwasu fosfumarowego. Bardziej skomplikowanie wyglądała sprawa z kwasem glutaminowym i glutaminą. Znakowanie tych związków występowało w dwóch miejscach: w stopniu nieznacznym w puli chloroplastowej aminokwasów (odznaczającej się dużą szybkością przemiany) i w mniej aktywnej puli znajdującej się zapewne poza chloroplastem. Autorzy tłumaczyli zaobserwowane zjawisko tym, że z chloroplastu wydostają się do cytoplazmy znakowane dwu- i trójwęglowe

związki pośrednie cyklu przemian węgla, które są tam prekursorami kwasu glutaminowego.

W dalszych badaniach autorzy prześledzili kinetykę znakowania pierwotnych aminokwasów nie tylko ^{14}C ale też ^{15}N (Bassham i Kirk, 1964). Okazało się, że w ciągu pierwszych minut asymilacji $^{15}\text{NH}_4^+$ gros pobranego ^{15}N daje się wykryć w grupie aminowej kwasu glutaminowego (wykres 1—3). Analiza zależności między czasem maksymalnego znakowania ^{15}N kwasu glutaminowego a czasem znakowania ^{15}N innych pierwotnych aminokwasów, pozwoliła autorom na wyciągnięcie wniosku, że grupy aminowe tych ostatnich powstały w wyniku reakcji transaminacji między kwasem glutaminowym a odpowiednimi ketokwasami. W doświadczeniach tych rola glutaminy w inkorporowaniu jonów amonowych okazała się zupełnie znikoma.

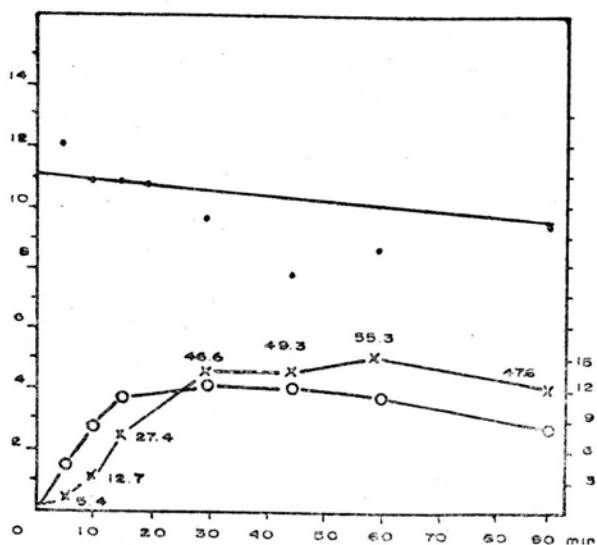
A zatem, podczas fotosyntetycznego wytwarzania aminokwasów, reakcja bezpośredniej redukcyjnej aminacji prowadząca do syntezy kwasu glutaminowego jest — przynajmniej u *Chlorella pyrenoidosa* — drogą pierwotnej inkorporacji jonów amonowych.

Wyniki i wnioski Smitha i in. (1961) potwierdzili Zak i Ničiporovič (1964a). W dalszej jednak pracy autorzy ci, badając kinetykę znakowania ^{14}C poszczególnych węgli w szkielecie aminokwasów, doszli do wniosku, że kwas fosfoglicerynowy nie może być prekursorem seryny ani glicyny (związek wyjściowy dla pierścienia

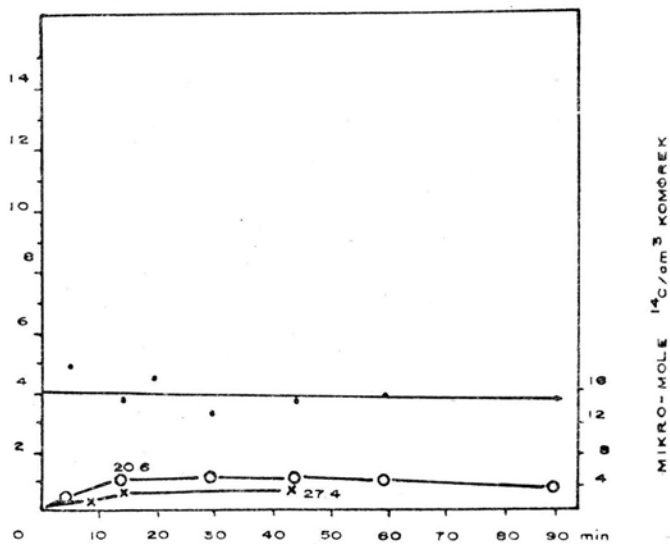


Wolne aminokwasy w komórkach *Chlorella pyrenoidosa* i stopień ich znakowania ^{14}C i ^{15}N podczas fotosyntezy (z pracy Bassham i Kirk, 1964)

2. WOLNA ALANINA



3. WOLNY KWAS ASPARAGINOWY

(czas fotosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$ i $^{15}\text{NH}_4$)● —● — ogólna ilość aminokwasu; ○ —○ — ^{14}C ;x —x — ^{15}N (liczby oznaczają ^{15}N w procentach)

purynowego) i wobec tego łańcuch węglowy w aminokwasach posiada inną genezę (Zak i Ničiporovič, 1964b).

Kates i Jones (1964) w dwóch szczepach *Chlamydomonas: reinhardti* i *moewusii* znaleźli enzymy katalizujące reakcje redukcyjnej aminacji kwasów pirogronowego i α -ketoglutazarowego w myśl schematów:



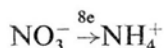
Zastosowanie ^{14}C -kwasu pirogronowego dawało wyłącznie znakowaną alaninę; dodatek do mieszaniny reakcyjnej ^{14}C -kwasu glutaminowego powodował znakowanie kwasu α -ketoglutazarowego i mniej niż w 3% kwasów cytrynowego i izocytrynowego.

Jak z powyższego wynika problem dróg włączania — zarówno pierwotnego jak i wtórnego — jonów amonowych do związków organicznych jak też mechanizmów regulujących te procesy, pozostaje nadal otwarty. Obiecujące w tym względzie wydają się prace z zastosowaniem $^{15}\text{NH}_4^+$.

Przyswajanie jonów azotanowych

Przyswajanie azotanów przez glony uwarunkowane jest ich redukcją w komórkach. Niedostatecznie jeszcze wiadomo jak proces ten przebiega *in vivo* oraz jaki jest mechanizm włączania N-azotanowego do związków azotowych komórki. Z licznych i wielostronnych badań na ten temat u mikroorganizmów i roślin wyższych wynika niewątpliwie, że szlak nieorganicznej redukcji azotanów w komórkach jest metabolicznie bardzo ważny (Nicholas, 1959, 1963; Taniguchi, 1961; Takahashi i in., 1963).

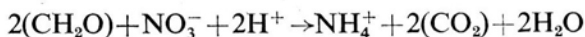
Redukcja jonu azotanowego do amonowego wymaga 8 elektronów:



Elektrony te muszą pochodzić z innych reakcji metabolicznych. A zatem proces ten jest ściśle związany z podstawową przemianą energii i materii w komórce. Właśnie istota tych powiązań stanowi główny problem mechanizmu redukcji azotanów *in vivo*.

Redukcja azotanów przez glony może być wykazana dzięki różnicom w wymianie gazowej między komórkami przyswajającymi azotany a komórkami asymilującymi w tych samych warunkach sole amonowe. Współczynnik oddechowy (CO_2/O_2) wahający się w granicach 1,0 w komórkach przyswajających sole amonowe, może przekroczyć 2,0 w komórkach asymilujących azotany (Syrett, 1956a). Analogiczne spostrzeżenia poczynili też inni badacze (Syrett, 1962). Asymilacja azotanów w ciem-

ności powoduje — w porównaniu z komórkami przyswajającymi jony amonowe — wydzielanie dodatkowego CO₂ zgodnie z równaniem:



Zjawisko to zaobserwowało wielu autorów (Syrett, 1962). Natomiast asymilacja azotanów na świetle odznacza się u glonów dodatkowym wydzielaniem tlenu: 2 drobiny O₂ na każdą drobinę przyswojonego jonu azotanowego, co wynika ze schematu: NO₃⁻ + 2H⁺ + H₂O → NH₄⁺ + 2O₂. Stwierdziło to szereg badaczy (Kessler, 1959; Syrett, 1962).

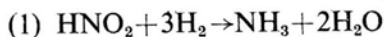
Problem wpływu światła na proces redukcji azotanów był przedmiotem licznych doniesień i spekulacji (Kessler, 1959).

Allen (Kessler, 1957a, dyskusja), Bongers (1958), Kok (Syrett, 1962) zaobserwowali, że komórki glonów asymilujące azotany na świetle, wydzielają tlen również w nieobecności CO₂. Bongers (1958) stwierdził ponadto, że wydajność fotosyntetycznie wydzielanego O₂ przez *Scenedesmus obliquus* była praktycznie taka sama, gdy zredukowanymi substratami były azotan, azotyn lub CO₂, oraz że układy uzyskiwały stan nasycenia przy zbliżonych intensywnościach światła. Logiczny wydaje się przeto wniosek, że w komórce substancje te mogą konkurować o fotochemicznie wytworzone czynniki redukujące.

Niewątpliwych dowodów na występowanie fotochemicznej redukcji azotanów u glonów należałoby oczekiwać w doświadczeniach z całymi komórkami w nieobecności CO₂ (celem wyeliminowania fotosyntetycznej redukcji węgla (i w atmosferze beztlenowej (celem ograniczenia oddychania i sprzężonej z nim redukcji azotanów); w tak postawionych doświadczeniach winna by występować szybka redukcja azotanów (Kessler, 1957a). Jednak w licznych badaniach przeprowadzonych przez wielu autorów (z wyjątkiem wyżej wymienionych) stwierdzono u glonów nieznaczną tylko redukcję azotanów na świetle w nieobecności CO₂ i O₂ (Kessler, 1959). Dla sprawnego przebiegu reakcji okazała się niezbędna obecność CO₂ lub glukozy — np. Davis (1953) stwierdził dziesięciokrotny wzrost redukcji azotanów przez *Chlorella* po dodaniu tych substancji.

W nieobecności CO₂ i w atmosferze czystego azotu Kessler (1955b) zaobserwował intensywną — prawie stechiometryczną — redukcję azotynów przez *Ankistrodesmus braunii*. Ponieważ wydajność tego procesu nieznacznie tylko zmalała po obniżeniu temperatury z 15° do 4°C, autor założył, że jest to reakcja fotochemiczna. Badając wpływ intensywności światła na redukcję azotynów przez *A. braunii* autor zaobserwował następującą zależność: w miarę zmniejszania intensywności światła proces utrzymuje się na jednakim poziomie aż do 1000 luksów, potem gwałtownie wzrasta, osiągając szczyt przy ok. 350 luksach i spada prawie do zera w ciemności. Reakcja — mało wrażliwa na 2,4-dwunitrofenol na świetle powyżej 1000 luksów — była bardzo na ten czynnik wrażliwa na słabym świetle. Skądinąd wiadomo, że związek ten, rozprzegający specyficznie oksydacyjną fosforylację, jest silnym inhibitorem reakcji redukcji azotynu przez wodór drobinowy. Toteż Kessler przyjmuje, że uzyskane na słabym świetle maksimum redukcji

azotynu jest skutkiem dodatkowej reakcji redukcji azotynu przez wodór wytwarzany fotochemicznie:



Na silniejszym świetle tlen prawdopodobnie inaktywuje hydrogenazę, przez co zostaje zahamowana reakcja (1), redukcja azotynu zaś przebiega jedynie zgodnie z równaniem (2). Jednak doświadczenia przeprowadzone przez autora w atmosferze czystego wodoru nie potwierdziły powyższych przypuszczeń (Kessler, 1959).

Bongers (1958) zaobserwował również, że na silnym świetle glony redukują intensywniej azotynu niż azotany.

Wydajny wpływ światła na redukcję azotynów przez okrzemki zaobserwował Harvey; to samo zauważył Yoshimura u *Lemma* (Kessler, 1959).

Produkty pośrednie redukcji azotanów

U glonów — podobnie zresztą jak u innych roślin zielonych — trudno wykryć produkty pośrednie redukcji azotanów bez zastosowania specjalnych chwytów. Wprawdzie już Warburg i Negelein w 1920 r. donieśli o wytwarzaniu azotynów przez *Chlorella*, lecz warunki doświadczenia tak silnie odbiegały od warunków fizjologicznych (warunki anaerobowe, pH 2,0), że sami autorzy skłaniali się do wniosku, iż mają do czynienia raczej z produktem procesu patologicznego, niż ze związkiem normalnego procesu fizjologicznego.

Dopiero Kessler w szeregu prac, poczynawszy od 1952 r. wykazał, że *Ankistrodesmus braunii* produkuje jony NO_2^- . Reakcja przebiegała w warunkach anaerobowych, była wrażliwa na KCN (całkowite zahamowanie przy 10^{-6} mola) i zależała od pH: przy pH 3,7 autor znajdował jedynie ślady, przy pH 3,4 już znaczniejsze ilości, a przy pH 2,7 następowało szybkie i obfite nagromadzenie jonów NO_2^- w podłożu. Zdaniem Kesslera przy dostatecznie niskim pH redukuje się więcej azotanów do azotynów w jednostce czasu, niż system redukujący azotynu jest w stanie przetworzyć, co w efekcie powoduje nagromadzenie jonów NO_2^- w podłożu.

Najbardziej efektywną metodą zablokowania redukcji azotanów na poziomie azotynów okazał się dodatek inhibitorów takich jak fenylouretan i szczególnie 2,4-dwunitrofenol (Kessler, 1955a). Ponieważ ostatnia substancja rozprzega specyficznie procesy utleniania biologicznego i oksydacyjną fosforylację słuszny wydaje się wniosek, że dalsza redukcja azotynów wymaga bogatych w energię wiązań fosforowych.

Wielu autorów obserwovalo nagromadzanie w podłożu azotynów przez różne szczepy *Chlorella* (Kessler, 1959). Również niektóre okrzemki mogą wydelać jony NO_2^- , szczególnie, gdy po głodzie azotowym asymilują azotany na swietle rozproszonym (Lewin i in., 1963).

Prawdopodobne produkty pośrednie dalszej redukcji azotynów: NO i NH_2OH nie zostały — jak dotychczas — bezspornie u glonów wykryte. Jedynie Yamafuji i in. (1963) donieśli o wykryciu tych związków w ekstraktach z kultur *Chlorella*

i *Scenedesmus* autolizowanych w ciągu czterech-pięciu dni w temperaturze 30°C; czy autorom udało się w tych warunkach zachować jałowość? Również brak przekonywających danych o przyswajalności tych związków dla glonów, chociaż o pobieraniu NO przez glony wspomina Nicholas (1963). Hydroksylamina jest toksyczna już w stężeniu $3 \cdot 10^{-5}$ mola nawet dla *Chlorella* i *Scenedesmus* (Syrett, 1962). Jako inhibitor reakcji dekarboksylacji i transaminacji hamuje u *Chlorella pyrenoidosa* fotosyntezę a zatem i wzrost (Churduk i Nezgorova, 1961).

Jony NH_4^+ — końcowe produkty redukcji azotanów nie są normalnie gromadzone przez glony. Można je wykryć jedynie wówczas, jeśli się uniemożliwi ich przekształcenie w związki organiczne, co np. udało się Bongersowi, gdy na świetle glony redukowały azotany w nieobecności CO_2 . Yamafuji i in. (1963) stwierdzili powstawanie jonów NH_4^+ w wyniku redukcji azotanów przez ekstrakty komórkowe *Chlorella* i *Scenedesmus* na świetle w obecności NADH.

Wykorzystanie wodoru drobinowego

Glony zawierające hydrogenazę zdolne są w warunkach beztlenowych do wykorzystania wodoru molekularnego w różnych reakcjach redukcyjnych, w tym również dla redukcji azotanów, azotynów i hydroksylaminy. Stwierdzili to: Kessler (1957c) dla *Ankistrodesmus braunii* i *Scenedesmus obliquus* (szczep D₃), Damaschke i Lübke dla szczepu *Chlorella* (Kessler, 1959), Hattori (1963) dla sinicy *Anabaena cylindrica*.

Interesujące spostrzeżenia poczynił Kessler (1957c). Otóż autor uzyskał po 90 minutach 100% redukcję azotynów, jeśli wzbogacił atmosferę wodorową w CO_2 (4%), niespełna 60% zaś bez CO_2 . Badania z $^{14}\text{CO}_2$ nie wykazały, żeby redukcji azotynów przy pomocy wodoru cząsteczkowego towarzyszyło znaczniejsze wiązanie CO_2 . Autor nie stwierdził analogicznego efektu katalitycznego CO_2 na redukcję azotanów i hydroksylaminy przez wodór molekularny. Jak wytłumaczyć to spostrzeżenie?

Enzymy szlaku redukcyjnego azotanów

Stosunkowo niewiele jeszcze wiemy o enzymach uczestniczących u glonów w procesie redukcji azotanów *in vivo*. Wiadomo, że proces ten jest bardzo wrażliwy na cyjanki, oraz że glony hodowane na azotanach wykazują zapotrzebowanie na molibden. Fakty te sugerują, iż układ enzymatyczny zaangażowany w ten proces — podobnie jak u innych organizmów — zawiera Mo w grupie czynnej.

Omura (1954) otrzymał reduktazę azotanową z jednokomórkowych glonów wodnych w wyniku autolizy komórek. Takagi i Murata w latach 1954—1955 wykryli reduktazę azotanową u wielu glonów morskich: zielenic, brunatnic i krasnorostów; nie znaleźli tego enzymu u gatunków: *Laminaria*, *Sargassum*, *Neodilsea* i *Caulacanthus* (Jacobi, 1962).

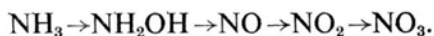
Reduktaza azotanowa jest prawdopodobnie enzymem adaptatywnym. Induktorem jego są jony NO_3^- , o czym świadczy fakt, że w ciągu pierwszych dwóch godzin po podaniu azotanów, synteza enzymu gwałtownie wzrosła, jony NO_3^- nie były jednak ze środowiska pobierane (Morris i Syrett, 1963). Również głód azotowy indukuje syntezę tego enzymu gdyż komórki *Chlorella vulgaris* hodowane na solach amonowych i wykazujące zatem znikomą aktywność reduktazy azotanowej przyswajały bardzo intensywnie jony NO_3^- po 18-godzinnym N-głodzeniu (Morris i Syrett, 1965).

Reduktaza azotanowa nie jest związana lub też jest bardzo luźno związana z ultrastrukturami komórkowymi, gdyż nawet po pięciu godzinach wirowania przy 104 000 g homogenatu *Ankistrodesmus braunii* enzym nie uległ odwirowaniu (Kessler i Czygan, 1963).

Reduktaza azotynowa u glonów jest najpewniej enzymem konstytucyjnym (Omura, 1954; Czygan, 1963). Enzym ten jest mało specyficzny w odniesieniu do reduktorów, gdyż równie skuteczne okazały się FAD i FMN, jak też NADH i NADPH (Czygan, 1963). Autorowi temu udało się rozdzielić enzym na dwie frakcje: dysymilacyjną — związaną ze stosunkowo większymi ultrastrukturami komórkowymi (osadzane po jednej godzinie wirowania przy 104 000 g w 3°C) i asymilacyjną — związaną z mniejszymi ultrastrukturami (osadzane po pięciu godzinach wirowania w tych samych warunkach) i bardzo czułą na brak bogatych w energię wiązań fosforowych. To ostatnie potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia co do wrażliwości reakcji redukcji azotynów na 2,4-dwunitrofenol (Kessler, 1955a) i na arseniany (Kessler i Bucker, 1960). Kessler i Czygan (1963) stwierdzili dużą wrażliwość reduktaz azotanowej i azotynowej na czynniki wiążące metale ciężkie, jak też na czynniki inaktywujące grupy sulfhydrylowe. Oba enzymy wykazały zmienność sezonową: maksimum aktywności w lipcu, minimum zaś w październiku. Knutsen (1965) przez dodatek azotynów spowodował indukcję reduktazy azotynowej w synchronicznej kulturze *Chlorella pyrenoidosa* hodowanej na moczniku. Dynamika syntezy tego enzymu wykazywała ścisłą korelację z dynamiką syntezy DNA w komórkach.

Spostrzeżenia Kesslera (1957a) o niezbędności jonów manganu dla pełnej redukcji azotynów przez *Ankistrodesmus braunii* pozwala przypuszczać, że u glonów — podobnie jak u innych mikroorganizmów — Mn wchodzi w skład grupy czynnej reduktazy hydroksylaminowej.

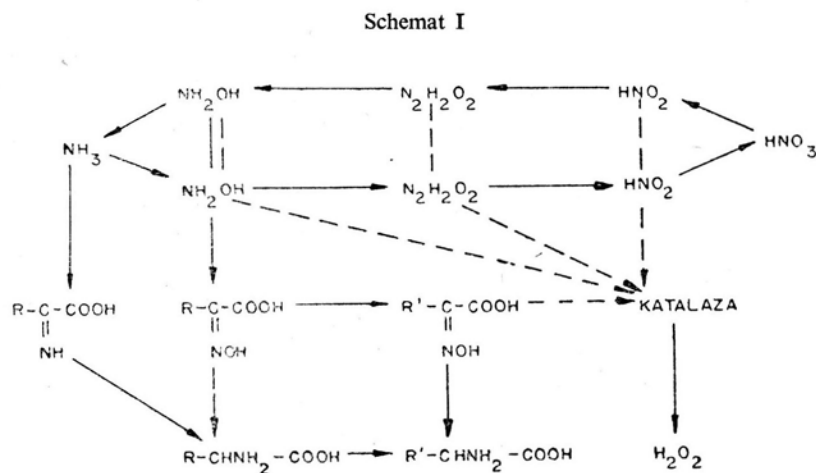
Yamafuji i in. (1963) w ekstraktach *Chlorella* i *Scenedesmus* stwierdzili obecność wszystkich enzymów, niezbędnych dla przeprowadzenia stopniowego utlenienia jonów amonowych do azotanowych według schematu:



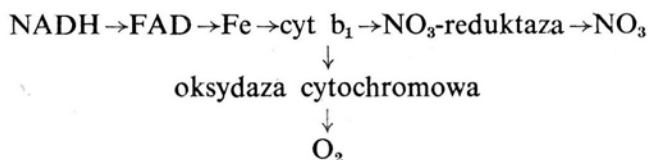
Własności tych enzymów u glonów różniły się wprawdzie nieco od własności analogicznych enzymów otrzymanych z wątroby kurzej (wrażliwość na podwyższoną temperaturę i brak inhibicyjnego wpływu nukleotydów flawinowych). Mimo to autorzy sądzą, iż opracowany przez nich schemat nieorganicznych przekształceń

związków azotowych w komórkach zwierzęcych jest również aktualny dla glonów. Zaproponowany przez nich tok przemian podaje schemat I.

W świetle powyższego wydaje się uzasadnione założenie, że u glonów — podobnie jak to ma miejsce u innych mikroorganizmów — istnieją dwa szlaki meta-



boliczne azotanów: 1) asymilacyjny — gdy produkty redukcji jonów azotowych wchodzi w skład organicznych związków komórki (głównie białek i kwasów nukleinowych) oraz 2) dysymilacyjny (oddechowy), w którym — w warunkach beztlenowych — jony azotanowe lub produkty ich stopniowej redukcji pełnią zamiast tlenu funkcję końcowych biorców elektronów:



Fragmentaryczne dotychczas spostrzeżenia wykazują podobieństwo kofaktorów tych reakcji u glonów do kofaktorów analogicznych reakcji u bakterii, grzybów i roślin wyższych, co sugeruje, że układy enzymatyczne uczestniczące w nieorganicznej redukcji azotanów funkcjonują u glonów w sposób bardzo podobny (jeśli nie identyczny) jak u innych organizmów. Układy te są ostatnio intensywnie badane u bakterii przez uczonych japońskich (Taniguchi, 1961; Takahashi i in., 1963) oraz przez uczonych europejskich głównie u *Neurospora* i u roślin wyższych (Nicholas, 1959, 1963). Na podstawie uzyskanych wyników szlak asymilacyjny jo-

nów NO_3 wydaje się związany z aktywnością enzymów Mo-flawinowych, zaś oddychanie azotanowe — z Mo-enzymami i układem cytochromowym (Takahashi i in., 1963; Nicholas, 1963). Tabela 1 charakteryzuje w sposób schematyczny naszą dotychczasową wiedzę o nieorganicznych przemianach jonów azotanowych w organizmach, jak i o warunkach niezbędnych dla ich przebiegu.

Tabela I

Schemat redukcji jonów azotanowych w organizmach (według Nicholas, 1959, z modyfikacjami E. Krajewskiej)

Dawca elektronów	lub	NADH NADPH	—————→									
Kofaktor		FAD	—————→									
Zapotrzebowanie na metale		Mo	Pyrydoksyna Cu Fe Mg	Pyrydoksyna Cu Fe Mg	Pyrydoksyna Cu Fe Mg (Zn?)	Pyrydoksyna Cu Fe Mg Mn	(Pyrydoksyna?) Mn Fe					
Stan oksydoredukcyjny azotu		NO_3	→	NO_2	→	NO	→	(NOH)	→	NH_2OH	→	NH_3
		+5		+3		+2		+1		-1		-3
Zapotrzebowanie na fosfor		P (lub inne aniony)		P (specyficzny)		P (specyficzny)		P (specyficzny)		P (specyficzny)		P (lub inne aniony)
Zapotrzebowanie na -SH		—————→										

Wykaz skrótów

- DNA kwas dezoksyrybonukleinowy;
 FAD dwunukleotyd adeniloflawinowy;
 FMN mononukleotyd flawinowy;
 NAD nukleotyd dwufosfopirydynowy;
 NADH nukleotyd dwufosfopirydynowy (forma zredukowana);
 NADP nukleotyd trójfosfopirydynowy;
 NADPH nukleotyd trójfosfopirydynowy (forma zredukowana).

B. PRZYSWAJANIE ORGANICZNYCH ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH

Głony zdolne są do pobierania z otoczenia i przyswajania organicznych związków azotowych, jak mocznik, aminokwasy, amidy, puryny.

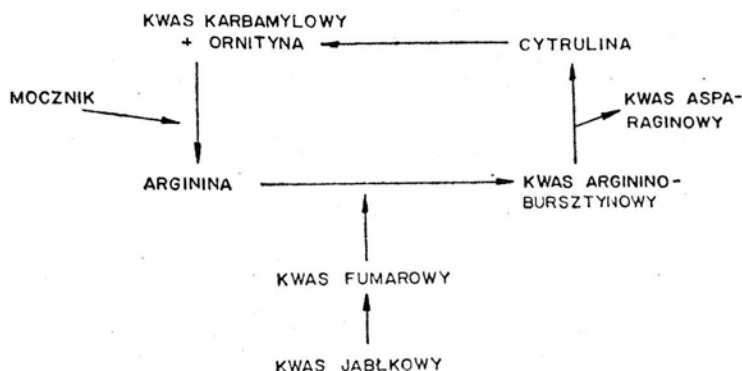
Przyswajanie mocznika i aminokwasów

Od dawna wiadomo, że mocznik jest łatwo przyswajany jako jedyne źródło azotu przez wiele glonów, szczególnie przez jednokomórkowe zielonice. Wzrost glonów na moczniku jest równie dobry, a niekiedy nawet i lepszy niż na azotanach

(Syrett, 1962; Birdsey i Lynch, 1962; Baker i Thompson, 1962; Cain, 1965; Diłova, 1965; Krajewska (nie publikowane). Davis i in. w 1953 r. (Syrett, 1962) zaproponowali mocznik jako najlepsze źródło azotu w masowych kulturach *Chlorella*, gdyż związek ten nie powoduje znaczniejszych zmian pH środowiska w miarę rozwoju kultury, jest tolerowany przez komórki glonu w dużych stężeniach, ogranicza rozwój towarzyszących kultur bakteryjnych. Piñevič i in. (1961) doszli jednak do nieco odmiennych wniosków. W innych grupach glonów tylko niektóre szczepy zdolne są do asymilacji mocznika (Syrett, 1962; Birdsey i Lynch, 1962).

Niejasne są dotychczas mechanizmy włączania mocznika do organicznych związków komórek u glonów asymilujących ten związek. Allison i in. (1954), pracując z *Nostoc muscorum*, stwierdzili wydzielanie $^{14}\text{CO}_2$ po dodaniu do hodowli ^{14}C -mocznika; w doświadczeniach przeprowadzonych w atmosferze pozbawionej CO_2 ^{14}C był inkorporowany do organicznych związków komórek. Chromatografia porównawcza rozpuszczalnych frakcji komórek wyrosłych na ^{14}C -moczniku lub ^{14}C -kwaśnym węglanie wykazały duże podobieństwo w rozmieszczeniu ^{14}C -metabolitów (maksimum aktywności w glutaminie i asparaginie). Na podstawie tych wyników autorzy doszli do wniosku, iż reakcją wstępną w asymilacji mocznika jest jego rozkład hydrolityczny do CO_2 i amoniaku. Jednakże próby wykrycia ureazy nie powiodły się (Walker, 1952; Hattori, 1957; Baker i Thompson, 1962). Walker (1952) wysunął hipotezę, że mocznik zostaje u glonów przyłączony in extenso do ornityny z wytworzeniem argininy (tj. mocznik zostaje włączony do metabolizmu na drodze jak by odwróconego cyklu ornitynowego); tak powstała arginina mogłaby reagować z kwasem fumarowym, tworząc kwas argininobursztynowy według schematu II.

Schemat II



Autor znalazł u *Chlorella pyrenoidosa* kwas argininobursztynowy, jak też enzym katalizujący jego rozkład do argininy i kwasu fumarowego.

Hipotezę Walkera poparli Hattori (1958) i Bollard (1959). Na korzyść jej przemawiają następujące obserwacje: większa zawartość argininy w komórkach

Chlorella pyrenoidosa wyrosłych na podłożu z mocznikiem niż na podłożu z azotanami (Walker, 1952); znaczny wzrost wolnej argininy w N-głodzonych komórkach *Scenedesmus obliquus* po dostarczeniu im mocznika (Bollard, 1959); natychmiastowy przyrost argininy w N-głodzonych komórkach *Chlorella ellipsoidea* po dostarczeniu im mocznika, podczas gdy dodatek soli amonowych powodował ten sam efekt dopiero po okresie zastoju, w którym nastąpił początkowo wzrost, a następnie spadek poziomu amidów (Hattori, 1958).

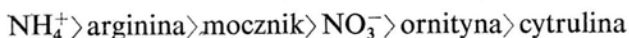
Jednak stosując ^{14}C -mocznik nie zdołał Hattori stwierdzić inkorporacji ^{14}C do argininy. Autor przyjął zatem, że w trakcie asymilacji mocznika węgiel zostaje uwolniony zeń jako CO_2 , grupy amidowe zaś zostają związane z jakimś akceptorem tak, że nie można stwierdzić powstawania wolnego amoniaku (Syrett, 1962). Nie udało się dotychczas również znaleźć u glonów arginazy, enzymu odpowiedzialnego za przekształcenie argininy w ornitynę i mocznik.

Ellner i Steers (1955) zaobserwowali, że guanina w komórkach *Scenedesmus brasiliensis* hodowanych na świetle w atmosferze CO_2 (5%) i na podłożu z ^{14}C -mocznikiem, pochodziła w 100% z mocznika; u *Chlorella* zaś w tych samych warunkach — tylko w 25%. Obserwacja ta sugerowałaby inną możliwość asymilacji mocznika *in extenso*.

Krajewska (nie publikowane) dodając do mieszaniny reakcyjnej czynniki redukujące zaobserwowała aktywność ureazy w ekstraktach komórek *Chlorella* hodowanych na moczniku jako wyłącznym źródle azotu.

* * *

Aminokwasy z cyklu ornitynowego są na ogół łatwo przyswajane przez glony zdolne do asymilacji mocznika (Baker i Thomas, 1962; Cain, 1965). Hattori (1957) stwierdził dla *Chlorella ellipsoidea* następującą kolejność przyswajania związków (jako jedyne źródła azotu):



Asymilacji tych związków przez N-głodzone komórki zawsze towarzyszyła intensyfikacja oddychania komórek oraz zanik w nich rezerw węglowodanowych.

W komórkach *Chlorella vulgaris*, gdy ^{14}C -mocznik stanowił jedyne źródło azotu, Baker i Thompson (1962), znaleźli gros radioaktywności w kwasie glutaminowym, alaninie i glutaminie. Również komórki hodowane na ^{14}C -ornitynie wykazały znaczną radioaktywność kwasu glutaminowego. Toteż autorzy przyjęli, że u glonu tego istnieją powiązania metaboliczne między kwasem glutaminowym, proliną i ornityną, analogiczne do powiązań stwierdzonych u ssaków, *Neurospora* i *E. coli*. Badacze znaleźli też znakowane ^{14}C cytrulinę i argininę w komórkach hodowanych na podłożu z ^{14}C -ornityną (jak też powstawanie argininy i cytruliny w wyniku asymilacji nieznakowanej ornityny). Autorzy przyjęli zatem, że u *Chlorella vulgaris* cykl ornitynowy — przynajmniej częściowo — funkcjonuje. Ponieważ u organizmu tego nie znaleziono arginazy, a znaleziono dezimidazę argininy (Walker i Myers, 1953), Baker i Thompson (1962) zakładają, że w organizmie tym arginina jest na drodze de-

zimidacji degradowana do cytruliny. Na korzyść tej hipotezy przemawiałyby spostrzeżenia, iż w pierwszych minutach przyswajania argininy przez N-głodzone komórki, powstającej w dużych ilościach cytrulinie towarzyszyły alanina i glutamina, co mogłoby odzwierciedlać powstawanie NH_3 w komórkach.

Ci sami autorzy stwierdzili też, że *Chlorella vulgaris* dość trudno przyswaja prolinę — zarówno znakowaną jak i nieznakowaną, co może być spowodowane słabą przenikliwością tego aminokwasu do komórki. Gros radioaktywności pochodzącej z ^{14}C -proliny autorzy znaleźli w kwasie γ -aminomasłowym. Tego zaskakującego wyniku nie byli jednak w stanie wytłumaczyć żadnym znanym mechanizmem. W wyniku zaś przyswajania ^{14}C -kwasu γ -aminomasłowego gros aktywności znaleziono w kwasie glutaminowym; szlak metaboliczny przebiegał prawdopodobnie via semialdehyd bursztynowy i cykl Krebsa (Baker i Thompson, 1962).

Glicyna jest doskonałym źródłem azotu dla wielu glonów. Pod względem szybkości dezaminacji glicyny Algéus (Syrett, 1962) dzieli glony na dwie grupy: 1) glony dezaminujące glicynę szybko, tak że wolne jony NH_4^+ gromadzą się w środowisku (typowy przedstawiciel — *Scenedesmus obliquus*) i 2) glony dezaminujące glicynę powoli, tak że nie obserwuje się gromadzenia jonów amonowych w podłożu (typowy przedstawiciel + *Chlorella vulgaris*).

Provasoli i Gold (1962) zaobserwowali, że bruzdnica *Oxyrrhis marina* przyswaja aminokwasy: alaninę, prolinę, walinę. Cain (1965) stwierdził, że wiele szczepów słodkowodnych *Chlamydomonas* jest zdolnych asymilować prócz aminokwasów cyklu ornitynowego również alaninę, serynę, lizynę i glicynę.

Przyswajanie amidów

Wiele glonów przyswaja łatwo amidy: acetamid, amid kwasu bursztynowego, asparaginę, glutaminę (Syrett, 1962; Cain 1965; Belmont i Miller 1965). Reakcją wstępną w procesie przyswajania amidów jest najpewniej hydroliza grupy amidowej. Miller zaobserwował, iż *Monodus subterraneus* wydziela glutaminazę pozakomórkowo, przy czym zużywa jedynie amoniak uwolniony z grupy amidowej; *Chlorella vulgaris* zaś nie wydziela enzymu pozakomórkowego, lecz przyswaja zarówno azot amidowy jak i aminowy, jak też węgiel ze szkieletu glutaminy.

Miller i Fogg (1958) zwracają uwagę, że aminokwasy i amidy są czynnikami chelatującymi; toteż wprowadzenie ich do podłoża, w którym rozwijają się glony, może spowodować efekty poboczne, niezależne od ich roli jako źródła azotu.

Przyswajanie puryn i związków pokrewnych

Istnieje kilka doniesień o przyswajaniu przez glony kwasu moczowego i ksantyny, gdy stanowiły one jedyne źródła azotu (Syrett, 1962). Na podłożach z tymi związkami Birdsey i Lynch (1962) stwierdziły bardzo dobry wzrost wielu zielenic; nie rosły jednak na nich *Euglena*, krasnorosty i sinice. Żaden z badanych szczepów

nie był zdolny do zużywania allantoiny, mimo że sinica *Anacystis nidulans* degradowała kwas moczowy do allantoiny. *Chlorella pyrenoidosa* przyswaja puryny i produkty ich degradacji w następującej kolejności: kwas moczowy>ksantyna>adenina>hypoksantyna. Ponieważ pobieranie tych związków było szybsze niż ich przetwarzanie, nagromadzały się w komórkach. U glonu tego szlak metaboliczny puryn okazał się podobny do szlaku przemian tych związków w innych organizmach i przebiegał zgodnie ze znanym schematem: adenina→hypoksantyna→ksantyna→kwas moczowy→allantoina→produkty końcowe (kwas glioksalowy+mocznik); mimo że allantoina nie była pobierana przez komórki, to została stwierdzona na wszystkich chromatogramach (Amman i Lynch, 1964). Cain (1965) zaobserwował, iż wiele słodkowodnych szczepów *Chlamydomonas* przyswaja łatwo adeninę i kwas moczowy. Livingstone zaś stwierdziła zużywanie azotu z guaniny przez *Chlamydomonas moewusii*.

Brak dotychczas doniesień o przyswajalności pirymidyn dla glonów. Z 38 przebadanych szczepów *Chlamydomonas* żaden nie wykazywał zadowalającego wzrostu, gdy źródło azotu stanowiły pirymidyny — cytozyna, uracyl, tymina (Cain, 1965).

Kwas moczowy może być ważnym źródłem azotu w morskich strefach przybrzeżnych. Niektóre sinice (np. *Agmenellum quadriplaticum*) rosną bardzo słabo i są słabo zabarwione w porównaniu z komórkami hodowanymi na azotanach; inne jak *Plectonema terebrans*, *Lynghya lagerheimi* — rosną i pigmentują na kwasie moczowym równie dobrze jak na azotanach (van Baalen, 1963; van Baalen i Marler, 1963). Autorzy przypuszczają, że u sinic morskich funkcjonują dwie drogi degradacji kwasu moczowego: 1) dobrze znana u innych organizmów droga z udziałem urikazy i 2) droga niespecyficzej degradacji — możliwie przy pomocy peroksydaz.

Dużą aktywność urikazy wykazały zarówno komórki całe, jak też ekstrakty komórkowe *Chlorella pyrenoidosa* (Amman i Lynch, 1964).

Krajewska (nie publikowane) zaobserwowała wzrost *Chlorella* sp. i *Oscillatoria* sp. na tiomoczniku jako jedynym źródle azotu. Wzrost tych kultur na świetle był — w porównaniu z hodowlami na solach amonowych, azotanach i moczniku — bardzo opóźniony i bardzo słaby, również pigmentacja komórek była bardzo niska, żółtoseledynowa.

LITERATURA

- Allison R. K., Skipper H. E., Reid M. R., Short W. A., Hagan G. L., 1954. Studies on the photosynthetic reaction. II. Sodium formate and urea feeding experiments with *Nostoc muscorum*. *Plant Physiol.*, **29**, 164—168.
- Amman E. C. B., Lynch V. H., 1964. Purine metabolism by unicellular algae. II. Adenine, hypoxanthine and xanthine degradation by *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. biophys. Acta*, **87**, 370—379.
- Baker J. E., Thompson J. F., 1962. Metabolism of urea and ornithine cycle intermediates by nitrogen starved cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.*, **37**, 618—623.
- Bassham J. A., Kirk M., 1964. Photosynthesis of amino acids. *Biochim. biophys. Acta*, **90**, 553—562.

- Belmont L., Miller J. D. A., 1965. The utilization of glutamine by algae. *J. Exper. Bot.*, **16**, 318—324.
- Birdsey E. C., Lynch V. H., 1962. Utilization of nitrogen compounds by unicellular algae. *Science*, **137**, 763.
- Bollard E. G., 1959. Urease, urea and ureide in plants. *Symp. Soc. Exptl. Biol.* No **13**, 340—329.
- Bongers L. H. J., 1958. Kinetic aspects of nitrate reduction. *Neth. J. Agr. Sci.*, **6**, 79—88.
- Cain B. J., 1965. Nitrogen utilization in 38 freshwater *Chlamydomonas* Algae. *Canad. J. Bot.*, **43**, 1367—1378.
- Churduk N. N., Nezgorova L. A., 1961. Inhibitirovanije fotosinteza gidrazidom izonikotinovoj kisloty, gidroksilaminom i chloramfenikolom. *Fizjol. Rast.*, **8**, 734—742.
- Czygan F. Ch., 1963. Untersuchungen über die Nitrst-reduktion der Grünalge *Ankistrodemus braunii* in vivo und in vitro. *Planta*, **60**, 225—242.
- Davis E. A., 1953. Nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **28**, 539—544.
- Diłova S., 1965. L'Influence de NO_3K , $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sur la croissance et le complexe protéine-pigment chez *Chlorella*. *Dokl. Balg. Akad. Nauk*, **18**, 667—669.
- Ellner P. D., Steers E., 1955. Urea as a carbon source for *Chlorella* and *Scenedesmus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **59**, 534—535.
- Fogg G. E., 1959. Nitrogen nutrition and metabolic patterns in algae. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, No **13**, 106—125.
- Fogg G. E., 1962. Nitrogen fixation. W «Physiology and Biochemistry of Algae» (red. R. A. Lewin), Acad. Press, N. Y.—London, 161—170.
- Fowden L., 1962. Amino acids and proteins. W «Physiology and Biochemistry of Algae» (red. R. A. Lewin), Acad. Press, N. Y.—London, 189—209.
- Friedmann I., 1962. The ecology of the atmophytic nitrate-alga *Chroococcidiopsis* Kashai Friedmann. Studies on cave algae from Israel. IV. *Arch. Mikrobiol.*, **42**, 42—45.
- Hattori A., 1957. Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea*. I. Assimilation of urea and other nitrogenous compounds by nitrogen starved cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **44**, 253—273.
- Hattori A., 1958. Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea*. II. Changes on levels of amino acids and amids during the assimilation of ammonia and urea by nitrogen starved cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **45**, 57—64.
- Hattori A., 1963. Effect of hydrogen on nitrite reduction by *Anabaena cylindrica*. (p. Biol. Abstracts, 1965, **46**, No. 7779).
- Holm-Hansen O., Nishida K., Moses V., Calvin M., 1959. Effects of mineral salts on short-term incorporation of carbon dioxide in *Chlorella*. *J. Exptl. Bot.*, **10**, 109—124.
- Jacobi G., 1962. Enzyme systems. W «Physiology and Biochemistry of Algae» (red. R. A. Lewin), Acad. Press, N. Y.—London, 125—140.
- Kates J. R., Jones R. F., 1964. Variation in alanine dehydrogenase and glutamate dehydrogenase during the synchronous development of *Chlamydomonas*. *Biochim. Biophys. Acta*, **86**, 438—447.
- Kessler E., 1955a. Über die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf Nitratreduktion und Atmung von Grünalgen. *Planta*, **45**, 94—105.
- Kessler E., 1955b. Role of photochemical processes in the reduction of nitrate by green algae. *Nature (L.)*, **176**, 1069—1070.
- Kessler E., 1957a. Contributions to the problem of photochemical nitrate reduction. W «Research in Photosynthesis» (red. H. Gaffron), Interscience, N. Y.—London, 250—256.
- Kessler E., 1957b. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enthaltenen Grünalgen. I. Über die Rolle des Mangans bei Photoreduktion und Photosynthese. *Planta*, **49**, 435—457.
- Kessler E., 1957c. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enthaltenen Grünalgen. II. Dunkel-Reduktion von Nitrat und Nitrit mit molekularen Wasserstoff. *Arch. Mikrobiol.*, **27**, 166—181.
- Kessler E., 1959. Reduction of nitrate by green algae. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, No **13**, 87—105.

- Kessler E., Bücker W., 1960. Über die Wirkung von Arsenat auf Nitratreduktion, Atmung und Photosynthese von Grünalgen. *Planta*, **55**, 512—524.
- Kessler E., Czygan F. C., 1963. Seasonal changes in the nitrate reducing activity of a green alga. *Experientia*, **19**, 89—90.
- Knutsen G., 1965. Induction of nitrite reductase in synchronized cultures of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 495—504.
- Kowalik W. 1962. Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung Synchronisierter Chlorellen. *Planta*, **58**, 337—365.
- Krajewska E., dane nie publikowane.
- Lewin J. C., Guillard R. L., 1963. Diatoms. *Ann. Rev. Microb.*, **17**, 373—414.
- Meffert M. E., 1964. Über die Kultur von *Scenedesmus obliquus* in Ammonium und Nitratnahrlosung. *Planta*, **61**, 298—308.
- Miller J. D. A., Fogg G. E., 1958. Studies on the growth of Xanthophyceae in pure culture. II. The relation of *Monodus subterraneus* to organic substances. *Arch. Mikrobiol.*, **30**, 1—16.
- Morris I., Syrett P. J., 1963. The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Arch. Mikrobiol.*, **47**, 32—41.
- Morris I., Syrett P. J. 1965. The effect of nitrogen starvation on the activity of nitrate reductase and other enzymes in *Chlorella*. *J. Gen. Microbiol.*, **38**, 21—28.
- Nicholas D. J. D., 1959. Metallo-enzymes in nitrate assimilation of plants with special reference to micro-organisms. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, No **13**, 1—23.
- Nicholas D. J. D., 1963. The metabolism of inorganic nitrogen and its compounds in micro-organisms. *Biol. Rev.*, **38**, 530—568.
- Omura H., 1954. On the nitrate and nitrite reductase in green algae. *Enzymologia*, **17**, 127—132.
- Piñevič W. W., Verzilin N. N., Maslov Ju., 1961. Vlijanije različnyh istočnikov azota na rost i nakopenije massy u *Chlorella pyrenoidosa*. *Vestnik Leningradskogo Universiteta*, **9**, 16—25.
- Proctor V. W., 1957. Preferential assimilation of nitrate ion by *Haematococcus pluvialis*. *Amer. J. Bot.*, **44**, 141—143.
- Provasoli L., Gold K., 1962. Nutrition of the american strain of *Gyrodinium cohnii*. *Arch. Mikrobiol.*, **42**, 196—203.
- Reisner G. S., Gering R. K., Thompson J. F., 1960. The metabolism of nitrate and ammonia by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **35**, 48—52.
- Samejima H., Myers J., 1958. On the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 107—117.
- Smith D. C., Bassham J. A., Kirk M., 1961. Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. II. Amino acids synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 299—313.
- Stewart W. D. P., 1964. The effect of available nitrate and ammonium nitrogen in the growth of two nitrogen-fixing blue-green algae. *J. Exptl. Bot.*, **15**, 138—145.
- Stross R. G., 1963. Nitrate preference in *Haematococcus* as controlled by strain age of inoculum, and pH of the medium. *Canad. J. Microbiol.*, **9**, 33—40.
- Syrett P. J., 1955. The assimilation of ammonia and nitrate by nitrogen starved cells of *Chlorella vulgaris*. I. The assimilation of small quantities of nitrogen. *Physiol. Plantarum*, **8**, 924—929.
- Syrett P. J., 1956a. The assimilation of ammonia and nitrate by nitrogen starved cells of *Chlorella vulgaris*. II. The assimilation of large quantities of nitrogen. *Physiol. Plantarum*, **9**, 19—27.
- Syrett P. J., 1956b. The assimilation of ammonia and nitrate by nitrogen starved cells of *Chlorella vulgaris*. III. Differences of metabolism dependent on the nature of the nitrogen source. *Physiol. Plantarum*, **9**, 28—37.
- Syrett P. J., 1956c. The assimilation of ammonia and nitrate by nitrogen starved cells of *Chlorella vulgaris*. IV. The dark fixation of carbon dioxide. *Physiol. Plantarum*, **9**, 165—171.
- Syrett P. J., 1962. Nitrogen assimilation. W «Physiology and Biochemistry of Algae» (red. R. A. Lewin), Acad. Press, N. Y.—London, 171—188.

- Syrett P. J., Morris I., 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 566—575.
- Takahashi H., Taniguchi S., Egami F., 1963. Inorganic nitrogen compounds distribution and metabolism. W «Comparative Biochemistry», t. V, cz. C (red. Florkin M. i H. S. Mason), Acad. Press, 91—202.
- Taniguchi S., 1961. Comparative biochemistry of nitrate metabolism. *Zts. Allgem. Mikrobiol.*, **1**, 341—375.
- Thang M. N., 1961a. Etude du métabolisme des nitrates chez *Chlorella pyrenoidosa* a l'obscurité. I. Assimilation du ^{14}C -glucose en rapport avec l'utilisation des nitrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 478—494.
- Thang M. N., 1961b. Etude du métabolisme des nitrates chez *Chlorella pyrenoidosa* a l'obscurité. II. Assimilation de l'azote de K^{15}NO_3 en présence de glucose. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 495—502.
- Tomova N. G., Jevstigniejeva Z. G., Kretovič W. L., 1964. Assimilacija nitratnogo i amonijnogo azota u *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82T. *Fizjol. Rast.*, **11**, 988—997.
- Van Baalen C., 1963. Uric acid as nitrogen source for blue-green algae. *Plant Physiol.*, **38**, suppl. V.
- Van Baalen C., Marler J. E., 1963. Characteristics of marine blue-green algae with uric acid as nitrogen source. *J. Gen. Microb.*, **32**, 457—463.
- Walker J. B., 1952. Arginosuccinic acid from *Chlorella pyrenoidosa*. *Proceed. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **38**, 561—566.
- Walker J. B., Myers J., 1953. Formation of arginosuccinic acid from arginine and fumarate. *J. Biol. Chem.*, **203**, 143—152.
- Yaaska V., 1964. Vlijanije rezima azotnogo pitanija na chimičeskij sostav nekotorych vidov zelenych vodoroslej. *Izv. Acad. Nauk Est. SSR ser. biol.*, **1**, 33—39 (p. *Biol. Abstracts*, 1965, **46**, No 12578).
- Yamafuji K., Osajima Y., 1963. Dehydrogenation of ammonia to nitrate by enzymes isolated from green algae. *Enzymologia*, **26**, 75—86.
- Zak E. G., Ničiporovič A. A., 1964a. Obrazovanije aminokislot pri fotosinteze identifikacija i degradacija glicina, alanina i serina. *Fizjol. Rast.*, **11**, 20—30.
- Zak E. G., Ničiporovič A. A.; 1964b. K voprosu o put'jach obrazovanija aminokislot pri fotosinteze. *Fizjol. Rast.*, **11**, 945—950.