

БИОЛОГИЯ

УДК 577.124

ИССЛЕДОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ

О.А. Сачкова, С.А. Коннова, В.В. Игнатов, Г.В. Мельников

Саратовский государственный университет,
кафедра биохимии и биофизики
E-mail: biofac@sgu.ru

Показано изменение соотношения гликанов различной полимерности и свободных аминокислот в биомассе высших водных растений – рдеста пронзеннолистного и тростника обыкновенного, собранных на различающихся по степени загрязненности воды соединениями азота и углеводородами нефти участках акватории Волги в районе г. Саратова. Проведена идентификация и определение содержания свободных аминокислот в биомассе растений, выявлены аминокислоты, наиболее отчетливо реагирующие на загрязнение воды. Исследованы молекулярные массы и моносахаридный состав полисахаридов растений, обнаружены изменения, возможно, связанные с негативным воздействием окружающей среды.

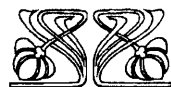
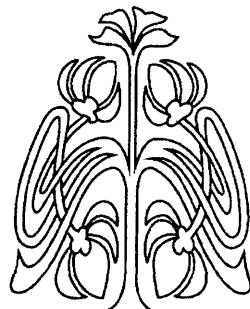
Carbohydrates and free amino acids of higher water plants

О.А. Sachkova, S.A. Konnova, V.V. Ignatov, G.V. Mel'nikov

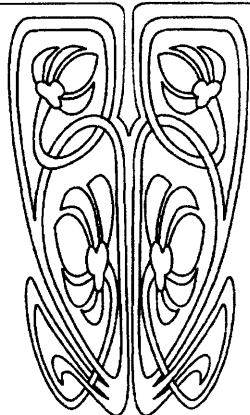
A change of the ratio of glycans of different polymerity and free amino acids in the biomass of higher water plants and common reed grass collected from several sites of the water area of the Volga river near Saratov (differing by pollution degree by compounds of nitrogen and oil hydrocarbons) was shown. Identification and content determination of 17 free amino acids in the biomass of plants were conducted, the amino acids reacting strongly to water contamination were detected. The molecular masses and monosaccharide composition of plant polysaccharides were studied, changes probably due to negative environmental stress were observed.

Проблема чистой воды в последние годы стала особенно острой в связи с высоким общим загрязнением окружающей среды. Общеизвестно, что в процессах самоочищения природных водоемов наряду с микроорганизмами важная роль принадлежит водным растениям. Макрофиты влияют на химические и физические свойства воды, служат мощным биологическим фильтром, выполняют в водоеме функции минерализации и окисления органического вещества, детоксикации различных поллютантов [1, 2, 3]. Показано, что именно погруженные высшие пресноводные растения, благодаря тесной связи с водной средой, не только наиболее остро реагируют на наличие токсических примесей в воде, но и способны служить индикаторами ее качества [4]. В ряде работ последних лет рдесты часто применяются для построения моделей распространения макрофитов на основе данных по метеоусловиям, гидрохимии воды, скорости течения и др. [5]. С точки зрения других ученых [3] макрофиты, такие как рдест пронзеннолистный, элодея канадская и другие, обладающие столь высокой экологической валентностью, не могут служить биоиндикаторами среды. Для обоснованного вывода в этом вопросе, очевидно, необходимо получение дополнительных экспериментальных данных.

Целью настоящей работы было изучение соотношения разных групп углеводов и свободных аминокислот в биомассе высших водных растений и влияния на эти показатели загрязненности воды соединениями азота и углеводородами нефти.



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Материал и методы

В работе использовали биомассу пресноводных трав: рдеста пронзеннолистного (*Potamogeton perfoliatus* L.) и тростника обыкновенного (*Phragmites communis* Trin.). Растения собирали на мелководье реки Волги у г. Саратова в июле и сентябре 2000 г. и фиксировали двумя способами: высушиванием на воздухе и замораживанием при -20°C . Схема выделения полисахаридов представлена на рис. 1. Для освобождения от пигментов экстракт обрабатывали 10%-ным раствором $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Смесь углеводов фракционировали гель-фильтрацией на носителе Sephadex G-50. Детекцию проводили по углеводам [6].

Для определения моносахаридного состава использовали тонкослойную и газо-жидкостную хроматографии. Тонкослойную хроматографию гидролизатов проводили на пластинках с целлюлозным покрытием. Обнаруживали сахара опрыскиванием пластинок раствором анизидинфталата в бутаноле. Газо-жидкостную хроматографию осуществляли на приборах Биохром-1 (СССР), а также Hewlett-Packard 5890 (США). Исследование содержания в биомассе растений моно-, ди-, три- и полисахаридов (см. схему на рис. 1) проводили в соответствии с процедурой, предложенной в руководстве [7].

Выделение аминокислот из растительной массы (см. рис.1) выполняли в соответствии с методикой, предложенной в работе [7] с не-

большими модификациями. Экстракты свободных аминокислот концентрировали упариванием на роторном испарителе, и смесь пропускали через хроматографическую колонку с катионитом КУ-2 в H^+ -форме. Десорбцию аминокислот выполняли с помощью 6N гидроксида аммония. Состав и содержание аминокислот в элюате определяли на аминокислотном анализаторе ААА-339 (ЧССР) с использованием натриевого ионита и стандартного набора из 17 аминокислот.

Результаты и их обсуждение

Для выявления влияния загрязнения воды на некоторые показатели химического состава растений с выбранных участков прибрежной зоны Волги у г. Саратова был проведен сбор макрофитов в конце июля 2000 г. Сотрудниками НИИОРХ (г. Саратов) получены данные об изменчивости гидрохимических показателей воды по водохранилищу [8].

Исследования показали, что по сравнению с относительно чистым участком на уровне автодорожного моста, рядом с городским водозабором (участок №1), в воде у железнодорожного моста (участок №2) выявлено увеличение азота аммонийных соединений и кремния в 1,5 раза. Кроме того, на участке №2 на поверхности воды отмечена визуально наблюдаемая нефтяная пленка (ПДК по содержанию углеводородов в воде на этом участке был превышен почти на порядок). На исследуемых уча-

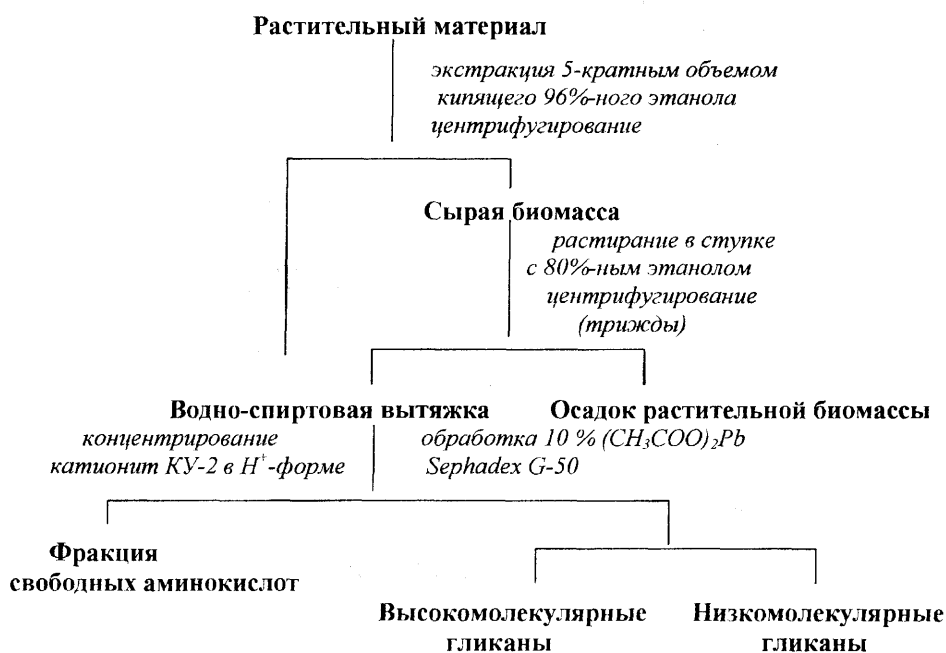


Рис. 1. Схема выделения углеводов и свободных аминокислот из биомассы высших водных растений



стках рдест пронзеннолистный и тростник обыкновенный были наиболее распространенными видами среди погруженных и полупогруженных высших водных растений соответственно.

Из высушенных и из замороженных растений рдеста пронзеннолистного, собранных с участков №1 и №2, были выделены углеводы экстракцией убывающими концентрациями этанола (см. рис. 1). Фракционирование экстрактов методом гель-фильтрации позволило выявить в каждом по две углеводные фракции, разделяющиеся по молекулярной массе. Сравнение профилей элюции экстрактов из высушенной и замороженной растительной массы показало, что в процессе высушивания произошло изменение соотношения различных форм углеводов в растениях, по-видимому, за счет существенного разрушения (~на 70%) более высокомолекулярных гликанов, и увеличение содержания низкомолекулярных углеводсодержащих фракций. Анализы моносахаридного состава полисахаридов показали, что гликополимеры, которые были извлечены из замороженной биомассы, содержали галактозу, рамнозу, фукозу и глюкозу. Аналогичная экстракция высушенной биомассы показала наличие только рамнозы и глюкозы. Очевидно, что наряду с уменьшением количества высокомолекулярных гликанов при высушивании произошло также и обеднение моносахаридного состава углеводов. Таким образом, для сохранения более полного спектра гликополимеров лучшим способом фиксации растительного материала является замораживание.

Сравнительный анализ качественного состава и концентраций разных групп углеводов

позволил выявить для каждого из исследуемых растений гликаны, наиболее отчетливо реагирующие на изменение условий окружающей среды. Так, в биомассе рдеста, собранной с загрязненного участка (№2), обнаружено повышенное содержание мальтозы на 13%, сахарозы на 78%, водорастворимых полисахаридов на 59% (рис. 2, а).

Наблюдалось также существенное (на 36%) увеличение количества моносахаридов в биомассе тростника с участка №2, сахарозы — на 22%, гемицеллюлозы — на 15%, целлюлозы — на 51%, значительное уменьшение количества водорастворимых полисахаридов — на 28% и мальтозы — на 63% по сравнению с растениями, собранными с участка №1 (рис. 2, б).

Сказывалось загрязнение воды и на моносахаридном составе высокомолекулярных углеводсодержащих веществ, полученных из замороженной биомассы растений. Гель-фильтрация позволила разделить экстракты гликополимеров для каждого растения на две фракции, различающиеся по молекулярной массе. Первая фракция по элюционным характеристикам соответствовала декстрану с молекулярной массой 20 кДа, вторая — 6 кДа.

Таким образом, из биомассы каждого растения выделены по 4 препарата полисахаридов, гомогенных по данным гель-фильтрации. В табл.1 представлены результаты анализа моносахаридного состава полисахаридов (ПС), полученных из биомассы растений, собранных с “чистого” (№1) и “загрязненного” (№2) участков.

Полученные данные свидетельствуют о том, что рост растений в загрязненных зонах индуцирует продукцию полисахаридов, отличных от тех, что образуются в более экологически благополучных условиях.

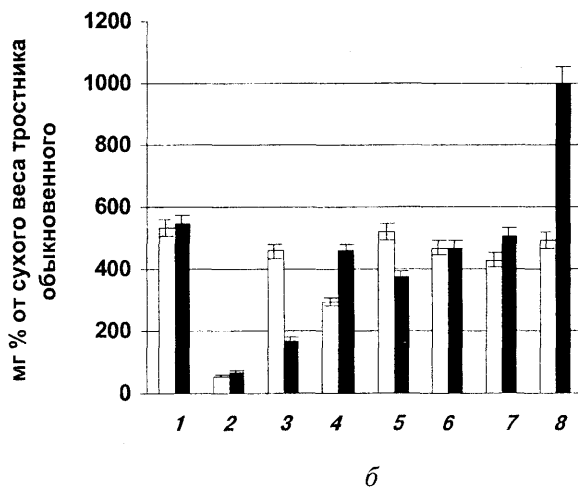
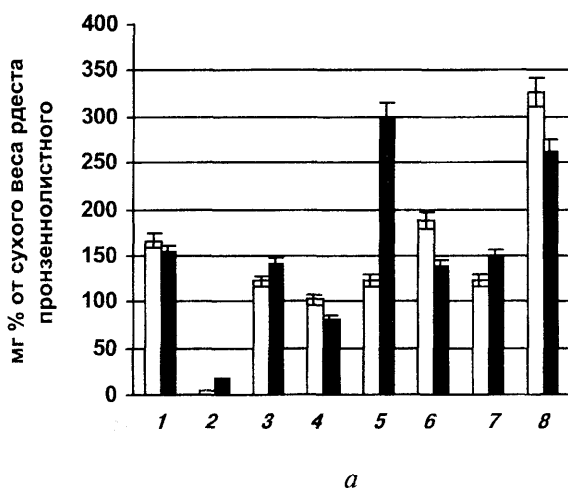


Рис. 2. Содержание разных групп углеводов в биомассе рдеста пронзеннолистного (а) и тростника обыкновенного (б): 1 — глюкоза, 2 — сахароза, 3 — мальтоза, 4 — моносахариды, 5 — полисахариды, 6 — крахмал, 7 — гемицеллюлоза, 8 — целлюлоза; □ — участок № 1, ■ — участок № 2



Таблица 1

Моносахаридный состав полисахаридных препаратов рдеста пронзеннолистного и тростника обыкновенного

Полисахариды	Рдест пронзеннолистный		Тростник обыкновенный	
	Участок		Участок	
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
ПС-1	Рамноза	Галактоза Рамноза	Глюкоза Фукоза	Глюкоза Рамноза
ПС-2	Рамноза	Фукоза Галактоза Глюкоза	Рамноза Галактуроновая кислота	Галактоза Глюкуроновая кислота

Возможно, эти полисахариды выполняют защитную функцию. Подобное предположение о роли полисахаридов высказано также и в работе [9].

Было проведено выделение и анализ аминокислот из биомассы рдеста и тростника, собранных с участков №1 и №2. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Среднее содержание свободных аминокислот в биомассе высших водных растений, собранных в 2000 г., мг% на сухой вес

№ п/п	Аминокислоты*	Рдест пронзеннолистный		Тростник обыкновенный	
		Участок		Участок	
		№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
1	Аспарагиновая кислота	11,00	12,00	64,97	96,12
2	Треонин	16,00	11,00	24,92	14,24
3	Серин	56,00	48,00	158,42	243,86
4	Глутаминовая кислота	14,00	61,00	21,36	32,04
5	Пролин	13,00	16,00	7,12	14,24
6	Цистин	-	-	-	-
7	Глицин	3,00	11,00	9,79	15,13
8	Аланин	50,00	92,00	24,92	55,18
9	Валин	29,00	28,00	22,25	24,03
10	Метионин	11,00	1,00	4,45	6,23
11	Изолейцин	10,00	9,00	4,45	43,61
12	Лейцин	18,00	50,00	33,82	53,40
13	Тирозин	8,00	12,00	27,59	49,84
14	Фенилаланин	179,00	172,00	265,22	419,19
15	Гистидин	2,00	5,00	6,23	9,00
16	Лизин	3,00	4,00	8,01	16,02
17	Аргинин	42,00	14,00	48,06	48,95
Сумма		465 ± 10	546 ± 6	732 ± 8	1154 ± 12

*Приведены средние значения пяти определений; образцы содержали также до 1,5% триптофана.

Данные, представленные в табл. 2, позволяют заключить, что сумма свободных аминокислот в растениях, собранных с участка №2, по сравнению с растениями с участка №1, была выше на 35% у рдеста и на 37% у тростника. Повышение содержания аминокислот рдеста произошло в основном за счет глутаминовой кислоты, аланина и лейцина, а у тростника — за счет изолейцина, серина, фенилаланина, аланина и пролина. Полученные данные согласуются с литературными. Так, в

работе [10] показано наличие в биомассе рдеста пронзеннолистного от 10 до 18 аминокислот, причем к наиболее биологически активным относят дикарбоновые и гидроксикаминокислоты [9].

Таким образом, проведенные исследования позволяют говорить о влиянии высоких концентраций углеводов и других загрязняющих веществ в воде на содержание отдельных гликополимеров и свободных аминокислот в биомассе как погруженных, так и полупогру-



женных высших водных растений. Такие анализы могут быть использованы для мониторинга состояния гидроценоза, подверженного постоянному антропогенному загрязнению.

Выражаем глубокую признательность со-

трудникам НИИОРХ (г. Саратов) Ю.А. Малининой, Е.В. Сониной за помощь в сборе растительного материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (проект НШ1529. 2003.4).

Библиографический список

1. Мережко А.И. Роль высших водных растений в самоочищении водоемов // Гидробиол. журн. 1973. №4. С. 119–125.
2. Лукина Л.Ф., Смирнова Н.Н. Физиология высших водных растений. Киев, 1988.
3. Эйвор Л.О. Макрофиты в экологии водоема М., 1992.
4. Carbiener R., Tremoliere M.S., Mereier J.L. Aquatic macrophyte community as bioindicators of eutrophication in calcareous oligosaprobe stream waters (Upper Rhina planem, Alsace) // Vegetatio. 1990. V. 86, №1. P. 71–88.
5. Lehmann A., Castella E., Lachavanne J.B. Morphological traits and spatial heterogeneity of aquatic plants along sediment and depth gradients, Lake Geneva, Switzerland // Aquatic botany. 1997. P. 281–299.
6. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
7. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М., 1976.
8. Шашуловская Е.А., Котляр С.Г. Мониторинг загрязняющих веществ в биогидроценозе Волгоградского водохранилища // Фундаментальные и прикладные аспекты функционирования водных экосистем: проблемы и перспективы гидробиологии и ихтиологии в XXI веке: Материалы Всерос. науч. конф. Саратов, 2001. С. 189–193.
9. Гляд В.М. Определение моно-, ди- и олигосахаридов в одной растительной пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология растений. 2002. Т. 49, №2. С. 311–316.
10. Хирная А.Н. Влияние водной среды на биохимический состав высшей водной растительности // Самоочищение и биоиндикация загрязненных вод. М., 1980. С. 109–111.