

Колмакова Анжелика Александровна

**АМИНОКИСЛОТЫ СЕСТОНА МАЛЫХ ЭВТРОФНЫХ ВОДОЕМОВ БАССЕЙНА
ЕНИСЕЯ**

03.02.10 - гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Красноярск – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биофизики Сибирского отделения РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Сущик Н.Н.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
чл.-корр. НАН Белоруси
Остапеня А.П.
доктор биологических наук,
профессор
Кратасюк В.А..

Ведущая организация: Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО
РАН

Защита состоится “___” _____ 2010 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.099.15 при Сибирском федеральном университете по адресу: 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского федерального университета.

Автореферат разослан “___” сентября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор



Гаевский Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ключевая проблема в современной гидробиологии – исследование закономерностей переноса вещества и энергии по трофическим цепям (Алимов, 2000). При исследовании трофических взаимодействий наряду с количественными показателями потоков вещества и энергии важной частью является учет качества органического вещества. Вследствие глубоких биохимических различий между растениями и животными трофическая пара продуценты - консументы может лимитировать скорость переноса вещества во всей трофической цепи.

В водных пелагических экосистемах основными факторами, ограничивающими рост зоопланктона при высокой биомассе фитопланктона, считаются элементный состав, стехиометрическое соотношение C:N:P, содержание незаменимых $\omega 3$ полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и стероидов в различных видах фитопланктона (Gulati, DeMott, 1997; Acharya et al., 2004). Другие биохимические компоненты биомассы первичных продуцентов, такие как незаменимые аминокислоты (НАК), обычно не принимаются во внимание, поскольку считается, что аминокислотный состав планктонных микроводорослей является практически одинаковым у всех видов (Ahlgren et al., 1992, Brown et al., 1997; Klein Breteler et al., 1999). Однако подобные представления базируются в основном на анализе ограниченного числа лабораторных культур и планктонных морских видов микроводорослей. Данные о составе аминокислот (АК) природных популяций пресноводного фитопланктона очень малочисленны (Душейко и др., 1969, Сиренко, Гавриленко, 1978). Вместе с тем, известно, что профили АК некоторых групп фитопланктона, например, цианобактерий и эукариотических микроводорослей, могут существенно различаться (Sorimachi, 1999; Sorimachi et al., 2000). Исследования стехиометрии биогенных элементов также дают основание предполагать, что содержание АК у продуцентов может быть лимитирующим фактором в питании консументов (Anderson et al., 2004). Как известно, животные не могут синтезировать 10 НАК, а именно, аргинин, гистидин, триптофан, фенилаланин, метионин, лизин, валин, треонин, изолейцин, лейцин, и должны получать их с пищей растительного и бактериального происхождения. Следовательно, представляется актуальным исследовать профили АК природных пресноводных популяций фитопланктона с целью выявления биохимических особенностей доминирующих видов

эукариотического и прокариотического фитопланктона и определить значение содержания АК в сестоне, включая содержание НАК, как фактора, потенциально лимитирующего качество пищи зоопланктона.

Цель диссертационной работы - сравнительный анализ профилей и содержания АК сестона при доминировании различных видов фитопланктона и оценка содержания АК в фитопланктоне как фактора, потенциально лимитирующего качество пищи пресноводных консументов.

В соответствии с поставленной целью решали **следующие задачи**:

– сравнить качественный состав и концентрации АК общего пула органического вещества (суммы взвешенного и растворенного) двух водоемов, в одном из которых доминировал прокариотический фитопланктон (т.е. наблюдалось "цветение" цианобактерий);

– исследовать сезонную динамику АК и ее связь с сезонной динамикой фитопланктона;

– с помощью статистических методов определить возможные источники происхождения отдельных аминокислот сестона;

– определить содержание аминокислот у доминирующих видов фитопланктона в эвтрофном водохранилище с помощью методов мультивариантной статистики;

– проанализировать возможность лимитирования зоопланктона недостатком незаменимых аминокислот в сестоне.

На защиту выносятся следующие **основные положения**:

1. "Цветение" воды цианобактериями представляется основной причиной, вызывающей изменение аминокислотного профиля общего пула органического вещества эвтрофных водоемов.

2. Природные популяции доминирующих видов эукариотического и прокариотического фитопланктона характеризуются специфическим содержанием аминокислот, включая различия в содержании незаменимых АК.

3. Видоспецифичные особенности количественного соотношения аминокислот доминирующего пресноводного фитопланктона потенциально могут лимитировать рост и развитие первичных консументов в эвтрофных водоемах.

Научная новизна. Впервые выполнено сравнительное исследование сезонной динамики аминокислот сестона двух водоемов при доминировании эукариотических микроводорослей и цианобактерий, вызывающих "цветение" воды. Установлено, что

общий пул аминокислот в эвтрофных водоемах имел преимущественно автохтонное происхождение. Впервые с помощью анализа биохимических и таксономических характеристик сестона методами мультивариантной статистики определены аминокислотные профили природных популяций фитопланктона эвтрофного водоема. Впервые обнаружено потенциальное лимитирование популяций пресноводного зоопланктона недостатком незаменимых АК у доминирующих видов фитопланктона.

Практическая значимость. Установлено, что "цветение" воды цианобактериями в эвтрофных водоемах, наряду с воздействием на многие другие компоненты экосистемы, приводит к существенному изменению аминокислотного профиля сестона. Изменение количественного соотношения аминокислот в сестоне может приводить к разобщениям в трофической цепи и, тем самым, оказывать негативное влияние на восстановление качества воды биологическими методами. Показано, что содержание незаменимых АК в сестоне следует учитывать при оценке качества пищи пресноводного зоопланктона.

Апробация работы. Материалы работы представлены в виде секционных и постерных докладов на Международной конференции «Научные основы сохранения водосборных бассейнов: междисциплинарные подходы к управлению природными ресурсами» (г. Улан-Удэ, Россия, 2004 г.), 12-ой Международной конференции по вредоносным водорослям (Копенгаген, Дания, 2006 г.), на IX съезде ГБО при РАН в г. Тольятти (сентябрь, 2006 г.), 11-ой Международной конференции по прикладной фикологии (Голуэй, Ирландия, 2008 г.), на X съезде ГБО при РАН (г. Владивосток, сентябрь 2009 г.) и на заседаниях объединенного семинара лаборатории экспериментальной гидроэкологии Института биофизики СО РАН и базовой кафедры гидробиологии и ихтиологии Красноярского государственного университета (г. Красноярск, 2000 - 2005 гг.).

Выигранные гранты. Исследования по теме были поддержаны со стороны Министерства образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития для независимых государств бывшего Советского Союза (CRDF, грант № REC-002, программа "Фундаментальные исследования и высшее образование"), Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-48550а, 06-05-64294а, 08-04-00291а), программы "Университеты

России – фундаментальные исследования” Министерства образования и науки РФ (грант № УР 07-01-011).

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач, определении состава аминокислот, органического углерода и органического азота, обработке и анализе полученного материала.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы. Общий объем работы 131 страница, включая 15 рисунков, 18 таблиц. Список литературы включает 169 источников, из них 146 – на английском языке.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, даны сведения об объекте исследования, сформулированы цели и задачи исследования.

ГЛАВА 1. АМИНОКИСЛОТЫ КАК ЧАСТЬ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Дана биохимическая характеристика аминокислот морских и пресных водоемов, а именно, распределение свободных и связанных АК в растворенном и взвешенном органическом веществе, в донных отложениях. Рассмотрено значение АК как источника азота и углерода для водных организмов: бактерий, водорослей, беспозвоночных и рыб. Рассмотрена роль АК как маркеров источников органического вещества донных отложений.

Описан аминокислотный состав основных групп водной биоты. Обнаружено, что состав свободных аминокислот грам-отрицательных эубактерий значительно отличается от такового грам-положительных эубактерий. Доказана роль планктонных микроводорослей как основного источника аминокислот в водных экосистемах. Данные о содержании АК в микроводорослях весьма противоречивы. Согласно ряду источников, АК состав разных видов микроводорослей в условиях лабораторных культур является достаточно постоянным. По другим данным, АК состав микроводорослей существенно различается, что может в значительной степени

влиять на питательные качества их биомассы для зоопланктона, вследствие различий в содержании НАК. Установлено, что АК состав беспозвоночных не только предопределен генетически, но и зависит от различных гидрохимических и гидрофизических факторов, стадии зрелости, а также от биохимического состава пищи.

Считается, что основные факторы, ограничивающие рост зоопланктона при высокой концентрации пищи - это стехиометрическое соотношение С:N:P и содержание незаменимых полиненасыщенных жирных кислот в различных видах фитопланктона. Влияние содержания аминокислот в фитопланктоне на рост и развитие зоопланктона исследовано слабо, хотя известно, что ряд АК являются незаменимыми компонентами питания животных и должны поступать с пищей. Описано значение ключевых незаменимых АК, а именно, лизина, метионина, гистидина, аргинина, для некоторых групп водных консументов. Показаны способы расчета количества пищи, необходимого для удовлетворения потребностей водных консументов в отдельных незаменимых АК. Дана оценка качества тех или иных пищевых ресурсов на основании знаний о потребностях животных в содержании незаменимых аминокислот в пище.

ГЛАВА 2. РАЙОН И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приводится описание гидроэкологических особенностей водохранилищ Бугач и Лесное, на которых в 2000-2005 гг. выполнялись полевые исследования. Водоохранилище Бугач было выбрано в качестве эвтрофного водоема, ежегодно испытывающего массовое развитие цианобактерий ("цветение"), а водохранилище Лесное – как эвтрофный водоем с доминированием эукариотических микроводорослей. Пробы отбирали еженедельно в течение всего вегетационного сезона, при отборе формировали интегрированную пробу из разных горизонтов. Далее организмы зоопланктона удаляли пропусканием пробы через сеть с размером пор 115 мкм. Для определения общего пула взвешенных и растворенных АК фиксированный объем пробы выпаривали досуха. При определении взвешенных АК пробы концентрировали фильтрованием через мембранные фильтры с нанесенной подложкой из BaSO₄. Сухой осадок пробы подвергали кислотному гидролизу в запаянной ампуле в 6N растворе HCl 22 часа при 110°C. Гидролизат фильтровали,

кислоту выпаривали. Для удаления оставшихся солей раствор гидролизата пропускали через колонку со смолой DOWEX-50. АК элюировали с колонки 6N раствором аммиака и перерастворяли в цитратном буфере (pH 2.2). Состав и содержание шестнадцати АК определяли на аминокислотном анализаторе KLA-3B (Hitachi, Япония). АК разделяли на ионообменной колонке со сшитыми сульфополистирольными смолами с использованием цитратных буферных растворов в качестве элюентов, после разделения получали нингидриновые производные, согласно классическому методу (Moore, Stein, 1951). Концентрации аминокислот определяли методом внешней калибровки по стандартной смеси аминокислот (Sigma, США).

В 2001 г. выполнили методическое сравнение концентраций АК общего пула и взвешенного вещества (сестона), отбирая пробы в три близкие даты. Средняя концентрация АК общего пула органического вещества составила 6.17 ± 0.36 мг/л, а средняя величина АК сестона – 5.58 ± 0.42 мг/л, различия статистически недостоверны ($t=1.07$, $n=4$, $p>0.05$). Таким образом, основную долю АК общего пула составляли АК сестона, в среднем - более 90%, что дало основание рассматривать данные общего пула аминокислот как отражающие преимущественно состав АК сестона.

Для определения азота и углерода пробы сестона фильтровали на прокаленные фильтры GF/F (Whatman, USA). Содержание азота и углерода в сестоне определяли на элементном анализаторе Flash EA 1112 NC Soil/MAS 200 (NEOLAB LLC, USA).

Приводятся методы статистической обработки результатов.

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ АМИНОКИСЛОТ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ФИТОПЛАНКТОНА «ЦВЕТУЩЕГО» И «НЕЦВЕТУЩЕГО» ЭВТРОФНЫХ ВОДОЕМОВ

Целью первого этапа работы было выявление возможной связи между профилем АК и составом фитопланктона в двух водоемах, в одном из которых доминировал прокариотический фитопланктон (т.е. наблюдалось "цветение" цианобактерий), а в другом - эукариотические микроводоросли.

В обоих водоемах был изучен пул АК общего органического вещества, включавший свободные и связанные в пептидах, белках и гуминовых веществах АК, а также АК живых организмов. В результате методического сравнения (гл.2) нами

установлено, что основную долю (более 90%) общего пула составляли АК сестона. Это согласуется с данными о том, что в эвтрофных водоемах биохимический состав сестона отражает главным образом таковой фитопланктона, тогда как доля зоопланктона составляет менее 5% от общего углерода сестона (Hessen et al., 2003).

В вдхр. Бугач в мае 2000 г. доминировали диатомовые рода *Stephanodiscus*. В июне происходила смена видового состава фитопланктона, при этом доминировали цианобактерии *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Vreb., и *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. С 20 июня по 11 июля наблюдалось интенсивное "цветение" воды, вызванное *Aph. flos-aquae*, доля которого увеличивалась до 95%, а биомасса фитопланктона возрастала до 144 мг/л. В июле возрастала биомасса диатомовых, зеленых и динофитовых водорослей, среди которых доминировали виды рода *Stephanodiscus*, *Chlamydomonas*, *Peridinium*, соответственно, а также возрастала биомасса эвгленовых *Euglena proxima* Dang. и *Trachelomonas volvocina* Ehr. В августе доминирующим видом стала цианобактерия *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. et Kom.

В общем пуле органического вещества проб, отобранных в водохранилищах Бугач и Лесное, обнаружено 16 базовых аминокислот (Табл. 1).

Таблица 1.

Концентрация аминокислот (мг/л) общего пула органического вещества вдхр. Бугач в 2000 г.

Дата	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe
17.05	0.25	0.06	0.41	0.54	0.26	0.33	0.86	0.06	0.33	0.42	0.19	0.07	0.25	0.43	0.16	0.25
30.05	0.10	0.03	0.10	0.24	0.13	0.12	0.34	0.11	0.17	0.19	0.14	0.01	0.08	0.18	0.06	0.09
06.06	0.05	0.01	0.04	0.11	0.06	0.06	0.13	0.06	0.10	0.07	0.09	0.01	0.03	0.07	0.02	0.04
13.06	0.06	0.01	0.02	0.11	0.05	0.07	0.15	0.07	0.14	0.11	0.11	0.01	0.03	0.06	0.01	0.02
20.06	0.06	0.02	0.02	0.18	0.06	0.10	0.23	0.09	0.18	0.17	0.13	0.01	0.04	0.13	0.02	0.03
27.06	0.12	0.03	0.03	0.60	0.20	0.32	1.07	0.17	0.39	0.58	0.48	0.04	0.28	0.78	0.05	0.09
04.07	0.15	0.02	0.04	0.88	0.19	0.38	1.22	0.19	0.46	0.70	0.41	0.02	0.15	0.65	0.62	0.08
11.07	0.15	0.03	0.09	1.07	0.35	0.62	1.77	0.22	0.55	0.73	0.72	0.03	0.26	1.07	0.04	0.07
18.07	0.18	0.05	0.07	0.39	0.25	0.24	0.71	0.17	0.30	0.38	0.24	0.05	0.19	0.33	0.12	0.15
25.07	0.80	0.14	0.12	1.43	0.82	0.72	2.94	0.63	0.80	1.41	0.92	0.16	0.79	1.55	0.54	0.85
01.08	0.42	0.10	0.11	0.94	0.45	0.53	1.47	0.35	0.48	0.75	0.48	0.07	0.40	0.72	0.26	0.35
15.08	0.33	0.06	0.70	0.60	0.28	0.26	0.99	0.24	0.33	0.44	0.31	0.07	0.26	0.44	0.18	0.23
22.08	0.20	0.06	0.10	0.54	0.29	0.25	0.69	0.25	0.29	0.39	0.28	0.05	0.23	0.40	0.14	0.15
29.08	0.19	0.05	0.07	0.80	0.26	0.29	1.01	0.24	0.32	0.43	0.27	0.05	0.24	0.41	0.16	0.18
06.09	0.32	0.07	0.16	0.76	0.32	0.31	1.05	0.28	0.40	0.51	0.40	0.06	0.31	0.51	0.19	0.26
13.09	0.21	0.06	0.08	0.65	0.30	0.30	1.00	0.28	0.34	0.49	0.36	0.07	0.27	0.48	0.16	0.20
20.09	0.28	0.08	0.13	0.60	0.28	0.28	0.94	0.24	0.34	0.46	0.35	0.06	0.27	0.46	0.18	0.21
27.09	0.31	0.07	0.23	0.84	0.42	0.42	1.01	0.30	0.48	0.62	0.44	0.07	0.35	0.55	0.24	0.28

Известно, что при гидролизе белков соляной кислотой разрушаются цистеин и триптофан. Глутамин и аспарагин определяются в виде глутаминовой и аспарагиновой кислот. Поэтому с помощью используемого метода возможно определение лишь 16 из 20 аминокислот, являющихся базовыми для синтеза белков. Аминокислоты, являющиеся промежуточными метаболитами в клетке (орнитин, таурин, γ -аминомасляная кислота и др.) и часто определяемые в составе растворенного органического вещества (Сакевич, Клоченко, 1996; Thomas, 1997), в исследованных нами водоемах обнаружены не были.

В результате корреляционного анализа процентного содержания АК (% от суммы АК), представленного в виде графа, выявлено три группы АК со сходной сезонной динамикой (Рис.1): основная группа из семи АК (I), группа глицина из четырех АК (II) и пара лейцин-глутаминовая кислота (III). Три АК, аспарагиновая кислота, аланин и аргинин, имели свою специфическую сезонную динамику каждая (Рис.1).

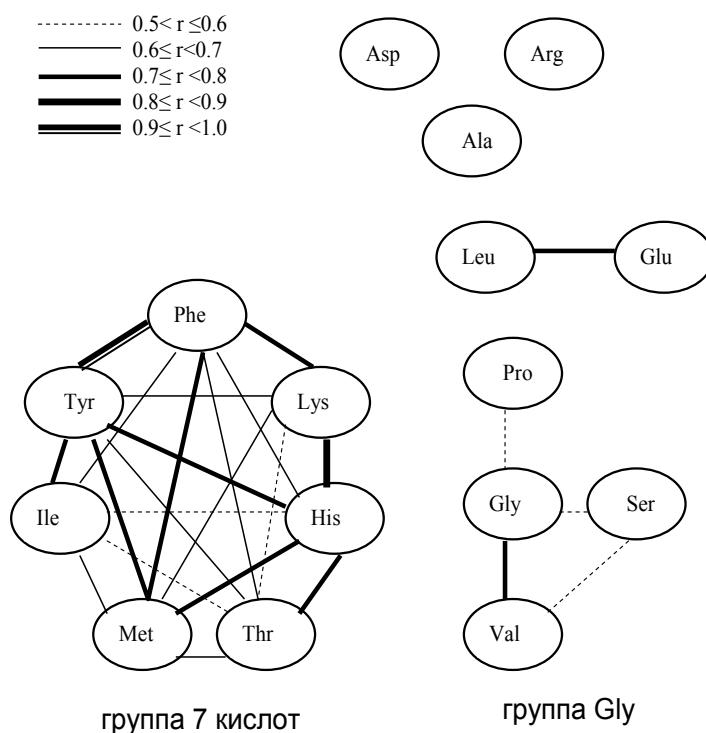


Рис. 1. Корреляционный граф содержания аминокислот (% от суммы) в водохранилище Бугач, май-сентябрь 2000 г. r - статистически достоверные ($p < 0.05$) коэффициенты корреляции.

Для выявления возможной связи между содержанием АК общего пула органического вещества и составом фитопланктона был проведен корреляционный анализ (Табл. 2). Выявлена статистически достоверная корреляция суммарной

концентрации АК с химическим потреблением кислорода (ХПК), концентрацией хлорофилла *a*, биомассой эвгленовых и динофитовых водорослей. Корреляция с общей биомассой фитопланктона оказалась статистически недостоверной.

Суммарное процентное содержание (% от суммы АК) группы I (тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, треонин, метионин, изолейцин) коррелировало с концентрацией хлорофилла *a* и биомассой эвгленовых водорослей. Процентное содержание АК группы II (глицина) имело достоверную отрицательную корреляционную связь с концентрацией хлорофилла *a* и с биомассой динофитовых. Содержание группы III (лейцина и глютаминовой кислоты) достоверно коррелировало с общей биомассой фитопланктона и с биомассой цианобактерий (Табл. 2).

Аспарагиновая кислота коррелировала с биомассой хризифитовых водорослей, тогда как для аргинина и аланина не было отмечено значимых корреляций ни с одной из групп фитопланктона. Мы предполагаем, что лейцин и глютаминовая кислота, аспарагиновая кислота и некоторые АК из группы 1 могут в дальнейшем быть использованы в качестве маркеров соответствующих групп фитопланктона.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции общей концентрации (мг/л) и относительного содержания (% от суммы АК) основных групп аминокислот с биомассой фитопланктона (мг/л), концентрацией хлорофилла (мкг/л), ХПК (мг/л) и биомассой отдельных таксонов водорослей в водохранилище Бугач, май - октябрь 2000 г., n=18.

Аминокислоты	Общий фитопланктон	Хлорофилл	ХПК	Цианобактерии	Диатомовые	Зеленые	Эвгленовые	Динофитовые	Хризифитовые
Общие аминокислоты	0.35	0.60	0.74	0.30	0.12	0.18	0.53	0.52	0.05
Группа 7-ми АК, %	-0.43	0.66	0.23	-0.48	0.40	-0.29	0.50	0.15	0.18
Группа Gly, %	-0.32	-0.60	-0.27	-0.27	-0.23	0.10	-0.37	-0.58	-0.40
Leu + Glu, %	0.79	0.08	0.24	0.78	-0.09	0.21	-0.04	0.40	0.05
Asp, %	0.09	0.04	-0.21	0.12	-0.25	0.06	-0.25	0.30	0.59
Arg, %	-0.29	-0.04	-0.10	-0.35	0.44	-0.19	0.23	-0.10	-0.19
Ala, %	0.21	-0.28	0.05	0.23	-0.22	0.40	-0.30	-0.27	-0.11

В мае 2000 г. в водохранилище Лесное доминировали диатомовые водоросли *Asterionella formosa* Hass. и виды рода *Stephanodiscus*. В июне также доминировала *A. formosa*, а в середине лета кратковременно – цианобактерия *Synechocystis salina* Wisl. К середине августа биомасса фитопланктона увеличивалась за счет диатомовых рода

Stephanodiscus и зеленой водоросли *Chlamydomonas* sp. В сентябре биомасса фитопланктона увеличивалась в основном за счет диатомовой водоросли *A. formosa*. Таким образом, в вдхр. Лесное в течение всего вегетационного сезона доминировали эукариотические виды фитопланктона. Тем самым, динамика видов фитопланктона обоих водохранилищ значительно различалась. Суммарная концентрация АК в вдхр. Лесное была существенно ниже, чем в вдхр. Бугач и также не коррелировала с общей биомассой фитопланктона.

Процентное содержание всех АК, за исключением аргинина, в течение сезона в Лесном, в отличие от такового в Бугаче, оставалось практически постоянным: величины содержания всех кислот, за исключением аргинина, коррелировали между собой и в корреляционном графе представляли одну группу (Рис.2). Скорее всего, такая корреляция АК состава вдхр. Лесного объяснялась постоянным доминированием эукариотического фитопланктона. Следует отметить, что как в вдхр. Лесном, так и в вдхр. Бугач, большинство АК образовывало единую группу в корреляционном анализе, тем самым, свидетельствуя о происхождении АК из одного источника – фитопланктона.

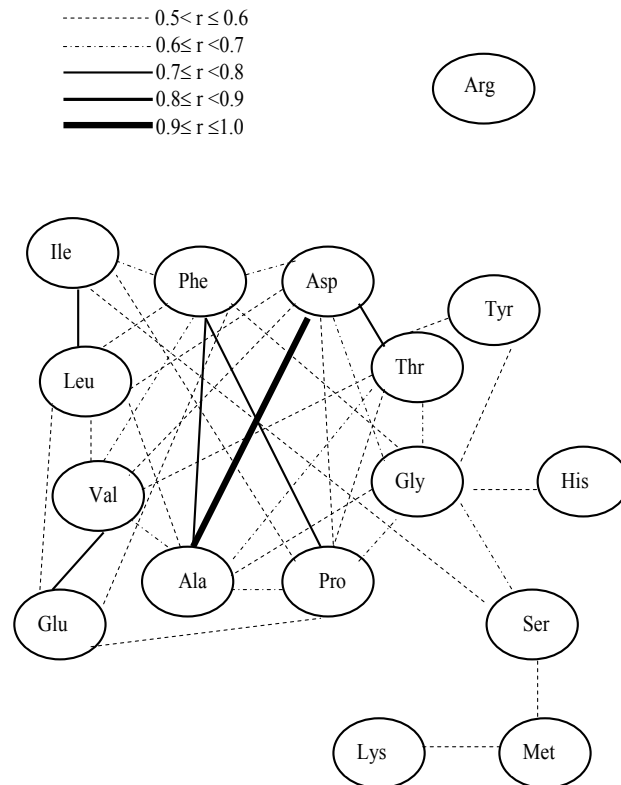


Рис.2. Корреляционный граф содержания аминокислот (% от суммы) в водохранилище Лесное, май-сентябрь 2000г. r- статистически достоверные ($p < 0.05$) коэффициенты корреляции.

В кластерном анализе процентного содержания АК получено два отдельных кластера проб, указывающих на различия в количественном соотношении АК двух изученных водохранилищ (Рис. 3). Первый, малый кластер, состоял из трех проб

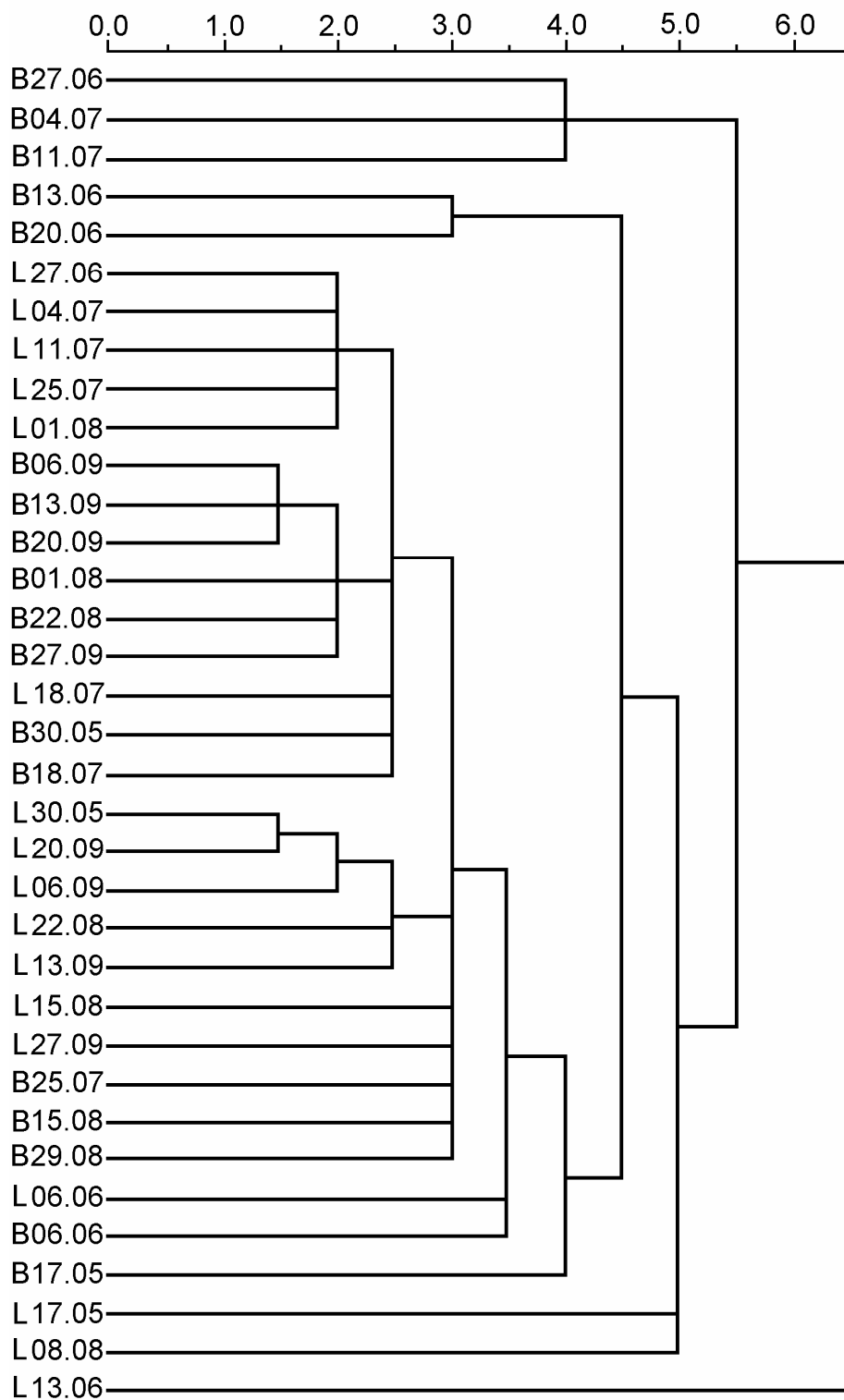


Рис. 3. Дендрограмма кластерного анализа содержания аминокислот (% от суммы) общего пула органического вещества водохранилищ Бугач (В) и Лесного (L), май-сентябрь, 2000 г. Ось абцисс – евклидовы расстояния, шестнадцатимерное гиперпространство.

27.06.00 - 11.07.00 из Бугача, взятых в период интенсивного "цветения" цианобактерий. Второй, большой кластер, объединил пробы как из Бугача, так и из Лесного, взятые в периоды доминирования эукариотического фитопланктона. Вместе с тем, в большом кластере наблюдались небольшие подкластеры проб, взятых в определенные периоды сезона, например, в сентябре и июне в вдхр. Бугач, что могло быть связано с доминированием определенных эукариотических видов. Очевидно, что такая смена доминирующих эукариотических видов была вызвана сезонными колебаниями различных факторов среды.

Таким образом, основной причиной достоверного изменения профиля АК общего пула органического вещества являлось "цветение" цианобактерий в эвтрофном водоеме. Следовательно, в водоемах, в которых доминируют эукариотические микроводоросли, профиль АК остается относительно постоянным в течение сезона. В водоеме, подверженном "цветению" цианобактерий, количественные соотношения АК сестона претерпевают значительные изменения в течение сезона и потенциально могут являться фактором, определяющим качество пищи и влияющим на рост и развитие зоопланктона.

ГЛАВА 4. РАЗЛИЧИЯ СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ДОМИНИРУЮЩИХ ВИДАХ ФИТОПЛАНКТОНА ЭВТРОФНОГО ВОДОХРАНИЛИЩА.

С целью определения содержания АК в природных пресноводных популяциях микроводорослей исследовали сезонную динамику аминокислот в сестоне в периоды доминирования (> 50% от общей биомассы) отдельных видов фитопланктона в мае - октябре 2002 – 2005 гг. в эвтрофном водохранилище Бугач.

Доминирующими видами эукариотического фитопланктона являлись динофлагеллята *Peridinium sp.* и диатомеи *Stephanodiscus sp.*, доминирующими видами прокариотического фитопланктона - цианобактерии *Planktothrix agardhii* (Gom). Anagn., *Gomphosphaeria lacustris* Chod. и *Anabaena flox-aquae* (Lyngb.). Поскольку биомасса фитопланктона в вдхр. Бугач существенно превышала 0.8 мг/л, то согласно (Hessen et al., 2003) содержание органического углерода, азота и аминокислот в сестоне определялось вкладом фитопланктона. В статистическом анализе были использованы данные проб с выраженным доминированием какого-либо вида фитопланктона, т.е. биомасса этого вида составляла более чем 50% от биомассы фитопланктона.

Для выявления возможных различий в биохимическом составе доминирующих видов водорослей проведен однофакторный дисперсионный анализ для трех наборов данных: процентного содержания АК, соотношения АК:С (мг/мг) и АК:N (мг/мг) для каждой аминокислоты (Табл. 3, 4) Периоды доминирования данных видов были использованы в качестве градаций однофакторного дисперсионного анализа. Они статистически достоверно определяли значительную часть вариабельности процентного содержания девяти аминокислот: гистидина (His), аспарагиновой кислоты (Asp), треонина (Thr), глютаминовой кислоты (Glu), аланина (Ala), метионина (Met), изолейцина (Ile), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe) (Табл. 3).

Мультивариантный канонический анализ соответствия, проведенный для этих девяти кислот, позволил установить, что наибольшие различия в количественных соотношениях аминокислот наблюдались между *Stephanodiscus* sp. и *P. agardhii* (ось фактора 1) и были обусловлены в основном различиями в содержании гистидина (His), тирозина (Tyr) и метионина (Met) (Рис. 4).

Таблица 3

Результаты однофакторного дисперсионного анализа аминокислот сестона (% от суммы АК) в периоды выраженного доминирования *Stephanodiscus*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Peridinium* и *Gomphosphaeria* как независимых переменных в водохранилище Бугач: η_x^2 - показатель степени влияния организованного фактора (%), F – критерий Фишера, p – достоверность степени влияния, степени свободы $\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 39$. Пробы были собраны в мае – октябре 2002 – 2005 гг. Незаменимые аминокислоты отмечены звездочкой.

Аминокислоты	η_x^2	F	p
Lys*	14.0	1.38	>0.05
His*	40.9	5.87	<0.01
Arg*	12.9	1.26	>0.05
Asp	46.5	7.38	<0.001
Thr*	28.8	3.43	<0.05
Ser	9.0	0.84	>0.05
Glu	35.3	4.65	<0.01
Pro	14.0	1.38	>0.05
Gly	23.4	2.60	>0.05
Ala	34.9	4.55	<0.01
Val*	9.2	0.86	>0.05
Met*	48.2	7.92	<0.001
Ile*	25.2	2.87	<0.05
Leu*	11.0	1.05	>0.05
Tyr	28.5	3.39	<0.05
Phe*	33.8	4.34	<0.01

Результаты однофакторного дисперсионного анализа соотношения АК:С (мг/мг) в сестоне в периоды выраженного доминирования *Stephanodiscus*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Peridinium* и *Gomphosphaeria* как независимых переменных в водохранилище Бугач: η_x^2 - показатель степени влияния организованного фактора (%), F - критерий Фишера, p - достоверность степени влияния, степени свободы $\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 39$. Пробы были собраны в мае - октябре 2002 - 2005 гг. Незаменимые аминокислоты отмечены звездочками.

Аминокислоты	η_x^2	F	p
Lys*	17.3	1.78	>0.05
His*	11.3	1.09	>0.05
Arg*	14.0	1.39	>0.05
Asp	33.6	4.30	<0.05
Thr*	11.8	1.14	>0.05
Ser	7.9	0.73	>0.05
Glu	22.9	2.52	>0.05
Pro	3.7	0.33	>0.05
Gly	9.5	0.90	>0.05
Ala	8.9	0.83	>0.05
Val*	6.9	0.63	>0.05
Met*	52.8	9.51	<0.001
Ile*	20.9	2.25	>0.05
Leu*	12.4	1.20	>0.05
Tyr	33.1	4.21	<0.05
Phe*	2.3	0.20	>0.05

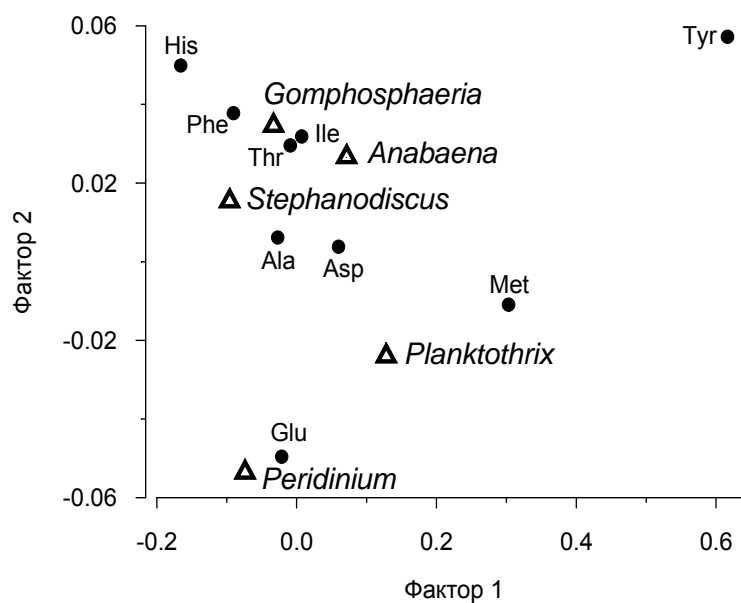


Рис. 4. Результаты мультивариантного канонического анализа соответствия содержания аминокислот в сестоне (кружки) периодам доминирования определенных видов фитопланктона (треугольники) в мае - октябре 2002-2005 гг. в водохранилище Бугач в двумерном пространстве факторов, представляющих 90.1% общей дисперсии ($\chi^2 = 2.59$ при степени свободы 32): фактор 1 - 78.5% дисперсии, фактор 2 - 11.6% дисперсии.

Было выявлено, что *Stephanodiscus* статистически значимо отличался от других видов более высоким (в 1.3 – 1.8 раза) средним процентным содержанием His. Низкий уровень Thr был характерен для *Peridinium*. Цианобактерия *Gomphosphaeria* имела наивысший уровень Ala. *Planktothrix* имел сравнительно низкий уровень Phe, но наивысший уровень Met. В отличие от вышеупомянутых видов, *Anabaena* не отличалась видоспецифичным содержанием упомянутых аминокислот (Рис.5).

Высокое процентное содержание в пересчете на единицу массы углерода Asp, Met и Tyr было характерно для *Planktothrix*, тогда как величины содержания у цианобактерий *Anabaena* и *Gomphosphaeria* были несколько ниже. Эукариотические виды, *Stephanodiscus* и *Peridinium*, имели значительно меньшее процентное содержание Asp, Met и Tyr, чем цианобактерии (Рис.6).

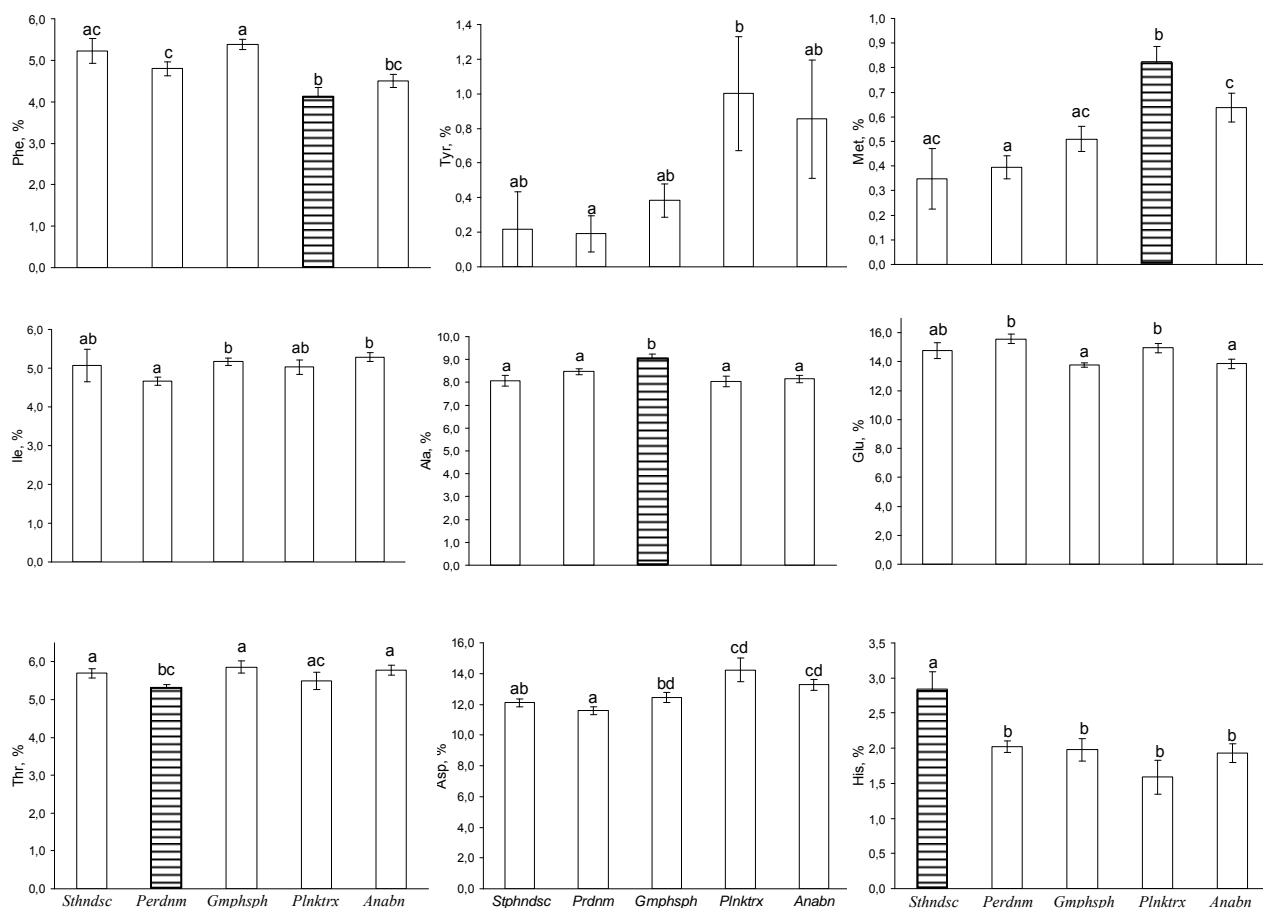


Рис.5. Средние значения содержания аминокислот (% от суммы), выбранных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, для проб выраженного доминирования пяти видов фитопланктона в период с мая по октябрь 2002-2005 в водохранилище Бугач. Средние, имеющие в обозначении одинаковую букву, статистически достоверно не различались ($p < 0.05$). Штриховкой отмечено достоверное минимальное или максимальное содержание АК у отдельных видов.

Содержание Lys и Met в пересчете на единицу массы азота также было видоспецифичным. Наивысшее значение Met:N было характерно для *Planktothrix*. Цианобактерия *Gomphosphaeria* имела наименьшее содержание Lys:N по сравнению с другими видами.

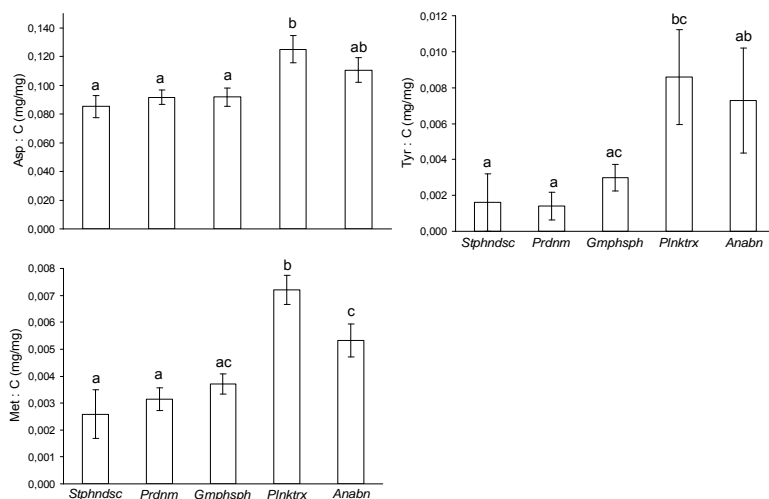


Рис. 6. Средние значения содержания аминокислот по отношению к углероду (мг/мг), выбранных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, для проб выраженного доминирования пяти видов фитопланктона в период с мая по октябрь 2002-2005 в водохранилище Бугач. Средние, имеющие в обозначении одинаковую букву, статистически достоверно не различались ($p < 0.05$).

Вместе с тем, выявлены аминокислоты, процентное содержание которых, а также соотношения АК:N и АК:C достоверно не различались для доминирующих видов фитопланктона, т.е. являлись инвариантными параметрами сестона изучаемого водоема (Рис.7).

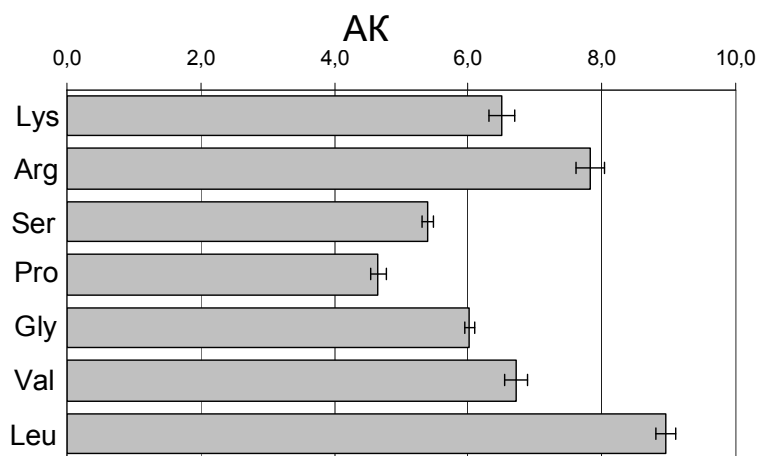


Рис. 7. Средние значения содержания аминокислот (% от суммы АК), не различавшихся для пяти видов фитопланктона во время их выраженного доминирования, в период с мая по октябрь 2002-2005 в водохранилище Бугач. Отрезки обозначают стандартные ошибки.

Таким образом, в отличие от данных многих других исследований, выявлено, что природные популяции фитопланктона обладают видоспецифическими различиями в содержании ряда аминокислот, включая незаменимые, и, возможно, имеют разную кормовую ценность для первичных консументов.

ГЛАВА 5. СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ЛИМИТИРУЮЩИЙ ФАКТОР ДЛЯ РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНЫХ КОНСУМЕНТОВ В ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

В главе рассматривается возможность лимитирования роста пресноводного зоопланктона вследствие несбалансированности количественного соотношения аминокислот фитопланктона на основе сравнения с литературными данными. Выявленные нами видоспецифические особенности содержания АК продуцентов могут отражать «неполноценность» качества фитопланктона как пищи, необходимой для роста первичных консументов, особенно по содержанию НАК.

Существует несколько способов оценки АК состава как показателя качества пищи консументов. Некоторые авторы предполагают, что уровень НАК, составляющий 50-60% от суммы АК способствует максимальному росту молоди рыб (Peres, Oliva-Teles, 2006). Уровень НАК в сестоне водохранилища Бугач составлял в среднем 48%. Следовательно, личинки рыб, являющиеся первичными консументами на ранних стадиях развития, и зоопланктон потенциально могли быть лимитированы в отдельные даты содержанием НАК в сестоне.

Второй подход для оценки АК качества пищи заключается в сопоставлении отношения НАК к общему азоту в пище и телах консументов (Andersen et al., 2004). Если животные потребляют пищу с соотношением какой-либо НАК к общему азоту $F_{X:N}$, меньшем, чем в тканях данного консумента $T_{X:N}$, то такая АК считается фактором, лимитирующим рост (Andersen et al., 2004). Мы сравнили соотношения НАК к азоту (Рис.8) в изученном нами сестоне с соотношениями, опубликованными для копепод, допуская, что соотношения $T_{X:N}$ у животных постоянны (Andersen et al., 2004). Обнаружено, что соотношение $F_{Lys:N}$ у *Gomphoshaeria* было существенно меньше, чем $T_{Lys:N}$ у копепод (Рис.8), что, вероятно, могло влиять на их популяционный рост. Данные по содержанию метионина в копеподах отсутствовали.

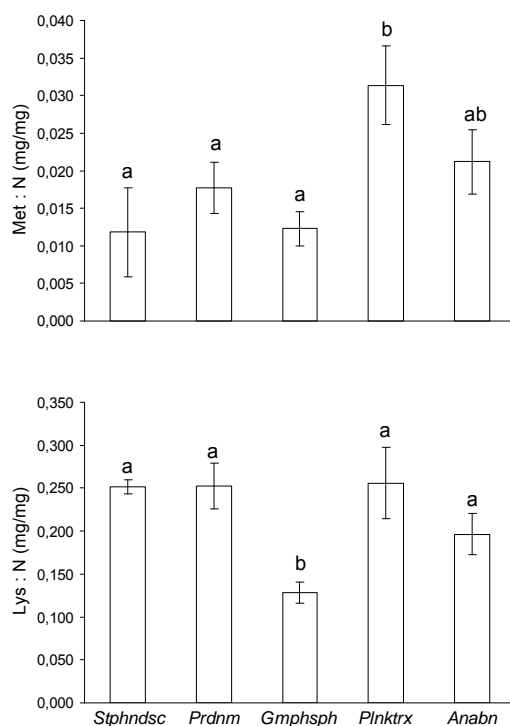


Рис. 8. Средние значения содержания аминокислот по отношению к азоту (мг/мг), выбранные с помощью однофакторного дисперсионного анализа для дат выраженного доминирования пяти видов фитопланктона в период с мая по октябрь 2002-2005 в водохранилище Бугач. Стандартные ошибки обозначенные одной и той же буквой незначительно различались при $p < 0.05$.

Согласно другому подходу, качество пищи считается выше, если АК профили пищевых источников ближе к АК профилю питающихся животных (Brown et al., 1997; Conceicao et al., 2003). Нами использованы для сравнения данные по АК профилям для морских и солоноватоводных беспозвоночных, поскольку в литературе отсутствуют данные для пресноводного зоопланктона, допуская сходство АК профилей всех животных (Sorimachi et al., 1999, Anderson et al., 2004).

Так, коловратки *Brachionus* и науплии *Artemia* имели уровень метионина 2.1-3.9% (Aragao et al., 2004), а пресноводная креветка *Macrobrachium* - 2.6% (Tidwell et al., 1998), тогда как в изученных видах фитопланктона уровень метионина был менее 1% (Рис.5). Метионин рассматривается как одна из АК, наиболее часто лимитирующих рост водных животных (Fox et al., 1995; Kleppel et al., 1998; Tidwell et al., 1998; Luo et al., 2005). Особенно низкие и, вероятно, лимитирующие уровни метионина, были характерны для сестона в периоды доминирования диатомеи *Stephanodiscus* и динофлагелляты *Peridinium*. В целом, уровень метионина в изученном пресноводном сестоне был в 2-3 раза ниже, чем, предположительно, требуется для зоопланктона.

Науплии *Artemia* имели уровень лизина 7.9-8.8% (Aragao et al., 2004), а пресноводная креветка - 7.8- 8.0% (Tidwell et al., 1998), что было выше, чем процентное содержание лизина у всех изученных видов фитопланктона (Рис.7). Лизин рассматривается как ключевая незаменимая аминокислота, лимитирующая рост и развитие водных животных (Fox et al., 1995; Brown et al., 1997; Schuhmacher et al., 1997; Tidwell et al., 1998).

Все изученные виды фитопланктона, исключая *Stephanodiscus*, также имели субоптимальные уровни гистидина. Пресноводная пильчатая креветка содержала 3.8-4% гистидина (Tidwell et al., 1998), что значительно выше, чем в изученном пресноводном сестоне (Рис.5). Этот факт дает основание предполагать лимитирование роста зоопланктона данной НАК в изученном водоеме.

Таким образом, выявленные видоспецифичные особенности содержания аминокислот у доминирующего пресноводного фитопланктона, могут являться лимитирующими факторами для роста и развития первичных консументов в эвтрофных водоемах.

ВЫВОДЫ

1. В изученных эвтрофных водоемах концентрации всех аминокислот общего пула органического вещества, за исключением аргинина, достоверно коррелировали друг с другом, что свидетельствовало об их происхождении из общего источника. Наиболее вероятным источником аминокислот общего пула органического вещества данных водоемов представляется фитопланктон.

2. Процентное содержание аминокислот общего пула достоверно изменялось при "цветении" цианобактерий эвтрофного водоема, в то время как в эвтрофном водоеме, в котором последовательно доминировали различные эукариотические микроводоросли, профиль аминокислот оставался относительно постоянным в течение всего вегетационного сезона. Показано, что "цветение" цианобактерий является ведущей причиной изменения профиля АК эвтрофных водоемов.

3. Получены корреляции между процентным содержанием отдельных аминокислот и таксономическими группами фитопланктона, например, между суммарным содержанием пары лейцин - глутаминовая кислота и биомассой цианобактерий. Обнаруженные корреляции свидетельствуют о перспективности использования некоторых групп аминокислот в качестве биомаркеров прокариотического и эукариотического фитопланктона.

4. Методами мультивариантного анализа установлено, что доминирование отдельных видов эукариотического и прокариотического фитопланктона вызывало существенные изменения в содержании аминокислот сестона эвтрофного водоема. Таким образом, в отличие от общепринятых представлений, обнаружено, что природные популяции доминирующих видов эукариотического и прокариотического фитопланктона характеризуются специфическим содержанием аминокислот, включая различия в содержании незаменимых АК.

5. На основании сравнения с данными по содержанию АК у видов зоопланктона оценено содержание АК в сестоне исследованного эвтрофного водохранилища как фактор, определяющий качество пищи консументов. Установлено, что при доминировании некоторых видов фитопланктона рост и развитие первичных консументов планктона потенциально могут быть лимитированы из-за недостатка отдельных незаменимых аминокислот.

ПУБЛИКАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Гладышев М.И. Прорастание акинет цианобактерий из донных отложений в эксперименте в водах “цветущего“ и “нецветущего“ водоемов / М.И.Гладышев, В.И. Колмаков, Е.С. Кравчук, Г.С. Калачева, А.А. Колмакова, И.В. Грибовская, А.В. Москвичева, М.Ю. Трусова, М.Д. Жиленков, О.Н. Махутова // Докл.АН.-2001.-Т.378.-№1.-С.134-137.
2. Колмакова А.А. Сравнительное изучение сезонной динамики аминокислот в воде двух малых сибирских водоемов / А.А. Колмакова, Г.С. Калачева, М.И. Гладышев, Е.А. Иванова, Е.С. Кравчук // Вестник КрасГУ.-2004.-№7.-С.106-119.
3. Колмакова А.А. Различия аминокислотного состава доминирующих видов фитопланктона в эвтрофном водохранилище / А.А. Колмакова, М.И. Гладышев, Г.С. Калачева // Докл. АН.-2007.-Т.415.-№5.-С.711-713.
4. Kalachova G.S. Seasonal dynamics of amino acids in two small Siberian reservoirs dominated by prokaryotic and eukaryotic phytoplankton / G.S. Kalachova, A.A. Kolmakova, M.I. Gladyshev, E.S. Kravchuk, E.A. Ivanova // Aquat Ecol.-2004.-№ 38.-P. 3-15
5. Gladyshev M.I. Seasonal correlations of elemental and ω 3 PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir / M.I. Gladyshev, N.N. Sushchik, A.A. Kolmakova, G.S. Kalachova, E.S. Kravchuk, E.A. Ivanova, O.N. Makhutova // Aquat Ecol.- 2007.-№ 41.-P.9–23

Подписано в печать 06.09.10

Формат 60x84/16

Тираж 100 экз. Заказ № 27

Отпечатано в типографии ИФ СО РАН