

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ВАРИАЦИИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЗЕЛеноЙ
ВОДОРосЛИ *ULVA INTESTINALIS* В УСЛОВИЯХ СОЛЕНых И
СОЛОНОВАТОВОДных МАЛых РЕК ЮГА РОССИИ (ПРИЭЛьТОНЬЯ)**

© 2011 г. О.А. Розенцвет, В.Н. Нестеров, Е.С. Богданова

Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук, г. Тольятти

Вставить фото авторов

Ключевые слова: абиотические факторы, малые реки, вариация, липиды, пигменты, жирные кислоты.

Исследована вариабельность состава и содержания липидов и жирных кислот образцов водорослей *Ulva intestinalis*, собранных из малых рек аридной зоны Прикаспийской низменности, отличающихся широким диапазоном изменения абиотических факторов (уровень минерализации, температурный режим, насыщение кислородом, кислотность среды). В качестве основной гипотезы проверяется роль изменчивости состава липидов как основы экологической пластичности вида.

Введение

Приэльтонье – один из ценных природно-территориальных комплексов региона бассейна Нижней Волги в пределах северной части Прикаспийской низменности [1]. Гидрографическая сеть этой территории представлена малыми реками, относящимися к водосборному бассейну оз. Эльтон, солеными озерами, лиманами, временными водотоками и родниками. Малые реки Приэльтонья относятся к категории соленых и солоноватоводных рек [2]. Известно, что водоемы с естественным высоким уровнем минерализации представляют значительный интерес в плане развития в них галотолерантных и галофильных видов, обычно редких, имеющих ограниченное распространение или относящихся к эндемичным формам [3]. Еще меньше видов среди гидробионтов, способных в активном состоянии обитать как в пресной, так и в соленой воде. К числу таких видов, относятся некоторые виды водорослей [4, 5]. Зеленая

водоросль *Ulva intestinalis* (L.) Link является одним из массовых видов макрофитов рек Приэльтонья.

Водоросли способны приспосабливаться к различным уровням солености водоемов, их кислотности, световым колебаниям, а также к другим факторам среды [6]. Считают, что это свойство находит свое отражение в исключительном разнообразии липидов [7, 8]. Особое значение имеют липиды, которые являются основой клеточных мембран, и которые регулируют отношения клетки с внешней средой. К числу таких липидов у водорослей относятся глико- и фосфолипиды, а также бетаиновые липиды [5, 9, 10].

Известны литературные сведения о влиянии отдельных факторов среды на состав липидов различных представителей водорослей [11–13]. Однако исследований варибельности липидных компонентов мембран одного вида организмов, существующих в местообитаниях, отличающихся разнообразием абиотических факторов в широких диапазонах их изменения, недостаточно. Отметим, что к настоящему времени отсутствует единый взгляд на выбор количественных критериев, позволяющих надежно отличить вариацию показателей, соответствующих естественным жизненным ритмам экосистемы, от сдвигов, выходящих за пределы адаптационных реакций и являющихся свидетельством нарушения равновесного оптимума [14].

Цель работы заключалась в изучении изменчивости состава липидов и жирных кислот *U. intestinalis*, обитающей в условиях малых рек Приэльтонья, и выявлению возможных границ изменчивости липидных компонентов. В качестве основной гипотезы проверяется роль изменчивости состава липидов как основы экологической пластичности вида.

Методы и постановка исследований

Эврибионтный вид зеленых водорослей *U. intestinalis* (ульва) относится к семейству Ulvaceae, класса Chlorophyceae, порядка Ulotrichales. Образцы водорослей собирали в августе на 10 станциях на рек. Хара, Солянка, Сморогда, Чернавка, Ланцуг, питающих оз. Эльтон, расположенных на территории Волгоградской области, в период с 2006 по 2010 гг. (рис. 1). Гидрохимические показатели и физико-химические параметры измерялись одновременно с отбором проб в соответствии с общепринятыми методическими указаниями [15].

Для анализа липидов на каждой станции отбирали слоевища водорослей, составляли три независимых биологических пробы (2–4 г сырой массы), инактивировали изопропиловым спиртом при 80 °С в течение 15 мин., и в плотно закупоренных виалах доставляли к месту проведения анализов. Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 1 : 2 по объему [16]. Гликолипиды разделяли методом одномерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках 10 × 10 см с закрепленным слоем силикагеля с использованием системы растворителей: ацетон/бензол/вода (91/30/8). Фосфолипиды разделяли двумерной ТСХ на стеклянных пластинках 6 × 6 см. Использовали две системы растворителей: для первого направления – хлороформ/метанол/бензол/аммиак (130/60/20/12), для второго – хлороформ/метанол/бензол/ацетон/уксусная кислота (140/60/20/10/8). Количественный анализ липидов проводили по методам, описанным ранее [17].

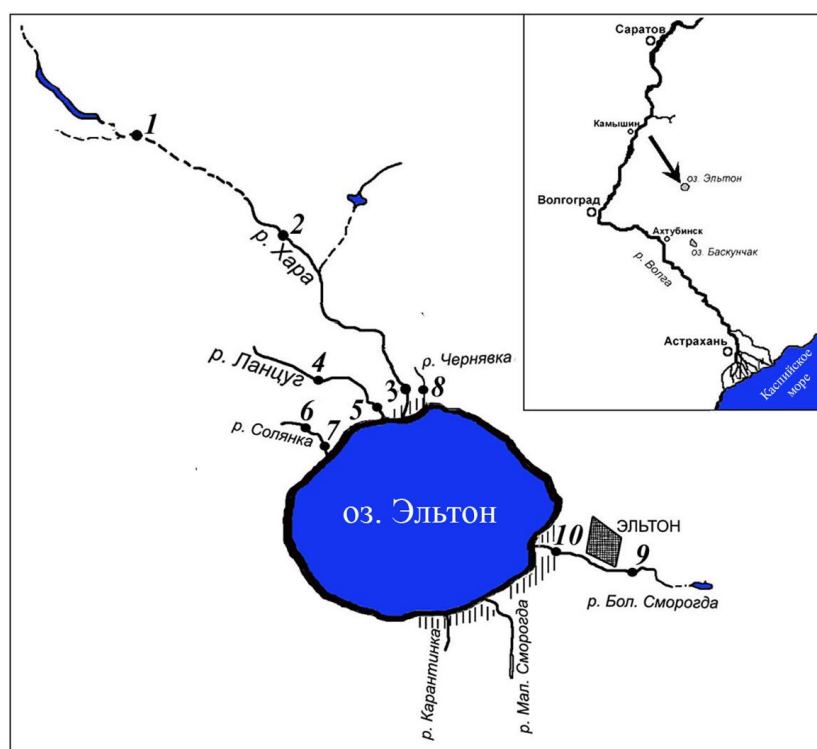


Рис. 1. Схема расположения малых рек и станций наблюдений в районе оз. Эльтон.

Жирные кислоты метилировали путем кипячения в пятипроцентном растворе HCl в метаноле в течение 1 ч. Полученные эфиры очищали препаративной ТСХ и анализировали на газо-жидкостном хроматографе «Хроматэк. Кристалл 5000.1» (Россия) с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0,25 мм «RESTЕК» (США) в изотермическом режиме. Температура колонки 180 °С, испарителя

и детектора 260 °С. Скорость тока газа-носителя (гелий) 20 мл/мин. Идентификацию жирных кислот осуществляли по полученным масс-спектрам, сравнивая их с имеющимися в базе данных NIST-98, а также путем сравнения времен удерживания с таковыми для стандартов «Sigma» (США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 for Windows, а также с применением электронных таблиц Microsoft Excel. Верхнюю (P_v) и нижнюю (P_n) границы доверительного интервала коэффициента вариации (Cv) рассчитывали по формулам [18]:

$$P_n = \frac{Cv}{1 + K\sqrt{1 + 2Cv^2}} \quad P_v = \frac{Cv}{1 - K\sqrt{1 + 2Cv^2}} \quad \text{где } K = \frac{t}{\sqrt{2(n-1)}};$$

$$Cv = \frac{s_x}{A} \times 100$$

Результаты исследования и их обсуждение

Зеленая водоросль *U. intestinalis* встречается в малых реках Приэльтонья в виде небольших куртин или массовых зарослей. Степень зарастаемости водоемов макрофитами, в том числе *U. intestinalis*, в зависимости от года наблюдений, составляет 10–50 %.

Для успешного развития водорослей ведущими факторами являются свет, температура, наличие источников углерода, минеральных и органических веществ [19]. Характеристики некоторых измеряемых нами параметров приведены в табл. 1. Уровень минерализации в реках Приэльтонья составляет 6,9–28,5 г/л, и согласно классификации континентальных водоемов данные водотоки относятся к мезогалинным (5–18 г/л) и полигалинным (18–30 г/л) (табл. 1) [20]. Наиболее минерализованными являются воды рек Солянка и Чернавка, а менее – воды в верхнем течении р. Хара и среднем течении р. Ланцуг. В достаточно широком интервале изменяется уровень насыщения воды кислородом (40–178 %). В среднем течение рек. Хара и Ланцуг отмечено самое низкое содержание кислорода в воде. По температурному режиму воды рек Чернавка и Сморогда более холодные в сравнении с другими реками, а по показателю кислотности – нейтральные и слабощелочные.

Известно, что *U. intestinalis* растет на разных субстратах у уреза воды и глубже или свободно плавает в соленых, солоноватых и пресных, часто загрязненных водах [4,

19]. Как видно из наших результатов условия малых солонатоводных рек аридной зоны с широким спектром изменчивости абиотических факторов также благоприятны для массового развития данного вида, что говорит об устойчивости и его высокой экологической пластичности.

Таблица 1. Некоторые абиотические условия на станциях при синхронных наблюдениях за содержанием липидов и жирных кислот

Номер станц ии	Участки реки	Число проб	Гидрохимические показатели воды			
			Минерализация, г/л	T, °C	Насыщен ие O ₂ , %	pH
1	Хара, верхнее течение	8	6,9	22,0	94	7,2
2	Хара, среднее течение	4	11,0	22,0	52	9,2
3	Хара, нижнее течение	4	13,8	22,8	178	8,3
4	Ланцуг, среднее течение	8	6,8	22,0	40	7,6
5	Ланцуг, нижнее течение	4	13,7	22,0	124	8,1
6	Солянка, среднее течение	4	27,6	24,8	95	7,5
7	Солянка, нижнее течение	7	27,3	26,0	138	7,8
8	Чернавка, среднее течение	6	28,5	18,5	53	7,3
9	Сморогда, среднее течение	7	13,7	24,2	96	8,4
10	Сморогда, нижнее течение	8	9,7	18,6	135	8,3

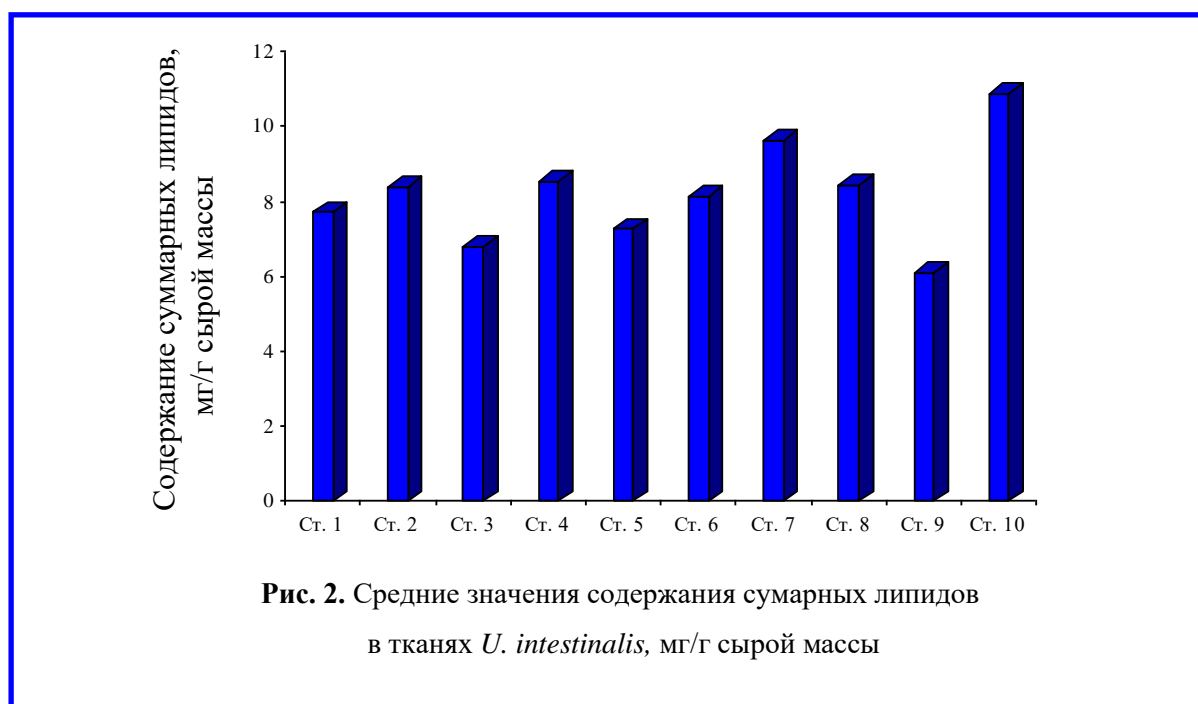
Характеристики, отражающие биохимическое состояние *U. intestinalis*, включали концентрацию пигментов, а также состав липидов и жирных кислот. Количество пигментов и их отношение является одним из показателей нормального развития растений и протекания фотосинтетических реакций. Анализ их содержания в некоторых образцах не выявил существенной разницы (табл. 2). У всех образцов водорослей соотношение между хлорофиллами «a» и «b» также практически не менялось.

Таблица 2. Содержание пигментов в некоторых образцах *U. intestinalis*

Реки	Хлорофилл «a»	Хлорофилл «b»	a/b	Каротиноиды
Чернавка	0,48±0,04	0,39±0,02	1,2	0,15±0,01
Хара	0,42±0,02	0,30±0,02	1,4	0,15±0,01
Сморогда	0,60±0,04	0,42±0,03	1,4	0,20±0,02
Ланцуг	0,56±0,04	0,44±0,03	1,3	0,21±0,02

Известно, что хлорофилл «a» входит в состав реакционных центров и периферических антенных комплексов фотосистем I и II, в то время как хлорофилл «b» преимущественно является компонентом светособирающего комплекса фотосистемы II [21]. Постоянство отношения хлорофилла a/b указывает на то, что соотношение между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающих комплексов оставалось неизменным, несмотря на существенную разницу в значениях факторов среды обитания.

Содержание суммарных липидов, измеренное в течение всего периода исследований, варьирует от 6 до 11 мг/г сырой массы в зависимости от станции наблюдений (рис. 2).



В табл. 3 приведены средние значения содержания всех исследованных компонентов липидов, входящих в состав клеточных мембран *U. intestinalis*. Гликолипиды являются основными липидами, их доля может достигать 80 % от суммы липидов. Среди этой группы липидов преобладает моногалактозилдиацилглицерин. Среди липидов, содержащих фосфор, главным является фосфатидилглицерин. Его содержание меняется в интервале 3–10 % от суммы мембранных липидов (61–71 % от суммы фосфолипидов) (рис. 3). Отличительной особенностью состава фосфолипидов данного вида водорослей является присутствие фосфатидихолина в клетках тех образцов, рост которых приурочен к условиям с меньшим уровнем минерализации в воде (Ст. 1 и 4) и его отсутствие в образцах растений, собранных в реках с максимальным уровнем минерализации. Следует отметить, что ранее при изучении липидов этой водоросли из морских мест обитания, фосфатидилхолин не был обнаружен в составе фосфолипидов [22]. Кроме глико- и фосфолипидов в состав липидов *U. intestinalis* входит бетаиновый липид – диацилглицеро-*N, N, N*-триметилгомосерин, содержание которого в составе мембранных липидов в среднем составляет 12 %.

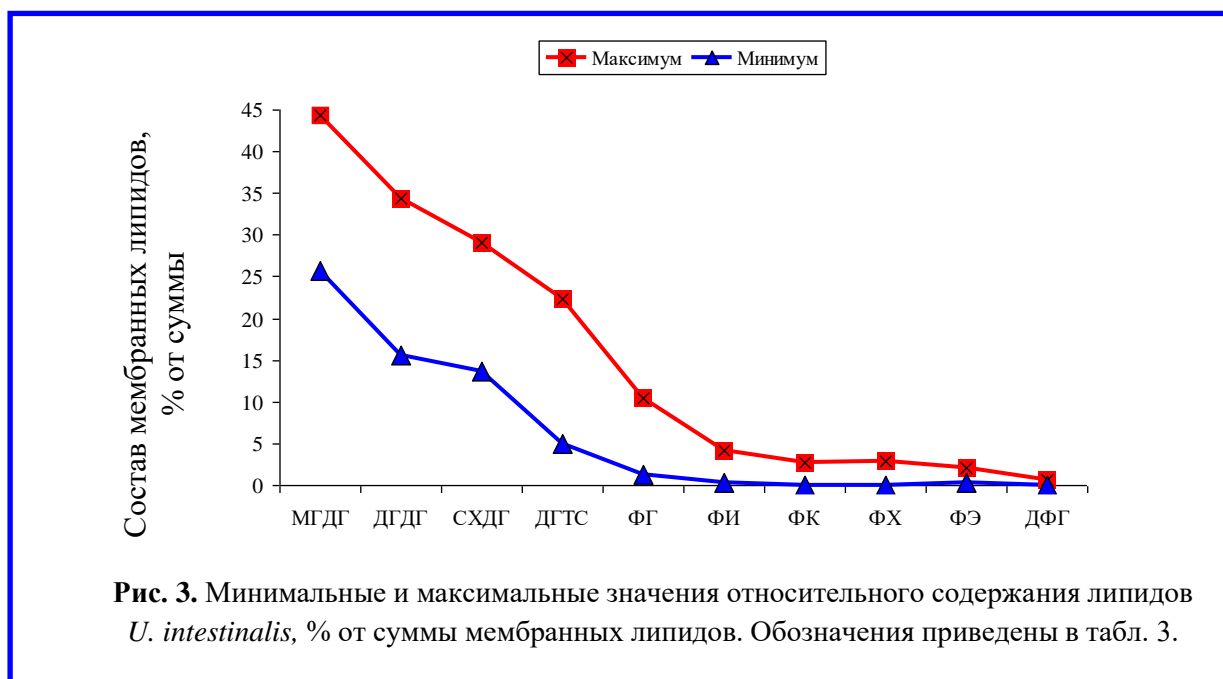
Таблица 3. Количественные вариации состава мембранных липидов *U. intestinalis*

<i>Липиды</i>	<i>A</i>	<i>Sx</i>	<i>Cv</i>	<i>Pn</i>	<i>Pв</i>
Гликолипиды					
Моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ)	2,60	0,97	37,3	30,8	47,4
Дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ)	1,66	0,57	34,0	28,3	43,4
Сульфохиновозилдиацилглицерин (СХДГ)	1,40	0,51	36,4	29,1	44,5
Бетаиновые липиды					
Диацилглицеро- <i>N, N, N</i> - триметилгомосерин (ДГТС)	0,85	0,30	35,3	29,1	44,7
Фосфолипиды					
Фосфатидилглицерин (ФГ)	0,39	0,24	60,8	48,7	80,9
Фосфатидилинозит (ФИ)	0,10	0,05	52,0	40,6	65,0
Фосфатидилэтаноламин (ФЭ)	0,06	0,03	52,0	42,1	67,3
Фосфатидилхолин (ФХ)	0,02	0,03	143,8	100,2	248,4
Фосфатидная кислота (ФК)	0,05	0,03	55,4	44,7	72,8
Дифосфатидилглицерин (ДФГ)	0,01	0,01	76,6	60,0	106,1

Примечание: *A* – среднее значение, мг/г сырой массы; *Sx* – стандартное отклонение от средней; *Cv* – коэффициент вариации; *Pn* и *Pв* – соответственно, нижняя и верхняя границы доверительного интервала для коэффициента вариации.

Структурно-функциональное значение липидов различно. Гликолипиды и фосфатидилглицерин входят в состав липидов мембран тилакоидов хлоропластов [23]. Эти липидные компоненты играют важную роль в фотосинтезе растений, создавая среду для функционирования компонентов фотосистем и регулируя взаимодействие отдельных комплексов [24]. Фосфолипиды являются структурным элементом клеточных мембран, которые отделяют клетку от внешней среды и разделяют клетку на отдельные компартменты. Как видно из представленных данных, типичный для мембран высших растений липид – фосфатидилхолин в клетках *U. intestinalis* может выступать как минорный компонент. Согласно современным представлениям, бетаиновые липиды важны для зеленых водорослей, а диацилглицеро-*N, N, N*-

триметилгомосерин рассматривается в качестве заменителя фосфатидилхолина во внехлоропластных мембранах [9]. Сравнение количественного уровня фосфолипидов и бетаинового липида показывает, что в непластидных мембранах преобладают липиды бетаинового типа (рис. 3).



Еще одной группой анализируемых биохимических параметров *U. intestinalis* стал состав жирных кислот. В табл. 4 представлены жирные кислоты, содержание которых по данным газожидкостного анализа было выше 1 %. Большую часть жирных кислот составляют ненасыщенные кислоты (рис. 4). Главной среди насыщенных кислот (Н) является пальмитиновая кислота. В небольших количествах в составе общих липидов идентифицированы миристиновая и стеариновая кислоты. Из семейства ненасыщенных кислот, содержащих одну двойную связь (МН), идентифицированы олеиновая кислота и пальмитоолеиновая кислоты, а среди диеновых кислот (ДН) – линолевая и эйкозановая кислоты. Наиболее гетерогенной оказалась группа полиненасыщенных жирных кислот (ПН).

По данным анализа были рассчитаны размах и коэффициенты вариации липидов и жирных кислот. Данные табл. 3 показывают, что коэффициенты вариации гликолипидов составляют 34–37 %. Фосфолипиды являются более вариабельными в сравнении с гликолипидами. Наибольший коэффициент вариации имеет фосфатидилхолин. Это связано с тем, что максимальное содержание данного липида

составляло 27 % от суммы фосфолипидов, а минимальное равно нулю (рис. 3). Коэффициент вариации бетаинового липида составляет 35%. Основные в количественном отношении кислоты (16:0; 18:1; 18:3) отличаются меньшими коэффициентами вариации (21, 31 и 25 %, соответственно) в отличие от минорных кислот, в которых его значения превышают 100 % (табл. 4).

Таблица 4. Интервалы и коэффициент вариабельности жирных кислот в суммарных липидах *U. intestinalis*

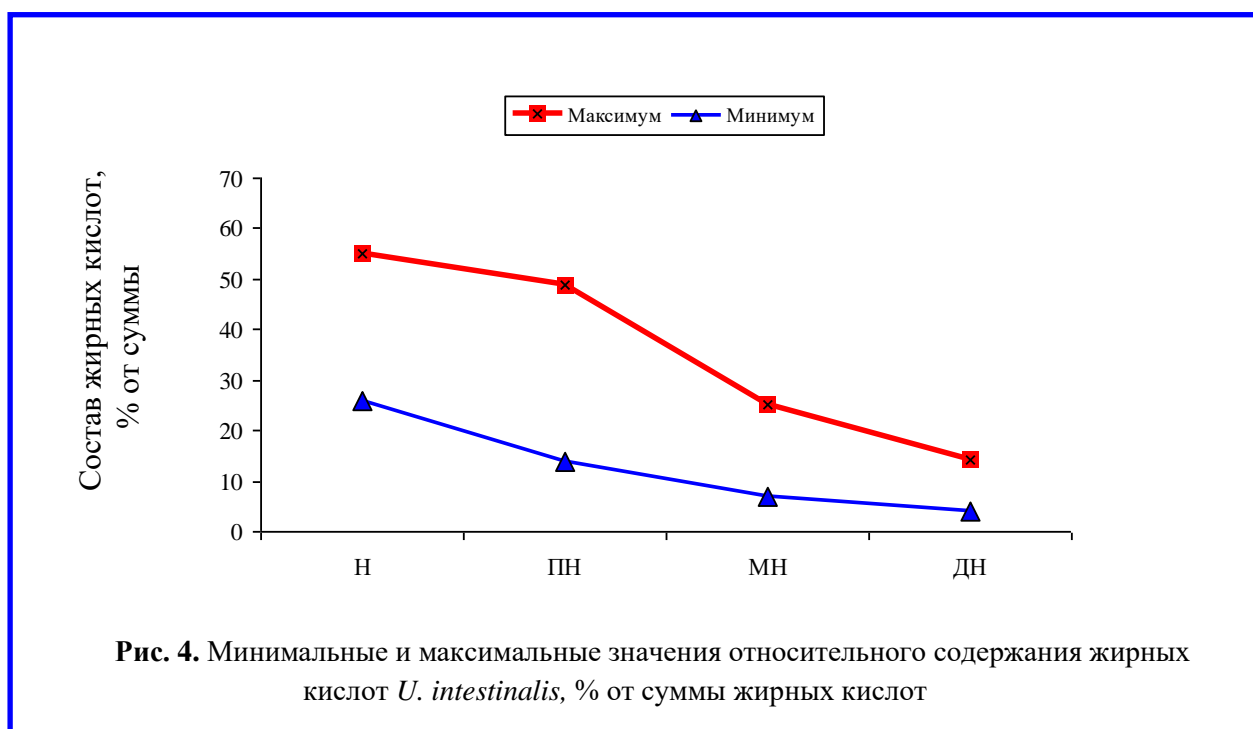
<i>Жирные кислоты</i>	<i>A</i>	<i>Sx</i>	<i>Cv</i>	<i>Pn</i>	<i>Pв</i>
Насыщенные (Н)					
Миристиновая (14:0)	1,0	0,8	80,0	62,3	111,9
Пальмитиновая (16:0)	36,1	7,7	21,3	17,8	26,6
Стеариновая (18:0)	1,3	0,7	53,8	43,5	70,6
Мононенасыщенные (МН)					
Пальмитоолеиновая (16:1)	3,3	1,7	51,5	41,8	67,2
Олеиновая (18:1)	9,3	2,9	31,3	25,9	39,3
Диеновые (ДН)					
Линолевая (18:2)	5,2	1,6	30,8	25,5	38,7
Эйкозодиеновая (20:2)	1,3	0,8	61,5	49,2	82,1
Полиненасыщенные (ПН)					
Гексадекатетраеновая (16:4)	1,5	1,2	80,0	62,3	111,9
Линоленовая (18:3)	17,8	4,5	25,3	21,1	31,6
Октадекатетраеновые (18:4)	7,9	3,2	40,5	33,3	51,8
Арахидоновая (20:4)	1,5	0,3	20,0	16,7	24,9
Другие	13,8	-	-	-	-

Примечание: *A* – среднее значение, % от суммы жирных кислот; *Sx* – стандартное отклонение от средней; *Cv* – коэффициент вариации; *Pn* и *Pв* – соответственно, нижняя и верхняя границы доверительного интервала для коэффициента вариации.

На основании литературных данных значение коэффициента вариации *Cv* менее 10 % может служить основанием для отнесения показателя к категории «жестких» [25]. Если $Cv > 40\%$, то правомерно заключение об относительно высокой пластичности показателя, а при вариации $40\% > Cv > 10\%$ – умеренно пластичной. С этой точки

зрения содержание таких компонентов липидов, как гликолипиды и фосфатидилглицерин, отвечающие за функционирование биологических процессов, которые осуществляются на мембранах тилакоидов, обладают наименьшей вариабельностью, и являются умеренно пластичными. Липиды, которые регулируют взаимоотношения организма со средой обитания, более изменчивы, и, следовательно, более пластичны.

По-видимому, одной из причин отнесения *U. intestinalis* к эврибионтным видам, является способность к изменению в широком интервале состава липидов, что позволяет этому виду быстро и без особых энергетических затрат приспосабливаться к тем или иным условиям обитания.



Как отмечалось выше, к настоящему времени отсутствует единый взгляд на выбор количественных критериев, позволяющих надежно отличить вариацию показателей, соответствующих естественным жизненным ритмам экосистемы [14]. Определения интервалов изменчивости липидной составляющей биологических мембран может стать одним из подходов к определению устойчивости вида к различным условиям среды в целом и выявлению границ толерантности в частности.

Заключение

Показано, что количественные характеристики биохимического состава речных популяций *U. intestinalis* из соленых и солоноватоводных малых рек Приэльтонья в значительной степени меняются в зависимости от условий обитания. Наибольшие изменения связаны с относительным содержанием фосфатидилхолина. Изменения в составе жирных кислот в тканях *U. intestinalis*, собранных в различных местах обитания, связаны, главным образом, с изменением соотношения насыщенных и ненасыщенных кислот, а также соотношения кислот с различной длиной углеродной цепи. Выявлены размах и коэффициенты вариации мембранных липидов и жирных кислот. На основании этого сделан вывод, что гликолипиды относятся к категории умеренно пластичных показателей, фосфолипиды – к категории пластичных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водно-болотные угодья Приэльтонья / под ред. Х. Леумменса, Э. Сохиной. Волгоград, 2005. 28 с.
2. Зинченко Т.Д., Головатюк Л.В. Биоразнообразие и структура сообществ макробентоса соленых рек аридной зоны юга России (Приэльтонье) // Аридные экосистемы. 2010. Т. 16. № 3 (43). С. 25–33.
3. Williams W.D. Environmental threats to salts lakes and the likely status of inland saline ecosystems 2025 // Environ. Conserv. 2002. V. 29. P. 154–167.
4. Виноградова К.Л. Ульвовые водоросли (Chlorophyta) морей СССР. Л.: Наука, 1974. 165 с.
5. Хотимченко С.В. Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Структура. Распределение. Анализ. Владивосток: Дальнаука, 2003. 233 с.
6. Van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M. An introduction to phycology. Cambridge: University Press, 1995. 623 p.
7. Thompson G.A. Lipids and membrane function in green algae // Biochim. Biophys. Acta. 1996. № 1302. P. 17–45.
8. Guschina I.A., Harwood J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae // Progress in Lipid Research. 2006. No. 45. P. 160–186.

9. *Harwood J.L.* Membrane Lipids in Algae. In: *Siegenthaler P.A., Murata N.* (Eds.), *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1998. P. 53–64.
10. *Dembitsky V.M., Rozentsvet O.A.* DGTS and phospholipid composition of some green marine macrophytes. // *Phytochemistry*. 1989. No. 28. P. 3341–3344.
11. *Azachi M., Sadka A., Fisher M. et al.* Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina* // *Plant Physiol*. 2002. V. 129. P. 1320–1329.
12. *Elenkov I., Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S.* Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora Vagabunda* // *Phytochemistry*. 1996. V. 42. No. 1. P. 39–44.
13. *Floreto E.A.T., Hirata H., Yamasaki S., Castro S.C.* Effect of salinity on the growth and fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta) // *Botanica Marina*. 1994. V. 37. No. 2. P. 151–155.
14. *Шитиков В.К., Зинченко Т.Д.* Анализ пространственно-временной изменчивости водных экосистем при статистической обработке данных мониторинга // *Проблемы экологического эксперимента (Планирование и анализ наблюдений)*. Тольятти: «Кассандра», 2008. С. 129–150.
15. *Алекин О.А., Семенов А.Д., Скопинцев Б.А.* Руководство по химическому анализу вод суши. Л.: Гидрометеиздат, 1973. 269 с.
16. *Кейтс М.* Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 323 с.
17. *Розенцвет О.А., Зинченко Т.Д., Выхристюк Л.А., Костина Н.В.* Изменение состава липидов *Enteromorpha intestinalis* в условиях речных вод аридной зоны Прикаспийской низменности // *Изв. Сам. НЦ*. 2008. Т. 10. № 5/1. С. 253–59.
18. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
19. *Жизнь растений*. Т. 3. / под ред. *А.А. Федорова*. М.: Просвещение, 1977. 487 с.
20. *Романенко В.Д.* Основы гидроэкологии. Киев: Генеза, 2004. 664 с.
21. *Liu Z., Yan H., Wang K. et al.* Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution // *Nature*. 2004. V. 428. P. 287–92.
22. *Jones A.L., Harwood J.L.* Lipids and lipid metabolism in the marine alga *Enteromorpha intestinalis* // *Phytochemistry*. 1993. V. 34. P. 969–972.
23. *Siegenthaler P.A., Murata N.* *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1998. P. 1–20.
24. *Loll B., Kern J., Sienger W. et al.* Lipids in Photosystem II: Interactions with Protein and Cofactors // *Biochim. Biophysic. Acta*. 2007. V. 1767. P. 509–519.

25. *Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Онищенко Ф.А.* Проблемы нормы в токсикологии. М.: Медицина, 1991. 208 с.

Сведения об авторах:

Розенцвет Ольга Анатольевна, д. б. н., главный научный сотрудник, лаборатория экологической биохимии, Институт экологии Волжского бассейна РАН, 445003, г. Тольятти, ул. Комзина, 10; e-mail: olgarozen@pochta.ru

Нестеров Виктор Николаевич, к. б. н., младший научный сотрудник, лаборатория экологической биохимии, Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти, e-mail: nesvik1@mail.ru

Богданова Елена Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории экологической биохимии, Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти, e-mail: cornales@mail.ru