

**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***

В двух красноярских водоемах, в одном из которых доминировал прокариотический фитопланктон (т.е. наблюдалось «цветение» воды в результате массового развития сине-зеленых водорослей), а в другом – эукариотические микроводоросли, в течение вегетационного периода исследовали динамику биомассы фитопланктона и аминокислотного состава сухого вещества воды. Выявлено, что единственным фактором, достоверно меняющим процентный состав аминокислот сухого остатка воды, было развитие сине-зеленых водорослей в «цветущем» водоеме. Во время доминирования сине-зеленых водорослей возросло абсолютное и относительное содержание лейцина и глутамина, а содержание остальных кислот в основном падало. Для «не цветущего» водоема не было выявлено каких-либо значимых изменений в составе аминокислот в течение сезона.

Введение

В последние десятилетия изучение органического вещества в водных экосистемах направлено не только на определение количества энергии и общего углерода, но и на качество самого вещества, т.е. его биохимический и элементный состав. Особый интерес представляет определение качества органического вещества для понимания взаимодействия двух базовых трофических звеньев: первичных продуцентов (фитопланктона) и первичных консументов (зоопланктона). Однако в настоящее время биохимическое качество пищи зоопланктона определяется лишь по стехиометрическому соотношению С:Р и содержанию незаменимых жирных кислот семейств $\omega 3$ и $\omega 6$ [напр., 30]. Между тем, вероятно наличие и других факторов, существенно влияющих на питательную ценность [4].

Как известно, один из важных компонентов пищи животных – аминокислоты. Основными продуцентами аминокислот в водных экосистемах являются микроводоросли [5, 7, 8, 12, 13, 26]. С одной стороны, было показано, что аминокислотный состав организмов, обитающих в морских экосистемах, достаточно однообразен [19] и аминокислоты служат плохими биомаркерами [9]. Аминокислотный состав пресноводных водорослей также однообразен и при исследованиях качества питания зоопланктона ему уделяется несопоставимо меньшее внимание, чем составу жирных кислот, резко различающемуся у разных групп организмов [3]. Однако, с другой стороны, установлено, что состав аминокислот в морских экосистемах может подвергаться сезонным изменениям [9] и достаточно тесно связан со структурой фитопланктона и временем отбора проб [24], а также с первичной продукцией [13, 14]. Данные о составе аминокислот природного фитопланктона пресноводных водоемов в доступной литературе нами не обнаружены, хотя известно, что состав растворенных в пресных водах аминокислот существенно зависит от типа водных объектов [22], от времени и места отбора проб [32]. По аналогии с морскими экосистемами можно ожидать изменения в аминокислотном составе пресноводного сестона в зависимости от видового состава фитопланктона. Не исключено также, что именно эти предполагаемые вариации аминокислотного состава в пресноводных экосистемах могут быть тем самым неизвестным пока дополнительным фактором, влияющим на качество питания зоопланктона, на наличие которого указывают некоторые исследователи [4].

Целью нашей работы было определение сезонной динамики состава аминокислот в пресноводных экосистемах. Поскольку имеются данные о том, что состав аминокислот прокариотических (бактерии, сине-зеленые) и эукариотических (зеленые водоросли) организмов может существенно различаться [28, 29], мы решили сравнить сезонную динамику аминокислотного состава двух водоемов. В одном из водоемов доминировал прокариотический фитопланктон (т.е. наблюдалось «цветение» сине-зеленых), а в другом – эукариотические микроводоросли.

На первом этапе работы мы решили не разделять аминокислоты на растворенные и взвешенные, а исследовать весь пул аминокислот, содержащихся в сухом остатке воды. Мы руководствовались следующими соображениями. Пул аминокислот в водоеме составляют свободные [10, 18] и связанные в пептидах, белках и гуминовых веществах кислоты [20], а также кислоты живых организмов [22, 24, 27]. Первые две группы кислот обычно относят к растворенным. Состав растворенных аминокислот также формируется главным образом за счет выделений организмов фитопланктона, которые в зависимости от трофического статуса экосистем и физиологической стадии могут выбрасывать в окружающую среду от 10 до 70% первичной продукции [22]. Растворенные аминокислоты интенсивно усваиваются гетеротрофными бактериями [26], кото-

* © А.А. Колмакова, Г.С. Калачева, Е.С. Кравчук, Институт биофизики СО РАН, 2004; М.И. Гладышев, Красноярский государственный университет, 2004; Е.А. Иванова, Красноярский государственный аграрный университет, 2004.

рые в свою очередь потребляются простейшими [23], мезо- и макрозоопланктоном [25]. Итак, не исключено, что качество пищи консументов, определяемое по аминокислотам, может зависеть от состава всего пула, а не только от состава сестона.

Методика

Исследования были проведены на малых рекреационных водоемах – прудах Бугач и Лесной, расположенных в окрестностях города Красноярска. Пруд Бугач – водоем равнинного типа в степной местности (площадь – 21 га, глубина до 8 м, рН – 8,2-9,2). Пруд Лесной - водоем «каньонного» типа, стратифицированный, без выраженной литоральной зоны. Площадь водоема составляет около 0,3 га, глубина – до 8 м, в летний период рН изменяется в пределах 7,8-9,4. Пруд Лесной окружен лесным горным массивом, на одной из сторон которого расположен дачный поселок.

Отбор проб воды осуществлялся еженедельно в центре водоемов из глубины 1-3 м с мая по сентябрь 2000 г. Для отбора проб использовали стандартный батометр (объем 8 л). Для определения пула аминокислот 1 литр пробы воды фильтровали через планктонную сеть с размером ячеек 0,08 мм и концентрировали методом выпаривания на водяной бане досуха. Сухой остаток переносили в ампулу из толстого стекла 12x120 мм и добавляли 20 мл 6N HCl. Ампулу запаивали, гидролиз сухого остатка проводили в термостате при 110°C в течение 22 часов. После гидролиза содержимое ампулы охлаждали, фильтровали и переносили в выпарительную чашку. Выпаривание производили на кипящей водяной бане. Сухой осадок, содержащий большое количество солей, обессоливали. Для этого осадок перерастворяли в 50 мл дистиллированной воды и пропускали через колонку 20x200 мм, заполненную смолой DOWEX –50 в H⁺ форме, со скоростью 1 мл в минуту. Раствор аминокислот после колонки выпаривали на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяли в цитратном буфере рН 2,2. Анализ проводили на аминокислотном анализаторе KLA-3B (Hitachi, Japan). Чувствительность прибора –0,1 мкмоль. Расчет производили путем сравнения площадей пиков исследуемых образцов с площадями пиков стандартной смеси аминокислот (Sigma, USA). Содержание каждой аминокислоты (*A*, мг/л) вычисляли по формуле

$$A = S/C \cdot 0,5d \cdot M_b / 1000 \cdot a/b,$$

где *S* – площадь пика аминокислоты в исследуемой пробе, *C* – площадь пика соответствующей кислоты в стандартной смеси, *M_b* – молекулярная масса аминокислоты г/моль, 1000 – коэффициент перевода микромоля в миллимоль, *a* – объем буфера, взятого для разведения пробы (мл), *b* – объем испытуемого образца, наносимого на колонку (мл), 0,5 – содержание аминокислоты в стандартной смеси в мкмоль/мл, *d* – объем стандартного образца, наносимого на колонку (мл).

Для определения видового состава и биомассы фитопланктона методом микроскопирования пробу воды фильтровали через фильтр «Владипор» (размер пор 0,75-0,85 мкм). Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли методом перманганатного окисления. Температуру и рН измеряли с помощью полевого рН-метра MP 120 (Mettler Toledo, Switzerland). Данные по хлорофиллу были получены с помощью флуоресцентного анализа на флуориметре «Фл-303».

Стандартная ошибка и критерий Стьюдента рассчитывались согласно работе [6], одномерный кластерный анализ – [17]. Расчет корреляционных коэффициентов для корреляционных графов детально описан в работе [11].

Результаты

Пруд Бугач. Весной, с 17 по 30 мая, при относительно низкой температуре воды доминировали диатомовые водоросли рода *Stephanodiscus* (рис. 1). При повышении температуры происходила смена видового состава фитопланктона, и к 20 июня в фитопланктоне доминировали сине-зеленые водоросли *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. и *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs.. С 20 июня по 11 июля наблюдалось интенсивное "цветение" воды вследствие развития *Aph. flos-aquae*, доля которого увеличивалась до 95%, а биомасса фитопланктона возрастала до 144 мг/л. В дальнейшем биомасса фитопланктона существенно снизилась и оставалась приблизительно на одном уровне до конца периода наблюдений. Доминировать продолжал вид *Aph. flos-aquae*, но уже с 18 июля в составе фитопланктона увеличилась биомасса диатомовых, зеленых и динофитовых водорослей, среди которых преобладали виды рода *Stephanodiscus*, *Chlamydomonas sp.*, *Peridinium sp.* соответственно, и также возросла биомасса эвгленовых *Euglena proxima* Dang. и *Trachellomonas volvocina* Ehr. (рис. 1). В начале августа появился *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. et Kom, ставший к середине августа доминирующим видом. Из *Chrysophyta* в июле и 1 августа обнаружен *Mallomonas tonsurata* Teil., затем *Chromulina sp.*

Величина рН в течение сезона варьировала незначительно, от 8,4 до 9,4 и в среднем составила 8,8. Сезонная динамика ХПК в основном отражала динамику концентрации хлорофилла, являющуюся косвенным показателем фотосинтетической активности, а не динамику общей биомассы фитопланктона (рис. 1).

В течение сезона в составе сухого остатка воды обнаружено 16 протеиногенных аминокислот (табл. 1). Суммарная концентрация аминокислот немного снижалась в начале лета, но с 20 июня стала возрастать (рис. 1). Начало увеличения суммарной концентрации аминокислот совпало с началом цветения, а 25 июля

наблюдалось максимальное значение концентрации аминокислот, совпавшее с сезонным максимумом концентрации хлорофилла (рис. 1). Выявлена сильная и статистически достоверная корреляция суммарной концентрации аминокислот с ХПК, концентрацией хлорофилла, биомассой эвгленовых и динофитовых водорослей (табл. 2). Корреляция с общей биомассой фитопланктона оказалась слабой.

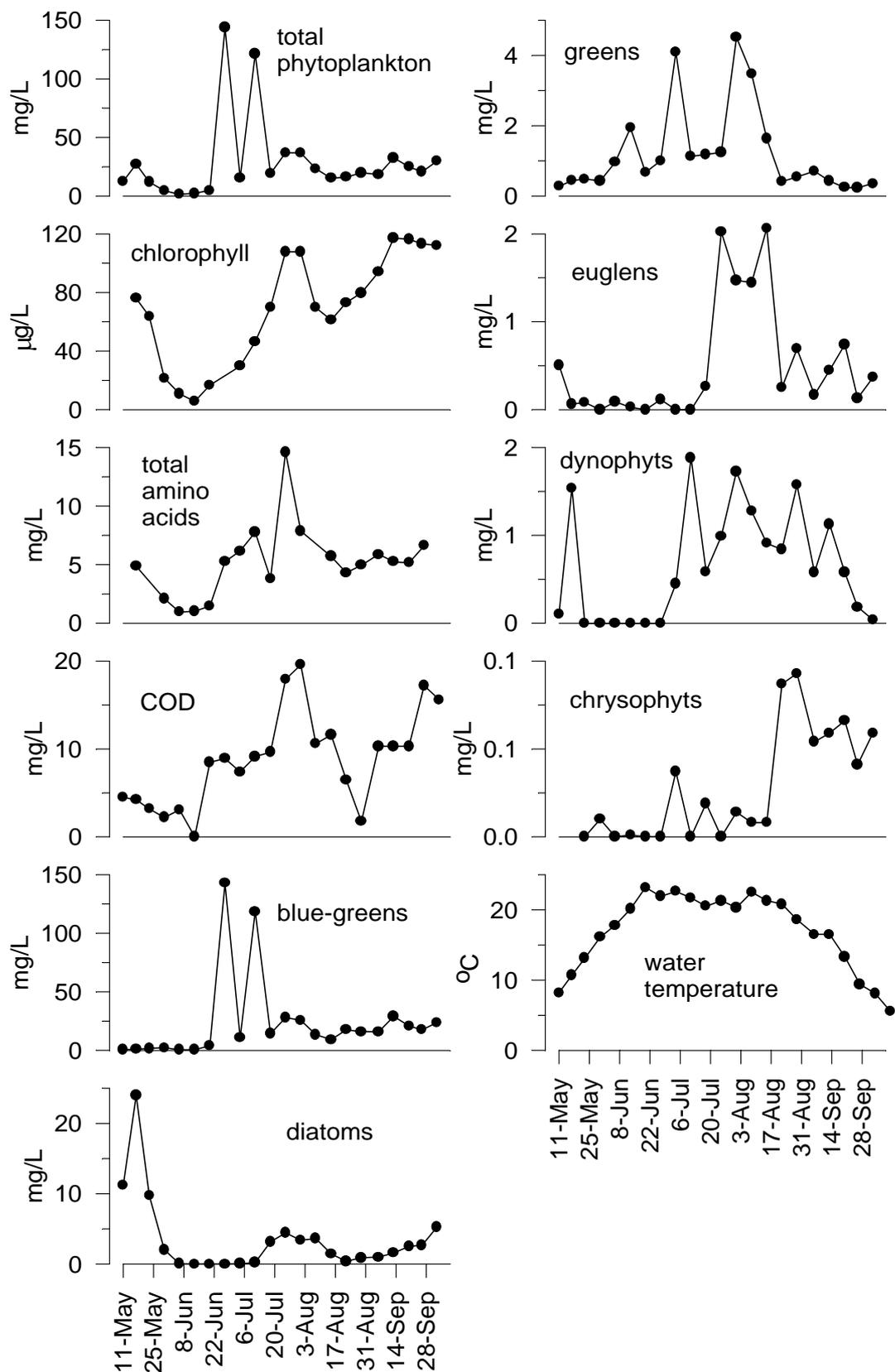


Рис. 1. Сезонная динамика компонентов экосистемы слоя воды (1-3 м) пруда Бугач в 2000 г.

Таблица 1

Концентрация аминокислот (мг/л) в воде пруда Бугач в 2000 г.

Date	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

Коэффициенты корреляции общей концентрации и относительного содержания (% от общего содержания) основных групп аминокислот с биомассой фитопланктона, концентрацией хлорофилла и ХПК в воде водохранилища Бугач, май - октябрь 2000 г. (n=18 пар)

Аминокислоты	Общее содержание фитопланктона	Концентрация хлорофилла	ХПК	Cyano-phyta	Bacil-lario-phyta	Chloro-phyta	Eugle-nophyta	Dino-phyta	Chryso-phyta
Общее содержание аминокислот, мг/л	0.35	0.60	0.74	0.30	0.12	0.18	0.53	0.52	0.05
Группа из 7 аминокислот*, %	-0.43	0.66	0.23	-0.48	0.40	-0.29	0.50	0.15	0.18
Группа <i>Gly</i> *, %	-0.32	-0.60	-0.27	-0.27	-0.23	0.10	-0.37	-0.58	-0.40
<i>Leu</i> + <i>Glu</i> , %	0.79	0.08	0.24	0.78	-0.09	0.21	-0.04	0.40	0.05
<i>Asp</i> , %	0.09	0.04	-0.21	0.12	-0.25	0.06	-0.25	0.30	0.59
<i>Arg</i> , %	-0.29	-0.04	-0.10	-0.35	0.44	-0.19	0.23	-0.10	-0.19
<i>Ala</i> , %	0.21	-0.28	0.05	0.23	-0.22	0.40	-0.30	-0.27	-0.11

* См. текст и рис.2.

Сезонная динамика концентраций большинства отдельных аминокислот была весьма сходной: коэффициенты корреляции варьировали от 0,65 до 0,98 (табл. 3). Исключением был только аргинин, концентрация которого не коррелировала ни с одной аминокислотой. Его содержание колебалось в течение сезона от 0,016 до 0,696 мг/л и было максимально 17 мая и 15 августа.

Известно, что качественный состав белков определяется относительным содержанием отдельных аминокислот. Наиболее высокое процентное содержание в сухом остатке воды пруда Бугач было характерно для глутамата, аспарагиновой кислоты, лейцина, аланина и глицина (табл. 4). Низкое содержание было у гистидина и метионина. Содержание аргинина было тоже незначительным за исключением двух дат – 17 мая и 15 августа (табл. 4).

Корреляционный анализ процентного содержания аминокислот, представленный в виде корреляционного графа, выявил три группы кислот со сходной сезонной динамикой (рис.2): основная группа из семи кислот, группа глицина из четырех кислот и пара «лейцин-глутамат» (рис.3). Три кислоты -аспарагин, аланин и аргинин (рис. 2) - имели свою специфическую сезонную динамику каждая (рис. 3).

Таким образом, в течение вегетационного периода наблюдались существенные вариации в составе аминокислот сухого остатка воды пруда Бугач. Для выявления возможной связи между составом аминокислот и составом фитопланктона был проведен корреляционный анализ, в котором использовались суммарное процентное содержание кислот трех групп и три отдельных кислоты, выделенные методом корреляционных графов (рис. 2). Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 2. Суммарное процентное содержание кислоты «группы семи» коррелировало с концентрацией хлорофилла и биомассой эвгленовых водорослей. Содержание кислот группы глицина имело достоверную отрицательную корреляционную связь с концентрацией хлорофилла и с биомассой динофитовых. Динамика пары «лейцин-глутамат» сильно коррелировала с общей биомассой фитопланктона и с биомассой сине-зеленых. Аспаргин коррелировал с биомассой хризифитов, тогда как для аргинина и аланина не было отмечено значимых корреляций ни с одной из групп фитопланктона.

Пруд Лесной. В мае в пруду доминировали диатомовые водоросли *Asterionella formosa* Nass. и виды рода *Stephanodiscus* (рис. 4). В июне *A. formosa* стала полностью доминирующим видом, составляя 80-90%. В середине лета фитопланктон состоял в основном из мелкоклеточной сине-зеленой водоросли *Synechocystis salina* Wisl. (70-80%), только 25 июля единично встречались *An. flos-aquae* и *Aph. flos-aquae*, биомасса которых была весьма низкой (рис. 4). К середине августа биомасса фитопланктона увеличивалась за счет диатомовых рода *Stephanodiscus* и зеленой водоросли *Chlamidomonas sp.* (рис. 4). В начале сентября наблюдался небольшой пик *Euglena sp.* В этом месяце биомасса фитопланктона увеличивалась в основном за счет диатомовой водоросли *A. formosa*. Из отдела *Dinophyta* в водохранилище встречаются только виды рода *Peridinium*, давшие небольшой пик в начале сезона. В отделе *Chrysophyta* происходила постоянная смена видов при низкой биомассе, небольшой пик 13 сентября был обусловлен *Dinobryon divergens* Imh.

Величины pH были близки к таковым в пруду Бугач: они варьировали от 7,9 до 9,6 и средняя за сезон величина составила 8,6. Величины ХПК были существенно ниже, чем в пруду Бугач и слабо связаны с динамикой хлорофилла и фитопланктона (рис. 4).

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между концентрацией (мг/л) аминокислот сухого остатка воды в пруду Бугач, май - октябрь 2000 г. (18 пар)

АМИНО-кислоты	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr
His	0.95														
Arg	0.30	0.31													
Asp	0.77	0.71	0.10												
Thr	0.94	0.91	0.18	0.88											
Ser	0.74	0.68	0.08	0.96	0.88										
Glu	0.83	0.74	0.09	0.96	0.92	0.95									
Pro	0.91	0.87	0.06	0.85	0.94	0.79	0.88								
Gly	0.80	0.72	0.09	0.97	0.91	0.97	0.97	0.86							
Ala	0.84	0.75	0.05	0.95	0.92	0.94	0.98	0.89	0.99						
Val	0.73	0.63	-0.01	0.93	0.86	0.94	0.96	0.84	0.96	0.95					
Met	0.96	0.94	0.32	0.75	0.94	0.73	0.82	0.87	0.79	0.82	0.71				
Ile	0.95	0.91	0.18	0.87	0.98	0.85	0.92	0.94	0.90	0.92	0.86	0.96			
Leu	0.75	0.64	0.02	0.93	0.87	0.95	0.98	0.81	0.97	0.97	0.98	0.75	0.87		
Tyr	0.98	0.96	0.26	0.73	0.93	0.68	0.78	0.91	0.76	0.80	0.66	0.97	0.94	0.68	
Phe	0.98	0.92	0.22	0.73	0.93	0.70	0.81	0.89	0.77	0.82	0.69	0.97	0.94	0.73	0.98

Таблица 4

Сезонная динамика аминокислотного состава (% от общей суммы) сухого остатка воды пруда Бугач, 2000 г.

Date	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe
17.05	5.1	1.2	8.4	11.1	5.3	6.8	17.7	1.2	6.8	8.6	3.9	1.4	5.1	8.8	3.3	5.1
30.05	4.9	1.3	4.7	11.5	6.0	5.9	16.2	5.1	8.3	9.0	6.5	0.7	4.0	8.7	2.2	4.4
06.06	5.1	1.0	4.4	12.0	6.2	6.7	13.8	5.9	10.3	7.1	9.2	1.1	3.5	7.8	1.9	4.0
13.06	5.8	1.1	1.6	10.5	5.0	6.8	14.9	6.6	13.3	10.6	10.7	0.9	2.9	6.0	1.4	2.1
20.06	4.2	1.0	1.4	12.2	4.3	6.7	15.8	6.1	12.2	11.4	8.8	0.7	2.9	9.1	1.3	2.1
27.06	2.4	0.6	0.6	11.5	3.9	6.1	20.7	3.3	7.3	11.1	9.2	0.8	5.3	14.7	1.0	1.7
04.07	2.4	0.4	0.7	14.3	3.1	6.9	21.7	3.5	8.2	12.5	7.3	0.3	2.4	11.6	1.1	1.5
11.07	1.9	0.4	1.1	13.8	4.6	8.0	22.8	2.8	7.1	9.4	9.3	0.4	3.4	13.8	0.5	0.9
18.07	4.8	1.2	1.7	10.4	6.6	6.3	18.5	4.4	7.8	10.0	6.2	1.3	5.1	8.7	3.2	3.9
25.07	5.5	0.9	0.8	9.8	5.6	4.9	20.1	4.3	5.5	9.6	6.3	1.1	5.4	10.6	3.7	5.8
01.08	5.4	1.3	1.3	12.0	5.8	6.7	18.7	4.4	6.1	9.5	6.1	1.0	5.1	9.1	3.3	4.5
15.08	5.8	1.1	12.2	10.5	5.0	4.5	17.3	4.2	5.7	7.7	5.4	1.2	4.5	7.8	3.2	4.0
22.08	4.6	1.4	2.2	12.6	6.8	5.8	16.0	5.8	6.8	9.1	6.5	1.0	5.4	9.2	3.2	3.5
29.08	3.8	0.9	1.5	16.1	5.2	5.9	20.3	4.8	6.5	8.6	5.5	0.9	4.8	8.4	3.3	3.7
06.09	5.4	1.2	2.7	12.8	5.5	5.2	17.9	4.7	6.7	8.6	6.7	1.0	5.3	8.6	3.3	4.4
13.09	4.0	1.1	1.5	12.3	5.8	5.7	19.1	5.2	6.4	9.3	6.8	1.3	5.5	9.2	3.1	3.8
20.09	5.4	1.5	2.6	11.6	5.5	5.5	18.2	4.6	6.5	8.9	6.8	1.1	5.3	9.0	3.6	4.0
27.09	4.7	1.0	3.5	12.7	6.3	6.3	15.3	4.5	7.2	9.3	6.6	1.0	5.2	8.4	3.6	4.2

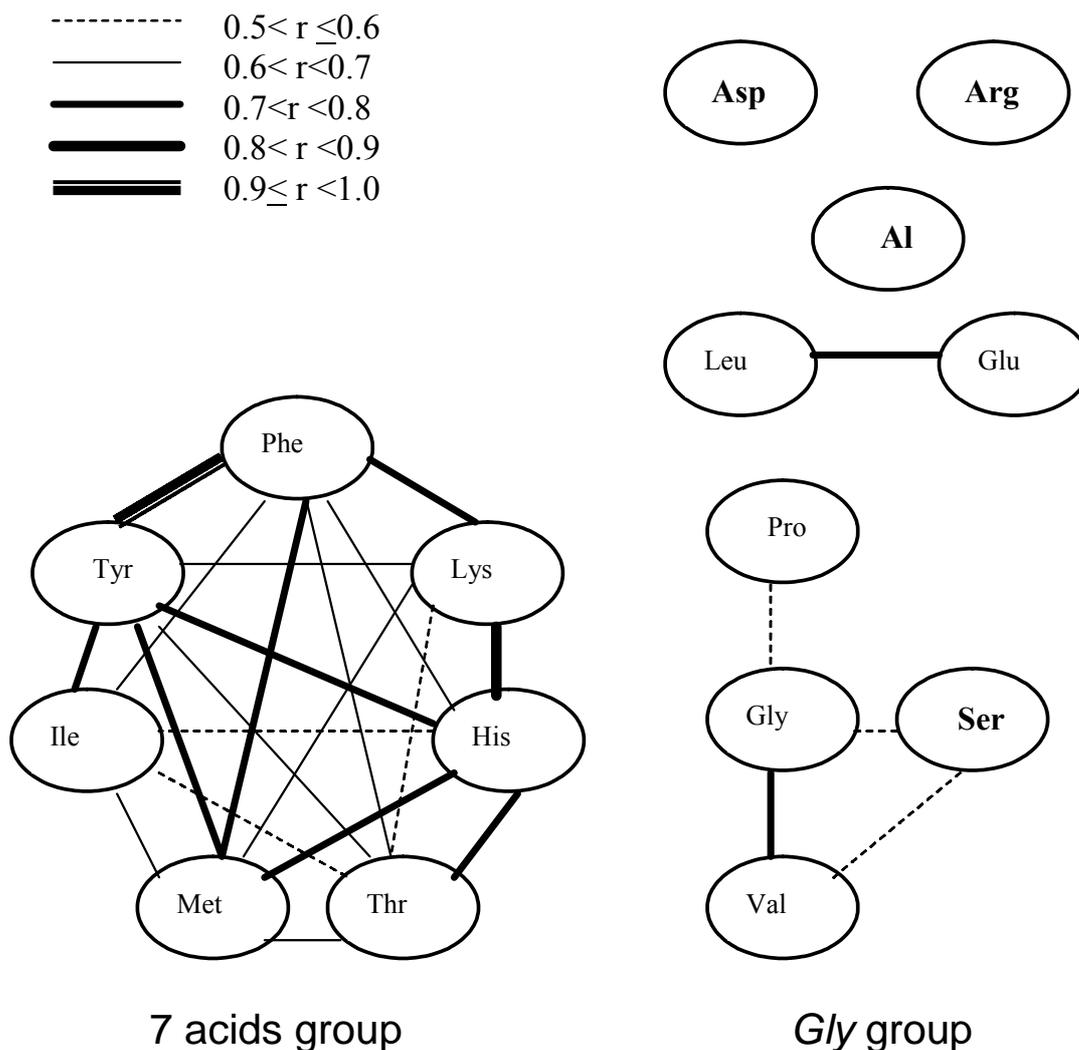


Рис.2. Корреляционные графы содержания (% от общего содержания) аминокислот в воде пруда Бугач (май-сентябрь 2000 г.), r – коэффициент корреляции ($p < 0.05$)

Концентрация аминокислот в воде пруда Лесной была существенно ниже, чем в Бугаче (табл. 5). Концентрация метионина после 8 августа была ниже предела чувствительности метода. Корреляционный анализ выявил наличие сильных достоверных статистических связей между концентрациями большинства аминокислот в пруду Лесном, за исключением аргинина (табл. 6). Таким образом, результаты корреляционного анализа полностью совпали с таковыми по Бугачу (табл. 3), за исключением немногих кислот, концентрации которых в Лесном в некоторые периоды были близки к нулю. Между тем, общая концентрация аминокислот в Лесном, в отличие от Бугача, не коррелировала ни с общей биомассой фитопланктона, ни с биомассой отдельных групп водорослей, ни с концентрацией хлорофилла и ХПК.

Состав, т.е. процентное содержание отдельных аминокислот 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. 5).

Среднее за сезон процентное содержание аминокислот в воде «нецветущего» пруда Лесной существенно отличалось от такового в «цветущем» пруду Бугач (табл. 7). Для аминокислотного состава проб воды Лесного характерно достоверно более высокое содержание лизина, аргинина, треонина и серина и более низкое - глутамата, валина, метионина, изолейцина и лейцина по сравнению с пробами воды Бугача. Процентное содержание остальных кислот в двух водоемах достоверно не отличалось.

Для выявления различий в составе аминокислот в обоих водохранилищах в течение сезона был выполнен кластерный анализ относительного содержания аминокислот (рис. 6). Все пробы, за исключением пробы 13 июня из Лесного, характеризовавшейся необычайно высоким содержанием аргинина, разделились на два кластера. Первый, малый, состоял из трех проб 27 июня – 11 июля из Бугача, взятых в период интенсивного «цветения» сине-зеленых. Второй, большой, объединил пробы как из Бугача, так и из Лесного, взятых в периоды доминирования эукариотического фитопланктона. В большом кластере можно выделить несколько

подкластеров. Первый подкластер состоит из двух проб из Бугача 13-20 июня, соответствовавших периоду перед началом «цветения». Следующий подкластер из проб Лесного 27 июня -11 июля и 25 июля -1 августа соответствовал периоду низкой биомассы фитопланктона. Другой подкластер включал сентябрьские пробы из Бугача и две августовские. Также можно выделить подкластер, состоящий из майской, августовской и сентябрьских проб из Лесного, охватывающих периоды сильного доминирования диатомовых. Однако состав аминокислот всех проб из большого кластера был относительно сходным и резко отличался от состава проб, взятых в период интенсивного «цветения».

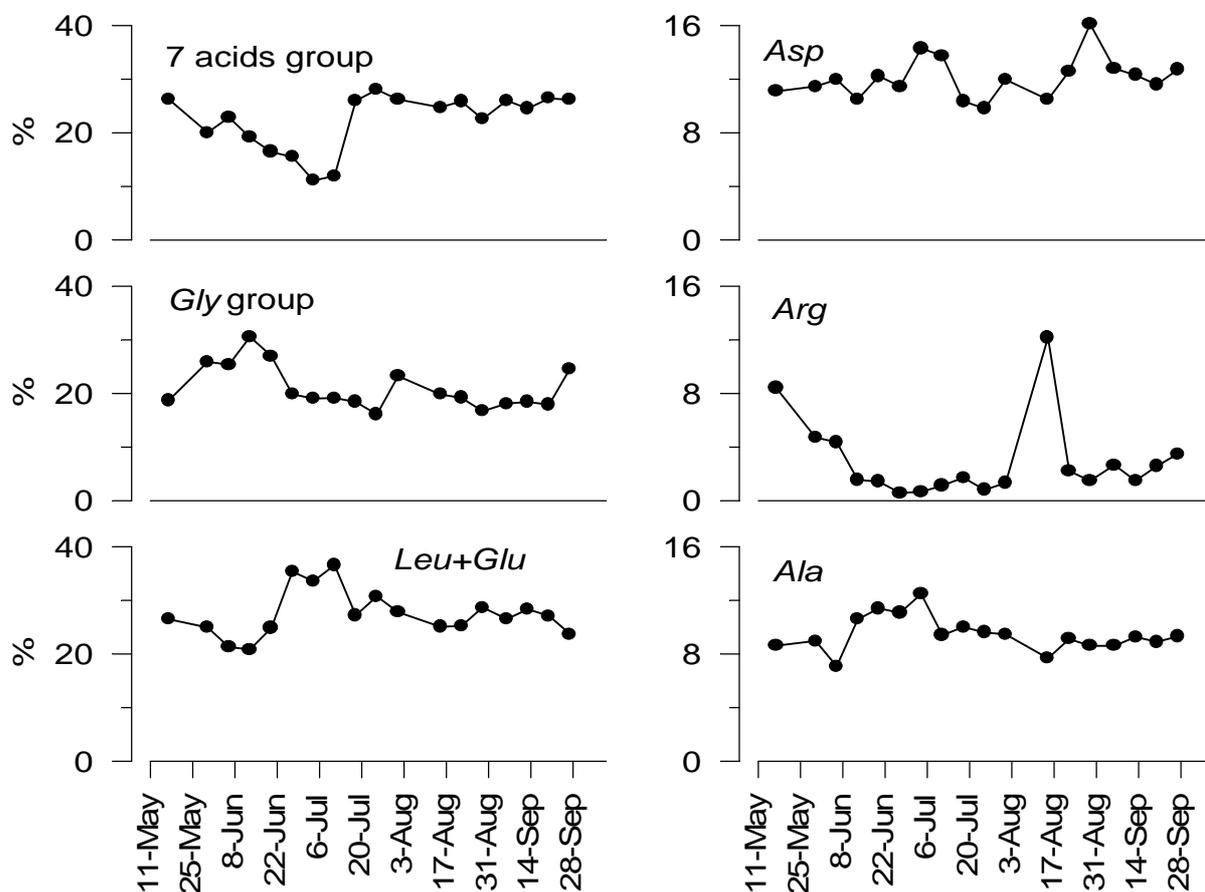


Рис. 3. Сезонная динамика процентного содержания групп аминокислот, объединенных в корреляционном графе (см. текст и рис.2.), и отдельных кислот в воде пруда Бугач в 2000 г.

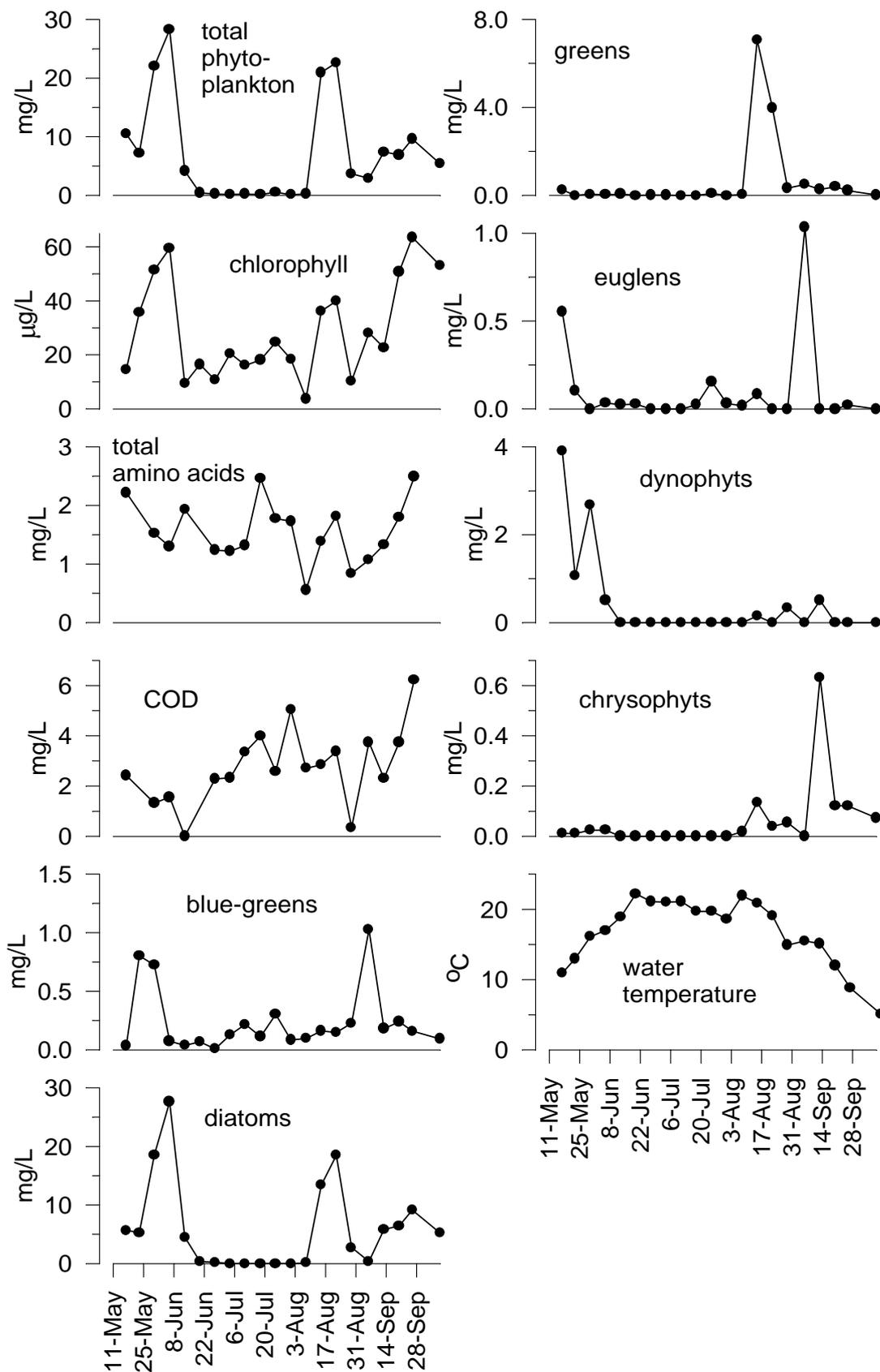


Рис. 4. Сезонная динамика компонентов экосистемы слоя воды (1-3 м) пруда Лесной в 2000 г.

Таблица 5

Концентрация аминокислот (мг/л) в воде пруда Лесной 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	0.17	0.21	0.14	0.14	0.32	0.12	0.16	0.15	0.10	0.03	0.08	0.14	0.06	0.09
30.05	0.08	0.02	0.17	0.16	0.11	0.11	0.26	0.07	0.11	0.12	0.08	0.00	0.05	0.10	0.03	0.05
06.06	0.15	0.01	0.03	0.15	0.10	0.09	0.22	0.05	0.09	0.11	0.09	0.01	0.05	0.09	0.03	0.04
13.06	0.10	0.01	0.83	0.14	0.09	0.10	0.18	0.05	0.08	0.09	0.07	0.01	0.04	0.08	0.03	0.03
27.06	0.07	0.02	0.06	0.16	0.09	0.08	0.18	0.07	0.09	0.14	0.08	0.01	0.05	0.07	0.04	0.05
04.07	0.06	0.02	0.05	0.16	0.09	0.08	0.18	0.06	0.09	0.13	0.08	0.00	0.04	0.07	0.05	0.05
11.07	0.09	0.02	0.07	0.16	0.10	0.08	0.20	0.07	0.10	0.13	0.07	0.01	0.05	0.08	0.04	0.05
18.07	0.13	0.03	0.04	0.31	0.16	0.14	0.38	0.13	0.17	0.27	0.13	0.02	0.10	0.23	0.12	0.10
25.07	0.07	0.02	0.15	0.22	0.13	0.12	0.27	0.08	0.12	0.18	0.09	0.01	0.06	0.12	0.08	0.07
01.08	0.10	0.03	0.10	0.21	0.12	0.11	0.25	0.10	0.12	0.17	0.08	0.01	0.05	0.12	0.08	0.07
08.08	0.03	0.01	0.04	0.07	0.04	0.04	0.07	0.03	0.05	0.05	0.03	0.00	0.02	0.03	0.05	0.02
15.08	0.13	0.02	0.18	0.14	0.07	0.09	0.23	0.07	0.09	0.12	0.07	0.00	0.05	0.09	0.01	0.05
22.08	0.07	0.02	0.34	0.19	0.10	0.13	0.28	0.07	0.12	0.14	0.09	0.00	0.06	0.11	0.04	0.06
29.08	0.04	0.01	0.01	0.10	0.06	0.06	0.17	0.05	0.07	0.08	0.05	0.00	0.03	0.06	0.03	0.04
06.09	0.05	0.01	0.05	0.12	0.07	0.07	0.21	0.05	0.08	0.10	0.07	0.00	0.03	0.07	0.03	0.04
13.09	0.08	0.02	0.25	0.12	0.08	0.09	0.20	0.07	0.08	0.10	0.06	0.00	0.05	0.07	0.04	0.04
20.09	0.09	0.02	0.15	0.20	0.13	0.13	0.33	0.09	0.12	0.15	0.11	0.00	0.07	0.11	0.05	0.06
27.09	0.15	0.03	0.07	0.31	0.16	0.22	0.38	0.13	0.19	0.22	0.15	0.00	0.12	0.21	0.07	0.10

Таблица 6

Коэффициенты корреляции между концентрацией (мг/л) аминокислот сухого остатка воды в пруду Лесной, май - октябрь 2000 г. (18 пар)

Аминокис- лоты	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr
His	0.83														
Arg	0.08	-0.11													
Asp	0.54	0.58	-0.09												
Thr	0.64	0.65	-0.06	0.96											
Ser	0.57	0.60	0.06	0.90	0.88										
Glu	0.61	0.61	-0.05	0.91	0.91	0.90									
Pro	0.67	0.79	-0.14	0.92	0.92	0.87	0.91								
Gly	0.70	0.74	-0.08	0.95	0.95	0.94	0.94	0.95							
Ala	0.45	0.53	-0.19	0.97	0.92	0.79	0.86	0.90	0.89						
Val	0.60	0.55	-0.05	0.96	0.94	0.93	0.95	0.88	0.94	0.90					
Met	0.75	0.73	-0.04	0.44	0.56	0.26	0.38	0.55	0.51	0.45	0.37				
Ile	0.65	0.65	-0.07	0.94	0.92	0.94	0.93	0.93	0.97	0.88	0.96	0.41			
Leu	0.69	0.62	-0.09	0.96	0.92	0.89	0.92	0.92	0.96	0.94	0.94	0.46	0.96		
Tyr	0.23	0.48	-0.27	0.76	0.73	0.52	0.56	0.71	0.66	0.81	0.59	0.51	0.64	0.73	
Phe	0.64	0.79	-0.19	0.94	0.92	0.90	0.92	0.97	0.97	0.91	0.92	0.51	0.94	0.94	0.70

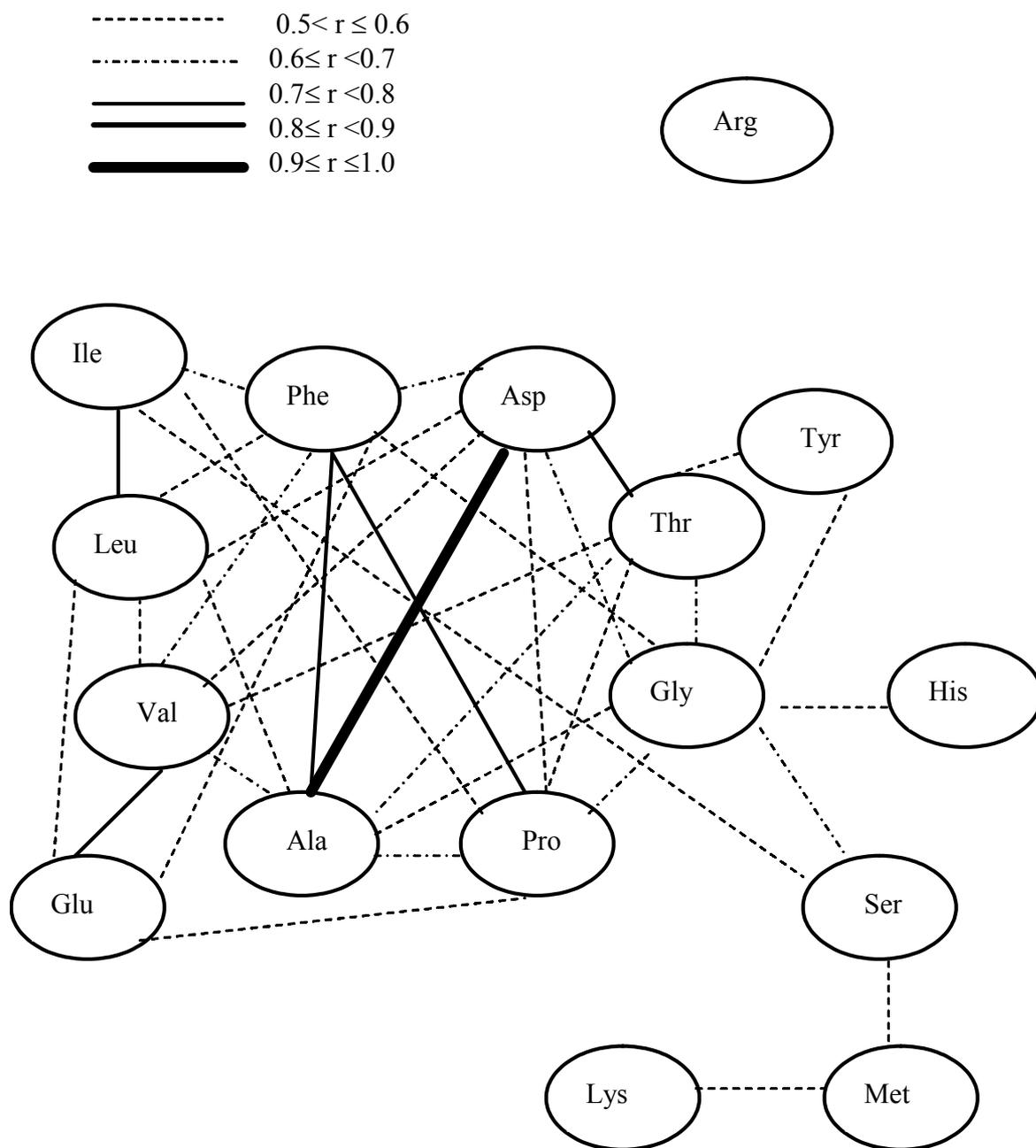


Рис.5. Корреляционные графы содержания (% от общего содержания) аминокислот в воде пруда Лесной (май-сентябрь 2000 г.), r – коэффициент корреляции ($p < 0.05$)

Среднее за сезон содержание (% от общего содержания) аминокислот в воде прудов Бугач и Лесной, их стандартная ошибка (\pm SE) и критерий Стьюдента (t), май - октябрь 2000 г.

Название аминокислоты	Пруд Лесной	Пруд Бугач	t
<i>Lys</i>	5.89 \pm 0.44	4.46 \pm 0.30	2.68*
<i>His</i>	1.25 \pm 0.09	1.02 \pm 0.08	1.91
<i>Arg</i>	9.56 \pm 2.45	2.61 \pm 0.67	2.73*
<i>Asp</i>	11.33 \pm 0.36	12.14 \pm 0.38	1.54
<i>Thr</i>	6.55 \pm 0.22	5.35 \pm 0.24	3.68*
<i>Ser</i>	6.74 \pm 0.20	6.07 \pm 0.20	2.36*
<i>Glu</i>	15.63 \pm 0.61	17.96 \pm 0.58	2.76*
<i>Pro</i>	4.83 \pm 0.19	4.70 \pm 0.25	0.41
<i>Gly</i>	7.02 \pm 0.23	7.72 \pm 0.53	1.21
<i>Ala</i>	8.88 \pm 0.38	9.44 \pm 0.29	1.17
<i>Val</i>	5.40 \pm 0.19	7.25 \pm 0.37	4.44*
<i>Met</i>	0.28 \pm 0.07	0.93 \pm 0.07	6.57*
<i>Ile</i>	3.44 \pm 0.14	4.46 \pm 0.26	3.45*
<i>Leu</i>	6.35 \pm 0.29	9.39 \pm 0.51	5.18*
<i>Tyr</i>	3.30 \pm 0.46	3.08 \pm 0.50	0.32
<i>Phe</i>	3.54 \pm 0.16	3.42 \pm 0.32	0.33

* $p < 0.05$

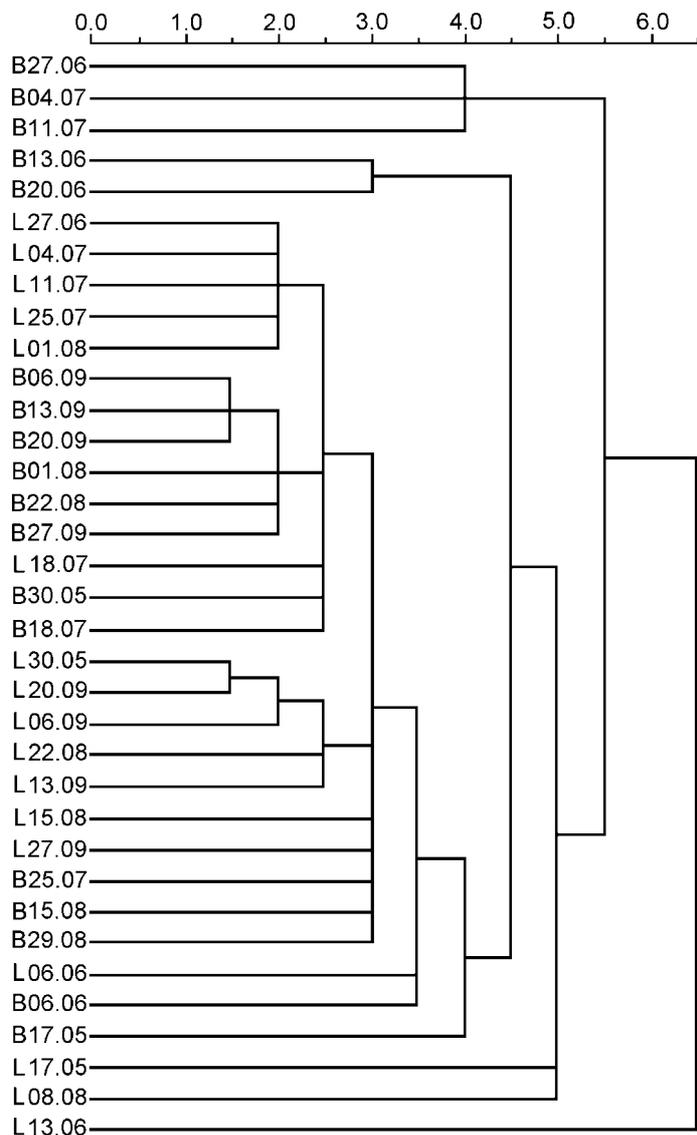


Рис. 6. Дендрограммы кластерного анализа содержания (% от общего содержания) аминокислот в воде прудов Бугач и Лесной (май-сентябрь 2000 г.), горизонтальные оси – евклидовы расстояния (отн. ед.)

Обсуждение результатов

В сухом остатке проб, отобранных на Бугаче и Лесном, используемым в работе методом обнаружено 16 базовых аминокислот. Известно, что при гидролизе белков соляной кислотой разрушаются серосодержащие аминокислоты и триптофан. Глутамин и аспарагин определяются в виде глутаминовой и аспарагиновой кислот. Поэтому не удивительно, что нами были определены только 16, а не все 20 аминокислот, необходимых для синтеза белков. Аминокислоты, являющиеся промежуточными метаболитами в клетке (орнитин, таурин, γ -аминомасляная кислота и др.) и часто определяемые в составе растворенного органического вещества [1, 32], в исследованных нами водоемах обнаружены не были. Концентрации аминокислот, зарегистрированные нами, укладываются в диапазон значений, приводимых другими авторами [1, 21, 22, 26, 32].

Известно, что первичный продуцент аминокислот в водных экосистемах - фотосинтезирующие организмы, в первую очередь фитопланктон [5, 12-14, 19, 24, 26]. Данное положение было косвенно подтверждено и в наших исследованиях: концентрации всех кислот, за исключением аргинина, достоверно коррелировали друг с другом, что свидетельствует об их происхождении из одного источника. Однако корреляция суммарной концентрации аминокислот с общей биомассой фитопланктона и в Бугаче, и в Лесном оказалась слабой и статистически недостоверной. Между тем в Бугаче обнаружена сильная достоверная корреляция концентрации аминокислот с концентрацией хлорофилла, являющейся косвенным показателем потенциальной фотосинтетической активности. Этот результат согласуется с данными многих авторов, отмечавших связь между первичной продукцией и концентрацией аминокислот [7, 16, 18, 20, 21, 26, 32]. Отсутствие корреляции между концентрацией хлорофилла и концентрацией аминокислот в Лесном может объясняться тем, что в этом водоеме концентрация хлорофилла в среднем была ниже и слабее отражала реальный процесс первичного продуцирования, чем таковая в Бугаче.

Выявлена сильная и статистически достоверная корреляция суммарной концентрации аминокислот с ХПК в Бугаче. Не исключено, что именно аминокислоты составляли основу органического вещества, окисляемого при определении ХПК. Корреляция концентрации аминокислот с биомассой эвгленовых и динофитовых водорослей могла быть следствием миксотрофного питания этих двух групп. Отсутствие вышеперечисленных корреляций в Лесном может объясняться относительно низким уровнем ХПК и биомассы фитопланктона и (или) наличием в нем иных, чем в Бугаче, видов водорослей.

Зарегистрированная нами в обоих водоемах сильная достоверная взаимная корреляция концентраций всех аминокислот, за исключением аргинина, подтверждает данные некоторых авторов о слабой изменчивости базового набора аминокислот в водных экосистемах [3, 9, 19]. В Лесном, где доминировали эукариотические микроводоросли, в течение сезона оставался практически постоянным и процентный состав аминокислот. Однако в Бугаче, в отличие от Лесного, состав аминокислот варьировал: корреляционный граф процентного содержания распался на три группы и три отдельных кислоты, каждая из которых имела свою особую сезонную динамику.

Суммарное процентное содержание группы из семи аминокислот (*Tyr, Phe, Lys, His, Thr, Met, Ile*) коррелировало с биомассой эвгленовых водорослей, динамика пары лейцин-глутамат сильно коррелировала с биомассой сине-зеленых, аспарагин коррелировал с биомассой хризофитов. Можно ли считать перечисленные аминокислоты маркерами соответствующих групп водорослей? Подобное заключение представляется нам преждевременным. Хотя известно, что определенные виды морских диатомовых водорослей накапливают глицин и серин в клеточной стенке [15] и некоторые авторы считают, что увеличение глицина в частицах, обнаруженных в седиментационных ловушках можно судить о происхождении этих частиц и о процессах деструкции органического вещества [24], материалы наших исследований в целом поддерживают мнение об относительно низкой информативности аминокислот как биомаркеров [9], по сравнению, например, с жирными кислотами [3, 31]. Тем не менее, отрицательная корреляция группы *Gly-Val-Ser-Pro* с концентрацией хлорофилла и с биомассой динофитов, а также отсутствие корреляций аргинина и аланина с общей биомассой фитопланктона, хлорофиллом и группами водорослей позволяет предположить, что в динамике этих кислот могут вносить вклад и гетеротрофные организмы.

Аргинин, как и все обнаруженные нами аминокислоты, является протеиногенной аминокислотой. Однако в некоторые даты его концентрация в обоих прудах, резко поднималась до очень больших значений, и это увеличение не было связано с развитием каких-либо видов фитопланктона. Не исключено, что аргинин происходил из аллохтонных источников и попадал в водоемы, например, с пылью растений при ее массовом переносе.

Среднее за сезон процентное содержание девяти кислот в воде Бугача и Лесного достоверно различалось (табл. 7), однако в целом, за исключением периода «цветения», состав всех аминокислот в воде прудов был сходным, согласно данным кластерного анализа.

Таким образом, единственным фактором, достоверно меняющим процентный состав аминокислот сухого остатка воды, было «цветение» воды в Бугаче. Во время развития сине-зеленых водорослей возрастало абсолютное и относительное содержание группы *Leu-Glu*, а содержание остальных кислот в основном падало. До «цветения» и после него существенных изменений в аминокислотном составе не наблюдалось. Для «нецветущего» водоема не было выявлено каких-либо значимых изменений в составе аминокислот в течение

сезона. Наши данные согласуются с данными других авторов, полученными на лабораторных культурах, согласно которым имеются различия в составе аминокислот прокариотных и эукариотных фотосинтезирующих организмов, хотя базовый состав был одним и тем же [29].

В целом аминокислотный состав сухого остатка воды исследованных нами водоемов достаточно близок к биомассам чистых культур водорослей, исследованных ранее нами [2] и другими авторами [3]. Исключения составляли лишь те даты, когда увеличивался уровень аргинина, а также период «цветения» сине-зеленых в Бугаче. Состав аминокислот сухого остатка в период цветения существенно отличается от состава аминокислот водорослевых культур по ряду параметров: увеличена в 2 раза доля кислот группы глутамат-лейцин и, соответственно, снижено содержание кислот группы лизина, относительное содержание аргинина не превышает 0,7-1,3 %.

Таким образом, в водоемах, в которых доминируют эукариотические микроводоросли, состав аминокислот остается относительно постоянным в течение сезона и вряд ли может являться фактором, лимитирующим развитие следующего звена трофической цепи - зоопланктона. В водоемах, подверженных «цветению» сине-зеленых, состав аминокислот может изменяться, но вклад этого изменения в качество группы зоопланктона на фоне иных факторов, определяющих питательную ценность сине-зеленых, пока не ясен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сакевич А.И. Свободные аминокислоты в экологическом метаболизме водорослей / А.И. Сакевич, П.Д. Ключенко // Гидробиол. журн.- 1996.- Т. 32.- № 5.- С.33-41.
2. Трубачев И.Н. Биохимический состав некоторых сине-зеленых водорослей и хлореллы / И.Н. Трубачев, И.И. Гительзон, Г.С. Калачева, В.А. Барашков, и др. // Прикладная биохимия и микробиология.- 1976.- Т. 12.- № 2.- С.196-201.
3. Ahlgren G. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae / G. Ahlgren, I.-B. Gustafsson, M. Boberg // J. Phycol. - 1992. - V.28. - P.37-50.
4. Boersma M. The nutritional quality of P-limited algae for Daphnia / M. Boersma // Limnol., Oceanogr. - 2000. - V.45.- №5.- P.1157-1161.
5. Bronk D.A. ¹⁵N tracer method for the measurement of dissolved organic nitrogen release by phytoplankton / D.A. Bronk, P.M. Glibert.// Mar. Ecol. Prog. Ser.- 1991.- V. 11.- P.171-182.
6. Campbell R.C. Statistics for biologists / R.C. Campbell.- Cambridge University Press, 1967.- 242 pp.
7. Carlucci A.F. Diel production and microheterotrophic utilization of dissolved free amino acids in waters off Southern California / A.F. Carlucci, D.B. Craven, S.M. Henrichs // Appl. Environ. Microbiol.- 1984.- V.48.- P.165-170.
8. Clayton J.R. Evaluation of methods for the separation and analysis of proteins and free amino acids in phytoplankton / J.R. Clayton, Q. Dortch, S.S. Thoresen, S.I. Ahmed // J. Plankt. Res.- 1988.- V.10.- P.341-358.
9. Cowie G.L. Sources and reactivities of amino acids in a coastal marine environment / G.L. Cowie, J.I. Hedges // Limnol. Oceanogr.- 1992.- V.37.- P.703-724.
10. Fuhrman J.A. Nanomolar concentrations and rapid turnover of dissolved free amino acids in seawater: Agreement between chemical and microbiological measurements / J.A. Fuhrman, R.L. Ferguson // Mar. Ecol. Prog. Ser.- 1986.- V.33.- P.237-242.
11. Gladyshev M.I. Content of metals in compartments of ecosystem of a Siberian pond / M.I. Gladyshev, I.V. Gribovskaya, A.V. Moskvicheva, E.Y. Muchkina et al. // Arch. Environ. Contam. Toxicol.- 2001.- V.41.- P.157-162.
12. Hama T. Determination of amino acid production rate of marine phytoplankton with ¹³C and gas chromatography-mass spectrometry / T. Hama, N. Handa, J. Hama // Limnol. Oceanogr.- 1987.- V.32.- P.1144-1153.
13. Hama T. Production and export of particulate fatty acids, carbohydrates and combined amino acids in the euphotic zone / J. Hama, E. Tanoue, T. Hama, N. Handa // Marine Chemistry.- 2002.- V.77.- P.55-69.
14. Hashimoto S. Annual and seasonal variations of amino acid and hexosamine fluxes in deep Bering Sea and deep central Subarctic Pacific/ S. Hashimoto, Y. Maita, M. Yanada, K. Takahashi // Deep-Sea Research I.- 1998.- V.45.- P.1029-1051.
15. Hecky R.E. The amino acid and sugar composition of diatom cell walls / R.E. Hecky, K. Mopper, P. Kilham, E.T. Degens // Mar. Biol.- 1973.- V.19.- P.323-331.
16. Ittekkot V. Variation of dissolved organic matter during a plankton bloom: qualitative aspects, based on sugar and amino acid analyses / V. Ittekkot // Mar. Chem.- 1982.- V.11.- P.143-158.
17. Jefers J. An introduction to system analysis: with ecological application / J. Jefers.- Moscow: "Mir", 1981.- 252 p. (translated from English)
18. Jørgensen N.O. Free amino acids in lakes: Concentrations and assimilation rates in relation to phytoplankton and bacterial production / N.O. Jørgensen // Limnol. Oceanogr.- 1987.- V.32.- P.97-111.
19. Lee C. Particulate amino acids in the sea: Effect of primary productivity and biological decomposition / C. Lee, C. Cronin // J. Mar. Res.-1984.- V.42.- P.1075-1097.

20. Midelbor M. Bacterial utilization of dissolved free amino acids, dissolved combined amino acids and ammonium in the Dekaware Bay estuary: Effects of carbon and nitrogen limitation / M. Midelbor, N.H. Borch, D.L. Kirchman // *Mar. Ecol. Prog. Ser.*- 1995.- V.128.- P.109-120.
21. Meon B. Dynamics and molecular composition of dissolved organic material during experimental phytoplankton blooms / B. Meon, D.L. Kirchman // *Mar. Chem.*- 2001.- V.75.- P.185-199.
22. Münster U. Amino acid profiling in natural organic matter isolated by reverse osmosis from eight different boreal freshwaters / U. Münster // *Environment International*.- 1999.- V.25.- №2/3.- P.209-224.
23. Nagata T. Release of dissolved free and combined amino acids by bacterivorous marine flagellates / T. Nagata, D.L. Kirchman // *Limnol. Oceanogr.*- 1991.- V.36.- P.433-443.
24. Petersson M. Use amino acid composition to investigate settling and resuspension of a spring bloom in the southern Skagerrak / M. Petersson, S. Floderus // *Limnol. Oceanogr.*- 2001.- V. 46.- №5.- P.1111-1120.
25. Riemann B. Zooplankton induced changes in dissolved free amino acids and in production rates of freshwater bacteria / B. Riemann, N.O. Jorgensen, W. Lampert, J.A. Fuhrman // *Microb. Ecol.*- 1986.- V.12.- P.247-258.
26. Rosenstock B. Sources and sinks of dissolved free amino acids and protein in a large and deep mesotrophic lake / B. Rosenstock, M. Simon // *Limnol. Oceanogr.*- 2001.- V.46.- №3.- P.644-654.
27. Servais P. Measurement of the incorporation rates of four amino acids into proteins for estimating bacterial production / P. Servais // *Microb. Ecol.*- 1995.- V.29.- P.115-128.
28. Sorimachi K. Evolutionary changes reflected by the cellular amino acid composition / Sorimachi K. // *Amino Acids*.- 1999.- V.17.- P.207-226.
29. Sorimachi K., Okayasu T., Akimoto K., Niwa A. Conservation of the basic pattern of cellular amino acid composition during evolution in plants / K. Sorimachi, T. Okayasu, K. Akimoto, A. Niwa // *Amino Acids*.- 2000.- V.18.- P.193-197.
30. Sterner R.W. Zooplankton nutrition: recent progress and a reality check / R.W. Sterner, K.L. Schulz // *Aquatic Ecol.* - 1998.- 32.- P.261-279.
31. Sushchic N.N. Particulate fatty acids in two small Siberian reservoir dominated by different groups of phytoplankton / N.N. Sushchic, M.I. Gladyshev, G.S. Kalachova, E.S. Kravchuk et al. // *Freshwater Biol.*- 2003.- V.48. P.394-403.
32. Thomas J.D. The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems / J.D. Thomas // *Freshwater Biology*.- 1997.- V.38.- P.1-36.

**SEASONAL DYNAMICS OF AMINO ACIDS IN TWO SMALL SIBERIAN RESERVOIRS
DOMINATED BY PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC PHYTOPLANKTON**

**A.A. Kolmakova, G.S. Kalachova, M. I.Gladyshev,
E.S. Kravchuk, E. A. Ivanova**

The comparison of the dynamics of phytoplankton biomass and total amino acid composition was made for two water bodies: in one the phytoplankton were dominated by prokaryotes (i.e., there was a bloom of cyanobacteria) and by eukaryotic microalgae in the other. The dynamics of phytoplankton biomass and of total amino acid composition of water were investigated during the vegetation season. It was found that the only factor that significantly changed the percentages of amino acids in water was the bloom of cyanobacteria in the "blooming" water body. During the bloom of cyanobacteria, the absolute and relative content of the Leu-Glu group increased, while the contents of other acids generally dropped. Before and after the bloom, no significant variations in the total amino acid composition were recorded. In the reservoir where eukaryotic microalgae dominated, no significant variations in amino acid composition were recorded during the season.