

О ГЕНТОКСИЧНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

© 2000 Е.С. Селезнева¹, З.П. Белоусова¹, Т.В. Макарова²

¹ Самарский государственный университет

² Самарский муниципальный университет Наяновой

Анализировали генотоксичность синтезированных модифицированных аналогов нуклеозидов: 1- β -D-рибофуранозилбензотриазол(I), 1- β -D-рибофуранозилбензоимидазол(II), 1- β -D-эритрофуранозилбензоимидазол (III). Обнаружили, что все синтезированные соединения индуцируют рецессивные и доминантные летальные мутации у *Drosophila melanogaster*, ингибируют бласттрансформацию ядер лимфоцитов периферической крови человека и понижают фертильность самок и самцов *Drosophila melanogaster*. Обсуждается возможность влияния синтезированных соединений на клеточное деление.

В медицине широко используются модифицированные нуклеозиды как антибактериальные и антивирусные препараты [3,8]. Между тем давно известно, что многие из них проявляют генотоксичность так как представляют собой модифицированные предшественники ДНК. Так 4,6-аминоурацил индуцирует хромосомные aberrации у *Vicia faba*; 8-азагуанин и 8-азатимин являются сильными метастатиками для животных клеток; 5-бромурацил - специфический мутаген для прокариот [9]. Аналоги пурина - кофеин, ксантин, ксантозин индуцируют гетероплоидию [7].

Высокая потребность в новых фармакологических препаратах побуждает синтезировать новые модифицированные нуклеозиды, которые необходимо подвергнуть генетическому мониторингу.

Были синтезированы аналоги нуклеозидов: 1- β -D-рибофуранозилбензотриазол (I), 1- β -D-рибофуранозилбензоимидазол

(II), 1- β -D-эритрофуранозилбензоимидазол (III), структурные формулы которых приведены на рисунке 1.

Мы предположили, что структурное сходство синтезированных соединений (I, II, III) с природными пуринами послужит причиной появления у них генотоксичных свойств.

Мутагенную активность определяли по способности веществ индуцировать рецессивные и доминантные летальные мутации у дрозофилы [2, 4], а также индуцировать хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови человека [5]. Токсичность веществ определяли по ингибированию бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, стимулированные к клеточному делению ФГА, а также по способности веществ снижать фертильность *Drosophila melanogaster*.

При анализе мутагенной активности I - III использовали в дозе LD50, которая была

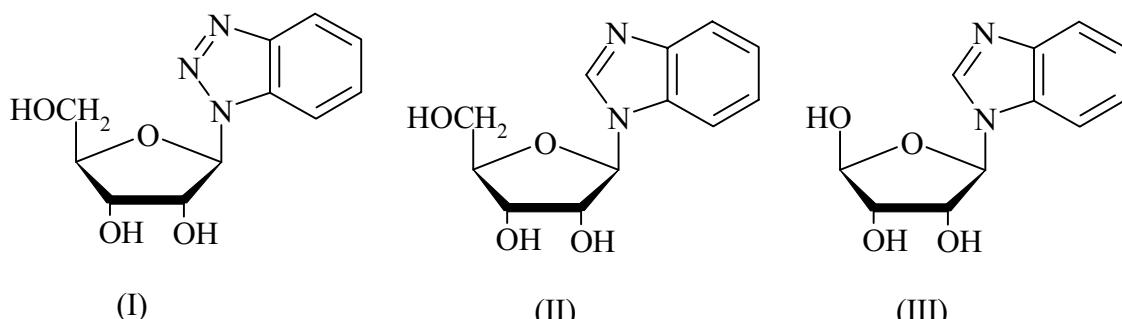


Рис.1. Структурные формулы синтезированных веществ

Таблица 1. Способность веществ индуцировать доминантные летали у имаго *Drosophila melanogaster*

Вещество	Процент доминантных леталей у самок	Процент доминантных леталей у самцов
I	11,04 ± 1,03	9,59 ± 1,02
II	9,20 ± 1,83	8,80 ± 1,08
III	8,94 ± 0,46	9,41 ± 0,46
контроль	3,12 ± 0,67	3,04 ± 0,46

предварительно определена и для имаго *Drosophila melanogaster* составила для I и II - 1/4 от насыщенного водного раствора, для III - 1/2 от насыщенного водного раствора. Время воздействия мутагенами - 30 часов.

Для анализа способности I - III индуцировать доминантные летали растворами синтезированных соединений воздействовали либо на самок (900 штук), либо на самцов (900 штук), которых затем скрещивали с интактными особями противоположного пола. Число доминантных летальных мутаций (ДЛМ) оценивали по количеству яиц из которых не вылуплялись личинки. Кладки яиц собирались в течение суток каждые 5 часов.

Результаты эксперимента суммированы в таблице 1.

Статистический анализ с использованием критериев Стьюдента и Фишера показал, что все синтезированные соединения достоверно (для $P>99\%$) индуцируют доминантные летали в опыте по сравнению с контролем. Мы не обнаружили достоверных отличий в действии веществ на самок и самцов, кроме того все вещества индуцировали приблизительно одинаковое количество доминантных летальных мутаций.

Способность I - III вызывать рецессивные летальные мутации в X-хромосомах самцов *Drosophila melanogaster* определяли стан-

дартными методом "Меллер-5". Результатом исследования представлены в таблице 2.

Проведенный статистический анализ не выявил отличий между действием веществ, но показал что все вещества достоверно индуцируют рецессивные летальные мутации у самцов *Drosophila melanogaster* для $P>99\%$.

Анализ способности веществ индуцировать хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови человека, показал что в концентрации, не вызывающей гемолиз эритроцитов - 0,001%, соединения не проявляют мутагенный эффект. Было проанализировано 200 препаратов. Ни в одной из проанализированных нами метафазных пластинок мы не обнаружили хромосомных перестроек.

Отсутствие мутагенного ответа на уровне клеточной культуры не говорит о специфичности действия данных веществ, так как на уровне целого организма многие вещества, не проявившие мутагенную активность, проходят дополнительную активацию и становятся мутагенами. Ферментативные системы *Drosophila melanogaster* обладают такими свойствами, и поэтому рекомендованы для генетического мониторинга. Кроме того, они обладают ферментативной активностью, сходной с таковой у микросомальной фракции ферментов печени млекопитающих, где и про-

Таблица 2. Способность аналогов нуклеозидов индуцировать рецессивные летали в X-хромосомах самцов *Drosophila melanogaster*

Вещества	Число проанализированных хромосом	Процент рецессивных леталей
I	1200	3,06 ± 0,99
II	1009	2,85 ± 0,39
III	1100	2,87 ± 0,36
контроль	1150	0,16 ± 0,28

Таблица 3. Способность модифицированных нуклеозидов подавлять бласттрансформацию ядер лимфоцитов периферической крови человека

Вещества	Число бласттрансформированных ядер лимфоцитов (в %)		
	в культурах, обработанных соединениями в концентрациях	0%	0,001%
	0,0001%		
I	94,80 ± 1,90	83,00 ± 1,10	87,40 ± 1,22
II	95,11 ± 1,89	73,80 ± 1,50	81,80 ± 1,50
III	94,78 ± 1,90	80,91 ± 1,34	85,20 ± 1,41

исходит метаболическая активация веществ, и, следовательно, синтезированные нами соединения могут проявить мутагенную активность и в тестах на млекопитающих.

При анализе числа бласттрансформированных ядер мы обнаружили цитостатический эффект действия исследуемых аналогов нуклеозидов (табл.3). Результаты анализа цитотоксичности представлены в таблице 3.

Все вещества ингибируют бласттрансформацию ядер (различия между опытом и контролем достоверны для $P>99\%$). Разведение в 10 раз не снижает цитотоксического эффекта, кроме того соединения проявляют равное ингибирующее действие.

Так как полученные нами результаты говорят о наличии у I - III генотоксических свойств, то мы предположили, что могут ингибировать и фертильность у тест-объекта. Для этого 1600 самок и самцов, подвергнутых воздействию токсикантов, скрещивали с интактными особями противоположно-

го пола. Каждые 5 часов подсчитывали число отложенных яиц. Мы обнаружили, что у самок и самцов *Drosophila melanogaster* снижается количество отложенных яиц (рис.1).

Статистический анализ показал, что вещества достоверно снижают фертильность *Drosophila melanogaster*, причем если I равнотоксичен как для самок, так и для самцов, у которых в равной степени падала фертильность, то II сильнее подавлял фертильность у самцов, а III - у самок ($P>95\%$). Снижение фертильности по нашему мнению является косвенным показателем эмбриотоксичности исследуемых веществ.

Проведенное исследование показало, что все изученные аналоги нуклеозидов обнаружили генотоксичность и это позволяет предположить, что причиной генотоксичности служит нарушение процессов клеточного деления. В пользу этого предположения говорят данные полученные другими авторами [1, 6], показавшими, что аналоги предшественников ДНК нарушают нормальную репликацию и таким образом подавляют или изменяют отдельные стадии клеточного деления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978.
2. Белоконь Е.М. Методические указания к определению мутагенной активности химических препаратов с помощью тестов на дрозофиле. Львов: ЛГУ, 1984.
3. Ильинских Н.Н., Медведев М.А., Бессуднова С.С., Ильинских И.Н. Мутагенез при различных функциональных состояниях организма. Томск: Томский университет, 1990.

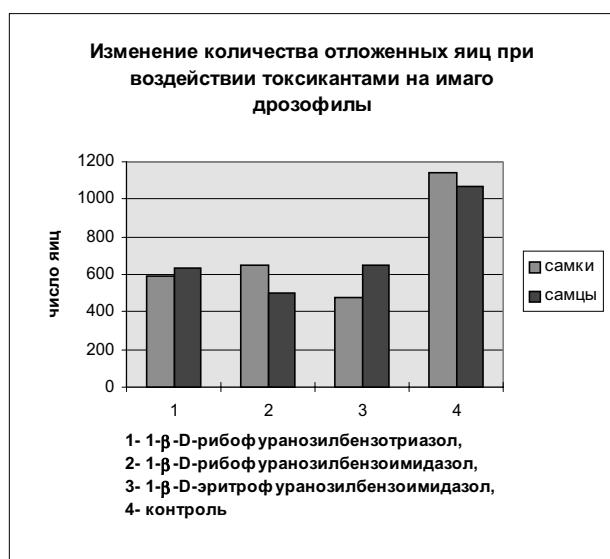


Рис.1. Результаты анализа влияния веществ на фертильность дрозофилы

4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных свойств химических веществ. Женева: ВОЗ, 1989.
5. Хрущев Г.К., Andres A.G., Ильина-Какуева В.И. Культура лейкоцитов крови как метод изучения кариотипа человека // Журн.эксп.биол. 1931. Т.7. №4.
6. Hung Peng, Siciliano Michael J, Plancet William. Gene deletion, a mechanism of induced mutation by arabinosyl nucleosides. // Mutat.Res. 1989. №2.
7. Mehra P.N., Dhiman N. Induced meiotic reductions in roottips. I. Effect of purine derivatives // Cytologia, 1986. V.51. №3.
8. Smith r., Kirkpatrick N. Ribavirin a broad spectrum antiviral agent, N-Y: Academic. Press. 1980.
9. Stoian V., Raicu P. Chromatid aberrations induced by some purine and pyrimidine derivatives in Vicia faba // Rev. roum. biol. Ser. bot. 1973. V.18.

ABOUT GENOTOXICITY OF MODIFIED NUCLOSIDES

© 2000 E.S. Selesneva¹, Z.P. Belousova¹, T.W. Makarova²

¹Samara State University

²Najanova's University, Samara

It was analysed the genotoxicity of synthetic modified analogs of the nucleosides: 1- β -D-ribofuranozilbenzotriazol (I), 1- β -D-ribofuranozilbenzoimidazol (II), 1- β -D-eritrofuranozilbenzoimidazol (III). It was founded that all synthetic compounds induce the recessive and dominant lethal mutations of *Drosophila melanogaster*, inhibit the blasttransfomation of lymphocyte nucleoses in the periferic human blood, decrease the fertility of females and males of *Drosophila melanogaster*. The possibility of the influencing of synthetic compounds on the cell division is discussed.

ИНДУЦИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА ИЗБЫТКОМ ХЛОРИСТОГО АММОНИЯ

© 2000 С.В. Мурзаева

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

Исследовали действие хлористого аммония (10^{-6} - 10^{-2} М) на горох при добавлении в среду выращивания. Увеличение концентрации этой соли приводило к замедлению роста растений, уменьшению содержания белка и хлорофилла в листьях и снижению скорости синтеза АТФ в изолированных хлоропластах. При избытке аммония ($2,5 \times 10^{-2}$ М) и длительном действии меньших концентраций (10^{-6} - 10^{-4} М) увеличивалась активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в листьях и корнях. Сравнение растворимых (цитозольных) и труднорастворимых (мембранных) белковых фракций, а также субклеточных структур, выделенных из проростков, показало активирование ферментов хлористым аммонием преимущественно в мембранных структурах - ядрах, субчастицах, митохондриях и хлоропластах.

Обсуждается активирование антиоксидантных ферментов в растениях гороха в связи с мембранотропным действием хлористого аммония. Сделан вывод об усилении окислительной активности пероксидазы при токсичном избытке соли.

Загрязнение окружающей среды делает необходимым изучение трансформации вредных соединений (ксенобиотиков) в растениях, выявление первичных мишенией воздействия, метаболических и детоксикационных путей их в живой клетке. К настоящему времени накоплен достаточно обширный материал, показывающий неспецифическое действие любых ксенобиотиков на клетку, проявляющуюся в активировании перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах, образовании активных форм кислорода (АФК), индуцирующих свободно-радикальные механизмы и провоцирующих окислительные стрессы [1-2].

К АФК относят: очень токсичные - гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), гидроксид ион радикал (OH^-) и супероксидрадикал (O_2^{\cdot}) и менее токсичные - гидроксид ион кислорода (HO_2^-) и перекись водорода (H_2O_2) [3]. В живых клетках, в том числе и растительных, существуют механизмы противостоящие окислительному стрессу, так называемые антиоксидантные системы, включающие ферменты и низкомолекулярные соединения. Ключевыми ферментами можно рассматривать супероксиддисмутазу, каталазу и пероксидазу, связанных последовательно механизмом катализического действия. Супероксиддисмутаза (СОД), КФ 1.15.11, осуществляет дисмутацию

супероксидного радикала до перекиси водорода и кислорода, каталаза (КАТ), КФ 1.11.1.6, разрушает перекись водорода на воду и кислород [4], а пероксидаза (ПО), КФ 1.11.1.7, окисляет широкий спектр восстановителей с участием H_2O_2 [5]. Совместное действие этих ферментов с низкомолекулярными антиоксидантами, такими как α - токоферол (витамин Е), восстановленный глутатион, аскорбат и др., обеспечивает защиту от АФК в живых организмах [6,7].

В литературе сообщается об активации ферментов - СОД и КАТ [8] или ПО [9-11] при увеличении адаптационных возможностей растений в различных неблагоприятных условиях, в том числе и при действии ксенобиотиков [12], однако не представлены данные об одновременной активации всех трех ферментов при действии токсичных концентраций загрязнителей. Сопоставление этих активностей в растениях в различных неблагоприятных условиях помогло бы разрешить вопрос об использовании их в биотестировании, который дискутируется в специальной литературе [13]. С другой стороны, активация СОД и ПО может указывать на развитие окислительного процесса, особенно в случае фермента пероксидазы. Катализический механизм действия этого фермента не является однозначно антиоксидативным [10,14]. В

последнее время ПО приписывают не только защитную роль от АФК, но и окислителя при детоксикации чужеродных соединений [15]. Нас этот вопрос заинтересовал в связи с выявлением первичных мишеней воздействия ксенобиотиков на растения и разработкой биохимических тестов на загрязнение окружающей среды.

С этой целью в настоящей работе исследовали активность СОД, КАТ и ПО в горохе при добавлении в среду выращивания хлористого аммония в широком диапазоне концентраций, включая токсические. Предстояло оценить изменения активности каждого фермента в разных частях растения - листьях и корнях, в субклеточных мембранных структурах и фракциях растворимых (цитозольных) и мембранных белков.

Методика

Горох (*Pisum sativum L.*) сорт "Неосыпающийся" выращивали в почвенной или водной культуре на среде Чеснокова-Базыриной, при естественном освещении и температуре 22-27° С. Полив и смену среды гидропоники проводили два раза в неделю. Хлористый аммоний (10^{-6} - 10^{-2} М) добавляли в среду (или в почву при поливе) в течение всей вегетации. Концентрация соли в каждом опыте различалась десятикратно, кроме того испытаны концентрации $2,5 \times 10^{-3}$ и $2,5 \times 10^{-2}$ М. Опыты с каждой концентрацией проводили в 2-х или 4-х кратной повторности. Растворительный материал для выделения белков и субклеточных фракций отбирали через 12, 14, 27, 35 и 70 сут.

Выделение белковых фракций. Навеску растительного материала, 1-5 г, растирали в ступке с кварцевым песком в 50 мл среды, содержащей 0,8 М сахарозу, 0,05 М Трис -HCl буфер, pH 8,2. Гомогенат фильтровали через четыре слоя капрона и центрифугировали 30 мин при 17000 g. В супернатанте, предварительно пропущенном через обеззоленный бумажный фильтр, определяли активность растворимых цитозольных ферментов. Трудно растворимые мембранные белки получали из осадка. Его обрабатывали охлажденным до -18° С абсолютным ацетоном (объемное отношение осадка к ацетону 1: 9), выдержи-

вали в холодильнике 2 ч, затем, после осаждения на центрифуге (режим указан выше), промывали охлажденным 80% ацетоном до полного удаления пигментов. После промывки осадок подсушивали (под феном), и из него экстрагировали мембранные белки 0,05 М Трис - HCl буфером, pH 8,2. Полученные грубые экстракти цитозольных и мембранных белков подвергали частичной очистке. Вначале их высаливали сульфатом аммония до 70 % насыщения, затем обессоливали на колонке с сефадексом g-25, уравновешенной 0,05 М Трис - HCl буфером, pH 8,2. Содержание белка в белковых фракциях определяли по методу Bredford [16].

Выделение субклеточных фракций.

Хлоропласти получали из листьев, по методу West, Wischich [17]. Среда для выделения содержала: 0,4 М сахарозу, 0,01 М MgCl₂, 0,01 М этилендиаминтетрацетат (ЭДТА) и 0,5 % бычий сывороточный альбумин (БСА) в 0,03 М Трис- HCl буфере, pH 7,4. Среда для сuspensionирования хлоропластов: 0,4 М сахароза и 0,5 % БСА, pH 7,4.

Реакции фотофосфорилирования проводили в термостатируемой ячейке при 25° С и освещении белым светом интенсивностью ФАР 50 Вт на м². Количество синтезируемого АТФ определяли биолюминесцентным методом, согласно работе [18]. Реакционная среда для фотофосфорилирования: 4 мМ АДФ, 2 мМ KН₂РО₄, 2 мМ MgCl₂, 0,17 мМ метилвиологен (МВ), 0,03 мМ Феназинмето-сульфат (ФМС), 0,05 мМ диурон (ДХММ), 20 мкг хлорофилла на 1,5 мл реакционной среды в 30 мМ Трис-HCl буфере pH 7,9.

Ядра и пластиды (объединенная фракция), а также митохондрии и микрочастицы выделяли из корней (5 г) измельчали ножницами, а затем - в гомогенизаторе 30 сек при 1500 об/мин в 75 мл среды, содержащей 0,3 М сахарозу, 0,015 М фосфатный и 0,02 М Трис -HCl буфера, pH 7,3. Гомогенат фильтровали через четыре слоя капрона и центрифугировали 30 мин при 15000 g, осаждая общую мембранный фракцию органелл и микрочастиц. Эту фракцию супензировали в указанной выше среде, после чего осаждали дифференциальным центрифугированием ядра + пластиды (10

мин при 1300 g), затем митохондрии (10 мин при 8000 g) [19]. Оставшийся супернатант, содержащий пероксисомы и другие субклеточные структуры использовали как источник субчастиц [20]. Осажденные органеллы (ядра + пластиды, митохондрии) ресуспендировали в среде, содержащей 0,3 М сахарозу и 0,05 М Трис-HCl буфер, pH 8,2. В суспензию выделенных органелл и в супернатант с субчастицами, а также к хлоропластам, добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 0,1%, выдерживали 1 ч при 4°C и определяли активности антиоксидантных ферментов в полученных экстрактах.

Определение активностей ферментов.

Активность СОД определяли спектрофотометрически по ингибированию восстановления нитросинего тетразолия (по увеличению поглощения при 560 нм) в реакционной смеси с ФМС и НАДН [21]. За единицу активности ферmenta принято его количество, ингибирующее восстановление нитросинего тетразолия на 50 %, принятное за 1 относительную единицу в расчете на мг белка в пробе.

Активность КАТ определяли полярографическим методом с помощью электрода Кларка по скорости выделения кислорода при разложении H₂O₂ [18]. Пероксидазную активность измеряли спектрофотометрически по скорости окисленияベンзидина перекисью водорода методом Бояркина [22]. За единицу активности этих ферментов принято их количество, разлагавшее 1 мкмоль H₂O₂ в мин на мг белка в пробе.

В работе использовали реагенты отечественного производства марки Х.Ч. и О.С.Ч., кроме: БСА, НАДН и ЭДТА фирмы "Reanal"

(Венгрия), Тритон X-100 фирмы "Merck" (ФРГ), Сефадекс g-25 средний и ФМС фирмы "Serga" (Швеция).

Результаты

Выращивание гороха в присутствии хлористого аммония в диапазоне испытанных концентраций 10⁻⁶-10⁻² М показывало заметное влияние на рост и развитие растений в течение вегетационного периода. Действие меньших концентраций - 10⁻⁶-10⁻⁴ М, проявлялось в замедлении роста надземных частей и корней, которое отмечалось через 3-4 недели выращивания. По мере развития растений наблюдали утолщение главного осевого корня, скручивание и пожелтение листьев, опадание цветковых завязей. В водной культуре такие нарушения появлялись раньше, чем в почвенной.

Высокие концентрации NH₄Cl, 10⁻³-10⁻² М, оказывали губительное действие на горох в первые недели выращивания. Двухнедельные проростки гороха, выращенные при указанных концентрациях аммония в водной культуре, отставали в росте в 1,5 - 3 раза и содержали меньше белка и хлорофилла в листьях, по сравнению с контрольным вариантом, табл.1. Надземная часть у таких растений желтела и погибала к концу третьей, а корни - к концу четвертой недели. В почвенной культуре растения гибли через 1,5-2 месяца.

Как оказалось, морфометрические повреждения в горохе, вызванные высокими концентрациями аммония, сопровождались усилением активностей антиоксидантных ферментов в листьях и корнях гороха. В табл.2.

Таблица 1. Влияние высоких концентраций NH₄Cl на рост гороха, содержание белка и хлорофилла в листьях

Концентрация NH ₄ Cl, М	Высота побегов, см	Содержание (мг на г сырой массы)	
		белок	хлорофилл
0	20 ± 2	14 ± 2	1,1 ± 0,1
2,5x10 ⁻³	13 ± 2	12,5 ± 1,5	1,0 ± 0,2
2,5x10 ⁻²	6 ± 2	11,5 ± 2,5	0,3 ± 0,03

Примечание. Здесь и в табл.2, 3 и 4 водная культура, возраст 14 сут. Представлены средние данные 4 опытов; ± стандартное отклонение от среднего.,

Таблица 2. Активность* антиоксидантных ферментов в горохе, выращенном при $2,5 \times 10^{-2}$ М NH_4Cl

Ферменты	Контроль (- NH_4Cl)	Опыт (+ NH_4Cl)
Из листьев		
СОД	58 ± 6	178 ± 15
КАТ	$3,4 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,3$
ПО	400 ± 60	2700 ± 150
Из корней		
СОД**	222 ± 32	337 ± 48
КАТ	$2,8 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,5$
ПО**	1070 ± 150	15900 ± 230

Примечание. * Суммарная активность, цитозольных и мембранных белков частично очищенных, ** - в грубых неочищенных белковых фракциях. Активность ферментов здесь и в табл. 3, 4, 5: СОД - относительные ед., КАТ и ПО - мкмоль H_2O_2 /(мин/ мг белка).

приведены данные по действию одной концентрации, другая, меньшая ($2,5 \times 10^{-3}$ М), вызывала подобные эффекты, но при более продолжительном выращивании (3-4 недели). Активности СОД и ПО, отмеченные в таблице знаком (**), были получены в неочищенных белковых фракциях из корней. Очистка, как правило, уменьшала активность указанных ферментов. Причиной тому могла быть неустойчивость ферментов при длительной процедуре выделения. Несмотря на варирование активностей, действие аммония отчетливо проявлялось в активировании всех трех ферментов. В среднем, под влиянием NH_4Cl в листьях увеличивалась активность СОД в 3; КАТ - в 1,2 и ПО - в 6,7 раз; в корнях, соответственно - в 1,5; 1,8 и 15 раз.

В некоторых опытах в корнях проростков активность ПО увеличивалась при высоких концентрациях аммония в 30 и более раз.

Концентрации NH_4Cl 10^{-6} - 10^{-4} М, тоже активировали ферменты, но в меньшей степени и при продолжительном воздействии. Подробные данные вегетационных опытов не приводятся, но отметим, что после 4-5 недель выращивания гороха в почвенной культуре активность СОД увеличивалась в среднем на 30-50 %, КАТ - на 10-30 %, ПО - на 50-80 %, причем, СОД больше активировалась в листьях, а ПО - в корнях. С возрастом и появлением внешних признаков повреждений растений активность СОД и ПО, в основном, увеличивалась, а каталазная активность, как правило, уменьшалась.

Таблица 3. Активность антиоксидантных ферментов в мембранных и цитозольных белковых фракциях, выделенных из гороха, выращенного при избытке хлористого аммония

Условия выращивания	АКТИВНОСТЬ					
	СОД		КАТ		ПО	
	М	Ц	М	Ц	М	Ц
В листьях						
Контроль $2,5 \times 10^{-2}$ М NH_4Cl	46 158	11 18	2,1 2,4	1,3 2,2	40 100	200 400
В корнях						
Контроль $2,5 \times 10^{-2}$ М NH_4Cl	172 287	50 50	1,9 3,7	0,9 1,3	3700 7400	7000 8500

Примечание. Активность ферментов в неочищенных белковых фракциях: м - мембранные, ц - цитозольные. Здесь и в табл. 4, 5 представлены средние данные 2-х опытов, стандартное отклонение $\pm 10-15\%$.

Таблица 4. Активность антиоксидантных ферментов в субклеточных структурах, выделенных из корней гороха, выращенного при избытке хлористого аммония

Субклеточные структуры	СОД		КАТ		ПО	
	-	+	-	+	-	+
Ядра, пластиды	0,1	1,5	0,04	0,4	240	470
Митохондрии	0,6	2,4	0,1	0,2	50	90
Субчастицы	3,3	8,7	0,2	1,2	500	1000

Примечание. Знаки: - или + указывают на отсутствие и добавление $2,5 \times 10^{-2}$ М NH_4Cl в среду выращивания гороха.

Локализацию воздействия аммония на растения можно было проследить по изменению активностей исследуемых ферментов в мембранных и цитозольных белковых фракциях, в табл.3 представлены такие данные. В контроле, в листьях и корнях гороха активности СОД и КАТ в мембранных белках были выше, чем в цитозольных. Пероксидазная активность в цитозоле, наоборот, превышала мембранные. Под влиянием NH_4Cl активировались как мембранные, так и цитозольные ферменты, однако отношение - мембранные/цитозольные, в целом растении возрастало для СОД в 2-2,9 раза (преимущественно в листьях), а ПО – в 1,3-1,7 раза (больше в корнях). Активность КАТ листьев сильнее увеличивалась в цитозоле, уменьшая отношение - мембранные/цитозольная активность, но в корнях оно увеличивалось в 1,4 раза. Таким образом, в горохе под влиянием NH_4Cl мембранные ферменты, в основном, активировались сильнее, чем цитозольные, указывая на мембранотропное действие этой соли.

На субклеточных мембранных структурах, выделенных из корней гороха, это положение подтвердилось. В табл.4 показано, что во фракции объединяющей ядра и пластиды, активность СОД увеличивалась в 15, КАТ - в

10, ПО - в 2 раза; в митохондриях, соответственно – в 4; 2 и 2,5 раза; в субчастицах – в 2,6; 6 и 2 раза, по сравнению с контролем. Интересно отметить 10-15 – кратное увеличение активностей СОД и КАТ в общей фракции ядер и пластид. Не исключено, что оно обусловлено повышенной "атакой" этих органоидов, но возможен также индуцированный синтез защитных ферментов de novo, подобно тому, как это происходит с СОД и ПО в зараженных растительных тканях [10, 11, 23].

Мембранотропное действие хлористого аммония подтверждалось также на мембранных структурах хлоропластов, выделенных из листьев гороха, табл.5. Функционально активные хлоропласти 2 класса [17], выделяли из гороха выращенного при $2,5 \times 10^{-3}$ М NH_4Cl (при концентрации соли на порядок больше, активные хлоропласти выделить не удалось). Как видно из таблицы хлоропласти растений, выращенных при подкормке хлористым аммонием активно синтезировали АТФ в присутствии экзогенных переносчиков электронов - МВ и ФМС, по сравнению с контрольными. В таких условиях, как известно, протекает псевдоциклический поток электронов, сопряженный с функционированием

Таблица 5. Влияние хлористого аммония на активность антиоксидантных ферментов и фотофосфорилирование в изолированных хлоропластах гороха

Условия опыта	Активность,			Синтез АТФ (мкмоль/ч мг хлорофилла) в присутствии	
	СОД	КАТ	ПО		
				МВ	ФМС
Контроль	7	0,8	10	271 (93)	518 (123)
$2,5 \times 10^{-3}$ М NH_4Cl	18	1,2	15	356 (95)	584 (123)

Примечание. Водная культура, возраст 12 сут. В скобках указан синтез АТФ при добавлении в среду ДХММ. По фотофосфорилированию представлены средние данные 2 - х опытов, отклонение от среднего $\pm 3-5\%$.

двух фотосистем, образованием АТФ и восстановлением кислорода до H_2O_2 [18]. Доказательством такого потока электронов в модельных опытах с хлоропластами служит ингибирование его диуроном (ДХММ) [24], в данном случае происходило ингибирование синтеза АТФ, показанное в скобках. Активности всех трех ферментов в хлоропластах были повышенны, по сравнению с контролем: СОД – в 2,6, КАТ и ПО – в 1,5 раза. Заслуживает внимания тот факт, что СОД активировалась сильнее, чем два другие фермента, что свидетельствовало в пользу интенсивного образования супероксидного радикала кислорода. Можно думать, что индуцируемая аммонием, активация антиоксидантных ферментов в хлоропластах обеспечивала защиту тилакоидных мембран от окислительного разрушения. Возможная регуляция, по-видимому, способствовала стимулированию псевдциклического фотофосфорилирования, самого по себе, продуцирующего H_2O_2 [18]. Оказалось, что эта защита уязвима при увеличении действующей концентрации соли на

хлоропласты. Так, исследование псевдциклического транспорта электрона и фотофосфорилирования показало, что добавление 10^{-6} - $10^{-2} M NH_4Cl$ непосредственно в реакционную среду инкубации хлоропластов усиливает поглощение кислорода с МВ и ингибирует ФМС-зависимый синтез АТФ (рисунок А, Б). Очевидно, что при концентрациях NH_4Cl больших, чем $10^{-3} M$, в хлоропластах наступало разобщение электронного транспорта от фотофосфорилирования, сопровождающее усиление окислительной активности. Последнее, соответствует литературным данным, показывающим, что разобщение высокими концентрациями аммония приводит к нарушению структуры тилакоидных мембран [25, 26].

Обсуждение результатов

Выбор хлористого аммония в качестве токсического агента в нашей работе был не случаен. Во-первых, аммиак относится к числу приоритетных загрязнителей сельского хозяйства и заводов производства минераль-

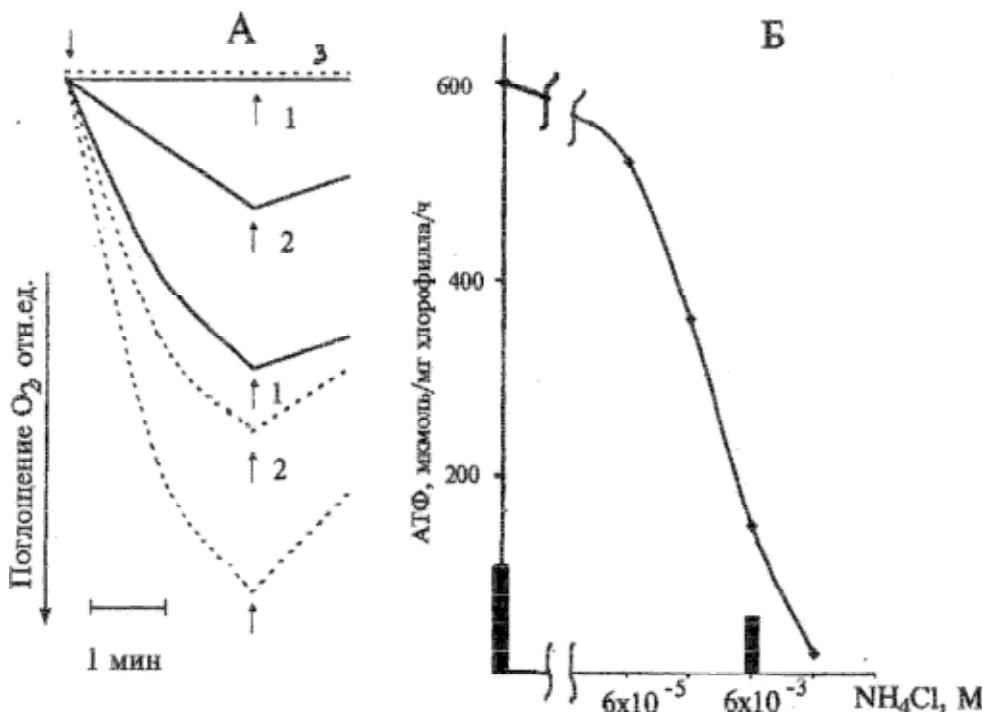


Рис. Влияние экзогенного NH_4Cl на электронный транспорт и фотофосфорилирование в хлоропластах гороха.

A - Поглощение кислорода в присутствии МВ. 1 и 2 - горох выращен на почве в отсутствие и при подкормке NH_4Cl , $10^{-3} M$, соответственно; прерывистые линии - то же, добавлен NH_4Cl , $6 \times 10^{-3} M$ в инкубационную среду хлоропластов; 3 - то же, что 1 и 2, добавлен ДХММ. Стрелками указано включение и выключение света.

Б - ФМС-зависимое фотофосфорилирование, столбиками отмечен уровень синтеза АТФ при добавлении ДХММ. Возраст гороха 27 сут.

ных удобрений в нашем регионе [27]. Во-вторых, механизм ингибирующего эффекта ионов аммония [10^{-2} М] на фотосинтез хорошо изучен [25, 26]. Как протонофор [28] он вызывает разобщение в энергетических мембранах. Исходя из того, что разобщение в мембранах сопряжено с инициированием ПОЛ, в регулировании которого принимают участие СОД, КАТ и ПО [14, 29], нами было предположено изменение активностей антиоксидантных ферментов в растениях под влиянием ксенобиотика. Сопоставляя морфологические и биохимические изменения можно было идентифицировать мишени воздействия ксенобиотика по активностям ферментов, судить о регуляции и деструкции процесса по токсическому действию, а также выявить возможность биотестирования повреждений на биохимическом уровне.

Физиологические опыты показали, что постоянное и длительное введение в среду выращивания гороха даже невысоких концентраций хлористого аммония в пределах 10^{-6} - 10^{-4} М NH_4Cl в течение вегетационного периода вызывали видимые нарушения в морфологии листьев и корней, несмотря на то, что аммонийный азот хорошо усваивается растениями. По-видимому, с течением времени в среде выращивания создается избыток его также как и при высоких концентрациях - 10^{-3} - 10^{-2} М, о чем свидетельствуют биохимические и морфологические нарушения, а также гибель растений.

Как и предполагалось, действие данной соли на горох изменяло активность антиоксидантных ферментов – СОД, КАТ и ПО. Это происходило в листьях и корнях, в мембранах и цитозоле клеток, было связано с концентрацией токсиканта и развивалось со временем. При кратковременном воздействии на горох повышенных концентраций хлористого аммония, все составляющие системы СОД-КАТ-ПО активировались значительно сильнее, чем при меньших концентрациях. Следует отметить соответствие усиления активности СОД в листьях и ПО во всем растении при появлении повреждений, связанных с длительным введением меньших концентраций соли в среду. Примечательно, что до наступления деструктивных процессов, приво-

дящих растения к гибели, антиоксидантная система: СОД-КАТ-ПО сильнее активировалась в мембранных структурах, об этом свидетельствует больший рост активностей в мембранных белковых фракциях, по сравнению с цитозольными и в субклеточных мембранных структурах ядрах, пластидах, митохондриях и хлоропластах. Эти данные подтверждали мембранотропное действие хлористого аммония и указывали на повышенное образование супероксидрадикала, поскольку СОД во всех мембранных структурах активировалась сильнее, чем КАТ и ПО. На примере функционально активных хлоропластов, можно было видеть, что регуляция ферментами метаболизма АФК, образуемых при действии мембранотропного агента, в значительной степени определялась концентрацией токсиканта. Следовательно, активирование ферментов СОД, КАТ и ПО в горохе под действием хлористого аммония в малых и высоких концентрациях на ранних этапах развития растений можно рассматривать как защиту мембран от окислительного повреждения, вызванного этой солью. На наш взгляд, лабильность антиоксидантной системы, выраженная в широкой вариабельности активностей каждого ферmenta в целом растении, указывают на регуляцию, поддерживающую нормальный метаболизм в растениях. Такое положение не противоречит литературным данным о регулирующей роли СОД, КАТ и ПО в ПОЛ [8, 14, 29], участии СОД в предотвращении мутаций [30], а ПО - в иммунитете растений [9-11].

Однако, существует и другой аспект, а именно высокое активирование ПО в горохе, ее цитозольной формы, особенно в корнях, где хлористый аммоний непосредственно ассимилируется [31]. ПО способна к окислительной детоксикации чужеродных соединений в цитоплазме клеток [10, 15], как цитохромом Р-450 в микросомах [20]. Особенность ПО заключается в том, что проявляя оксидазную активность, она вовлекает молекулярный кислород в пероксидазный механизм и продуцирует супероксид (O_2^-), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) и гидроперекиси [32], иными словами, обладает не только анти-, но и прооксидативными свойствами.

Есть мнение о том, что продукты пероксидазного окисления, такие как (OH^-) ингибируют СОД, КАТ и разрушают мембранные, тональст и плазмолемму растительных клеток [9-11, 23]. Исходя из сказанного, можно думать, что сильная активация пероксидазы под действием хлористого аммония связана не только с защитой мембран, но и с окислением NH_4Cl как токсиканта. При этом следует иметь ввиду возможность окисления продуктов ассимилированного иона аммония – аминокислот, амидов и азотистых оснований, образуемых по пути аммония из корней в листья [31]. Все эти продукты могут служить субстратами в пероксидазно-оксидазных реакциях [5]. При оксидазном механизме пероксидаза может использовать ион Cl^- [32, 33], что тоже следует учитывать при воздействии хлористого аммония на растения. Предпосылкой таких событий являются химические процессы, развивающиеся при проникновении ионов аммония и хлора через мембранны - повышение pH внутри клеток и органелл [34], образование хлорированных гидроперекисей. Последние особенно способствуют инициированию свободнорадикальных реакций ПОЛ и пероксидазно-оксидазного механизма [5, 32, 35].

Таким образом, сильное увеличение пероксидазной активности в цитозоле, особенно в корнях, где ксенобиотик непосредственно контактирует с мембранными клеток, и сопутствующая активация СОД под влиянием NH_4Cl , указывают на возможное окисление хлористого аммония и его метаболизирующих продуктов в горохе. Это подтверждается и существенным активированием антиоксидантных ферментов в субчастицах, в которых присутствуют пероксисомы, микросомы и др. мембранные структуры, содержащие окислительные системы [15, 20]. Мы предполагаем, что токсичный избыток хлористого аммония, подобно другим факторам [3, 35, 36], инициирует окислительный стресс, сопровождающийся стимуляцией ПОЛ, бесконтрольным образованием новых радикалов и цепей радикальных реакций, деструктивными процессами в мембранных, приводящими к их деградации и, в конечном итоге, к гибели растений. Одновременное активирование фермен-

тов СОД и ПО, при более сильном увеличении пероксидазной активности (в 10 и более раз), вероятно, может служить индикатором действия загрязняющих токсических веществ на растения, когда повреждения еще не видны, а биохимическая структура мембран нарушается и находится на критическом уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малыхотра С.С., Хан А.А. Биохимическое и физиологическое действие приоритетных загрязняющих веществ // Загрязнение воздуха и жизнь растений / Под ред. Майкла Трешоу. Л.: Гидрометеоиздат, 1988. (Air Pollution and Plant Life / Edited by Michael Treshow. Utah, USA, Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City. 1986).
2. Дурмисидзе С.В. Биохимия растений и охрана окружающей среды // Биотрансформация ксенобиотиков в растениях / Ред. О.Т. Хачидзе. Тбилиси: Мецниреба, 1988.
3. Скулачов В.П. Старение организма - особыя биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование гипотезы Вейсмана // Биохимия. Т.62. 1997. Вып.11.
4. Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии / Под ред. У.Прайер. М.: Мир, Т.1. 1979. (Free Radicals in Biology / Edited by William A. Pryor. New York San Francisco. London: Acad. Press, 1976).
5. Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Greppin H. Peroxidases. 1970-1980: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. Geneve, Switzerland: Univ. De Geneve, Centre de Botanique. 1982.
6. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранных растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНИТИ, Т.6. 1989.
7. Шорнинг Б.Ю., Полещук С.В., Горбатенко И.Ю., Ванюшин Б.Ф. Действие антиоксидантов на рост и развитие растений // Известия АН. Серия биологии

- ческая. 1999. №1.
8. *Gil P., Barja de Qniroga G.* Effect of Temperature Acclimation on Enzymatic Activities and Thermal Sensitivity of Catalase, Oxygen Consumtion and Concentration of Tissue Peroxidation Products in Discoglossus Pictus Tadpoles // Comp. Biochem. Physiol. V.89 B. 1988.
9. Чигрин В.В. Окислительные, липолитические и протекторные ферменты в листьях устойчивых и восприимчивых к ржавчине растений пшеницы // Физиология растений. Т.35. 1988.
10. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М.: Наука, 1988.
11. *Svalheim Oystein, Robertsen Borre.* Induction of Peroxidases in Cucumber Hypocotyls by Wounding and Fungal Infection // Physiol. Plant. V.78. 1990.
12. *Canada A.T., Calabrese E.J.* Superoxide Dismutase: Its Role in Xenobiotic Detoxification // Pharmac. Ther. V.44. 1989.
13. Суачкова Н.Е., Шеин И.В., Романова Л.И., Милютина И.Л., Кудашева Ф.Н., Вараксина Т.Н., Степень Р.А. Биохимические индикаторы стрессового состояния древесных растений. Новосибирск.: Наука СО, 1997.
14. Мерзляк М.Н., Хенди Д.А., Амертон Н.М., Жигалова Т.В., Павлов В.К., Житенева О.В. Деградация пигментов, перекисное окисление липидов и активность свободнорадикальных процессов при осеннем старении листьев // Биохимия. Т.58. 1993.
15. Роговин В.В., Муравьев Р.А., Акимов В.С., Бавыкина И.В. Пероксидосомы растительных клеток // Физиология растений. Т.34. 1987.
16. *Bredford M.M.* A Rapid and Sensitive Method for Principle of Protein-Dye Binding // Analyt. Biochem. V.72. 1976.
17. *West K.L., Wischich J.T.* Photosynthetic Control by Isolated Pea Chloroplasts // Biochem. J. V.109. 1968.
18. Мурзаева С.В., Акулова Е.А. Роль каталазы и пероксидазы в регуляции фотохимических реакций хлоропластов, связанных с метаболизмом перекиси водорода // Механизм фотодыхания и его особенности у растений различных типов / Под ред. Ю.С. Карпилова и А.К. Романовой. Пущино, 1978.
19. *Маслов А.И.* Глицилоксидазная активность митохондрий зеленых листьев растений // Физиология растений. Т.26. 1979.
20. *Арчаков А.И.* Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975.
21. *Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K.* The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methasulphate and Molecular Oxygen // Biochem. and Biophys. Res. Commun. V. 46, 1972.
22. *Бояркин А.Н.* Быстрый метод определения пероксидазы // Биохимия. Т.16. 1951.
23. *Tanaka K., Sugahara K.* Role of Superoxide Dismutase in the Defense Against SO₂ Toxicity and Induction of Superoxide Dismutase with SO₂ Fumigation. Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity // Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. Japan. V.11. 1980.
24. *Акулова Е.А., Мухин Е.Н.* Применение ингибиторов ферментов и доноров электронов в хлоропластах // Методы исследования фотосинтетического транспорта электрона / Под ред. Е.А. Акуловой. Пущино, 1974.
25. *Ohmori M., Gimler H., Schreiber U., Heber U.* Relative Intensivity of Photosynthesis to the Dissipation of a Transthylakoid Proton Gradient in Intact Chloroplasts // Physiol. Veget. V.25. 1985.
26. *Puritch G.S., Barker A.V.* Structure and Function of Tomato Leaf Chloroplasts During Ammonium Toxicity // Plant Physiol. V.42. 1967.
27. *Розенберг Г.С., Краснощеков Г.П., Сульдимиров Г.К.* Экологические проблемы города Тольятти. Институт экологии Волжского бассейна РАН. Администрация г. Тольятти. 1995.
28. *Ремии Д., Булычов А.А., Курелла Г.А.* Влияние хлористого аммония на трансмембранный электрический потенциал и градиент pH в одиночных хлоропластах // Физиология растений. Т.33. 1986.
29. *Владимиров Ю.Н., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.
30. *Carlioz A.T.* Isolation of Superoxide Dismutase Mutants in Escherichia coli: is Superoxide

- Dismutase Necessary for Aerobic Life? // EMBO J. V.5. 1986.
31. Алексина Н.Д., Клюйкова А.И. Усвоение азота растениями при повышенной температуре // Физиология растений. Т.33. 1986.
32. Yamazaki J. Peroxidase. Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. N. Y., London: Acad. Press, 1974.
33. Колизерко Е.И., Орешкина Н.Я., Гуськов А.В. Взаимосвязь роста пероксидазной и ИУК-оксидазной активности в каллусных тканях фасоли при засолении среды //
- Физиология растений. Т.35. 1988.
34. Трофимова М.С., Молотковский Ю.Г. pH цитозоля изолированных протопластов и его искусственное изменение // Физиология растений. Т.35. 1988.
35. Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю., Лызлова С.Н. Антиокислительные свойства и деградация белков сыворотки активными формами кислорода (O_2^- , OCl^-) генерируемыми стимулированными нейтрофилами // Биохимия. Т.53. 1988.
36. Inze D., Van Montagu M. Oxidative stress in plants // Current Opin. Biotechnol. V.5. 1995.

THE INDUCTION OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN PLANTS (PISUM SATIVUM) BY EXCESS AMMONIUM-CHLORIDE

© 2000 S.V. Murzaeva

Institute of Ecology of the Volga River Basin of Russian Academy of Sciences, Togliatti

Investigated action of ammonium-chloride (10^{-6} - 10^{-2} M) on peas at addition on medium of cultivation. The augmentation of concentration of this salt resulted in retardation of growth plants, decrease of the contents of protein and of chlorophyll in leaves and depression of rate of synthesis ATP in the isolated chloroplasts. At excess of ammonium ($2,5 \times 10^{-2}$ M) and long action of smaller concentrations (10^{-6} - 10^{-4} M) the activity of enzymes of a superoxide dismutase, catalase and peroxidase in leaves and roots was enlarged. The comparison soluble (cytosolic) and hardsoluble (membrane-bound) proteinaceous fractions, and also subcellular fragments, secured of young growth peas, has shown activating enzymes by ammonium-chloride mainly in membranous structures (nuclei, subparticles, mitochondria and chloroplasts).

The activation antioxidative of enzymes in plants of peas is discussed in connection with by membranotropism action of ammonium-chloride. The conclusion about intensifying of oxidative activity of peroxidase is made at toxicity excess salt.

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ЛИПИДОВ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ

©2000 О.А. Розенцвет¹, С.В. Саксонов², В.Г. Козлов¹, Н.В. Конева¹

¹ Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

² Жигулевский государственный заповедник им. И.И.Спрыгина, пос. Бахилова Поляна

Изучен состав общих, полярных и нейтральных липидов 14 видов пресноводных трав. Обсуждаются вариабельность биохимических показателей в зависимости от вида растений и места обитания.

Одна из самых значительных проблем, с которой столкнулось человечество в XX веке - нарастающий дефицит чистой пресной воды. Огромное влияние производственной деятельности на окружающую среду, и в особенности, на гидросферу, привело к тому, что различные акватории нашей планеты характеризуются разным уровнем деградации водной среды [1]. Значительная часть пресноводных экосистем под влиянием антропогенных влияний функционирует в режиме высоких нагрузок химическими, радиоактивными и иными поллютантами, теплового перегрева, избыточного насыщения биогенными веществами и т.п. [1,2]. В частности, состояние водных ресурсов Самарской области рассматривается как очень тяжелое [15,17]. Самарская область – одна из наиболее развитых индустриальных и сельскохозяйственных областей в Среднем Поволжье, и ее экологические проблемы – типичны для всего региона. В связи с чем, экологическую обстановку Среднего Поволжья можно рассматривать как прогностическую модель тех экстремальных условий, которые могут сложиться в водных экосистемах любой страны [21].

Одно из важных, для биосфера в целом и человека в частности, свойств водных экосистем является их способность к восстановлению гомеостазиса посредством самоочищения. Самоочищение – это комплекс взаимодействий физических, химических и биологических процессов, приводящих качество воды к первоначальному состоянию.

Важную роль в самоочищении загрязненных вод играют водные растения [11-13]. Прибрежно-водная и водная растительность,

поглощая и аккумулируя биогенные элементы, органические соединения и токсические вещества, может влиять на процессы формирования качества воды [5]. Так, заросли высших водных растений могут служить барьером для поступления в водоем рассеянных загрязнений, а также угнетающе действовать на сапротифтную микрофлору [11]. К настоящему времени доказана роль водных растений в процессах очищения водоемов, загрязненных тяжелыми металлами [7, 24], нефтепродуктами [11], пестицидами и радионуклидами [4, 22]. Однако механизмы указанных процессов, происходящих на клеточном уровне, в частности на уровне мембран клетки, исследованы недостаточно. Между тем более глубокое изучение биохимических особенностей гидробионтов, живущих в загрязненных водоемах и принимающих участие в их очищении, имеет кроме теоретического интереса и большое практическое значение. Понимание механизмов очищения позволит подойти к направленному регулированию самоочищения с одной стороны, с другой стороны - к использованию биохимических характеристик в оценке экологического состояния водных экосистем.

Существенную роль в процессах адаптации организмов к условиям среды обитания играют липиды как главный компонент мембранных клетки [28, 31]. Целью настоящей работы стало изучение особенностей липидного состава высших водных растений; выявление зависимости состава липидов от таксономического статуса и характера жизненной формы. Кроме того, была предпринята попытка, проанализировать вариабельность

липидных характеристик растений в зависимости от места их обитания с целью выявления наиболее информативных показателей для оценки механизмов адаптации растений к изменениям факторов окружающей среды.

Липиды по химическому строению и функциям, которые они выполняют внутри клетки, а также по степени изменчивости принято делить на две группы: нейтральные и полярные. В связи с этим нами проведено подробное исследование всего липидного спектра водных растений.

Методы исследования

Растительный материал. Объектами исследования стали наиболее распространенные для региона Средней Волги водные растения: кубышка желтая (*Nuphar lutea* (L.), многокоренник обыкновенный (*Spirodela polyrrhiza* (L.)), пузырчатка обыкновенная (*Utricularia vulgaris* L.), рдест блестящий (*Potamogeton lucens* L.), рдест волосовидный (*P.trichoides* Cham. et Schlect), рдест гребенчатый (*P.pectinatus* L.), рдест маленький (*P.pussilus* L.), рдест стеблеобъемлющий (*P.perfoliatus* L.), рдест сплюснутый (*P.compressus* L.), рдест Фриса (*P.friesii* Rupr.), роголистник погруженный (*Ceratophyllum demersum* L.), стрелолист стрелолистный (*Sagittaria sattifolia* L.), уруть колосовая (*Myriophyllum spicatum* L.) и частуха подорожниковая (*Alisma plantago-aquatica* L.). Все перечисленные растения многолетние травы, характерные для стоячих или медленно текущих пресных или солоноватых вод [20].

Липидный состав изучен у 14 видов сосудистых растений. В систематическом отношении [20], исследованные виды относятся к двум классам (*Magnoliopsida* и *Liliopsida*), каждый из которых включает по 3 порядка, объединяемых в 7 семейств (табл.1).

В качестве пунктов отбора выбраны довольно удаленные друг от друга водоемы (акватория Саратовского водохранилища), в которых данные растения образуют разнообразные фитоценозы, нередко являясь в них доминантами. Первый пункт сбора материала (точка 1) представляет собой мелководный залив у острова Шалыга-Середыш с песчано-илистым дном и довольно интенсивным течением.

Он расположен в нижнем бьефе Куйбышевского гидроузла на расстоянии 17 км вниз по течению, и входит в состав Жигулевского государственного заповедника. Второй пункт (точка 2) также является заливом Волги - Змеиный затон. Это неглубокая (2-4 м), узкая извилистая протока (староречье) с илистым дном. Затон расположен в 60 км ниже по течению от плотины Куйбышевского гидроузла, и входит в состав национального парка "Самарская Лука". Время сбора растений: конец июля - начало августа 1998 г. Температура воды в обеих точках была приблизительно одинаковой и составила около 22 °C.

Растения собраны по стандартным методикам, разработанным для водных растений [9]. Для анализа отбирали усредненные пробы биомассы, состоящие из нескольких растений целиком, т.е. листьев, стеблей и корней.

Экстракция и анализ липидов. Отмытые в проточной воде от эпифитов образцы измельчали с помощью высокоскоростного гомогенизатора и далее проводили экстракцию липидов по методу Блайя и Дайера [10]. Общее количество липидов определяли гравиметрическим способом. Для разделения нейтральных липидов использовали одномерную тонкослойную хроматографию (TCX) на пластинках (10 x 10 см) с закрепленным слоем силиказоля (эстонская фирма "Хаапсалу") с последовательным применением систем растворителей: толуол – гексан – муравьиная кислота (140:60:1) и гексан – диэтиловый эфир – муравьиная кислота (60:40:1). Для анализа гликолипидов использовали систему растворителей: ацетон – бензол – вода (91:30:8). Фосфолипиды анализировали на микропластинках (6 x 6 см). Количественное определение фосфолипидов проводили методом Васьковского, нейтральных липидов – методом Кабара и Чена, гликолипидов – по содержанию галактозы с анtronовым реагентом [18].

Полученные данные приведены в табл.1-4, в которых средние данные приведены по трем повторностям.

Результаты и их обсуждение

О составе липидов водных растений накоплен достаточно большой экспериментальный материал, но он, в основном, каса-

Таблица 1. Классификация водных растений и содержание общих липидов (мг/г сырого веса)

Статус видов		Общие липиды		
Таксономический	Экологический	1	2	Средние
MAGNOLIOPSIDA				
Numphaeales				
Nymphaeaceae				
<i>Nuphar lutea</i>	I	8,5	7,8	8,1
Ceratophyllaceae				
<i>Ceratophyllum demersum</i>	II	6,5	7,5	7,0
Myrales				
Haloraceae				
<i>Myriophyllum spicatum</i>	II	6,5	7,3	6,9
Scrophulariales				
Lentibulariaceae				
<i>Utricularia vulgaris</i>	II	5,5	-	5,5
LILIOPSIDA				
Arales				
Lemnaceae				
<i>Spirodela polyrhiza</i>	I	5,6	5,7	5,65
Alismatales				
Alismataceae				
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	III	9,4	9,3	9,35
<i>Sagittaria sagittifolia</i>	III	11,3	8,9	10,1
Najadales				
Potamogetonaceae				
<i>Potamogeton compressus</i>	II	13,7	-	13,7
<i>Potamogeton friesii</i>	II	7,9	-	7,9
<i>Potamogeton lucens</i>	II	9,8	-	8,2
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	II	7,3	5,9	6,6
<i>Potamogeton pectinatus</i>	II	-	0,6	8,4
<i>Potamogeton pussillus</i>	II	5,9	-	5,9
<i>Potamogeton trichoides</i>	II	8,0	-	8,0

Примечание. Места сбора образцов 1 – о. Шалыга, 2 – Змеиный затон.

ется морских растений, или пресноводных водорослей. Водные растения представляют собой естественную группу макрофитов, которые в ходе эволюционного развития приобрели ряд специфических особенностей, способствующих их существованию в воде [11, 12].

Условия существования в водной среде вызвали формирование экобиоморфологических особенностей этих растений. По отношению к водному фактору, как среде обитания исследованные растения являются гидрофитами (настоящими водными растениями) и гелофитами (воздушно-водными) и подразделяются на 3 различные экологические группы: I - гидрофиты, свободно плавающие в воде (*Nuphar lutea*, *Spirodela polyrhiza*), II -

погруженные укореняющиеся растения (*Potamogetonaceae*, *Ceratophyllum demersum*, *Utricularia vulgaris*, *Myriophyllum spicatum*), III- низкотравные гелофиты (*Alisma plantago-aquatica*, *Sagittaria sattifolia*) [16].

Как известно, липиды в зависимости от химического строения выполняют различные функции и обладают различной степенью изменчивости в зависимости от систематического и экологического положения организма [23]. В связи с этим сравнительный анализ липидных компонентов проводился по трем классам липидов (нейтральные, глико- и фосфолипиды).

Содержание общих суммарных липидов (ОЛ), изменяется от 5,5 до 13,7 мг/г сырого

Таблица 2. Состав нейтральных липидов водных растений (% от суммы нейтральных липидов)
 МАГ-monoацилглицерол, ДАГ-диацилглицерол, ТАГ-триацилглицерол, СЖК- свободные жирные кислоты,
 СС- свободные стерины, ЭС- эфиры стеринов, ВС-воски, УВ-углеводороды

№	Название видов и принадлежность к экологической группе	МАГ		ДАГ		ТАГ		СЖК		СС	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	<i>Nuphar lutea</i> (I)	6,5	9,0	10,2	14,6	19,3	17,8	11,7	22,3	7,3	5,0
2	<i>Spirodela polyrhiza</i> (I)	8,3	14,0	8,7	12,6	29,8	8,4	18,8	37,9	4,1	4,6
3	<i>Ceratophyllum demersum</i> (II)	15,3	13,7	7,1	8,6	29,2	17,1	10,0	37,4	6,4	4,6
4	<i>Myriophyllum spicatum</i> (II)	18,7	13,9	10,9	10,0	22,3	22,5	21,9	30,8	5,5	2,3
5	<i>Potamogeton compressus</i> (II)	19,8	-	22,0	-	20,6	-	12,8	-	7,0	-
6	<i>Potamogeton friesii</i> (II)	16,0	-	16,7	-	26,0	-	20,0	-	8,0	-
7	<i>Potamogeton lucens</i> (II)*	21,7	21,4	10,3	15,4	24,5	20,5	17,8	17,3	6,4	7,3
8	<i>Potamogeton perfoliatus</i> (II)	6,7	22,3	10,3	13,9	29,7	20,0	32,9	17,5	8,5	7,2
9	<i>Potamogeton pectinatus</i> ** (II)	7,8	9,9	3,0	8,7	32,8	28,6	6,8	11,1	6,5	7,4
10	<i>Potamogeton pussillus</i> (II)	7,9	-	15,7	-	20,9	-	25,6	-	5,6	-
11	<i>Potamogeton trichoides</i> (II)	10,3	-	35,5	-	19,4	-	12,1	-	9,3	-
12	<i>Utricularia vulgaris</i> (II)	20,0	12,6	16,7	16,9	23,9	22,3	-	14,0	5,8	6,5
13	<i>Alisma plantago-aquatica</i> (III)	16,0	22,2	22,0	19,4	17,0	15,3	17,5	16,0	5,5	6,3
14	<i>Sagittaria sagittifolia</i> (III)	16,5	18,5	22,2	11,9	7,0	12,8	34,3	22,7	4,4	4,4
№	Название видов и принадлежность к экологической группе	ЭС		ВС		СП		УВ			
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	<i>Nuphar lutea</i> (I)	10,4	8,2	11,0	4,8	5,2	7,7	18,3	10,6		
2	<i>Spirodela polyrhiza</i> (I)	6,3	5,8	5,0	4,0	4,7	8,4	14,3	4,3		
3	<i>Ceratophyllum demersum</i> (II)	3,2	5,3	9,3	4,7	-	-	19,5	8,6		
4	<i>Myriophyllum spicatum</i> (II)	6,0	10,0	-	7,5	-	-	14,7	3,0		
5	<i>Potamogeton compressus</i> (II)	2,4	-	4,4	-	-	-	11,4	-		
6	<i>Potamogeton friesii</i> (II)	-	-	4,0	-	5,3	-	4,0	-		
7	<i>Potamogeton lucens</i> (II)*	-	3,0	7,0	5,6	6,3	4,5	6,0	5,0		
8	<i>Potamogeton perfoliatus</i> (II)	-	2,3	3,9	7,9	-	4,0	8,0	4,8		
9	<i>Potamogeton pectinatus</i> ** (II)	3,5	3,5	5,0	4,9	5,2	5,5	29,4	20,4		
10	<i>Potamogeton pussillus</i> (II)	4,5	-	5,0	-	-	-	14,8	-		
11	<i>Potamogeton trichoides</i> (II)	6,4	-	4,0	-	-	-	3,0	-		
12	<i>Utricularia vulgaris</i> (II)	12,8	6,5	10,2	4,0	-	8,1	10,6	9,1		
13	<i>Alisma plantago-aquatica</i> (III)	8,0	10,7	4,0	6,7	10,0	4,2	-	-		
14	<i>Sagittaria sagittifolia</i> (III)	6,0	8,6	5,0	3,7	5,5	11,8	3,9	5,6		

Примечание. Места сбора образцов 1 – о. Шалыга, 2 – Змеиный затон;

* - образцы собраны на разных участках одного местообитания (точка 1)

** - образцы собраны на разных участках местообитания 2

веса растения, что составляет от 2,0 до 7,5% от их сухого веса. Разброс в содержании липидов довольно существенный, максимальная величина превышает минимальную в 2,5 раза (табл.1).

Сравнение средних величин содержания ОЛ показывает, что эта характеристика является видоспецифичной, поскольку не прослеживается какой-либо зависимости

между содержанием общих липидов и таксономической принадлежностью или экологическим статусом. Даже сравнение наиболее близких в филогенетическом отношении растений, таких как семейство Potamogetonaceae, не выявило четкой закономерности в накоплении липидов.

Для растений, собранных в удаленных друг от друга местах обитания, количества ОЛ

Таблица 3. Состав полярных липидов водных растений (гликолипиды: % от суммы гликолипидов; фосфолипиды: % от суммы фосфолипидов). МГДГ-моногалактозилдиацилглицерол, ДГДГ-дигалактозилдиацилглицерол, СХДГ- сульфохиновозилдиацилглицерол, ФХ-фосфатидилхолин, ФЭ-фосфатидилэтаноламин, ФГ-фосфатидилглицерол, ФИ-фосфатидилиноозитол, ФК- фосфатидная кислота, ДФГ-дифосфатидилглицерол

№	Название видов и принадлежность к экологической группе	МГДГ		ДГДГ		СХДГ		ФХ		ФЭ	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	<i>Nuphar lutea</i> (I)	46,7	51,0	40,3	34,2	13,0	14,8	42,3	43,1	15,3	17,0
2	<i>Spirodela polyrhiza</i> (I)	54,7	-	33,3	-	12,0	-	44,1	41,9	26,3	23,6
3	<i>Ceratophyllum demersum</i> (II)	50,9	54,6	29,8	26,1	19,3	19,3	48,4	59,4	18,4	16,8
4	<i>Myriophyllum spicatum</i> (II)	64,5	54,4	29,5	33,5	15,9	12,1	33,9	49,1	18,9	20,8
5	<i>Potamogeton compressus</i> (II)	60,6	-	27,3	-	12,1	-	40,4	-	21,9	-
6	<i>Potamogeton friesii</i> (II)	53,6	-	28,7	-	17,8	-	40,1	-	18,4	-
7	<i>Potamogeton lucens</i> (II)*	51,4	56,1	27,7	31,6	20,9	12,3	44,7	48,2	14,1	14,6
8	<i>Potamogeton perfoliatus</i> (II)	57,4	54,3	29,4	28,6	13,2	17,1	42,2	58,2	11,2	19,9
9	<i>Potamogeton pectinatus</i> (II)**	51,9	60,3	31,7	23,6	16,4	16,1	40,4	38,4	18,4	17,8
10	<i>Potamogeton pussillus</i> (II)	60,0	-	26,6	-	13,4	-	49,0	-	25,6	-
11	<i>Potamogeton trichoides</i> (II)	53,7	-	36,6	-	9,8	-	45,7	-	16,9	-
12	<i>Utricularia vulgaris</i> (II)	45,7	48,2	39,9	37,2	14,4	14,6	48,0	39,4	12,0	10,0
13	<i>Alisma plantago-aquatica</i> (III)	53,5	50,3	37,7	34,6	8,8	15,1	47,5	35,9	13,3	20,5
14	<i>Sagittaria sagittifolia</i> (III)	47,0	50,0	40,3	39,5	12,7	10,5	36,6	42,5	21,6	24,3

№	Название видов и принадлежность к экологической группе	ФГ		ФИ		ФК		ДФГ	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	<i>Nuphar lutea</i> (I)	12,3	12,2	17,3	21,4	9,1	3,6	3,7	2,8
2	<i>Spirodela polyrhiza</i> (I)	8,8	14,4	12,1	12,3	7,2	5,7	1,5	2,1
3	<i>Ceratophyllum demersum</i> (II)	17,3	11,3	6,3	6,7	6,5	3,1	3,0	2,7
4	<i>Myriophyllum spicatum</i> (II)	17,2	14,6	10,5	6,8	15,9	5,5	3,6	3,2
5	<i>Potamogeton compressus</i> (II)	20,8	-	6,4	-	8,1	-	2,4	-
6	<i>Potamogeton friesii</i> (II)	14,8	-	8,9	-	14,1	-	37,0	-
7	<i>Potamogeton lucens</i> (II)*	21,6	20,4	8,6	9,1	5,1	4,9	6,0	2,8
8	<i>Potamogeton perfoliatus</i> (II)	23,9	14,0	11,3	5,9	6,7	0,4	4,7	1,5
9	<i>Potamogeton pectinatus</i> (II)**	22,0	20,9	10,3	11,5	4,9	4,7	4,0	6,7
10	<i>Potamogeton pussillus</i> (II)	13,9	-	4,7	-	2,7	-	4,1	-
11	<i>Potamogeton trichoides</i> (II)	18,1	-	4,9	-	10,3	-	4,1	-
12	<i>Utricularia vulgaris</i> (II)	15,2	20,5	4,1	16,4	18,8	10,5	1,9	3,2
13	<i>Alisma plantago-aquatica</i> (III)	16,5	15,9	12,6	14,5	6,9	11,0	3,2	2,2
14	<i>Sagittaria sagittifolia</i> (III)	18,4	17,5	14,3	10,8	7,1	2,8	2,1	2,0

Примечание. Места сбора образцов 1 – о. Шалыга, 2 – Змеиный затон;

*- образцы собраны на разных участках одного местообитания (точка 1)

** - образцы собраны на разных участках местообитания 2

довольно близки и их различия связаны скорее с видовыми различиями, поскольку разная способность к синтезу липидов проявляется как у близкородственных видов, каковыми являются представители одного семейства Potamogetonaceae, так и у далеких в фи-

логенетическом плане растений.

Данные по качественному профилю и количественному соотношению нейтральных липидов представлены в табл.2. Следует отметить, что анализу нейтральных липидов биохимикиами уделялось гораздо меньше вни-

мания, нежели анализу жирных кислот и полярных липидов. В задачу нашего исследования входило также получить представление об особенностях в составе нейтральных липидов водных растений. Как известно нейтральным липидам отводится роль запасных липидов и источников энергии. Кроме того, они принимают активное участие в метаболических процессах, являясь, в том числе, и промежуточными интермедиатами в синтезе полярных липидов. Среди нейтральных липидов в исследуемых нами растениях обнаружены моно-, ди- и триацилглицерины, свободные жирные кислоты, свободные стеролы и их эфиры, спирты и воски (табл.2). Сумма эфиров глицерина и жирных кислот доминирует у всех исследованных видов растений и достигает 80,0% у *Sagittaria sagittifolia*. У большинства видов сумма эфиров глицерина и жирных кислот варьирует от 61,6 % (*Ceratophyllum demersum*) до 79,6% (*P. perfoliatus*). Причем, в тех видах, которые имеют высокое содержание свободных жирных кислот, наблюдается меньшее содержание ацилглицеринов. Соотношение моно-, ди- и тризамещенных эфиров глицерина зависит только от вида растения и не связано с разными условиями обитания. Так, в *P. compresuss* содержание всех трех ацилглицеринов распределено достаточно равномерно (19,8% - моноацилглицерины, 22,0% - диацилглицерины и 20,6% - триацилглицерины). Для остальных видов наблюдается более высокое содержание триацилглицеринов по сравнению с моно- и диацилглицеринами за исключением *P. trichoides*, где содержание диглицеридов составляет 35,5% против 10,3% - моноацилглицеринов и 19,4% - триацилглицеринов.

Свободные жирные кислоты, выступая как жирорастворимые анионы, играют роль трансмембранных переносчиков ряда физиологически активных катионов. Обычно количество свободных жирных кислот в высших растениях невелико. В наших исследованиях эта величина варьировала от 6,8% (*P. pectinatus*) до 37,9% (*Spirodela polyrhiza*). Пул жирных кислот может пополняться за счет гидролиза мембранных фосфолипидов в результате активации мембранных фосфолипаз

или перекисного окисления липидов. Однако в этом случае можно было бы ожидать появления лизо-форм фосфолипидов, как продуктов деградации липидов, чего мы в наших исследованиях не обнаруживали (табл.4). Это позволяет нам предположить, что высокое содержание свободных жирных кислот является специфической особенностью водных растений. Количество жирных кислот (табл.2) является величиной переменчивой как от вида растений, так и от места обитания. Считается, что изменение уровня свободных жирных кислот является одним из механизмов поддержания значений микропривязкости плазмалеммы в определенных пределах [8].

Уровень стеролов изменяется от 2,3% до 9,3% от суммы нейтральных липидов (табл.2). Несмотря на достаточно низкий уровень свободных стеролов, их влияние на структуру и функции мембран очень велико. Установлено, что 75% стеролов связано с плазмалеммой [27]. Функции растительных стеролов состоят, прежде всего, в их способности влиять на структуру мембраны и ее проницаемость. Кроме того, они способны действовать как растительные гормоны или их предшественники. Наряду со свободными стеролами исследуемые нами виды растений способны синтезировать эфиры стеролов, что является характерным признаком высших растений. Количество их составляет 2,3-12,8% от суммы нейтральных липидов. Спиртовые компоненты обнаружены не у всех видов растений. По-видимому, они являются промежуточными продуктами, которые с достаточно большой скоростью принимают участие в липидном метаболизме. Среди нейтральных липидов исследованных растений, нами зафиксировано от 3,0 до 29,4% углеводородов от общего количества нейтральных липидов. Природные углеводороды представляют большой интерес как химические маркеры в биогеохимии [26, 36]. Определенный класс углеводородов, может быть характерной особенностью только определенных групп живых организмов или растений и использоваться в хемотаксономии [33, 34].

Глико- и фосфолипиды относятся к группе полярных липидов, которые входят в со-

став мембран клеток. Они редко встречаются в свободном виде, а существуют в виде ассоциатов со структурными белками и ферментами. Состояние клетки и активность ферментов зависит от состояния липидов. Состав мембранных липидов исследованными нами водных растений представлен галакто-сульфо- и фосфолипидами (табл.4). Большую часть массы полярных липидов составляют галакто- и сульфолипиды, входящие в состав хлоропластов. Их содержание составляет от 60,0% до 73,8% от общей суммы полярных липидов. Независимо от места сбора (табл.4), экологического или систематического статуса у всех исследованных макрофитов доминирует моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ) (45,7-60,6%). Дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ) занимает второе место по вкладу в гликолипиды (23,6-39,5%). Сульфохиновозилдиацилглицерин (СХДГ), обнаруженный также у всех исследованных растений, который является обязательным структурным компонентом хлоропластов мембран фотосинтезирующих организмов, вносит наименьший вклад в состав гликолипидов (8,8-22,9%). Соотношение МГДГ/ДГДГ имеет адаптивное значение [14, 31]. Оно может изменяться в зависимости от изменений в среде обитания. Наши данные показали, что соотношение МГДГ/ДГДГ изменяется в пределах 1,5-2,6, причем данное соотношение изменяется как при переходе от одного вида к другому, так и в одноименных образцах, собранных в различных местах обитания.

Соотношение индивидуальных фосфолипидов (табл.4) показывает, что доминирующими фосфолипидом является фосфатидилхолин (ФХ), как у всех фотосинтезирующих растений. Его содержание в зависимости от вида растения изменяется от 33,9% до 59,4% в разных растениях. Второе место по вкладу в фосфолипиды занимает либо фосфатидилглицерин (ФГ) либо фосфатидилэтаноламин (ФЭ) в зависимости от систематического положения. Если снова проанализировать наиболее близкородственные виды, то ФГ преобладает над ФЭ для видов *P. lucens*, *P. pectinatus*, *P. trichoides*, а ФЭ – для *P. compressus*, *P. pusiluss*. *P. pectinatus*. Остальные фосфолипиды вносят меньший в процен-

тном отношении вклад: дифосфатидилглицерин, обнаруженный у всех исследованных растений составляет 1,5-6,0%, а количество фосфатидилинозитола в сумме с фосфатидилсерином равно 4,1-21,4%.

Как уже упоминалось ранее, что липиды в зависимости от своего статуса по разному откликаются на изменения в окружающей среде, особенно в условиях различного рода стрессов. Кроме того, сами растения имеют различные механизмы ответных реакций на стрессовые воздействия. В наших исследованиях мы не дифференцировали влияние каких-либо конкретных факторов, способных оказывать влияние на метаболизм липидов, а лишь проанализировали состав липидов растений одного вида, собранных в различных местах обитания. Однако и в этом случае нами отмечены изменения в составе липидов. Так, для *P. lucens* и *P. pectinatus*, собранных в одном месте обитания, соотношение НЛ практически одинаково, тогда как для *P. perfoliatus* (точка 1 и точка 2) можно отметить разный количественный и качественный состав липидов. Так, для образца, собранного в точке 1, наблюдается более высокое содержание свободных жирных кислот при отсутствии спиртов, эфиров стеринов и восков, которые присутствуют в образце, собранном в точке 2. Суммы ацилглицеринов достаточно близки (55,7% и 58,25%), а соотношение моно-, ди- и триацилглицеринов также различно для разных образцов. Отмечены различия и в составе полярных липидов. Одноименные образцы растений, собранных в одном месте обитания, имеют содержание ФХ 44,7% и 48,2% (*P. lucens*) и 40,4% и 38,4 % (*P. pectinatus*), а для *P. perfoliatus*, собранного в различных местах обитания, содержание ФХ составило 42,2 % (точка 1) и 58,2% (точка 2). То же можно отметить и для соотношения двух других фосфолипидов, а именно ФГ и ФЭ. Так для *P. perfoliatus* показано, что в зависимости от места сбора соотношение ФГ и ФЭ менялось значительно, тогда как для *P. lucens* и для *P. pectinatus* сохраняется преобладание какого-то одного фосфолипида, ФГ в случае *P. lucens* и ФЭ в случае *P. pectinatus*. Если сравнить фосфолипидный состав растений в зависи-

мости от экологической принадлежности, то и погруженные макрофиты и гелофитные растения показали достаточно широкую вариабельность в содержании практически всех главных фосфолипидов. Фосфатидилэтаноламин проявил большую стабильность. В плавающих гидрофитах, практически все фосфолипиды мало изменялись в зависимости от места обитания, за исключением фосфатидной кислоты.

Подводя итог, можно сказать, что основные липидные характеристики, а именно, состав нейтральных липидов с доминированием эфиров глицерина, качественный состав полярных липидов, является типичным для высших растений. Однако, изменения, зафиксированные нами в количественном составе липидов в зависимости от места обитания растений, такие как соотношение между моно-, ди- и тризамещенными эфирами глицерина, количество свободных жирных кислот, соотношение между количеством моно- и дигалактолипидов, а также, изменение содержания фосфолипидов, свидетельствуют о высокой пластичности данной группы растений, их высокой способности к внутренним перестройкам, что, по-видимому, и является причиной устойчивости данной группы растений. Изменения в составе липидов свидетельствует о том, что данная группа растений является достаточно чувствительной к изменениям среды обитания и возможности использования указанных характеристик в эколого-биохимических исследованиях. Однако применение этих показателей требует более подробных будущих исследований по изучению влияния конкретных антропогенных факторов на изменения липидного состава гидробионтов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брагинский Л.П. Принципы классификации и некоторые механизмы структурно-функциональных перестроек пресноводных экосистем в условиях антропогенного пресса // Гидробиол. журн. 1998. Т. 34. №6.
2. Вехов Н.В. Высшие водные растения как индикаторы состояния экологической обстановки на территории Воркутинского промышленного комплекса // География и природные ресурсы. 1993. Вып.1.
3. Воронихин Н.Н. Флора континентальных водоемов. М.: Наука, 1953.
4. Голубев В.Н. Механизмы взаимодействия пестицидов с липидным бислоем клеточных мембран // Успехи химии 1993. Т.62. №7.
5. Довбня И.В. Продукция высшей водной растительности Волжских водохранилищ / Пресноводные гидробионты и их биология. Л.: Наука, 1993.
6. Дубына Д.В., Шеляг-Сосонко Н.Р. Тенденции антропогенных смен водной растительности плавнево-литоральных геосистем Северного Причерноморья // Гидробиол. журн. 1996. Т.32. №5.
7. Золотухина Е.Ю., Гавриленко Е.Е., Бурдин К.С. Некоторые аспекты накопления и выведения ионов металлов водными макрофитами // Биологические науки. 1990. №12.
8. Иванова А.Б., Гордон Л.Х., Лыгин А.В. Роль структурных липидов в регуляции ионного транспорта растительных клеток // Цитология. 1997. Т.39. № 4/5.
9. Катанская В.М. Высшие водные растения континентальных водоемов СССР. Л.: Наука, 1991.
10. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975.
11. Кокин К.А. Экология высших водных растений. М.: МГУ, 1982.
12. Матвеев В.И. Динамика растительности водоемов Средней Волги. Куйбышев: Кн. изд-во, 1990.
13. Мережко А.И., Пасичная Е.А., Пасичный А.П. Биотестирование токсичности водной среды по функциональным характеристикам макрофитов // Гидробиологический журнал. 1996. Т.32. №1.
14. Новицкая Г.В., Астахова Н.В., Суворова Т.А., Трунова Т.И. Роль липидной компоненты мембран в устойчивости растений огурца к низкой температуре // Физиология растений. 1999. Т.46. № 4.
15. Павловский В.А., Розенберг Г.С. Государственный доклад о состоянии окружающей среды Самарской области в 1995г.

- Самара, 2000.
16. Папченков В.Г. О классификации макрофитов водоемов и водной растительности // Экология. 1986. № 6.
17. Розенберг Г.С., Стрелков А.К., Караваев Е.И. Предложения по улучшению состояния водной среды и экологической обстановки, характерные для Волжских городов и областей. Самара-Тольятти, 1995.
18. Северин С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии. М.: МГУ, 1989.
19. Скулачев В.П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.: Наука, 1962.
20. Флора Европейской части СССР. Л.: Наука, 1979. Т.4.
21. Френкель М.О. Структурно-функциональная организация межрегионального мониторинга бассейна реки Волги: Дисс. докт. географ. наук.
22. Шебунина Н.А. Поиск видов-индикаторов загрязнения водных экосистем хлорорганическими пестицидами // Гидробиол. журн. Т. 26. 1990.
23. Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С. Экологобиохимический мониторинг и экологобиохимическое тестирование в районах экологического неблагополучия // Известия АН СССР. Сер. биол. 1993. №1.
24. Ялынская Н.С., Лопотухин А.Г. Накопление тяжелых металлов в растениях рыбоводных прудов // Гидробиол. журн. Т.29. 1993. №1.
25. Dembitsky V.M., Rezanka T., Rozentsvet O.A. 1993. Lipid composition of three macrophytes from the Caspian Sea. Phytochemistry. 33.
26. Engel A.E., Macko S.A. *Organic Geochemistry. Principles and Applications*. Plenum Press, New York. 1993.
27. Grunwald C. Effect of free sterols, steryl esters and glycoside on membrane permeability. *Plant Physiol.* 1971.
28. Harwood J. Plant lipid biosynthesis. Fundamental and agricultur application. Cembridge university press. 1998.
29. Kabara J.I., Chen J.S. Microdetermination of lipids classes after thin-layer chromatography. *Analyt. Chem.* 48, 1976.
30. Kervin J.L. In: *Isopentenoids and other natural products: Evolution and Function*. ACS Symp. Ser. 562, (Nes, W.D., Ed), ACS Washington, DC., 1994.
31. Kuiper P.J.C. Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. *Physiol. Plant.* 1984.
32. Nevenzel J.C. Biogenic hydrocarbons of marine organisms. In: *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*, (Ackman, R.G., ed), CRC Press, FL. 1, 1989.
33. Peters K.E., Moldovan J.M. *The Biomarker Guide. Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*. Prentice Hall, New Jersey, 1993.
34. Rezanka T., Zahradnik J., Podojil M. Hydrocarbons in green and blue-green algae. *Folia Microbiol. (Bohem.)* 27, 1982.
35. Vaskovsky V.E., Vasendin I.M., Kostetsky E.Y. A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography*. 114, 1975.
36. Vokman A.T., Reveill A.P., Murray E. In: R. P. Eganhouse (Eds.), *Molecular Markers in Environmental Geochemistry ACS Symposium Series*. Washington, DC, 1997.

ECOLOGO-BIOCHEMICAL APPROACH TO THE STUDY OF HIGER WATER PLANT'S LIPIDS

© 2000 O.A. Rozentsvet¹, C.B. Saksonov², V.G. Kozlov¹, N.V. Koneva¹

¹ Institute of Ecology of the Volga River Basin of Russian Academy of Sciences, Togliatti

² Zhiguli State Reservation Named for I.I. Sprygin, Bakhilova Poliana

The composition of total, polar, and neutral lipids from 14 species freshwater grasses was studied. Variability of the plant's biochemical indicators depending on the species and habitat is discussed.

УДК 577.4

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К ДЕЙСТВИЮ КАДМИЯ У ГРИБА *PENICILLIUM LANOSO-COERALEUM*

© 2000 А.И. Шуткевич

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

В работе изложены результаты исследования механизмов адаптации к действию кадмия у гриба *Penicillium lanoso-coeraleum* на различных уровнях организации.

Изучение механизмов адаптации к постоянно изменяющимся условиям среды представляет определенный теоретический и практический интерес. Широкое антропогенное рассеивание металлов в экосистемах приводит к формированию новых геохимических провинций и созданию экстремальных условий для существования отдельных видов. С определенной степенью уверенности можно утверждать тот факт, что токсичные металлы выступают сегодня как один из факторов, лимитирующих развитие отдельных компонентов экосистем, приводя к утрате ими устойчивого существования на уровне отдельных организмов, видов и сообществ.

Цель настоящей работы - обобщить результаты исследований механизмов влияния кадмия и механизмов адаптации к его воздействию у гриба *Penicillium lanoso-coeraleum* (Thom).

Микромицеты являются важным компонентом как водных, так и наземных экосистем и осуществляют деструкцию органического вещества до простых соединений (Мюллер, Лёффлерб 1995). Основной их особенностью является экстраклеточный тип метаболизма высокомолекулярных соединений за счет экзоферментов.

Кадмий является одним из самых токсичных металлов (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989), активно используемых в промышленности, благодаря чему он широко рассеивается во внешней среде и оказывает существенное воздействие на устойчивое функционирование экосистем различного уровня организации и масштаба.

Материалы и методы

Клон микромицета *P. lanoso-coeraleum* был выделен из окружающей среды в лаборатории генетических основ устойчивости экосистем ИЭВБ РАН, видовое определение было подтверждено на кафедре микологии МГУ.

Культивирование и поддержание штамма дикого типа и полученных субклонов производилось на плотной и жидкой среде Чапека – Докса (Билай, 1973) при температуре 30° С. При культивировании в жидкой среде использовали орбитальный термостатируемый шейкер УВМТ-12-250 с частотой биения 75 об/мин.

Морфологические изменения колоний оценивались визуально, микроморфологические - с помощью микроскопов МБИ-15, МБС-10, поляризационно-интерферционного Биолар Р-1, Биолар и фиксировались с помощью микрофотографии на пленке Микрат М.

Разделение белков осуществляли в градиенте поликариламидного геля в денатурирующих условиях с SDS – 2-МЕ по Лемли и окрашивали с помощью СВВ R-250. Молекуллярную массу белков определяли с помощью низко- и высокомолекулярных стандартов фирмы Pharmacia Biotechnology. Осаждение мицелия и спор осуществляли с помощью центрифugирования на центрифугах К-23, К-26 и UP-65. Гомогенизацию образцов проводили в жидком азоте.

Кадмий в среду культивирования добавляли в виде хлорида кадмия в концентрациях от 250 мкМ до 5 мМ. Концентрацию кадмия в жидкой среде определяли методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии на AAS-3 в воздушно-ацетilenовой смеси.

Концентрацию белка и изменения оптических свойств культуральной среды определяли на спектрофотометре Spekord M-40 в ультрафиолетовой и видимой частях спектра (190 – 900 нм).

В работе были использованы отечественные реагенты квалификации ОСЧ и ХЧ, фирм Serva (Германия), Sigma (США), BDH (Великобритания), Ferrak (Германия), Reanal (Венгрия).

Полученные результаты

Первоначальным этапом исследований явилось получение субклонов, устойчивых к действию кадмия из клона дикого типа. Был использован метод генетической селекции на плотных средах с возрастающими концентрациями кадмия от 250 мкМ до 5 мМ. В ходе последовательной селекции были выделены субклионы, способные расти на среде, содержащей кадмий в концентрациях до 2 мМ. Изучались макро- и микроморфологические, физиологические и генетические изменения на уровне дифференциальной экспрессии генов, сохранение приобретенного признака устойчивости к действию кадмия в неселективных и селективных условиях.

На макроморфологическом уровне наблюдались следующие типы изменений. В отличие от дикого типа, колонии которого имели куполообразную форму с ровными краями и равномерной окраской, устойчивые к кадмию субклионы имели пикообразный центр, складчатую форму, фестончатые края и неравномерную окраску, которая ослабевала по направлению к периферии. Было обнаружено возникновение бесцветных колоний белого цвета.

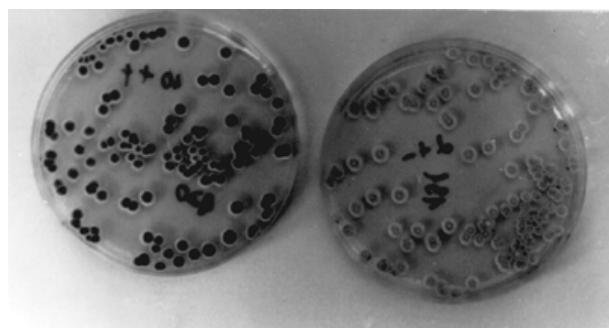
На микроморфологическом уровне у штаммов, устойчивых действию кадмия наблюдались следующие изменения. На первом этапе селекции устойчивые субклионы имели гифы спиралевидной формы, нарушалась целостность и структура клеточных оболочек: образовывались перетяжки и изменялась геометрия мицелия и конидий (рис.1). Наружение морфологии конидий проявлялось в виде изменения их размеров, строения и количества.

На физиологическом уровне были обнаружены следующие типы реакций. У первой

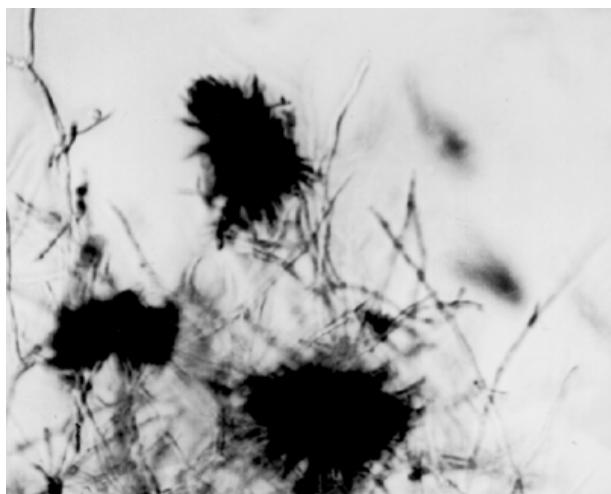


*Рис. 1. Изменение морфологии гриба *R. lanosocoeruleum* при адаптации к действию кадмия. Перетяжки на гифах и нарушение структуры конидиеносцев и конидий*

группы субклионы происходило торможения темпов развития и спороношение наступало на 20–32 часа позже дикого типа. Вторая группа субклионы практически не отличалась от дикого типа. Особый интерес представляет третья группа, у которой наблюдался кадмий-зависимый рост (рис.2), т.е. на среде без кадмия происходило торможение развития или полное отсутствие роста. Приобретенный признак устойчивости в неселективных условиях сохранялся на протяжении 160 генераций (время наблюдения). У некоторых субклионы были выделены депигментированные мутанты белого цвета, которые в свою очередь давали два основных типа: белые спороносящие и белые без спороношения, развивающиеся вегетативным способом. Колонии, не способные к спороношению, окрашивали субстрат в желтый цвет и не ревертировали в голубые (дикий тип). В то время как белые спороносящие колонии ревертировали в окрашенные с частотой 1к 856-872.



*Рис. 2. Кадмий зависимый эффект у гриба *R. lanosocoeruleum* с фенотипом Cd^R. На среде без кадмия рост и спороношение задерживаются (светлые колонии)*



*Рис. 3. Игольчатые Cd-содержащие кристаллы в жидкой среде при культивировании гриба *P. lanoso-coeruleum* с фенотипом Cd^R*

В ходе экспериментов была прослежена эволюция механизма взаимодействия гриба с кадмием. Первоначальный механизм заключался в связывании металла оболочкой клеток. В ходе последовательных генераций был выделен субклон, выделяющий во внешнюю среду низкомолекулярное соединение, связывающее кадмий и переводящее его в нерастворимую форму при pH от 4 до 8 в виде кристаллов. Спектрофотометрический анализ в ультрафиолетовой и видимых областях спектра позволил предположить, что этим соединением является промежуточный продукт синтеза меланина, который обеспечивал окраску колоний дикого типа. При этом гифы утрачивали способность связывать кадмий и



*Рис. 4. Cd-содержащие кристаллы по периферии колонии гриба *P. lanoso-coeruleum* при культивировании на плотной среде*

он осаждался на дне в виде тонкоигольчатых кристаллов (рис.3). При культивировании этого клона на плотной среде, кристаллы накапливались по периферии колоний (рис.4).

Использование метода электрофореза в градиенте ПААГ с SDS и 2-МЕ позволило выявить дифференциальную экспрессию генов под воздействием кадмия. Была выявлена дифференциальная экспрессия и репрессия генов связанных с процессами адаптации к действию кадмия, что подтверждено присутствием или отсутствием их продукта в виде белков с различной молекулярной массой и значением Rf.

При изучении эффектов кадмия на изменение метаболизма углеводородов из состава среды Чапека-Докса исключалась сахароза и вводились цитрат, лактат, ацетат. Было установлено, что клоны, устойчивые к действию кадмия ауксотрофны по признаку способности использовать цитрат.

Приобретенный признак устойчивости к кадмию сопровождался приобретением устойчивости к действию меди, марганца и рубидия в близких концентрациях, но не приводил к устойчивости к действию никеля и хрома.

Обсуждение результатов

Полученные результаты позволяют утверждать тот факт, что кадмий является одним из наиболее токсичных металлов, ограничивающих развитие отдельных компонентов водных сообществ. При этом его воздействие является полифункциональным и реализуется на различных уровнях организации биологических систем: молекулярном, генетическом и популяционном.

Наиболее интересным фактом является выделение клонов с различной степенью зависимости роста от присутствия в культуральной среде кадмия и эволюция механизма его детоксикации. Механизм такой адаптации может быть представлен в виде следующей цепи реакций.

Первоначальным является реакция кадмия с мукополисахаридами и сульфогидрильными группами белков оболочки клетки, что обеспечивает его детоксикацию. Однако его частичное проникновение во внутреннее

пространство клетки приводит к реализации мутагенных эффектов и взаимодействию с генетическим аппаратом. Для субклона, утратившего способность связывать кадмий оболочкой клетки это выражалось в приобретении нового механизма, позволяющего избегать прямого контакта с металлом за счет выделения хелатирующего агента. Изучение его оптических свойств и отсутствия пигментации у этого субклона позволяет утверждать, что этим продуктом является промежуточный субстрат синтеза меланина, который связывает кадмий и переводит его в нерастворимую форму.

Анализ дифференциальной экспрессии генов позволил выявить определенные белки, которые принимают участие в процессе адаптации к присутствию кадмия в окружающей среде. В соответствии с концепцией, предложенной Алтуховым и соав. (1996), выделены репрессибельные, индуцибельные и конститутивные гены, определяющие биологию вида и его фенотипическую изменчивость под действием селектирующего фактора и зависимость от его присутствия в среде обитания.

Использование в работе субклонов различного типа, полученных из одной споры показало, что токсическое воздействие кадмия приводит к изменению биоразнообразия на уровне вида, расширяет его адаптивные возможности за счет полифункционального воздействия металла. При этом субклоны обладающие положительной зависимостью роста от кадмия получают селективное преимущество в антропогенных экосистемах, в то время как не приобретшие механизмы, обеспечивающие устойчивость, элиминируются.

Классический генетический анализ

выявил возникновение ауксотрофности у отдельных субклонов, которая проявлялась в способности расти на различных субстратах, показал что кадмий затрагивает системы генов ответственных за катаболизм сахаров. Было обнаружено, что приобретение признака устойчивости к кадмию сопровождается утратой использовать цитрат и ацетат. Однако это фенотипический признак не устойчив и ревертирует.

Было обнаружено, что приобретение фенотипа устойчивости к кадмию также обеспечивает способность грибов расти на средах, содержащих медь, марганец и рубидий в концентрациях от 5 мкМ до 1,25 мМ, но не приводит к устойчивости к действию никеля и кобальта.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что адаптация к действию кадмия у низших эукариот реализуется на различных уровнях организации, приводит к различным изменениям на генетическом, морфологическом и популяционном уровнях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П., Корочкин Л.И., Рычков Ю.Г. Наследственное биохимическое разнообразие в процессах эволюции и индивидуального развития // Генетика. Т.32. 1996. №11.
2. Кабата-Пендас А., Пендас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989.
3. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1973.
4. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология. М.: Мир, 1995.

MECHANISMS OF ADAPTATION TO ACTIVITY OF CADMIUM AT FUNGI PENICILLIUM LANOSO-COERALEUM

© 2000 A.I. Shutkevich

Institute of Ecology of the Volga River Basin of Russian Academy of Science, Togliatti

In work the findings of investigation of the mechanism of adaptation to activity of cadmium at fungi Penicillium lanoso-coeraleum at various levels of organization enunciated.

АНАЭРОБНЫЙ РОСТ БАКТЕРИЙ НА МЕТАНЕ С FE(III) ВОССТАНОВЛЕНИЕМ, КАК ЭЛЕКТРОН-АКЦЕПТИРУЮЩИМ ПРОЦЕССОМ

© 2000 Ж.С. Потехина¹, Н.Г. Шерышева¹, И.А. Бычек-Гущина¹, Г. Готтшалк²

¹Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

²Институт микробиологии и генетики Геттингенского университета, Германия

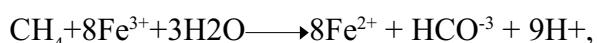
Метанокисляющие и Fe(III) восстанавливающие бактерии были выделены из анаэробных осадков реки Волги и горячих источников Камчатки. Увеличение титра клеток при культивировании в анаэробной среде сопровождалось продукцией Fe(II) в присутствии и отсутствии метана, но рост был более интенсивным, когда метан вводили в газовую фазу. Рост бактерий на оксигидроксидах сопровождался образованием черного осадка. На Fe(III) пирофосфате цвет раствора изменялся от желтого до темно-зеленого с последующим осветлением среды и формированием белого осадка (вивиантита). Изменения в соотношении фосфолипидов в фосфолипидной фракции бактерий выявлено в зависимости от культивирования в аэробных и анаэробных условиях.

В глубочайших слоях почв и вод, особенно в илах и придонных осадках кислород становится лимитирующим фактором, и огромное количество бактерий участвует в анаэробном разложении органического материала. Эти процессы ведут к образованию CO₂ и CH₄. Приблизительно один биллион тонн метана производится бактериями ежегодно. Большая часть метана окисляется бактериями, но около двух сотен миллионов тонн освобождается в атмосферу, что способствует разрушению озонового слоя. Биологическое окисление метана в анаэробных пресноводных, морских и гиперсоленных системах и анаэробных осадках является неоспоримым фактом, что демонстрировалось многочисленными исследованиями. Этот процесс чрезвычайно важен в контроле в атмосфере потоков метана, образующегося в экосистемах. Известно, что основная часть метана, образующегося при разложении органического вещества, связывается биологически в анаэробных условиях. Следовательно, микроорганизмы анаэробных сообществ являются мощным барьером в эмиссии метана в атмосферу. Проблема снижения потока метана в атмосферу требует изучения механизмов анаэробного связывания метана в водных и наземных экосистемах и, прежде всего, выявления ответственных за этот процесс микроорганизмов. Однако анаэробное биологи-

ческое окисление метана остается мало изученным метаболическим процессом. Организмы, осуществляющие связывание метана, до сих пор не идентифицированы, также не много известно о природе акцепторов электронов, вовлеченных в этот процесс. Цендер и Брок [1] высказали гипотезу, что сообщества, включающие метаногенные архебактерии могут быть ответственны за окисление метана в анаэробных экосистемах. Однако результаты, полученные в экспериментах по ингибированию метаногенов, показали, что анаэробное окисление метана связано с организмами, отличными от метаногенов а также сульфатредукторов [2]. Согласно Альперину, электрон-акцептор, используемый организмами, окисляющими метан анаэробно, должен присутствовать в зоне окисления метана и продуцировать отрицательное изменение свободной энергии в реакции с метаном. Такими возможными акцепторами электронов являются оксиды железа, оксиды марганца и S(0), восстанавливающиеся до S(IV). Это означает, что анаэробное окисление метана может осуществляться либо организмами, использующими оксиды металлов, либо восстанавливающими серосодержащие компоненты как акцепторы электронов. Недавно было высказано предположение, что анаэробное окисление метана связано с метаболическим шунтом метаногенов, продуциру-

ющих CO₂ и H₂ из метана [3], что термодинамически возможно, если парциальное давление H₂ держать низким с помощью H₂-потребляющих сульфатредуцирующих бактерий.

Было высказано предположение, исходя из известных данных об энергетической выгодности реакций восстановления окисленных соединений железа и из расчета, что при восстановлении окисленного железа одним молем метана выделяется энергия в – 425,76 кДж в реакции:



что такой процесс *in situ* могут осуществлять метанокисляющие бактерии, используя соединения трехвалентного железа как акцепторы электронов [4].

Важность микробиологических процессов, связанных с восстановлением Fe(III) и Mn (IV) соединений в природных экосистемах демонстрировалась в работах Лавли и др. [5-8]. Было показано, что Fe(III) восстановление функционирует как последняя ступень в анаэробной деградации органической материи. Показано, что Fe(III) - один из наиболее важных потенциальных акцепторов электронов в затопляемых почвах (9) и многих водных осадках [10]. Энзимы Fe(III) восстановителей катализируют процессы восстановления в не содержащих сульфиды анаэробных экосистемах [7]. Известно большое количество филогенетически разнообразных микроорганизмов, способных к анаэробному окислению органических и неорганических веществ, использующих Fe(III) соединения в качестве акцепторов электронов. *Aerobacter* sp., *Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa* окисляют сахар [11], *Geobacter metallireducens* - ароматические углеводороды и органические кислоты [12], *Pseudomonas* sp.- H₂ [13], штаммы рода *Pelobacter* - спирты (14,15). Метанол окислялся в сокультуре *Shewanella putrefaciens* и *Clostridium sphenoides* [16].

Данные ряда исследований [4,17,18] подтверждают гипотезу использования энергии Fe (III) восстановления в анаэробном окислении метана.

Способность к долговременному существованию двух коллекционных штаммов метанотрофных бактерий *Methylomonas*

methanica и *Methylomonas clara*, известных как "строгие" аэробы была сообщена в работе [18]. Анаэробную питательную среду готовили с 100 мМ Fe(III) оксигидроксидом как предполагаемым акцептором электронов. 20% метана вводили в газовую фазу, замещением азота. От 8-до 12% метана потребилось бактериями. Этот метаболизм обеспечил энергию поддержания бактерий в течение более чем двух лет.

В представленной работе мы изучали способность бактерий, выделенных из анаэробных осадков реки Волги, гейзеров Камчатки и музеиных штаммов, использовать ряд Fe(III) соединений, как электрон-акцепторов в анаэробных условиях. Метан, единственный донор электронов, вводился в газовую фазу. Железовосстановливающий штаммы рода *Shewanella* также исследовались в чистой культуре и в ассоциациях с метанотрофами и *Clostridium* sp.

Известно, что группа метанотрофных бактерий имеет ряд биохимических и физиологических особенностей и характеризуется наличием комплекса сложных цитоплазматических мембран. Фосфолипиды являются важнейшим компонентом мембран и выполняют важную роль в их структуре и функции. Фосфолипиды и жирные кислоты регулируют активность многих связанных с мембранами ферментов [19]. Изменение в составе мембранных липидов, как было сообщено, является важной реакцией организма на стресс [20]. Данные по индивидуальному фосфолипидному составу являются таксономически значимыми. В то же время вариабельность содержания отдельных фосфолипидов внутри фосфолипидного пула бактерий зависит от многих параметров таких как температура, pH, состав среды, в том числе и от условий культивирования. Мы провели сравнительные исследования фосфолипидного состава штамма NG-1 в аэробных и анаэробных условиях существования бактерий.

Материалы и методы

Инокулум для накопительных культур получен из образцов анаэробных осадков реки Волги. 5 мл каждого осадка суспендировали в 250 мл анаэробной основной сре-

ды в стеклянных бутылках и поставлялись в лабораторию. Среда содержала (в г/л дистиллированной воды): KNO_3 -1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,02; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ -1,5; KH_2PO_4 -0,7 (мг/л); EDTA-5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -2; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; $\text{MgCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ -0,003; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -0,2; $\text{CuCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -0,2; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -0,02; Na_2MoO_4 -0,03; H_3BO_3 -0,3. Аморфный оксигидроксид Fe(III) железа (в конечной концентрации приблизительно 100 мМ) был добавлен в среду. Газовая фаза над накопительной культурой состояла из $\text{CH}_4:\text{CO}_2:\text{N}_2$ в соотношении 40:10:50. Инкубировали при 30° С в темноте. Четыре чистые культуры были получены. Колонии образуются на агаровых косяках в течение 4-х дней. Колонии были розовые, бежевые и желтые.

Стандартная анаэробная техника использовалась в приготовлении среды и дальнейших исследованиях. После добавления резазурина среда кипятилась и немедленно охлаждалась в потоке азота. Затем разливалась по 50 мл в 120 мл бутылки и продувалась азотом. Бутылки закрывали резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками и автоклавировали при 121°С, 20 мин. 20мМ Fe(III) пирофосфат добавлялся в среду до автоклавирования, 20мМ цитрат - после автоклавирования из стерильного раствора, 100 мМ оксигидроксид - после отмывания в стерильной дистиллированной воде.

Использование метана как донора электронов изучалось сравнением роста численности бактерий и продукции Fe(II) при введении 20% метана в газовую фазу и без метана (контроль). Эксперименты выполнялись в двух повторностях.

Инокулят (10%) был добавлен из культуры, растущей на основной среде с метаном и Fe(III) оксигидроксидом.

В работе использовали штаммы NG-1 NG-2, выделенные из накопительной культуры метанотрофных бактерий анаэробных осадков реки Волги, К-2, ПД12, выделенные из гидротерм Камчатки. Штамм *Shewanella putrefaciens* DSM 9461 был получен из немецкой коллекции микроорганизмов, *Shewanella* sp. выделен из почв. Штамм *Methylomonas methanica* 12, получен из Всесоюзной коллекции микроорганизмов.

Среда для культивирования бактерий содержала (г/л): пирофосфат Fe(III) –10; NaH_2PO_4 – 0,6; NH_4Cl – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KCl – 0,1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; витаминов раствор (21) – 10 мл; микроэлементов (22) - 3 мл; pH 7,0 -7,5.

Среда с добавлением резазурина кипятилась и дезаэрировалась потоком 100% N_2 , затем разливалась с помощью газонепроницаемых шприцов в заранее простилизованные анаэробные пробирки. Предварительно продутая потоком азота бактериальная суспензия вводилась в пробирки с анаэробной средой из расчета 0,2 мл инокулята на 2 мл среды, остаточный O_2 связывали цистеином. 12% азота из газовой фазы каждой пробирки замещали таким же количеством смеси метана и CO_2 , в соотношении 90:10 .

Культивирование бактерий осуществляли при Т° 30°С в стационарных условиях и после 10 суток с перемешиванием среды на качалках.

Аналитическая техника

Fe(III) восстановление определялось измерением продукции Fe(II) в течение эксперимента. Количество Fe(II) растворенного после 15 мин. в 0,5 N HCl определялось с феррозином [23].

Концентрация метана измерялась хроматографически, на газовом хроматографе, модель 437А. Использовалась колонка с поропаком QS Milpore Corporation. Длина колонки 1,5 м, расход газа 25 мл/мин. При Т° пламенного ионизационного детектора 110° С.

Количество метана определяли на интеграторе CJ-100, используя внутренний стандарт 10% метан.

Число клеток определяли микроскопированием, прямым счетом в камере Горяева.

Клетки из 250 мл суспензии отделяли центрифугированием. Липиды экстрагировали по методу Блайда и Дайера [24]. Фосфолипиды разделяли на фракции на силикагелевых пластинках размером 60x60 мм с закрепленным слоем методом двумерной тонкослойной хроматографии в следующих системах растворителей: хлороформ–метанол–бензол-ацетон-27% NH₄OH (65:30:10:6) и

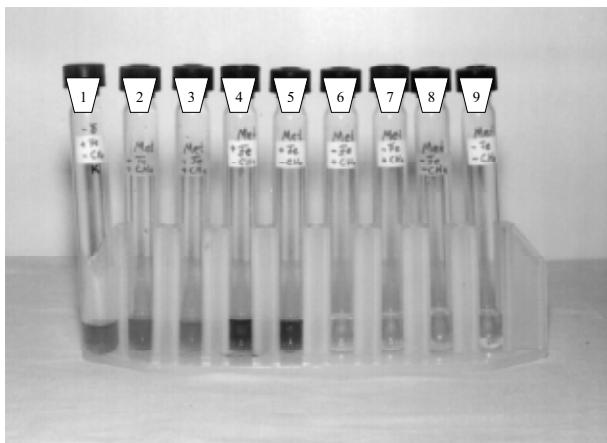


Рис. 1. Восстановление Fe(III) пирофосфата штаммом *Methylovonas methanica*:
1 – контроль без бактерий + $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 2,3 – бактерии + $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 4,5 – бактерии + $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 6,7 – бактерии – $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 8,9 – бактерии – $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$

хлороформ-метанол-бензол- $\text{HCO}_2\text{H} - \text{H}_2\text{O}$ (70:30:10:5:4:1). Метод Васьковского использовали для количественного определения фосфолипидов [25].

Результаты

Выявлены общие, характерные для всех изучаемых чистых штаммов, особенности роста и продукции Fe(II) в условиях эксперимента.

В средах с пирофосфатом железа и метаном в газовой фазе регистрировалось Fe(III) восстановление по изменению цвета среды с соломенно-желтого до темно-зеленого с

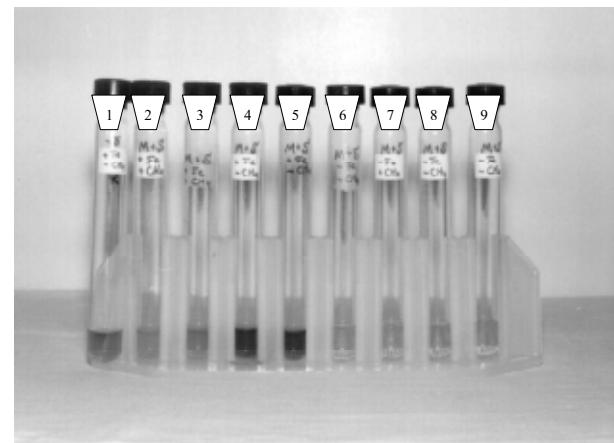


Рис. 3. Восстановление Fe(III) пирофосфата штаммами *M. Methanica* и *Sh. putrefaciens*:
1 – контроль без бактерий + $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 2,3 – бактерии + $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 4,5 – бактерии + $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 6,7 – бактерии – $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 8,9 – бактерии – $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$

последующим осветлением среды и образованием белого осадка (рис.1-4). Fe(III) пирофосфат полностью восстановился и около 25% начальной концентрации метана окислилось метанотрофами (рис.5).

Титр клеток увеличился с 4×10^7 клеток/мл до $12-30 \times 10^7$ клеток/мл (рис.6). Белый осадок восстановленного железа включал кристаллы вивианита (рис.7).

В вариантах с пирофосфатом железа и без метана в газовой фазе цвет среды изменялся с соломенно-желтого до темно-зеленого (рис.1-4). Химическими анализами регистрировалось 40 -60% восстановления пирофос-

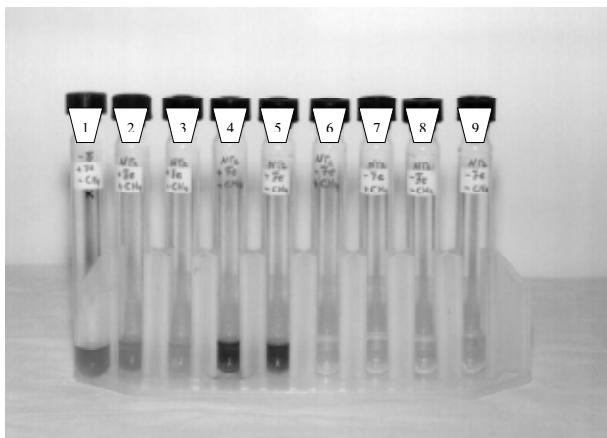


Рис. 2. Восстановление Fe(III) пирофосфата штаммом NG-2:
1 – контроль без бактерий + $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 2,3 – бактерии + $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 4,5 – бактерии + $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 6,7 – бактерии – $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 8,9 – бактерии – $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 0 – контроль без бактерий – $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$



Рис. 4. Восстановление Fe(III) пирофосфата штаммом *Shewanella putrefaciens*: 1 – контроль без бактерий + $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 2,3 – бактерии + $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 4,5 – бактерии + $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 6,7 – бактерии – $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$; 8,9 – бактерии – $\text{Fe(III)} - \text{CH}_4$; 0 – контроль без бактерий – $\text{Fe(III)} + \text{CH}_4$

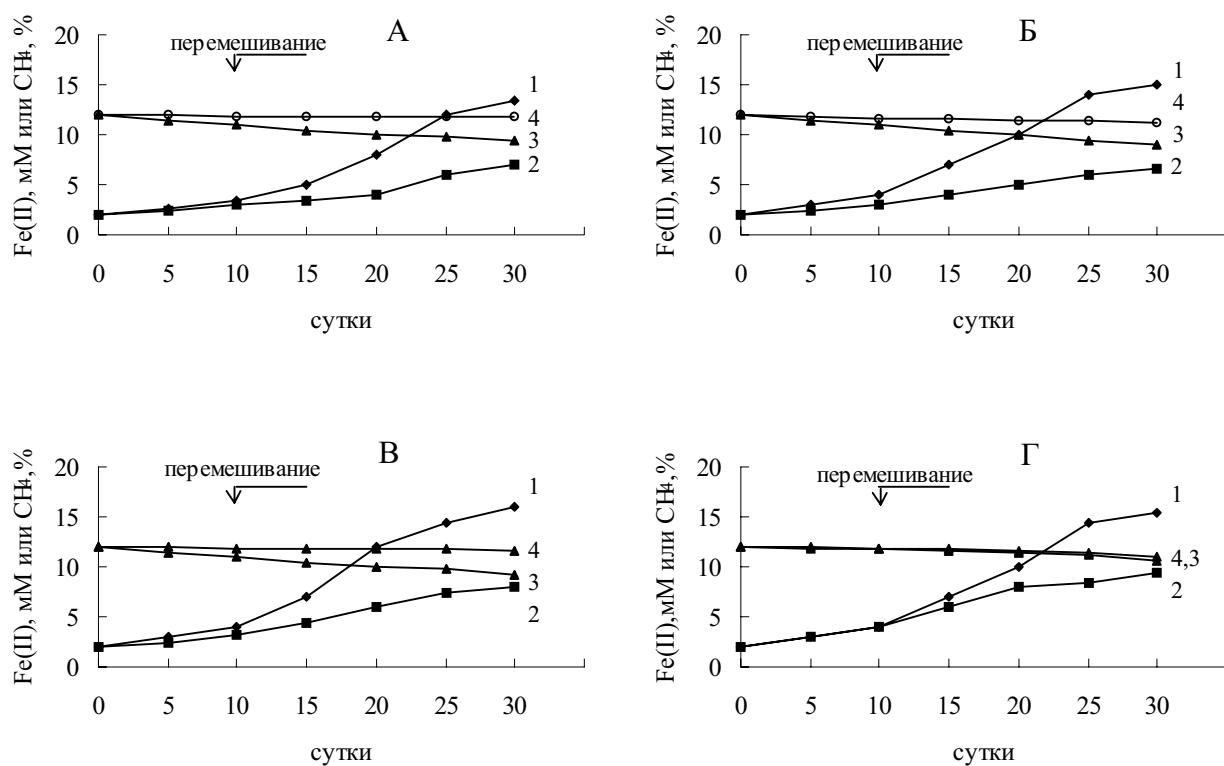


Рис. 5. Продукция Fe(II) и потребление метана штаммами:

A – M. methanica, Б – NG-2, В – K-2, Г – Sh. putrefaciens:

1 – Fe(II) на среде с метаном; 2 – Fe(II) на среде без метана;

3 – метан на среде с Fe(III) пирофосфатом; 4 – метан на среде без Fe(III) пирофосфата

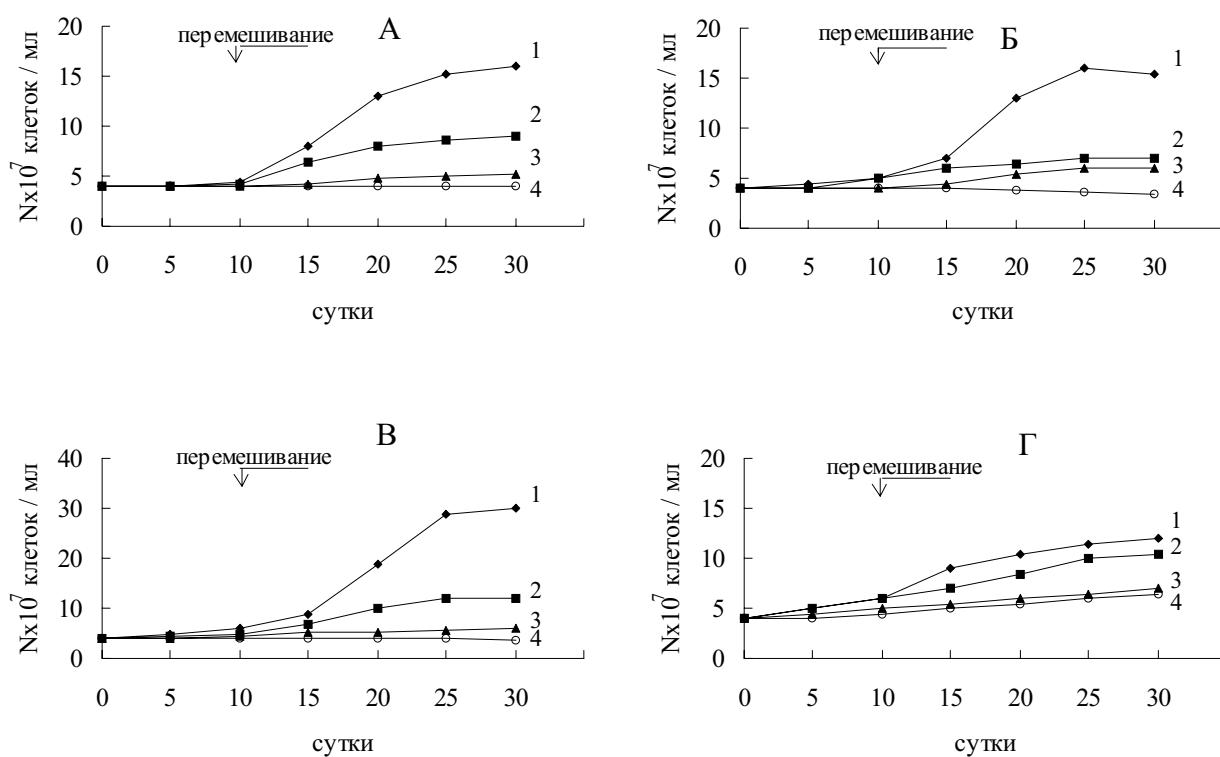


Рис. 6. Анаэробный рост бактерий: А – M.methanica, Б – NG-2, В – K-2, Г – Sh. putrefaciens:

1 – титр клеток в среде с Fe(III) пирофосфатом и метаном; 2 – титр клеток в среде без Fe(III) пирофосфата;

3 – титр клеток в среде с Fe(III) пирофосфатом без метана;

4 – титр клеток в среде без Fe(III) пирофосфата и метана

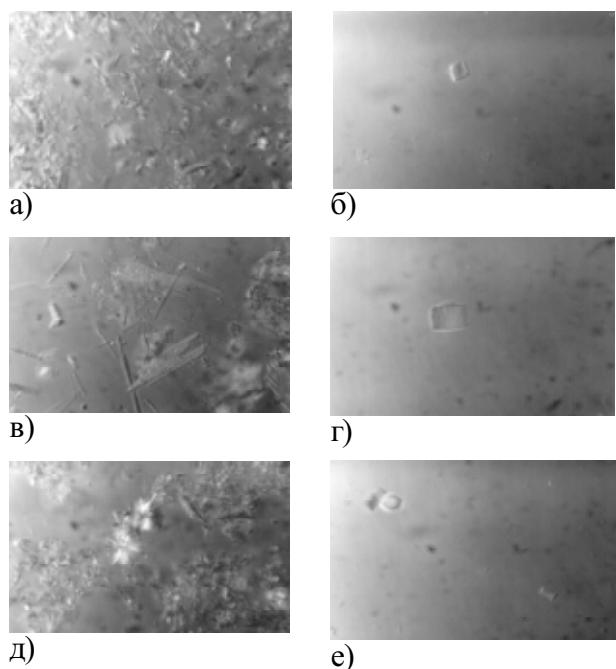


Рис. 7. Кристаллы вивианита, образовавшиеся в присутствии метана в газовой фазе при восстановлении Fe(III) пирофосфата штаммами: а - *M.methanica*; б - НГ-2; в - К-2. Восстановление Fe(III) пирофосфата без метана в газовой фазе: г - *M. Methanica*; е - *NГ-2*; е - *K-2*

фата (рис.5) и наблюдался существенно меньший прирост численности клеток (рис.6).

В средах без пирофосфата железа, но с метаном в газовой фазе окислилось около 3% метана (рис.5), прирост биомассы был незначительный (рис.6).

В средах без пирофосфата железа и без метана не происходило никакого увеличения численности клеток (рис.6). В отсутствие бактерий в среде (контроль) не наблюдалось изменения цвета среды, восстановления пирофосфата, и окисления метана.

Штамм НГ-1 рос, окисляя 20-25 % метана от начальной концентрации и восстанавливая все три Fe(III) соединения (рис.8). Увеличение титра клеток коррелировало с продукцией Fe(II), рост титра клеток был более интенсивным на всех Fe(III) соединениях, когда газовая фаза содержала метан. Не было значительного окисления метана, однако были существенные отличия в продукции Fe(II): до 20 мМ при культивировании с метаном и 8-10 мМ в вариантах без метана.

Рост бактерий на оксигидроксида сопровождался формированием черного осадка. На пирофосфате происходило изменение цвета

среды от соломенно-желтого до зеленого с последующим осветлением надосадочной жидкости и формированием белого осадка восстановленного железа при культивировании с метаном. В вариантах без метана цвет изменялся с соломенно-желтого до темно-зеленого.

В фосфолипидной фракции бактерий штамма НГ-1 были найдены следующие компоненты: фосфотидилхолин(ФХ), фосфотидилэтаноламин(ФЭА), фосфатидилглицерин(ФГ), дифосфатидилглицерин (ДФГ), фосфатидилсерин(ФС) и неидентифицированный X-липид (табл.1). Количественное соотношение фосфолипидов во фракции значительно варьировалось в зависимости от условий культивирования штамма. Так, культивирование в анаэробной среде сопровождалось возрастанием содержания ДФГ, ФХ, ФГ и х-

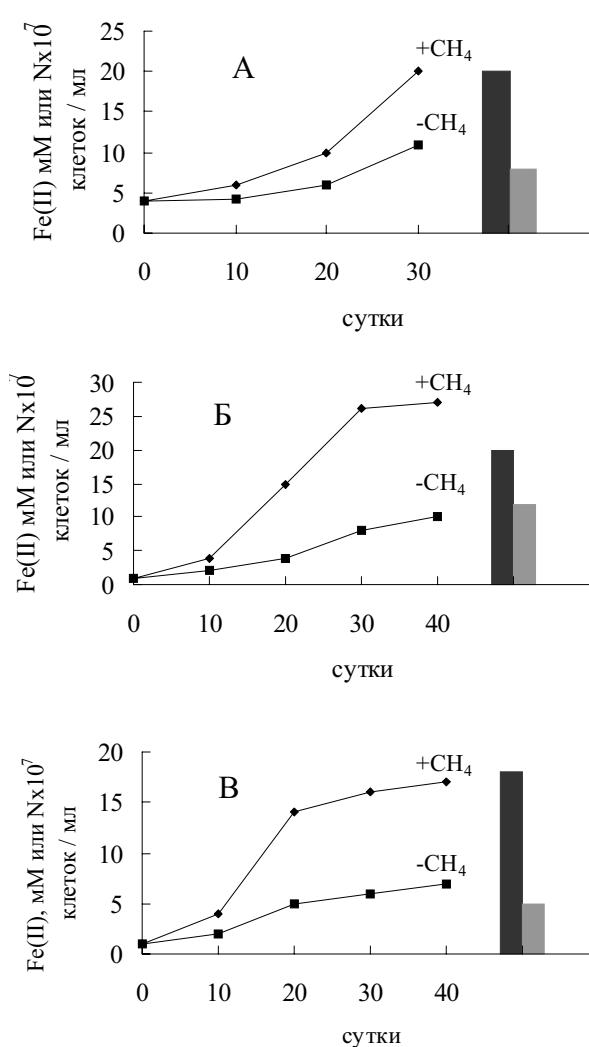


Рис. 8. Продукция Fe(II) и бактериальный рост штамма НГ-1 на среде с Fe(III) пирофосфатом - А, гидроксидом железа - Б и цитратом железа - В

Таблица1. Соотношение фосфолипидов штамма НГ-1 в аэробной и анаэробной культуре

Условия эксперимента	Состав фосфолипидной фракции					
	ФХ,%	ФЭА,%	ФГ,%	ДФГ,%	ФС,%	X,%
Аэробные	6.3	26.3	5.8	36.8	22.6	2.1
Анаэробные	9.2	15.0	8.2	49.0	10.4	8.2
Анаэробные +Fe(III)пирофосфат	1.0	20.9	8.1	50.2	11.5	8.3
Анаэробные +Fe(III) оксигидроксид	8.0	28.7	9.9	35.7	16.4	1.3

липida и уменьшение содержания ФЭА, ФС. Добавление Fe(III) пирамиофосфата не повлияло существенно на соотношение фосфолипидов в анаэробной культуре. За исключением ФХ, количество которого сильно увеличилось. В противоположность этому количественное соотношение фосфолипидов бактерий, растущих с Fe(III) оксигидроксидом, и аэробной культуры было схожим, за исключением ФГ и ФС.

Штаммы ПД12 и Clostridium sp. не росли на метане в анаэробных условиях (рис.9).

Однако, при совместном культивировании прирост численности бактерий составил 25×10^7 клеток в мл среды на метане и пирамиофосфате, 19×10^7 клеток в мл на пирамиофосфате без метана и столько же на метане без пирамиофосфата уже за первые сутки культивирования. Рост титра бактерий в среде без метана и без Fe(III) пирамиофосфата не наблюдался. Существенно вырос титр клеток Shewanella sp. в сокультуре с Clostridium sp. (рис.9). Интересным является факт, что в данном случае, в отличие от сокультуры Clostridium sp. с метанотрофом ПД-12, констатирован примерно одинаковый прирост численности клеток в средах содержащих и не содержащих метан и пирамиофосфат железа.

Обсуждение и выводы

Исследование метанотрофных бактерий, выделенных из анаэробных осадков, очень важно для выяснения механизма окисления

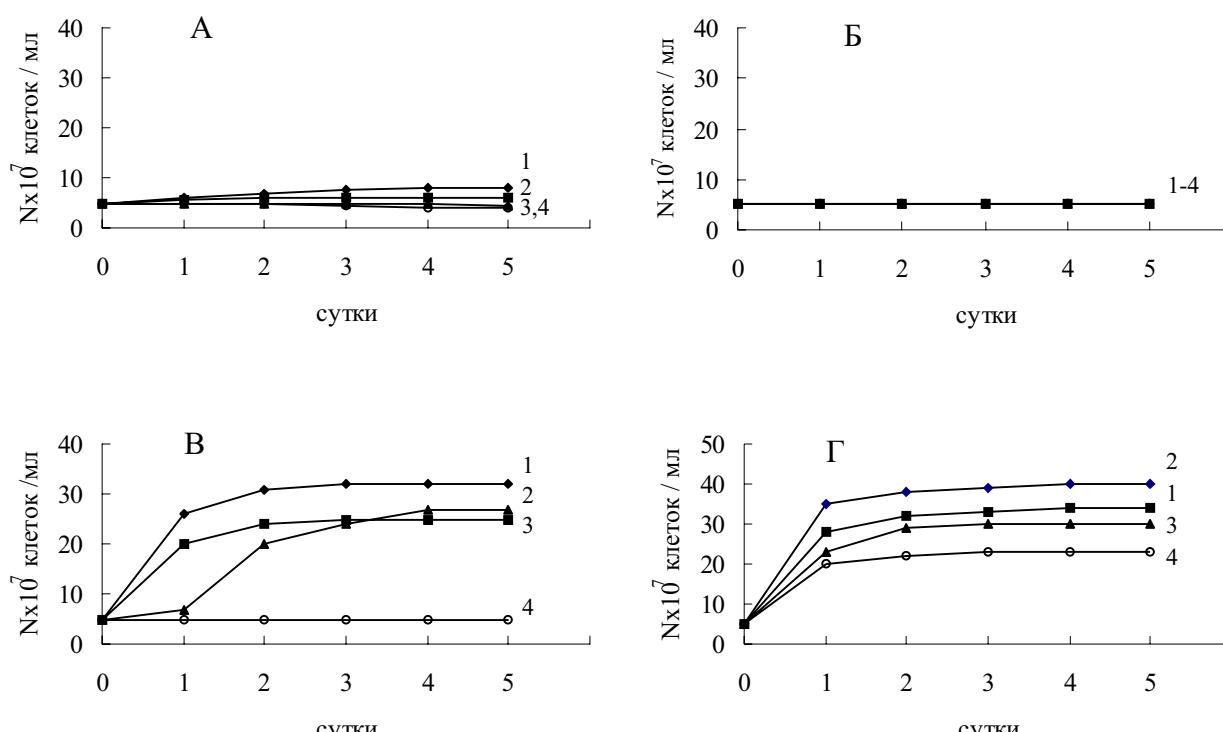


Рис. 9. Анаэробный рост бактерий: А-ПД-12;
Б – Clostridium sp., В – ПД-12 и Clostridium sp.; Г - Clostridium sp. и Shewanella sp.:
1 – титр клеток в среде с Fe(III) пирамиофосфатом и метаном;
2 – титр клеток в среде с Fe(III) пирамиофосфатом без метана;
3 – титр клеток в среде без Fe(III) пирамиофосфата с метаном;
4 – титр клеток в среде без Fe(III) пирамиофосфата без метана

и ассоциации С1-соединений в экосистемах.

Исследования, проведенные на чистых штаммах метанотрофных бактерий, показали полное восстановление Fe(III) соединений в среде, с продукцией 15–20 мМ Fe(II), сопровождающееся ростом численности бактерий и окислением метана в газовой фазе. Следовательно, бактерии получают энергию для поддержания и роста из диссимиляционной Fe(III) редукции, и могут использовать в дыхательном метаболизме не только O_2 , но и Fe(III) соединения. Существование бактерий в бескислородных условиях было связано с восстановлением Fe(III) соединений и снижением содержания метана в газовой фазе. Доказательством того, что энергия, освобождающаяся при окислении метана, используется микроорганизмами в конструктивном метаболизме является то, что больше бактериальных клеток синтезируется, если метан добавлен. Результаты, полученные на штаммах, выделенных из Волги, являются свидетельством биологического анаэробного связанных с Fe(III) редукцией окисления метана, образующегося при метаногенезе в анаэробных осадках реки.

Не регистрировалось потребление метана железовосстанавливающим штаммом *Shewanella putrefaciens* и не установлено какой субстрат использовали бактерии в качестве донора электронов.

Необходимо отметить, что процесс окисления метана чистыми культурами в лабораторных условиях слабый и требует длительного контакта жидкой и газообразной фазы при интенсивном перемешивании и оптимальной температуре. Такие условия маловероятны в природных экосистемах. Совместное культивирование бактерий в ассоциациях привело к интенсивному росту бактерий ПД12 и *Clostridium*, *Shewanella* sp. и *Clostridium* sp. Повидимому, значительное окисление метана в анаэробных природных экосистемах можно объяснить тем, что процесс осуществляется в сообществах микроорганизмов со сложными синтрофными взаимосвязями, где важной составляющей являются адаптированные к анаэробиозу и способные не только окислять метан но и восстанавливать Fe(III) соединения, метанотрофные бактерии.

Мы обнаружили существенное увеличение количества ДФГ в фосфолипидной фракции в анаэробной культуре. Известно, что ДФГ локализуется исключительно на внутренних мембранах митохондрий эукариот и играет важную роль в организации и функционировании электрон-транспортной цепи. Его роль в мембранах прокариот менее ясна. Можно предположить, что ДФГ участвует в перестройке мембран и реорганизации электрон-транспортной цепи, связанной с адаптацией бактерий к существованию в бескислородных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zehnder A.I.B., Brock T.D. Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology // Appl. Environ. Microbiol. 1980. V.39.
2. Alperin M.J., Reburgh W.S. Inhibition Experiments on Anaerobic Methane Oxidation // Appl. Environ. Microbiol. 1985.
3. Hoeler T.M., Alperin M.J., Albert D.B., Martens C.S. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium // Global Biogeochem. Cycles. 1994. V.8.
4. Потехина Ж.С., Уманская М.В., Васнева Ж.П. Анаэробный рост *Methylomonas methanica* 12 на среде с окисленным соединением железа // Доклады Академии Наук СССР. 1990. Т. 315. №3.
5. Lovley D.R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // Microbiol. Rev. 1991. V.55.
6. Lovley D.R. Magnetite formation during microbial dissimilatory iron reduction // In: Frankel R.B., Blakemore R.P. (eds). Iron biominerals. Plenum Press, New York. 1991.
7. Lovley D.R., Phillips E.J.P., Lorengau D.J. Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments // Environ. Sci. Technol. 1991. V.25.
8. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V.51.
9. Miura Y., Watanabe A., Murase J., Kimura M. Methane production and its fate in paddy fields. 2. Oxidation of methane and its coupled

- ferric oxide reduction in subsoil // *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 1992. V.38.
10. *Potekhina J.S.* The role of Fe (III) reduction in anaerobic processes // In JP Belaich, M. Bruschi and JL.Garsia (ed.) *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer*, Plenum Publishing Comp., New York. 1990.
 11. *Bromfield S.M.* Reduction of ferric compounds by soil bacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1954. V.11.
 12. *Lovley D.R., Lonergan D.J.* Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15 // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V.56.
 13. *Балашова В.В., Заварзин Г.А.* Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией // *Микробиология*. 1979. Т.48.
 14. *Lovley D.R., Phillips E.J.P., Lonergan D.J., Widman P.K.* Fe (III) and S⁰ reduction by Pelobacter carbinolicus // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V.61.
 15. *Lonergan D.J., Jenter H., Coates J.D., Schmidt T., Lovley D.R.* Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe (III)-reducing bacteria // *J. Bacteriol.* 1996. V.178.
 16. *Daniel R., Warnecke F., Potekhina J.S., Gottschalk G.* Identification of the syntrophic partners in a coculture coupling anaerobic methanol oxidation to Fe(III) reduction // *FEMS Microbiol. Letters*. 1999. V.180.
 17. *Potekhina JS.* Anaerobic reducion of iron(III) oxyhydroxide by *Methylomonas methanica*. // 7-th Inter. Congr. of Bacteriol. and Appl. Microbiology Division. Czech. Rep. Prague. July 3-8. Abstr.book. 1994.
 18. *Potekhina JS. Gottschalk G.* Existence of *Methylomonas methanica* and *Methylomonas clara* under anaerobic conditions // 8-th Intern. Sympos. on Microbial Growth on C1 compounds. California. San Diego. 27 August-1 September. Abstr. book. 1995.
 19. *Mackie R.I., White B.A. and Bryant M.P.* Lipid metabolism in anaerobic ecosystems // *Microbiology*. 1991. V.17.
 20. *Heipieper H.J., Weber F.J., Sikkema J., Kewelon H., de Bont J.A.* Mechanism behind resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 1994. V.12.
 21. *Wolin E.A., Wolfe R.S., Wolin M.S.* Viologen dye inhibition of methane formation by *Methanobacterium omelianskii* // *J. Bacteriol.* 1964. V.87.
 22. *Pfennig N., Lippert K.D.* Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototroper Schwefelbakterien // *Arch. Microbiol.* 1966. V.55.
 23. *Lovley D.R., Phillips E.J.P.* Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the fresh water tidal Potomac River // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986. V.52.
 24. *Bligh E.G., Dyer W.J.* // *Canad. J. Biochem. Physiol.* 1959. V.37.
 25. *Vaskovsky V.E., Latyshev N.A.* // *J. Chromatogr.*, 1975. V.115.

ANAEROBIC GROWTH BACTERIA ON METHANE WITH FE(III) REDUCTION AS ELECTRON ACCEPTING PROCESS

© 2000 J.S. Potekhina¹, N.G. Sherisheva¹, I.A. Bychek-Guchina¹, G. Gottschalk²

¹ Institute of Ecology of the Volga River Basin of Russian Academy of Sciences, Togliatti

² Institute of Microbiology and Genetic Georg-August University, Gottingen, Germany

Methanotrophic and Fe(III) reducing bacterium, were isolated from sediments of Volga River and from hot springs of Kamchatka. Bacteria grew by the oxidation of CH₄ coupled to reduction of Fe(III) compounds. The increase in cell numbers coincided with the production of Fe(II) in the presence and absence of CH₄, but the growth of bacteria was more intensive when CH₄ was added. Growth of bacteria on ferric oxyhydroxide resulted in the formation of a black precipitate. On ferric PPi reduction was observed as a change in the medium colour from yellow to green to a clearing of the medium and the formation of a white precipitate. The changes of phospholipid content in aerobic and anaerobic cultivation conditions were shown.