

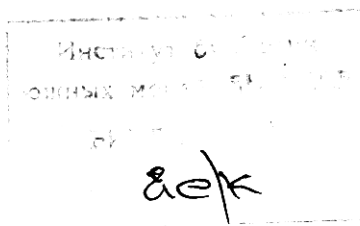
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

Экология моря

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1980 г.

Выпуск 6



DETECTION OF NEW COMPONENTS OF CELL METABOLIC POOL IN THE WATER ENVIRONMENT

Summary

The paper deals with experimental analysis of habitats of the unicellular algae *Nephrochloris salina* Carter, *Platymonas viridis* Rouch, *Gymnodinium lanskaya* Rouch, *Chlorella vulgaris* Beyer, and *Euglena gracilis* Klebs, as well as the yeast *Candida utilis* with the view of detecting the substances of organic nature appearing in the environment due to the cells vital activity. The purine and pyrimidine bases, polysaccharides, substances of lipid nature and amino acids appear in the environment in the process of cell culture incubation. The appearance of cell metabolites in the water environment should be connected with transmembrane transfer which may be implemented both by means of specific translocases and due to conformational reconstructions of cell membranes as well as owing to passive diffusion.

УДК 577.152.3:551.464.791.7

В. Л. БАЗЕЛЯН

СЕЗОННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СКОРОСТИ ГИДРОЛИЗА РАСТВОРИМЫХ В МОРСКОЙ ВОДЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ β -АМИЛАЗЫ

Морские водоросли — одноклеточные и макрофиты — прижизненно и посмертно выделяют в воду 25—35% синтезированного ими органического вещества [11]. Содержание растворимых углеводов в общем фонде РОВ достигает в зарослях макрофитов 30% на поверхности и 60% у дна [6]. В прибрежной зоне их концентрация нередко равна 1—2 мг/л [19], достигая иногда 8 мг/л [16], причем значительная часть представлена полимерными молекулами, молекулярная масса которых достигает 200 000 [10].

Кроме полисахаридов в составе внешних метаболитов морских водорослей и бактерий значительный интерес с точки зрения биохимии и экологии представляют пептиды и особенно высокомолекулярные белки ввиду их важных ферментативных свойств, проявляющихся и во внешней среде [12]. Так, например, амилалитическая активность ферментов в воде эвтрофного водоема — залива Куршю-Марес — на протяжении всего летнего периода 1970 г. колебалась от 1,22 до 14,6 ед/л [5]. Относительный показатель амилалитической активности, определенный по степени гидролиза крахмала, составлял от 3 до 6% для открытых вод Тихого океана и 1,5—3% для вод апвеллинга [3].

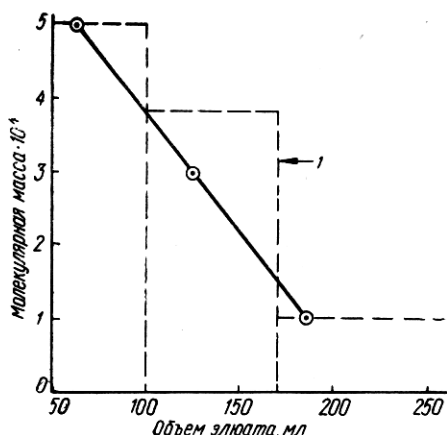
Имеются основания предполагать, что внешнеметаболический комплекс РОВ представляет собой сбалансированную биохимическую систему, в которой приход РОВ за счет прижизненных и посмертных выделений водорослей и бактерий равен убыли этих веществ в значительной мере за счет ферментативного гидролиза. Однако концентрация РОВ [13], активность внеклеточных ферментов [5, 15] и количество микроорганизмов [14], обладающих амилалитической активностью, существенно колеблются в зависимости от времени года.

Исходя из сказанного, задачей настоящей работы было изучение возможности гидролиза растворимых полисахаридов в морской воде под действием β -амилазы, а также изменение скорости гидролиза в зависимости от сезона года.

Материал и методы. *Выделение растворимых полисахаридов.* Водорастворимые ^{14}C -полисахариды с молекулярной массой $\geq 50\,000$ вы-

деляли из талломов *Enteromorpha linza* по описанной ранее методике [2].

Гидролиз ^{14}C -полисахаридов. Гидролиз полисахаридов вели в морской воде в присутствии толуола при 20°C в течение 1 ч. Концентрация полисахаридов составляла 4 мг/л, β -амилазы фирмы «Мерк» — 0,2 мг/л (6 ед.). Морскую воду отбирали на глубине 0—50 см и фильтровали непосредственно перед



Калибровочные данные для колонки с гелем Г-75:

1 — границы выхода полисахаридов определенной молекулярной массы.

построена на основании данных по выходу полисахаридов определенной молекулярной массы для данной колонки.

Результаты и обсуждение. При проведении опытов по выяснению возможности гидролиза растворимых полисахаридов в морской воде под действием β -амилазы вскоре было выяснено, что получаемые результаты существенно отличаются, если использовалась морская вода, отобранная в разных местах и в различное время года. В этой связи предполагалось, что в морской воде присутствуют вещества, изменяющие активность β -амилазы (ингибиторы и активаторы), либо ферменты, обладающие амилолитической активностью. Действительно, строгая стандартизация опытов позволила обнаружить сезонный характер изменения активности β -амилазы в морской воде.

Полученные данные (табл. 1—4) свидетельствуют о том, что скорость гидролиза полисахаридов в морской воде в разные сезоны года

проводили непосредственно перед опытом через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм. Время отбора проб: январь—февраль, апрель—май, июль—август, октябрь—ноябрь 1976 г. Гидролиз прерывали добавлением ТХУ на холоду. Гидролизат наносили на колонку с нейтральным сефадексом Г-75 ($h=50$ и $d=2,3$ см). Элюирование проводили бидистиллированной водой, собирая фракции по 5 мл для последующей радиометрии [2].

Параллельно проводили гидролиз полисахаридов в буферном растворе, рН которого равно рН морской воды.

Градуировка колонки по молекулярным массам. Методика градуировки колонки описана в работе [2]. Калибровочная кривая (рисунок)

Таблица 1

Распределение ^{14}C -полисахаридов по молекулярной массе после гидролиза под действием β -амилазы в буферном растворе и морской воде в весенний период

Молекулярная масса	Единицы измерения	Среда			Разница между	
		К*	Б*	О*	Б и К	О и К
$\geq 5 \cdot 10^4$	нмп/мин	19788	18709	18731	1073	1057
	%	95,4	90,2	90,3	5,2	5,1
	мг/л	3,816	3,608	3,612	0,208	0,204
$\geq 3 \cdot 10^4$	нмп/мин	954	1330	1970		
	%	4,6	6,41	9,5	1,81	4,9
	мг/л	0,184	0,256	0,380	0,072	0,196
$\leq 3 \cdot 10^4$	нмп/мин	0	703	41		
	%	0	3,39	0,2	3,39	0,2
	мг/л	0	0,136	0,008	0,136	0,008

* Здесь и в табл. 2—5 К — контроль выхода полисахаридов с $M_n \geq 5 \cdot 10^4$, Б — гидролиз полисахаридов в буферном растворе, О — гидролиз полисахаридов в морской воде.

Таблица 2

Распределение ^{14}C -полисахаридов по молекулярной массе после гидролиза под действием β -амилазы в буферном растворе и морской воде в летний период

Молекулярная масса	Единицы измерения	Среда			Разница между	
		К	Б	О	Б и К	О и К
$\geq 5 \cdot 10^4$	имп/мин	19836	18637	18604	1199	1232
	%	95,33	89,67	89,82	5,66	5,51
	мг/л	3,813	3,587	3,588	0,266	0,255
$\geq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	971	1422	2032		
	%	4,67	6,81	9,81	2,14	5,14
	мг/л	0,187	0,274	0,392	0,087	0,205
$\leq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	0	725	76		
	%	0	3,52	0,37	3,52	0,37
	мг/л	0	0,139	0,020	0,139	0,020

достоверно различается (табл. 5) и составляет соответственно 204, 225, 236, 258 мкг/л в час весной, летом, осенью и зимой. На основании этих данных можно предположить, что за счет присутствующих в морской воде ферментов идет постоянная деградация полисахаридов, причем скорость гидролиза носит сезонный характер. Одним из вероятных факторов, влияющих на изменение скорости гидролиза полисахаридов, а соответственно и активности ферментов, может быть, кроме

Таблица 3

Распределение ^{14}C -полисахаридов по молекулярной массе после гидролиза под действием β -амилазы в буферном растворе и морской воде в осенний период

Молекулярная масса	Единицы измерения	Среда			Разница между	
		К	Б	О	Б и К	О и К
$\geq 5 \cdot 10^4$	имп/мин	19821	18583	18552	1238	1269
	%	95,51	89,8	89,6	5,71	5,91
	мг/л	3,820	3,592	4,584	0,228	0,236
$\geq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	932	1395	2075		
	%	4,49	6,74	10,02	2,25	5,53
	мг/л	0,180	0,270	0,401	0,153	0,221
$\geq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	0	713	78		
	%	0	3,46	0,38	3,46	0,38
	мг/л	0	0,138	0,015	0,138	0,015

температуры и токсинов водорослей, сезонное изменение численности бактерио- и фитопланктона в разные сезоны года. Повышение скорости гидролиза полисахаридов в летне-осенний период обусловлено, вероятно, массовым развитием фитопланктона [4], тогда как наивысшая скорость гидролиза (258 мкг/л в час) в зимний период (табл. 5) со-

Таблица 4

Распределение ^{14}C -полисахаридов по молекулярной массе после гидролиза под действием β -амилазы в буферном растворе и морской воде в зимний период

Молекулярная масса	Единицы измерения	Среда			Разница между	
		К	Б	О	Б и К	О и К
$\geq 5 \cdot 10^4$	имп/мин	19780	18715	18446	1065	1334
	%	95,48	90,0	89,02	5,48	6,46
	мг/л	3,819	3,600	3,561	0,219	0,258
$\geq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	936	1402	2184		
	%	4,52	6,74	10,54	2,22	6,02
	мг/л	0,181	0,270	0,422	0,089	0,241
$\leq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	0	677	91		
	%	0	3,26	0,44	3,26	0,44
	мг/л	0	0,130	0,017	0,130	0,017

Таблица 5

Оценка достоверности различий между скоростями гидролиза растворимых ^{14}C -полисахаридов под действием β -амилазы в морской воде в разные сезоны года

Сезон	$\bar{X}$, мкг/л/ч ⁻¹	$S\bar{x}$	Sd	t	P	Разница между сезонной и среднегодовой скоростями
Весна	204	6,67	—	—	—	—26,75
Лето	225	4,17	7,87	2,67	<0,05	— 5,75
Осень	236	3,36	5,36	2,05	<0,1 >0,05	+ 5,25
Зима	258	6,89	7,67	2,87	<0,05	+27,25
Весна	204	6,67	9,59	5,63	<0,001	

впадает с наиболее высоким количеством микроорганизмов (61,6%), гидролизующих крахмал [14].

Среднегодовая скорость гидролиза растворимых в морской воде полисахаридов при их концентрации 4 мг/л и активности β -амилазы 6,0 единиц (0,2 мг/л) составляет 230,75 мг/л в час. Эта величина может изменяться в разные сезоны года в зависимости от ряда факторов. Согласно полученным результатам, β -амилаза активностью в одну единицу способна гидролизовать в морской воде при 20°C 38,5 мкг/л в час растворимого полисахарида (имеется в виду образование полисахаридов с $\text{MM} \leq 30\,000$) из энтероморфы при исходной концентрации 4 мг/л. При известной амилалитической активности водоема на основании этих данных можно рассчитать скорость гидролиза полисахаридов, внося поправку на температурный коэффициент — Q_{10} , равный в среднем 1,94 [2].

Предположим, что морская вода обладает амилалитической активностью 0,01 ед/л, что вполне реально исходя из приведенных выше данных [3, 5, 15], тогда скорость гидролиза полисахаридов будет составлять для разных температурных зон следующие величины:

при 10°C — 4,64 мкг/л/сут
 при 20°C — 9,0 мкг/л/сут
 при 30°C — 17,82 мкг/л/сут
 при 40°C — 34,04 мкг/л/сут

Как видно из этих расчетов, температура является, вероятно, одним из важнейших факторов, влияющих на скорость ферментативных процессов в морской воде. По мнению Ю. И. Сорокина [8], основным фактором, тормозящим жизнедеятельность бактерий (а следовательно, и продуцирование внеклеточных ферментов) в глубинных водах океана, является суммарное действие низкой температуры и повышенного давления.

Если учесть, что среднегодовая температура поверхностных вод Мирового океана составляет 17,5°C [9], а концентрация растворенных углеводов в прибрежных водах относительно велика — 0,5—3,9 мг/л, в среднем около 1,5 мг/л [18, 19], то при скорости ферментативного гидролиза 9 мкг/л/сут время полного обновления растворенных в морской воде полисахаридов за счет ферментативных процессов составит 166 дней.

Средняя скорость «оборота» всего растворенного органического вещества морской воды, по расчетам Е. К. Дуурсма [17], для эвфотического слоя равна около одного года. Для всей толщи воды соответствующая величина, по мнению Б. А. Скопинцева [7], составляет несколько сот лет. По данным К. М. Хайлова [10], скорости оборота

отдельных классов органических соединений морской воды могут существенно отличаться от средних расчетных данных. При концентрации полисахаридов около 1 мг/л и концентрации детрита 0,2 мг/л, типичной для вод открытого моря, время обновления полисахарида в морской среде за счет жизнедеятельности микроорганизмов детрита равно примерно одному году, при концентрации детрита 2 мг/л, свойственной многим поверхностным водам, ожидаемое время обновления полисахарида должно быть равно примерно одному месяцу [10].

К сожалению, в литературе имеются единичные сведения [5, 15] о концентрации свободных ферментов в морской воде, на основании которых можно было бы произвести расчеты и сделать заключение о влиянии процессов ферментативного гидролиза на скорость обновления отдельных классов растворенной органики в морской воде.

В природных условиях гидролитические процессы, вероятно, протекают значительно медленнее, чем в экспериментальных, что может быть связано с температурными колебаниями, влиянием солнечной радиации на поверхностный слой воды, более низкой концентрацией субстратов и ферментов, а также местом их локализации, и с влиянием сезонных колебаний других экологических факторов. Однако гидролиз макромолекул в морской воде на более мелкие фрагменты позволяет судить о трансформации РОВ вообще и полисахаридов в частности, так как растворенные углеводы могут потребляться только в виде низкомолекулярных сахаров [13].

Практически постоянное содержание РОВ в морской воде обусловлено, вероятно, механизмами саморегуляции с участием внеклеточных ферментов, о чем свидетельствуют полученные данные. С одной стороны, в зимний период повышается скорость гидролиза полисахаридов под действием β -амилазы, но фактическая скорость гидролиза в несколько раз уменьшается за счет снижения температуры поверхностных слоев воды. Вместе с тем в весенне-летний период в прогретых слоях воды активируются ферментативные процессы за счет повышения температуры, однако под действием токсинов, выделяемых водорослями, концентрация выделяемых бактериями гидролитических ферментов падает в 12 раз [1], что приводит к снижению гидролиза в 18 раз [10].

Таким образом, основными факторами, лимитирующими скорость ферментативных процессов в поверхностных водах в разные сезоны года, являются температура и токсины водорослей.

1. Айзатуллин Т. А., Хайлов К. М. Кинетика ферментативного гидролиза растворенных в морской воде макромолекул в присутствии бактерий. — Гидробиол. журн., 1970, 6, № 6, с. 49—55.
2. Базелян В. Л., Шафажинская Н. Е. Ферментативный гидролиз полисахаридов в морской воде и при контакте со взвешенными частицами. — Биология моря, Киев, 1979, вып. 51, с. 92—102.
3. Батурина М. В. Растворенное органическое вещество и его корпускулярные компоненты в водах восточной экваториальной зоны Тихого океана: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1977. — 24 с.
4. Горбенко Ю. А. Экология морских микроорганизмов перифитона. — Киев: Наук. думка, 1977. — 252 с.
5. Грибаускене В. Ю., Ямонтене М. М., Янкавичюс К. К. Активность гидролитических ферментов в воде и биомассе планктонных организмов эвтрофного водоема — залива Куршю-Марес. — Тр. АН ЛитССР. Сер. В, 1973, 2, с. 3—7.
6. Ерохин В. Е. Потребление внешних органических метаболитов водорослей морскими беспозвоночными: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 1971. — 26 с.
7. Скопинцев Б. А. Некоторые соображения о распространении и состоянии органического вещества в водах океана. — Океанология, 1966, 6, вып. 3, с. 441—452.
8. Сорокин Ю. И. Биогеохимическая деятельность и трофическая роль бактерий в морских водоемах. — Журн. общ. биологии, 1973, 34, № 3, с. 396—406.
9. Степанов В. Н. Мировой океан. — М.: Знание, 1974. — 256 с.

10. Хайлов К. М. Микробиологические процессы внеклеточного гидролиза полисахаридов, растворенных в морской воде. — Микробиология, 1968, 37, вып. 3, с. 518—522.
11. Хайлов К. М. Экологический метаболизм в море. — Киев: Наук. думка, 1971. — 252 с.
12. Хайлов К. М., Бурлакова З. П., Ланская Л. А. Внешние метаболиты в монокультурах морских одноклеточных водорослей. — В кн.: Вопросы гидробиологии. М.: Наука, 1965, с. 437—438.
13. Хайлов К. М., Горбенко Ю. А. Внешнеметаболическая регуляция в системе сообщество перифитонных микроорганизмов — растворенное органическое вещество морской воды. — Докл. АН СССР, 1967, 173, № 6, с. 1434—1437.
14. Цыбань А. В. Бактерионейстон и бактериопланктон шельфовой области Черного моря. — Киев: Наук. думка, 1970. — 276 с.
15. Янкавичюс К. К., Антанинен А. С., Баранаускаене А. К., Будрене С. Ф., Грибаускаене В. С., Маламене Б. А., Разюлите Р. И., Янкавичюте Г. Ю. Экзогенные органические соединения планктических организмов пресноводной экосистемы и их роль в развитии популяций. — В кн.: Тез. докл. Междунар. симпоз. «Взаимодействие между водой и живым веществом» (6—10 окт). Одесса, 1975, с. 31—33.
16. Collier A., Ray S. M., Magnitsky W. Preliminary note on naturally occurring organic substances in sea water, affecting the feeding of oyster. — Science, 1950, 111, N 2876, p. 151—158.
17. Duursma E. K. The production on dissolved organic matter in sea, as related to the primary gross production of organic matter. — Neht. J. Sea. Res., 1963, 2, p. 85—91.
18. Lewis G. J., Rakestraw N. W. Carbohydrates in sea water. — J. Mar. Res., 1955, 14, p. 253—258.
19. Walsh G. E. Studies of dissolved carbohydrates in Cope Cod waters. 1. Generaly survey. — Limnol. and Oceanogr., 1965, 10, p. 570—576.

Одесское отделение Института
биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
26.06.79

V. L. BAZELYAN

SEASONAL CHANGES IN THE RATE OF SEA WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES: HYDROLYSIS UNDER EFFECT OF β -AMYLASE

Summary

The paper deals with seasonal changes in the rate of sea water-soluble polysaccharides hydrolysis under effect of β -amylase. Temperature and toxins of algae are supposed to be the main factors limiting the enzymic processes rate in the surface waters in different seasons of the year.