

А. Ю. Комендантов, Е. Е. Ежова

**СОЛЕННОСТНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ  
РАСТВОРЕННЫХ В ВОДЕ АМИНОКИСЛОТ  
LYCASTOPSIS AUGENERI (POLYCHAETA, NEREIDAE)**

*A. Ju. Komendantov, E. E. Yezhova* Salinity dependence of dissolved amino acids uptake by *Lycastopsis augeneri* (Polychaeta, Nereidae)

Идея поглощения растворенных органических веществ, высказанная в начале века А. Пюттером (Putter, 1908), получила в настоящее время многочисленные подтверждения. Выяснилось, что морские беспозвоночные, принадлежащие к различным типам животного мира, способны к поглощению растворенных органических веществ (*POB*). Единственным условием оказалось наличие поверхностей, образованных ресничным или слизиобразующим эпителием. Неоднократно показано, что поглощение *POB* — процесс, связанный с активностью специфических ферментов-пермеаз, сильно зависит от концентрации неорганических ионов и, в первую очередь,  $H^+$  и  $Na^+$  (см. обзор Комендантов, Хлебович, наст. сб.).

Целью настоящего исследования было изучение закономерностей поглощения растворенных в воде аминокислот примитивной nereидой *Lycastopsis augeneri*, обитающей в верхней литорали Японского моря. Интерес к объекту вызван тем, что в интерстициальных средах наблюдаются необычайно высокие концентрации *POB*. Многие авторы (Старикова, 1970; Clark, Gockson, 1972; Stephens, 1975 и др.) указывают, что в прибрежных водах над мягкими, богатыми органикой грунтами и, тем более в интерстициали, содержание *POB* может превышать обычную для открытых районов океана концентрацию  $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  на 2 порядка. Максимальные плотности полихет обнаружены нами в штормовых выбросах бухты экспедиции залива Посьета, там же — наибольшие концентрации *POB*, вызванные антропогенным стоком и постоянным выщелачиванием органического вещества из отмерших трав, водорослей, трупов животных (Вышкварцев, Пешеходько, 1982). По нашему (Хлебович, Комендантов, 1985) определению, эти полихеты являются физиологически пресноводными, и в природе, и в условиях эксперимента выдерживающими сильные колебания солености (Комендантов и др., 1988). Сказанное, вместе с легкостью культивирования в лаборатории, делает этих

животных удобным объектом исследования, в частности, соленостной зависимости поглощения растворенных аминокислот. В мировой литературе данные об аминокислотном транспорте в широком интервале соленостей ограничиваются кривыми поглощения глицина для одной полихеты — *Nereis limnicola* (Stephens, 1964), одной олигохеты — *Enchytraeus albidus* (Siebers, Bulnheim, 1977) и 5 видов двусторчатых моллюсков (Anderson, Bedford, 1973; Комендантов, 1986). Это делает настоящее исследование весьма актуальным.

### Материал и методика

Полихеты выбирались из береговых выбросов водорослей залива Посьета в июле 1987 г. с помощью термоэлектратора. В лаборатории черви содержались в аквариуме оригинальной конструкции (Хлебович, Ежова, 1986), кормом служили водоросли и кусочки кальмара. Культивирование и эксперименты проводились при температуре  $20 \div 21^\circ \text{C}$ . Для опытов отбирались одноразмерные животные с массой тела  $7.4 \pm 0.1$  мг, которые содержались по 20 экз. в чашках Петри в 20 мл ежедневно сменяемой воды. Экспериментальные среды готовились разведением тихоокеанской воды соленостью 35‰. Четыре опытные группы животных перед началом экспериментов не менее 2 недель содержались в следующих условиях:

- 1) избыток естественной пищи — листья зостеры,
- 2) раствор D,L-лейцина  $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  в морской воде,
- 3) раствор D,L-глицина  $20 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  в морской воде,
- 4) полное отсутствие пищи.

Растворы лейцина и глицина были выбраны по результатам предварительного опыта в преферендум-приборе. Ликастопсисы отчетливо реагируют на присутствие в воде растворенных органических веществ. Некоторые явно привлекают червей и вызывают пищевое поведение, другие отпугивают. Нами изучалась реакция полихет на растворы 8 аминокислот и глюкозы. Выяснилось, что черви 5-дневного голодания проявляют положительный таксис к растворам глицина, треонина и серина, явно избегая лейцина, валина, триптофана. Глицин, кроме того, составляет основу природного пула свободных аминокислот и наиболее часто используется в подобного рода исследованиях. Таким образом, для опытов мы избрали привлекающее и отпугивающее червей вещество. В качестве метки служил D,L-глицин  $2\text{H}_3$  в конечной концентрации  $20 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  и D,L-лейцин  $2\text{H}_3$  в конечной концентрации  $22.5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ . В настоящей работе не предпринималось специальных мер для подавления микрофлоры, так как было показано, что при коротких экспозициях ее активность не оказывает заметного влияния на результаты экспериментов, тем более, что полихеты не способны накапливать метку, отфильтровывая бактерий (Комендантов, Хлебович, наст. сб.) После двухчасовой

экспозиции в меченой аминокислоте черви отмывались в трех сменах воды соответствующей солености и растворялись в 0.5 мл 50% муравьиной кислоты при  $+70^{\circ}\text{C}$  в течение 68 ч. Активность проб определялась на сцинтилляционном счетчике БЕТА-1 с использованием жидкого сцинтиллятора ЖС-105. Опыты проводились в изотопной лаборатории Зоологического института АН СССР. Результаты обрабатывались статистически, каждая точка на графике — результат 8 - 10 измерений.

### Результаты и обсуждение

Результаты опытов отражены на рис. 1 и 2. Из рис. 1 следует, что поглощение глицина, максимальное при 35‰, резко падает при понижении солености, составляя 25% от максимума при 25‰, и стремится к нулю при солености 8‰. Обращает на себя внимание наличие второго пика в районе 12‰. Нам представляется, что появление этого пика не случайно, так как он воспроизвелся во всех повторностях. Кроме того, сперматозоиды *L. augeneri* активируются при солености выше 8‰ и способны к активному поступательному движению и оплодотворению только с 10—12‰. Можно думать, что это — подтверждение предположения о поглощении аминокислот как функции ресничного движения. Мы не смогли проверить устойчивость ресничного движения ликастопсиса, но можно предположить, что ресничное и жгутиковое движение имеют одинаковые или близкие соленостные оптимумы. Так, у дальневосточного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* максимум поглощения аминокислот соответствует 10—12‰ (Комендантов, 1983), в то же время максимальная фильтрационная активность (функция мерцательного эпителия) приходится на ту же соленость. В работе Л. М. Ярославцевой (1981) исследовалась клеточная устойчивость жаберного эпителия *S. fluminea* (по нашим предположениям — *S. japonica* — Комендантов, Орлова, наст. сб.). Оказалось, что при 10—12‰ время переживания клеток резко возрастает. У *Mytilus edulis* Японского моря ресничный эпителий не угнетается в соленостях от 8 до 35‰ (Козлитина, 1976), и только в этом интервале отмечено поглощение глицина. У *Laternula limicola* пик поглощения глицина лежит в области 22‰ (Комендантов, 1983), а максимум активности спермы — 18‰. Из рис. 2 следует, что поглощение лейцина — также соленостнозависимый процесс. При солености 4—8‰ интенсивность накопления метки низка, при 12‰ резко возрастает и далее незначительно повышается вплоть до 25‰. К сожалению, техническая ошибка не позволила получить данных для солености 35‰, зато выяснилось, что пребывание червей в течение 30 мин в пресной воде практически полностью ингибирует процесс поглощения аминокислоты при возвращении в морскую воду, по крайней мере, на несколько часов. Эти данные, безусловно, нуждаются в уточнении, а сам факт в дальнейшем

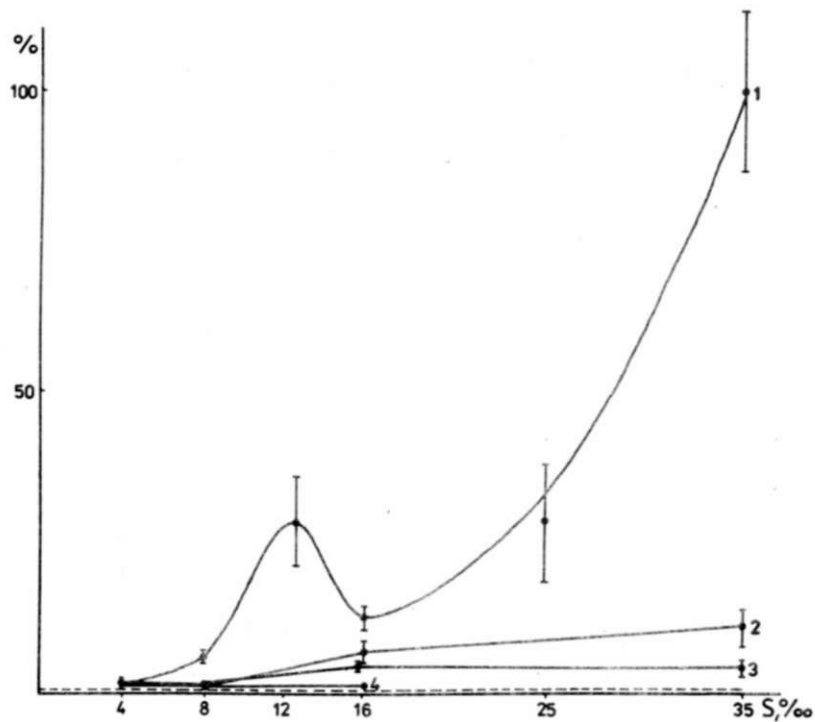


Рис. 1. Поглощение глицина *L. augeneri*:

1 — голодающие полихеты, 2 — листьями зостеры, 3 — с глицином, 4 — с лейцином. Горизонтальный пунктир — контроль; пояснения в тексте. По оси абсцисс — солёность среды акклиматизации, ‰; по оси ординат — интенсивность накопления метки, процент от максимума.

исследовании. Можно предположить, что при дальнейшем увеличении солёности среды акклиматизации до 35‰ интенсивность накопления аминокислоты будет возрастать.

Была проведена вторая серия опытов для выяснения влияния оформленной пищи на поглощение аминокислоты. У полихет, получавших в избытке листья зостеры, отмечены значительно более низкие уровни поглощения обеих аминокислот, эта разница особенно заметна в высоких солёностях. Так, в опытах с глицином в солёностях 4–16‰ разница составляет около 5%, а при 35‰ достигает 90% (см. рис. 1). Лейцин поглощается сходным образом: в нижней части ряда отличия недостоверны, при 16‰ достигают 40%; логично предположить, что при дальнейшем возрастании солёности среды акклиматизации разница будет увеличиваться. Необходимо отметить, что в обоих случаях сохраняется общая тенденция: с ростом солёности увеличивается интенсивность поглощения аминокислоты. Важно также, что почти во всех случаях наблюдается хоть и низкий, но достоверно отличающийся от контроля (убитые перед инкубацией в меченой АК и инкубированные в немеченой АК черви) уровень поглощения.

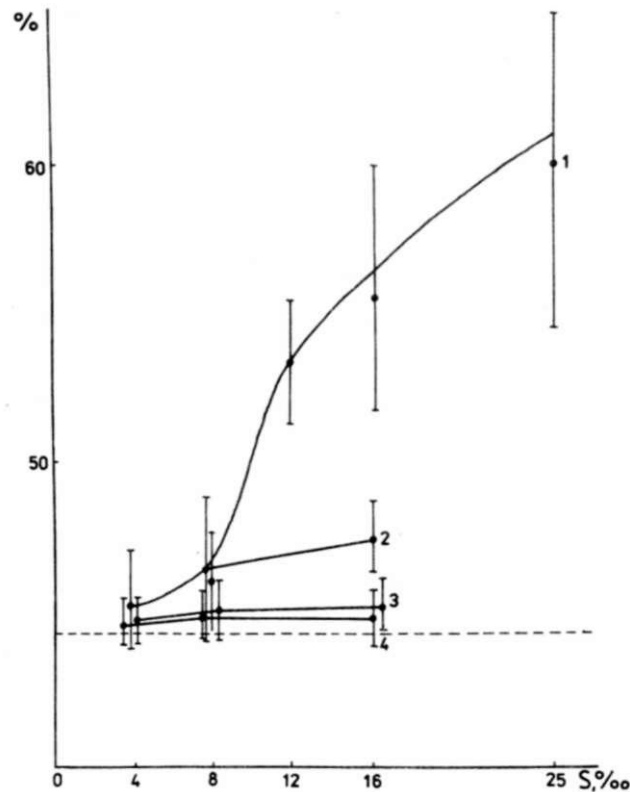


Рис. 2. Поглощение лейцина *L. augeneri*  
Обозначения как на рис. 1

Была проведена попытка оценить насыщаемость транспортных систем (см. рис. 1,3; 2,4), а также возможность взаимного ингибирования поглощения двух аминокислот (см. рис. 1, 4; 2, 3). После двухнедельной акклимации в растворе глицина черви снижали уровень накопления этой аминокислоты на порядок, сохраняя тенденцию к усилению поглощения с ростом солёности. В солёностях больше 8‰ уровень поглощения достоверно отличается от нулевого. Лейцин же животные этой группы не поглощают. Аналогичная картина наблюдается при акклимации к раствору лейцина: глицин поглощается ничтожно слабо и не всегда достоверно отлично от нуля, лейцин же не поглощается вовсе. Необходимо отметить, что использованные концентрации аминокислот оптимальны. При разбавлении растворов эффект снижается, в более концентрированных растворах черви выглядят угнетёнными и при  $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  погибают в верхних солёностях. Очевидно, что достигнуть абсолютного насыщения «глициновой» системы невозможно. В то же время «лейциновая» система насы-

щается легко. Обращает на себя внимание взаимное ингибирование поглощения глицина и лейцина. Полученные нами данные хорошо согласуются с представлениями Бамфорда (Bamford, Gingles, 1974) о наличии двух транспортных систем для индивидуального вещества (одной — насыщаемой, специализированной, более активной в низких концентрациях, другой — менее специализированной и практически не насыщаемой), но противоречит данным о полной независимости систем транспорта этих двух аминокислот (Oxender, Christensen, 1963; Christensen, 1969; Schultz, Curran, 1970; Guidotti et al., 1978; Jonston, 1979; Heinz, 1975; Богданова и др., 1982). Противоречие объясняется, вероятно, тем, что в разных типах животного мира системы транспорта аминокислот организованы по-разному, а перечисленные выше работы проводились на тканях позвоночных.

Представляет несомненный интерес вклад поглощенных аминокислот в бюджет энергии полихет. По результатам нашего опыта, максимальные скорости поглощения составляют  $8.348 \cdot 10^{-5}$  мг·экз.<sup>-1</sup>·ч<sup>-1</sup> для глицина и  $2.680 \cdot 10^{-6}$  мг·экз.<sup>-1</sup>·ч<sup>-1</sup> для лейцина. Мы предполагаем, что различие в скорости поглощения использованных в опыте аминокислот связано с реакцией полихет на них. Используя усредненные данные по газообмену полихет (Камлюк, 1974), мы оценили возможный вклад лейцина и глицина в энергетический бюджет *L. augeneri*. Он составил 1.7 и 0.1% для глицина и лейцина соответственно. Эти величины несколько меньше, чем приводимые в литературе для олигохеты *Enchytraeus albidus* (Siebers, Vulnheim, 1977) и ряда полихет (Stephens, 1968; Testerman, 1972). Это, наверное, объясняется различием в способности различных видов к сорбции *POV*, а также тем, что в приведенных работах оценивается вклад многих органических веществ, растворенных в воде. Нам представляется, однако, что растворенные аминокислоты играют скорее информационную роль, указывая на источник гниющей органики, являющейся обычной пищей ликастопсисов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Богданова Н. П., Никольский Н. Н., Семенова Е. Г. Транспорт аланина в культуре клеток млекопитающих // Цитология, 1982.— Т. 24.— № 6.— С. 667—672.
- Вышкварцев Д. И., Пешеходько В. М. Картирование доминирующих видов водной растительности и анализ их роли в экосистеме мелководных бухт залива Посет Японского моря // Тр. Ин-та биологии моря ДВНЦ АН СССР, 1982 — № 25 — С. 120—130.
- Камлюк Л. В. Энергетический обмен у свободноживущих плоских и кольчатых червей и факторы его определяющие // Журн. общ. биол., 1974.— Т. 35.— № 6 — С. 874—885.
- Козлитина Л. М. Устойчивость к опреснению некоторых моллюсков и влияние на нее тоничности солевого раствора // Биология моря, 1976.— № 1.— С. 36—40.

- Комендантов А. Ю. Соленостная зависимость поглощения растворенного в воде глицина тремя видами дальневосточных эстуарных двустворчатых моллюсков // Тез. докладов VII Всесоюз. совещания по изучению моллюсков. Л., 1983.— С. 170-171.
- Комендантов А. Ю., Аладин Н. В., Ежова Е. Е. Зависимость осморегуляторных способностей полихеты *Lucastopsis augeneri* от факторов среды // Зоол. журн., 1989 — Т. 00 — № 00 — С. 00-00.
- Старикова Н. Д. Закономерности вертикального распределения растворенного органического углерода в морских водах и грунтовых водах морских осадков // Океанология, 1970.— Т. 10.— № 6 — С. 988 -1000.
- Хлебович В. В., Комендантов А. Ю. О физиологически пресноводных беспозвоночных морского происхождения // Журн. общ. биологии, 1985.— Т. 46.— № 3 — С. 331-335.
- Хлебович В. В., Ежова Е. Е. О перспективе культивирования полихеты *Lucastopsis augeneri* // Тез. докл. Первого Всесоюз. совещания по проблемам зоокультуры.— М., 1986.— С. 87-88.
- Ярославец Л. М., Павленко В. А., Федосеева С. В. О соотношении клеточной устойчивости к опреснению и способности к соленостной акклимации у некоторых морских моллюсков // Биология моря, 1981.— № 1.— С. 54-60.
- Bamford D. R., Gingles R. Absorption of sugars in the gill of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* // Comp. Biochem. Physiology, ser. A, 1974.— Vol. 49 A.— N 4 - P. 637-646.
- Christensen H. N. Some special kinetics problems of transport // Adv. Enzym., 1969 — Vol. 32 — P. 1-20.
- Clark M E., Gockson G. A., North W. G. Dissolved free amino acids uptake by marine polychaetes under anoxic conditions // Biol. Bull., 1979.— Vol. 157.— N 3.— P. 434-444.
- Guidotti G. G., Borghetti A. F., Gazzada G. C. The regulation of amino acids transport in animal cells // Biochim. biophys. acta, 1978.— Vol. 515.— P. 329-366.
- Heinz E., Geck P., Pitrzyk C. Driving forces of amino acid transport in animal cells // Ann. New York Acad. Sci., 1975.— Vol. 264 — P. 428-441.
- Johnstone R. M. Electrogenic amino acid transport // Can. J. Physiol. Pharmacol., 1979.— Vol. 57 — P. 1-15.
- Oxender D. L., Christensen H. N. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by Ehrlich cell // Biol. Chem., 1963. - Vol. 238. - P. 3687-3699.
- Putter A. Studien zur vergleichenden physiologie des stoffwechsels // Abhandlungen des kogniglichen Gessellschafts fur Wissanschaffen Gottingen (Mathematisch-Physische Keasse), 1908.— Vol. 6.— N 1.— P. 1-79.
- Schultz S. G., Gurran P. F. Coupled transport of sodium and organic solutes // Physiol. Rev., 1970 - Vol. 50.— P. 637-718.
- Siebers D., Bulnheim H.-P. Salinity dependance uptake kinetics and specificity of amino acids absorption across the body surphace of oligochaete annelid *Enchitraeus albidus* // Helgolander wiss. Mecresunters., 1977.— Vol. 29.— N 4.— P. 473-492.
- Stephens G. C. Uptake of organic material by aquatic invertebrates. III. Uptake of glycine by brackish water annelids // Biol. Bull. of the Marine Biol. Laboratory, Woods Hole., 1964 —Vol. 126.—N 1.— P. 150-162.
- Stephens G. C. Dissolved organic matter as a potential source of nutrition for marine organisms // American Zoologist., 1968.— Vol. 8.— N 1 — P. 95-106.
- Stephens G. C. Uptake of naturally occuring primary amines by marine annelids // Biol. Bull., 1975 - Vol. 149 — N 2.— P. 397-407.
- Testerman J. K. Accumulation of free fatty acids from sea water by marine invertebrates // Biol. Bull. of Laboratory, Woods Hole, Mass., 1972.— Vol. 142 — P. 160-177.

### Summary

The absorption of neutral amino acids (AA) under the different salinities by *Lycastopsis augeneri* was studied. The uptake of glycine and leucine was salinity-dependend. The presense of *Zostera marina* leaves at the experimental mediums during some days decreases <sup>3</sup>H-labelled AA absorption. The intensity of glycine uptake falls on 90% and leucine—almost 50%. It was shown, that leucine inhibits glycine uptake and glycine inhibits leucine uptake. Saturation phenomena was observated for the leucine absorption only. Consideration of the role of AA ion metabolism is given.