

УДК 612.014.461.3:66.047.88+536.629:536.4.032(58.058)

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ ВОДЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ С РАЗЛИЧНЫМ ОСМОТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ, СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДА ВЫСУШИВАНИЯ НАД ВОДООТНИМАЮЩЕЙ СРЕДОЙ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

© 2021 г. Р. В. Мальшев\*

*Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,  
Республика Коми, Сыктывкар, Россия*

*\*e-mail: malrus@ib.komisc.ru*

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

После доработки 28.10.2020 г.

Принята к публикации 29.10.2020 г.

Определение соотношения связанной и свободной воды в тканях растения – один из способов оценки функционального состояния растения. Для измерения количества фракций воды в живых тканях используют методы, основанные на различных физических свойствах свободной и связанной воды. Известно, что количество связанной воды в тканях зависит от концентрации в них гидрофильных соединений. Цель настоящей работы заключалась в сравнении метода высушивания над водоотнимающим агентом и метода дифференциальной сканирующей калориметрии для определения фракций связанной и свободной воды в тканях с различным осмотическим давлением. Объектами исследования являлись паренхима из сердцевин клубня картофеля и средняя часть листа проростка пшеницы. Результат проведенного сравнения выявил ряд ограничений для каждого из методов. При использовании метода высушивания над гигроскопичными средами необходимо учитывать как концентрацию осмолитов в цитоплазме клеток, так и снижение физической проницаемости подсыхающей ткани для паров воды. Наиболее полно оценить количество свободной и связанной воды в тканях растений позволяет метод промораживания на дифференциальном сканирующем калориметре, однако этот метод следует осторожно использовать при изучении тканей с высоким содержанием молекул, сорбирующих воду.

*Ключевые слова:* свободная вода, связанная вода, водоотнимающий агент, осмотическое давление, дифференциальная сканирующая калориметрия

**DOI:** 10.31857/S004213242102006X

### ВВЕДЕНИЕ

Вода является неорганическим бинарным соединением. Благодаря смещению атомов кислорода, молекула воды является полярной и представляет собой диполь. Вода – это жидкость, не имеющая вкуса и запаха, в зависимости от условий она может находиться в трех агрегатных состояниях. В растениях вода составляет до 90% массы. Оптимальное прохождение всех физиологических процессов в растениях возможно только при достаточном водообеспечении. Водный обмен является составляющей обмена веществ в цитоплазме клетки (Алексеев, 1969). Без воды невозможно проникновение веществ в клетку и выход из нее, она принимает непосредственное участие в росте и увеличении массы растения. Поступление воды в растение и ее расход точно регулируются, что формирует водный баланс рас-

тения. В тканях растений распределение воды крайне неравномерное, большая часть воды находится в протопласте клетки, около 10% депонировано в клеточной стенке (Физиология и биохимия..., 2000). Необходимо добавить, что оводненность тканей растений – величина непостоянная, изменяющаяся с течением времени и под действием факторов среды.

В живых тканях вода также находится в трех состояниях: 1) свободная вода (вода с неизменными физико-химическими свойствами), присутствующая главным образом в межклеточном пространстве; 2) слабо связанная, так называемая, межфазная вода (интерстициальная), вода из внешних слоев толстой гидратной оболочки ионов или макромолекул; 3) сильно связанная – это вода, связанная в первой гидратной оболочке или включенная в мицеллы (Nishioka et al., 1984;

Natakeyama et al., 1987). Каждая из форм воды характеризуется определенными физическими свойствами и функциями. Свободная вода – наиболее подвижная фракция, находится между гидратированными ионами и коллоидами, главным образом участвует в процессах “переноса” веществ. Оставшиеся две фракции воды слабо и сильно связанной воды являются наименее подвижными. Считается, что связанная вода не может быть отнята из тканей при замораживании и являться растворителем (Максимов, 1944). Уникальное строение молекулы воды позволяет образовывать связи не только с ионами, но и крупными биологическими молекулами, поддерживая, тем самым, их структуру. Известно, что одна молекула белка может связать от 850 до 1000 молекул воды, а молекула целлюлозы абсорбирует на себе до трех молей воды (Некрасов, 1973; Nakamura et al., 1981; Natakeyama et al., 1987; Paoian et al., 2004).

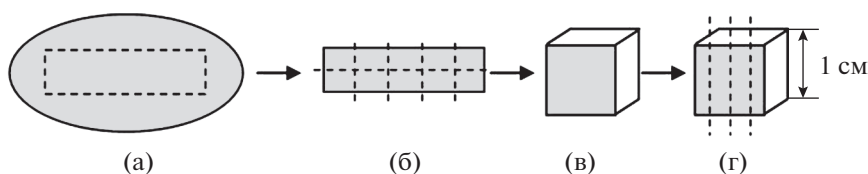
Важное значение для биологических систем имеет соотношение фракций свободной и связанной воды. Свойства внутриклеточной воды влияют на ассоциацию и диссоциацию цитоскелетных структур (Clegg, 1984). Интенсивность протекания физиологических процессов в растительных тканях зависит от количества свободной воды, а с содержанием связанной воды коррелирует устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов (Гусев, 1974; Тарабрин, 1980). Одним из важных свойств воды является способность к переохлаждению, то есть способность замерзать при температуре ниже 0°C. Это явление отмечено многими исследователями (Simatos et al., 1974; Gliguem et al., 2009; Tomaszewska-Gras, 2012). Способность воды находиться в переохлажденном состоянии имеет особое значение в процессе подготовки растения к неблагоприятному зимнему периоду. Еще до начала сезонного снижения температуры в тканях меристемы хвойных отмечается постепенный выход воды в межклеточное пространство, что способствует постепенному обезвоживанию клеток. Устойчивость воды к кристаллизации при температуре ниже 0°C существенно увеличивает диапазон времени для постепенного и безопасного обезвоживания клеток в процессе закаливания и формирования криорезистентности (Миронов, Левин, 1985; Алаудинова и др., 2007; Миронов и др., 2017).

Для определения содержания воды в растительных тканях достаточно знать массу образца до и после высушивания. Для оценки количества свободной и связанной воды в растительных тканях используют ряд методов. Первая группа методов основана на свойстве подвижности воды. Несвязанные молекулы воды быстро передвигаются по градиенту концентрации. Благодаря этому свойству количество свободной воды в растениях возможно оценить при высушивании образцов в герметичных сосудах над водоотнимающей сре-

дой или погружая ткани в гипертонический раствор сахарозы (Думанский, 1948; Физиология сельскохозяйственных..., 1967; Сулейманов, 1974; Яковец, 2011). Вторая группа методов основана на физических явлениях, проявляющихся при замерзании воды, и утверждении, что к кристаллизации способна только свободная вода (Физиология сельскохозяйственных..., 1967). Первый из этой группы метод основан на измерении доли свободной воды с помощью дилатометра. Суть данного метода заключается в определении изменения объема ткани при ее замораживании (Физиология сельскохозяйственных..., 1967; Фрашук, 1986; Гольд и др., 2008). Второй, менее распространенный метод оценки количества свободной и связанной воды в тканях, – калориметрический, в его основе лежит определение количества выделяемого тепла при фазовом переходе вода–лед (Туманов, 1940; Физиология сельскохозяйственных..., 1967; Ciesla et al., 2004; Einhorn-Stoll et al., 2012; Natakeyama et al., 2013). Не стоит забывать и о таком методе исследования, как ядерно-магнитный резонанс, позволяющий достаточно точно идентифицировать фракции воды в растительных тканях (Жолкевич и др., 1989; Хохлова, Бочкарева, 2009).

Содержание воды и соотношение ее фракций в растении не постоянны. Изменение количества свободной и связанной воды зависит, главным образом, от количества соединений с высокой водоудерживающей способностью в клетках и тканях. Так, в конце вегетационного периода и в течение осени внутри клетки повышается концентрация осмолитов: низкомолекулярных водорастворимых белков, углеводов, аминокислот, которые связывают значительное количество воды (Романова, 1970; Некрасов, 1973; Миронов и др., 2001, 2006; Климов, 2001; Трунова, 2007; Slovakova et al., 2011). Изменение количества водорастворимых соединений в цитоплазме безусловно сказывается на ее осмотическом давлении. Как было отмечено выше, при количественном определении фракций воды в живых тканях используют методы, основанные на различных физических явлениях. Возникает закономерный вопрос: будут ли сопоставимы результаты количественного измерения фракции воды, полученные методами на основе различных физических явлений и необходимо ли при измерениях учитывать осмотический потенциал растительных тканей?

В настоящей работе приведены результаты сравнительных исследований определения количества свободной и связанной воды в растительных тканях с использованием метода высушивания над водоотнимающим агентом (концентрированной серной кислотой) и с применением метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Сравнительное исследование



**Рис. 1.** Схема подготовки экспериментального материала. Клубень картофеля (а), вырезанная и разделенная центральная часть запасающей паренхимы клубня (б), используемая в измерениях часть ткани (в, г). Пунктиром показаны линии разреза.

методов проводилось на тканях с различным осмотическим давлением ( $P$ ). Дисперсионный анализ и статистическую обработку результатов проводили в среде MS Excel, значимость различий оценивали с применением многогранного теста Дункана. Объем выборки для каждого из вариантов, составлял:  $n = 10$ .

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили запасающая паренхима клубня картофеля *Solanum tuberosum* L. и средняя часть первого листа четырехдневного проростка пшеницы *Triticum aestivum* L. Определение осмотического давления клеточного сока в исследуемых тканях проводили плазматическим методом по Х. де Фризу (Викторов, 1983). Приготовленные образцы тканей помещали в раствор сахарозы с различной малярной массой. Изотоническим считали раствор, в котором у клеток тканей наблюдался слабый уголкообразный плазмолиз. Результаты оценки осмотического давления клеточного сока в тканях объектов показали, что уголкообразный плазмолиз в запасающей паренхиме клубня картофеля начинался при  $P \geq 24$  атм, а в листе проростка пшеницы – при  $P \geq 11$  атм.

#### *Подготовка материала для проведения измерений количества связанной и свободной фракций воды*

Перед началом измерений клубни картофеля были очищены от перидермы, отмыты в проточной воде. Из центральной части запасающей паренхимы клубня вырезали кубики с гранью 1 см (рис. 1). Подготовка к измерениям листа пшеницы заключалась в отделении его от семянки непосредственно перед измерением и удалении верхней и нижней части листа, в измерениях использовали среднюю часть листа.

#### *Методика проведения измерений количества свободной и связанной воды с высушиванием над водоотнимающим агентом*

Подготовленный экспериментальный материал взвешивали и помещали в стеклянные бюксы. В каждый бюкс помещали один предварительно

измельченный образец запасающей паренхимы клубня картофеля сырой массой около 600 мг или листа пшеницы сырой массой около 100 мг. Для оценки содержания свободной воды, образцы в бюксах высушивали в эксикаторе над водоотнимающим агентом, в качестве которого использовали концентрированную серную кислоту. Образцы выдерживали в герметично закрытом эксикаторе в течение 24 ч при температуре 20–25°C. После экспозиции экспериментальный материал взвешивали повторно. Для оценки абсолютного содержания воды образцы помещали в сушильный шкаф и выдерживали их до постоянной массы при температуре 105°C. Общую оводненность, количество свободной и связанной воды в тканях определяли согласно формулам:

$$m(\text{H}_2\text{O}) = m_1 - m_2, \quad (1)$$

$$m(\text{H}_2\text{O свобод.}) = m_1 - m_3, \quad (2)$$

$$m(\text{H}_2\text{O связ.}) = m(\text{H}_2\text{O}) - m(\text{H}_2\text{O свобод.}), \quad (3)$$

где  $m(\text{H}_2\text{O})$  – масса воды, содержащейся в растительных тканях;  $m(\text{H}_2\text{O свобод.})$  – масса свободной воды;  $m(\text{H}_2\text{O связ.})$  – масса связанной воды;  $m_1$  – сырая масса растительных тканей;  $m_2$  – масса растительных тканей после высушивания при 105°C;  $m_3$  – масса растительных тканей после высушивания над серной кислотой.

Полученные количественные значения фракций воды в тканях выражали в долях по отношению к общему содержанию воды (табл. 1, 2).

#### *Методика проведения измерений количества свободной и связанной воды с применением дифференциальной сканирующей калориметрии*

Измерения температуры кристаллизации воды в тканях картофеля и листа пшеницы проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе DSC-60 Shimadzu (Япония). Подготовленный материал в количестве около 30 мг помещали в алюминиевый контейнер объемом 90 мм<sup>3</sup> и охлаждали со скоростью 1°C/мин от +5 до –30°C. Перед измерением образцы ткани клубня картофеля дополнительно измельчали до размеров 2–3 мм (рис. 2).

**Таблица 1.** Оводненность, доля свободной и связанной воды в тканях паренхимы клубня картофеля

| Статистические параметры  | Оводненность, %                                |               | Свободная вода, %                              |               | Связанная вода, %                              |               |
|---------------------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
|                           | сушка над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | по данным ДСК | сушка над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | по данным ДСК | сушка над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | по данным ДСК |
| Среднее значение и ошибка | 81.0 ± 1.1                                     | 83.0 ± 1.2    | 7.6 ± 1.3                                      | 66.7 ± 2.9*   | 73.4 ± 1.1                                     | 15.9 ± 3.0*   |
| Минимум                   | 75.9   | 76.2          | 3.0  | 48.9          | 68.9   | 6.0           |
| Максимум                  | 85.0   | 90.8          | 15.4   | 79.0          | 81.8   | 32.6          |

Примечание: \* – различия значимы на уровне  $p \leq 0.05$ . Здесь и в табл. 2 и 3.

**Таблица 2.** Оводненность, доля свободной и связанной воды в тканях листа проростка пшеницы

| Статистические параметры  | Оводненность, %                                |               | Свободная вода, %                              |               | Связанная вода, %                              |               |
|---------------------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
|                           | сушка над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | по данным ДСК | сушка над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | по данным ДСК | сушка над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | по данным ДСК |
| Среднее значение и ошибка | 86.0 ± 0.1                                     | 84.6 ± 0.4*   | 60.6 ± 2.0                                     | 71.3 ± 1.1*   | 25.4 ± 2.0                                     | 13.2 ± 1.0*   |
| Минимум                   | 84.9   | 82.5          | 52.8   | 66.7          | 10.9   | 6.5           |
| Максимум                  | 86.5   | 86.9          | 74.0   | 76.0          | 33.2   | 17.5          |

Температуру кристаллизации воды определяли по началу пика фазового перехода (рис. 3). После измерений материал высушивали при 105°C до постоянной сухой массы. Оводненность оценивали согласно формуле (1). Свободную воду оценивали по количеству воды, претерпевшей фазовый переход, рассчитанной с использованием коэффициента удельной теплоты кристаллизации при фазовом переходе вода–лед 330 Дж/г (Ciesla et al., 2004; Tomaszewska-Gras, 2012), по формуле:

$$m(\text{замер. воды}) = 330 \times Q, \quad (4)$$

где  $Q$  – тепловой эффект при нуклеации воды, мДж; 330 – удельная теплота льдообразования для пресной воды, мДж/мг.

В настоящее время установлено, что в диапазоне от 0 до –16°C, а по некоторым данным до –20°C, в тканях растений замерзает фракция свободной воды, связанная вода замерзала при более низкой температуре (Бакрадзе, 1983; Миронов и др., 2001; Nowak et al., 2018). Существующая связь между температурой замерзания воды и

свободой движения молекул воды позволяет применять низкотемпературную ДСК как метод количественной оценки фракции воды в тканях растений.

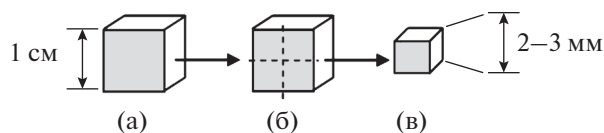
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По нашим данным средняя температура замерзания воды в тканях клубня картофеля составляла  $-6.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , в тканях листа пшеницы –  $-8.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Полученные значения температуры замерзания воды указывают на то, что фазовый переход претерпевала фракция свободной воды.

Согласно результатам измерений, оводненность тканей клубня картофеля и листа пшеницы, оцениваемая как разница между сырой и сухой массой были близки по значениям (табл. 1, 2). Распределение долей свободной и связанной воды по данным метода сушки над серной кислотой у исследуемых образцов было различно. Паренхима клубня картофеля содержала около 8% свободной и 73% связанной воды, а ткани листа пшеницы, напротив, содержали больше свободной воды – около 60%, доля связанной воды составляла 25%.

Оценка методом ДСК не выявила существенных различий в соотношении фракций воды между исследуемыми образцами. Содержание свободной воды в клубне картофеля было более 66% а связанной – около 16% (табл. 1). Калориметрические измерения листа пшеницы показали, что в нем содержалось около 71% свободной и 13% связанной воды (табл. 2).

Необходимо сказать, что процесс испарения воды, имеющий физическую основу в живых си-



**Рис. 2.** Схема подготовки экспериментального материала из клубня картофеля для измерения на ДСК. Исходный объем ткани (а), линии деления исходного объема ткани (б), помещаемая в алюминиевый контейнер часть клубня картофеля (в). Пунктиром показаны линии разреза.

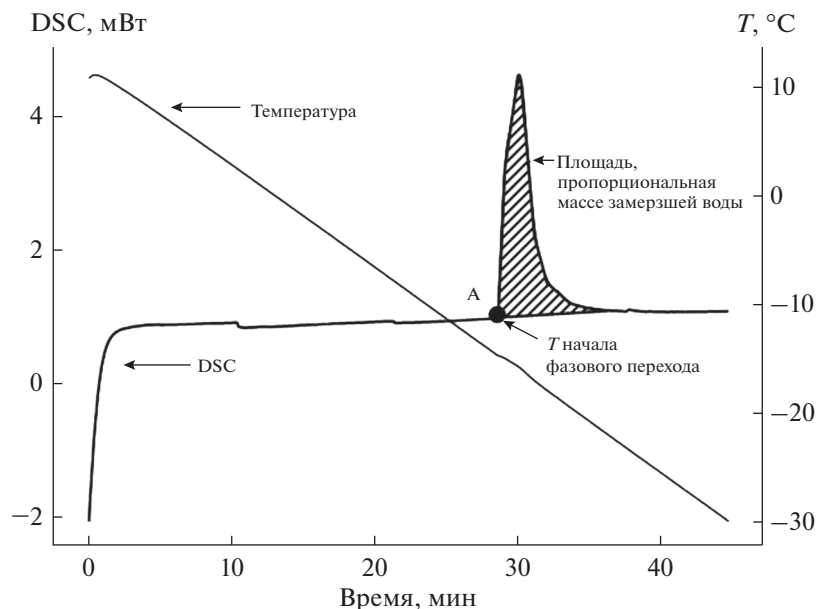


Рис. 3. Термограмма кристаллизации воды в образце.

стемах, является нелинейным. По мере убыли воды из живых тканей возрастает концентрация осмолитов, что неминуемо приводит к снижению скорости потери влаги на уровне клетки, ткани, органа. Расхождение данных, полученных калориметрически и при сушке над серной кислотой, может быть связано с рядом факторов, начиная с влияния осмотического давления цитоплазмы клеток на снижение скорости испарения воды, заканчивая формированием “корки” — слоя высушенных клеток на поверхности тканей, препятствующей испарению воды, или в целом сокращение площади испарения.

Поскольку результаты измерений фракций воды у тканей клубня картофеля, получаемые методом сушки, могут зависеть от выше описанных факторов, оценку связи между осмотическим давлением цитоплазмы клеток и количеством связанной воды в тканях проводили на основании метода ДСК. Результаты калориметрических измерений не позволяют однозначно сказать о существовании четкой связи между осмотическим давлением и количеством связанной воды в тканях растений. Так, при осмотическом давлении в клубне картофеля  $P \geq 24$  атм содержание связанной воды составляло 16%, в то же время содержание связанной воды в листе проростка пшеницы с осмотическим давлением  $P \geq 11$  атм было всего на 3% меньше.

Дополнительно были проведены измерения количества водных фракций в тканях клубня картофеля и листа проростка пшеницы до и после сушки над серной кислотой с использованием метода ДСК.

Было установлено, что после суток нахождения тканей клубня картофеля в эксикаторе над серной кислотой их оводненность снизилась в 1.3 раза (табл. 3). Уменьшение оводненности тканей клубня картофеля было связано с убылью воды как из фракций свободной, так из фракции связанной воды. Необходимо отметить, что количество убывшей связанной воды (0.5 мг/мг сухой массы) почти не уступало количеству убывшей свободной воды (0.7 мг/мг сухой массы). Иная зависимость потери влаги выявлена у листа проростка пшеницы. Несмотря на уменьшение оводненности тканей листа в 1.5 раза, снижение было вызвано испарением свободной воды, в то время как количество связанной воды значимо не изменилось, а ее отношение к общему водосодержанию вполне закономерно возросло (табл. 3).

Выявленное изменение количества связанной воды в клубне картофеля после его высушивания над серной кислотой, по нашему мнению, может быть обусловлено содержанием значительного количества крахмала, гидрофильные группы которого адсорбируют воду. Известно, что сорбируемые в зернах крахмала молекулы воды находятся в трех состояниях: свободные, первично адсорбированные (сильно связанные) и вторично адсорбированные; при этом, доля связанной воды в нативных зернах крахмала не зависит от степени их гидратации (Угрозов и др., 2008; Белопольская и др., 2012). Можно полагать, что обнаруженное методом ДСК разное количество связанной воды в тканях клубня картофеля в исходном состоянии и после сушки над водоотнимающей средой, связано с убылью вторично связанной воды из кол-

**Таблица 3.** Оводненность, доля свободной и связанной воды в тканях листа проростка пшеницы и клубня картофеля (по данным дифференциальной сканирующей калориметрии)

| мг H <sub>2</sub> O/мг сухой массы | Клубень картофеля  |  | Лист пшеницы       |  |
|------------------------------------|--------------------|--|--------------------|--|
|                                    | исходное состояние | после сушки над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | исходное состояние | после сушки над конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| Оводненность                       | 4.3 ± 0.2          | 3.1 ± 0.2*   | 6.5 ± 0.9          | 4.2 ± 0.9*   |
| Свободная вода                     | 3.6 ± 0.2          | 2.9 ± 0.2*   | 5.8 ± 0.8          | 3.3 ± 0.6*   |
| Связанная вода                     | 0.7 ± 0.1          | 0.2 ± 0.1*   | 0.6 ± 0.2          | 0.8 ± 0.2  |

лоидов. По-видимому, в данном случае применение метода ДСК имеет ограничения при исследовании: фракции молекул воды, степень связи которых с субстратом одновременно не позволяет им выстраивать кристаллическую решетку льда при понижении температуры, но и не препятствует их перемещению вдоль градиента концентрации паров при высушивании.

В целом, несмотря на существующие разногласия в получаемых данных, нельзя говорить о неприменимости какого-либо из методов для количественной оценки связанной и свободной воды в тканях растений. Следует полагать, что для корректной интерпретации полученных результатов как при использовании метода высушивания над концентрированной серной кислотой, так и метода промораживания с применением ДСК, необходимо учитывать физиологические и структурные особенности изучаемого объекта.

Использование метода высушивания в воздушной среде с низким содержанием паров воды применительно к запасающим тканям, таким как запасающая паренхима клубня картофеля, необходимо учитывать как высокое содержание осмолитов, так и возможное влияние на скорость испарения воды повышения плотности подсыхающей ткани. Эффект торможения испарения влаги вследствие повышения плотности ткани можно снизить, если максимально диспергировать материал, однако полностью его исключить по-видимому нельзя. Применение метода ДСК позволяет наиболее полно оценить количество свободной и связанной воды в тканях растений, однако и этот метод имеет ограничения при изучении тканей с высоким содержанием сорбирующих воду молекул. Получаемые результаты о количестве связанной воды в данном случае могут быть завышены, что было показано на тканях клубня картофеля. Наименьшие разногласия между сравниваемыми методами по соотношению фракций воды были получены при использовании в качестве объекта исследования листа пшеницы. Сопоставимость данных, полученных разными методами при оценке фракций воды у листа пшеницы, может быть следствием как меньшего содержания осмо-

литов, так и большей проницаемостью его тканей для паров воды.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для количественной оценки фракций свободной и связанной воды в растительных тканях необходимо внимательно подходить к подбору метода исследования изучаемого объекта. Для верной интерпретации полученных данных необходимо учитывать физиологические и структурные особенности изучаемого объекта. На результаты, получаемые методом высушивания над гигроскопичными средами, могут оказывать существенное влияние как концентрация осмолитов в цитоплазме клеток, так и снижение физической проницаемости подсыхающей ткани для паров воды. Наиболее полно оценить количество свободной и связанной воды в тканях растений позволяет метод промораживания на дифференциальном сканирующем калориметре, однако и этот метод имеет ограничения при изучении тканей с высоким содержанием сорбирующих воду молекул.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ ГР АААА-А17-117033010038-7).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алаудинова Е.В., Симкина С.Ю., Миронов П.В. Сезонные изменения содержания воды в меристематических тканях почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylves-*

- tris L.* и ее распределение в клетках // Хвойные бореальной зоны. 2007. Т. 24. № 4–5. С. 487–491.
- Алексеев А.М.* Водный режим клеток растения в связи с обменом веществ и структурированностью цитоплазмы. М.: Наука, 1969. 36 с.
- Бакрадзе Н.Г.* О кристаллизации внутриклеточной воды в тканях растений // Биофизика. 1983. Т. 28. С. 119–121.
- Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Грунина Н.А., Родригес Кастильо Л.О.* Тепловые свойства водных кластеров в нативных и аморфных крахмалах // Вестн. СПбГУ. 2012. Сер. 4. Вып. 2. С. 10–21.
- Викторов Д.П.* Малый практикум по физиологии растений / Учеб. пособие для биол. спец. вузов, 3-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1983. 135 с.
- Гольд В.М., Гаевский Н.А., Голованова Т.И. и др.* Физиол. раст. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: метод. указания по лаб. работам. Красноярск: ИПК СФУ, 2008. 61 с.
- Гусев Н.А.* Состояние воды в растении. М.: Наука, 1974. 134 с.
- Думанский А.В.* Учение о коллоидах. М.–Л.: Госхимиздат., 1948. 418 с.
- Жолкевич В.Н., Гусев Н.А., Капля А.В. и др.* Водный обмен растений. М.: Наука, 1989. 256 с.
- Климов С.В.* Пути адаптации растений к низким температурам // Успехи соврем. биол. 2001. Т. 121. С. 3–22.
- Максимов Н.А.* Развитие учения о водном режиме и засухоустойчивости растений от К.А. Тимирязева до наших дней “Тимирязевские чтения”. М.: Изд-во АН СССР, 1944. 48 с.
- Миронов П.В., Левин Е.Д.* Переохлаждение и обезвоживание хвойных зачатков в зимующих почках листовницы сибирской // Физиол. раст. 1985. Т. 32. № 4. С. 695–701.
- Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Лоскутов С.Р.* Низкотемпературная устойчивость тканей меристем почек хвойных: особенности распределения связанной воды в клетках // Хвойные бореальной зоны. 2017. Т. 35. № 1–2. С. 117–122.
- Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Репях С.М.* Низкотемпературная устойчивость живых тканей хвойных. Красноярск: СибГТУ, 2001. 221 с.
- Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Шимова Ю.С., Симкина С.Ю.* Фракционный состав водорастворимых цитоплазматических белков меристем зимующих почек ели и пихты // Хвойные бореальной зоны. 2006. Т. 18. №2. С. 228–231.
- Некрасов Б.В.* Основы общей химии. М.: Химия, 1973. Т. 1. 656 с.
- Романова Т.Д.* Физико-химические свойства белков и активность дегидрогеназ в связи с состоянием воды в зимующих растениях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань: Казанский гос. ун-т им. В.И. Ульянова-Ленина, 1970. 16 с.
- Сулейманов И.Г.* Состояние и роль воды в растении. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1974. 181 с.
- Тарабрин В.П.* Водный режим и устойчивость древесных растений к промышленным загрязнениям. Газоустойчивость растений. Новосибирск: Наука, 1980. С. 18–29.
- Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
- Туманов И.И.* Физиологические основы зимостойкости культурных растений. Л.: Сельхозгиз, 1940. 367 с.
- Угрозов В.В., Шебершинева Н.Н., Филиппов А.Н., Сидоренко Ю.И.* Сорбция и десорбция паров воды зернами нативного крахмала некоторых культур // Коллоид. журн. 2008. Т. 70. № 3. С. 402–407.
- Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Ред. Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, Н.М. Макрушин. М.: Колос, 2000. 640 с.
- Физиология сельскохозяйственных растений в 12 томах. Физиология водообмена растений, устойчивость растительных организмов. Природа иммунитета / Ред. Б.А. Рубин. М.: МГУ, 1967. Т. 3. С. 12.
- Фрацук Н.Ф.* Устройство для определения свободной и связанной воды в биологических тканях. Авторское свидетельство SU 1442186 А1. База патентов СССР. 1986. <http://patents.su>.
- Хохлова П.Л., Бочкарева М.А.* Водный обмен растений: итоги ЯМР-исследований // Уч. зап. Казанского гос. ун-та. Естественные науки. 2009. Т. 151. Кн. 4. С. 74–102.
- Яковец О.Г.* Фитофизиология стресса. Методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. Минск: БГУ, 2011. 50 с.
- Einhorn-Stoll U., Hatakeyama H., Hatakeyama T.* Influence of pectin modification on water binding properties // Food Hydrocolls. 2012. V. 27. Iss. 2. P. 494–502.
- Ciesla K., Rahier H., Zakrzewska-Trznadel G.* Interaction of water with the regenerated cellulose membrane studied by DSC // J. Therm. Anal. Calorim. 2004. V. 77. P. 279–293.
- Clegg L.S.* Intracellular water and the cytomatrix: some methods of study and current views // J. Cell Biol. 1984. V. 99. № 1. P. 167–171.
- Gliguem H., Ghorbel D., Grabielle-Madlmont C. et al.* Water behavior in processed cheese spreads. DSC and ESEM study // J. Therm. Anal. Calorim. 2009. V. 98. P. 73–82.
- Hatakeyama T., Ikeda Y., Hatakeyama H.* Effect of bound water on structural change of regenerated cellulose // Macromol. Chem. Phys. 1987. V. 188. Iss. 8. P. 1875–1884.
- Hatakeyama T., Inui Y., Iijima M., Hatakeyama H.* Bound water restrained by nanocellulose fibres // J. Therm. Anal. Calorim. 2013. V. 113. P. 1019–1025.
- Nakamura K., Hatakeyama T., Hatakeyama H.* Studies on bound water of cellulose by differential scanning calorimetry // Text. Res. J. 1981. V. 51. Iss. 9. P. 607–613.
- Nishioka N., Yoshimi S., Iwaguchi T., Kosai K.* Permeability through cellulose membranes grafted with vinyl monomers in homogeneous system II. States of water in acrylonitrile grafted cellulose membranes // Polym. J. 1984. V. 16. P. 877–885.
- Nowak P., Harańczyk H., Kijak P., Marzec M. et al.* Bound water behavior in *Cetraria aculeata* thalli during freezing // Polar Biol. 2018. V. 41. Iss. 5. P. 865–876.

- Papoian A. G., Ulander J., Eastwood M. P. et al.* Water in protein structure prediction // PNAS USA. 2004. V. 101. № 10. P. 3352–3357.
- Slovakova L., Matusikova I., Salaj J., Hudak J.* Effect of low temperatures on the structure of plant cells: structural, biochemical, and molecular aspects / Handbook of Plant and Crop Stress. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2011. P. 536–564.
- Simatos D., Faure M., Bonjour E., Couach M.* Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry in the study of water in foods // Water relations of foods / Ed. R. Duckworth. London, New York, San Francisco: Academic Press, 1974. P. 193–209.
- Tomaszewska-Gras J.* Detection of butter adulteration with water using differential scanning calorimetry // J. Therm. Anal. Calorim. 2011. V. 108. P. 433–438.

## Definitions of Free and Bound Water in Plants, a Comparative Analysis of the Drying Method over a Dewatering Agent and Differential Scanning Calorimetry

R. V. Malyshev\*

*Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*

*\*e-mail: malrus@ib.komisc.ru*

The article presents the results of a comparative study of two methods of drying over a water-removing medium and the DSC method. Measurements of the amount of free and bound water were performed in plant tissues with different osmotic pressure of the cytoplasm. The results of the comparison revealed a number of limitations for both methods. It is necessary to take into account the physiological and structural features of the object under study. The most complete estimation of the amount of free and bound water in plant tissues is possible by the method of freezing on a differential scanning calorimeter, but this method also has limitations when studying tissues with a high content of water-sorbing molecules.

*Keywords:* free water, bound water, dewatering agent, osmotic pressure, differential scanning calorimetry