

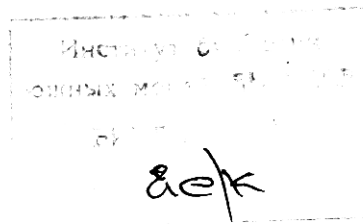
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

Экология моря

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1980 г.

Выпуск 6



ОРГАНИЗМ И СРЕДА

УДК 576.343:578.088:581.19:615.9(26)

В. Е. ЕРОХИН, В. Н. КАРНАУХОВ

СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА МАКРОФИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ФЕНОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Один из актуальных вопросов экологической биохимии моря — взаимодействие макрофитов в прибрежных биоценозах как между собой с помощью продуктов внеклеточной экскреции, так и с окружающей средой при участии органических веществ биогенного и антропогенного происхождения. Последние в настоящее время стали мощным экологическим фактором, изменяющим состав прибрежных биоценозов и их продуктивность. Наиболее значительное токсическое влияние оказывают нефтепродукты и в первую очередь их компоненты, растворенные в морской воде, в том числе и фенолы. В настоящей работе мы попытались подойти к оценке устойчивости макрофитов в прибрежных биоценозах при воздействии фенолов на основе анализа функциональной активности клетки, ее энергетического аппарата.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на двух видах черноморских водорослей — макрофитов — *Cystoseira barbata* (Good. et Wood) Ag. и *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link в период их интенсивного роста (май).

Водоросли собирали в зоне открытого побережья в районе г. Севастополя. Для опытов использовали молодые талломы макрофитов, собранные вместе с субстратом (камни), к которому они были прикреплены. Адаптацию макрофитов к аквариальным условиям проводили в течение суток. После этого в воду с макрофитами добавляли фенол. Испытаны следующие концентрации: 0,001; 0,01; 0,1; 5,0; 10,0; 25,0; 100,0 и 1000,0 мг/л. Контролем служили макрофиты, содержащиеся в морской воде без токсиканта. Опыты проводили при плотности макрофитов, составляющей 1 г на 5 л воды. Температуру воды и освещенность поддерживали близкими к естественным. Время экспозиции в эксперименте 24 ч.

В области биохимии и молекулярной биологии уже вплотную подошли к изучению молекулярной организации функциональных механизмов живой клетки и процессов регуляции. Именно эти механизмы обеспечивают возможность выполнения клеткой таких функций, как рост, репродукция, адаптация к условиям среды и т. д.

Среди коферментов окислительного метаболизма ключевые позиции занимают пиридиннуклеотиды (Пн) и флавопротенны (Фп). Соотношение окисленных и восстановленных форм этих соединений характеризует скорость выработки энергии и отражает функциональную активность клетки. Известно, что Пн обладают люминесценцией только в восстановленном состоянии (460—480 нм) и утрачивает эту способность при переходе в окисленное состояние. Фп люминесцирует только в окисленном состоянии (520—530 нм) [4, 5, 7]. Отмеченное свойство Пн и Фп позволяет контролировать состояние энергопроизводящего аппарата клетки методами люминесцентного анализа по соотношению интенсивностей люминесценции окисленных Фп и восста-

новленных пиридиннуклеотидов (Пн—Н₂): $\xi = B/A$ [4, 5]. В этом выражении А представляет собой интенсивность люминесценции восстановленных пиридиннуклеотидов в длине волны 465—475 нм, а В — интенсивность люминесценции окисленных флавопротеинов. Чтобы найти В, необходимо вычислить разность между общей интенсивностью люминесценции при 520 нм (I_{520}) и 1/2 интенсивности люминесценции Пн—Н₂ в максимуме ($I_{475} = A$). В этом случае искомый параметр имеет вид:

$$\xi = \frac{B}{A} = \frac{I_{520} - 0,5I_{475}}{I_{475}}.$$

Все величины в этом выражении могут быть измерены по спектру люминесценции клетки. Предложенный безразмерный параметр ξ характеризует состояние энергопроизводящего аппарата клетки и позволяет проводить не только качественные, но и количественные наблюдения [5]. Величина ξ не зависит ни от изменения рассеивающих свойств микрообъекта, ни от изменения чувствительности регистрирующей системы, ни от интенсивности возбуждающего излучения и т. п.

Отобранные через определенный период времени талломы макрофитов, находившиеся в морской воде с фенолом, помещали на предметный столик микроспектрофлуориметра [6] и регистрировали спектры люминесценции. Для возбуждения использовали излучение дуговой ртутной лампы ДРШ-250 в длине волны 365 нм. В ряде опытов дополнительно использовали аппликацию 2,4-динитрофенола на различные участки свежесобранных талломов макрофитов непосредственно на предметном столике микроспектрофлуориметра. Регистрацию спектров люминесценции в этом случае проводили через интервалы времени 5—10 мин.

Результаты и обсуждение. Полученные на свежесобранных макрофитах спектры люминесценции выявили интересные особенности и различия функциональной активности клеток и состояния энергопроизводящего аппарата. На рис. 1 представлены типичные спектры люминесценции *S. barbata* в норме и после действия 2,4-динитрофенола. Как видно, в норме спектры характеризуются ярко выраженным преобладанием полос люминесценции восстановленных пиридиннуклеотидов ($\xi = 0,4$). Подобное соотношение восстановленных и окисленных компонентов дыхательной цепи характерно для тканей, находящихся в состоянии покоя [4, 5]. При воздействии на ткани *S. barbata* 2,4-динитрофенола наблюдается разобщение окисления с фосфорилированием, что проявляется в изменении формы спектра люминесценции клеток. Скорость переноса электронов по дыхательной цепи увеличивается, что приводит к увеличению параметра ξ ($\xi = 0,55$).

В норме различные участки таллома *S. barbata* обладают однотипными спектрами люминесценции, параметр ξ которых лежит в интервале от 0,4 до 0,3 (рис. 1, 2), что указывает на относительно низкий уровень энергетической активности клеток этой водоросли в норме. В отличие от этого, при изучении водоросли *E. intestinalis* обнаружено два характерных типа спектров люминесценции клеток различных участков таллома: клетки с высоким значением параметра ξ ($\xi = 0,7$; рис. 3, 1) и клетки с относительно низкой величиной этого параметра ($\xi = 0,47 \div 0,50$, рис. 3, 2). Учитывая, что при действии 2,4-динитрофенола величина параметра ξ увеличивается у клеток *E. intestinalis* до $0,70 \div 0,75$ (см. 1' и 2' на рис. 3), можно полагать, что клетки водоросли, характеризующиеся в норме высоким значением ξ ($\xi = 0,7$; рис. 3, 1), практически не изменяющимся при действии 2,4-динитрофенола (рис. 3, 1'), находятся в состоянии максимально напряженной энергопродукции. В отличие от них, клетки, характеризующиеся в нор-

ме относительно низким значением параметра ($\xi=0,47-0,50$; рис. 3, 2), который увеличивается при действии 2,4-динитрофенола ($\xi=0,70 \div 0,75$; на рис. 3, 2'), находятся в состоянии нормального или несколько повышенного (но не максимального) уровня энергопродукции.

Выводы о разном уровне энергопродукции в клетках изученных макрофитов *C. barbata* и *E. intestinalis* сделаны на основе предполо-

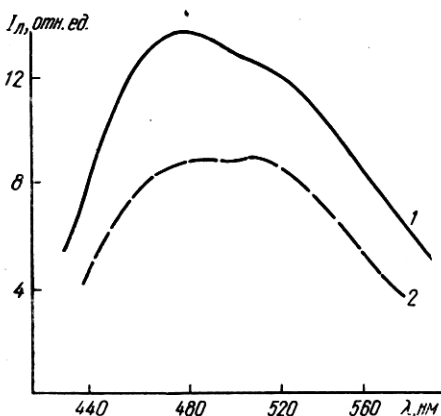


Рис. 1. Спектры люминесценции восстановленных пиридиннуклеотидов и окисленных флавопротеинов в талломах *C. barbata* в норме (1) и после действия 2,4-динитрофенола (2) в течение 5 мин.

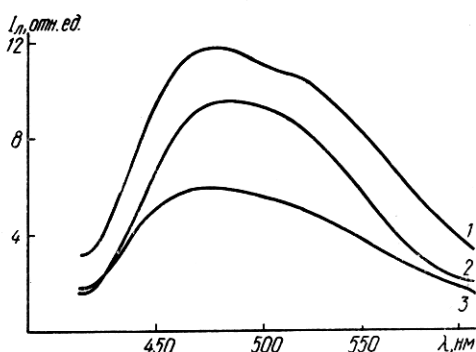


Рис. 2. Спектры люминесценции различных участков верхних веточек слоевища:

1 — район точек роста, $\xi=0,36$; 2 — место сочленения верхней веточки с ветвью нижестоящего порядка, $\xi=0,32$; 3 — средняя часть верхней веточки, $\xi=0,30$.

жения об отсутствии в норме разобщения окисления с фосфорилированием. В то же время высокий уровень ξ может наблюдаться и в случае разобщения окисления с фосфорилированием, когда скорость выработки АТФ, а следовательно, и уровень энергопродукции, будут низкими. Поэтому приведенный выше вывод о более высоком уровне энергопродукции в клетках водоросли *E. intestinalis* по сравнению с клетками *C. barbata* нуждался в проверке независимым методом. С этой целью было проведено сравнительное определение уровня АТФ в тканях обоих макрофитов биолуминесцентным методом с применением люциферин-люциферазного комплекса из светляков *Luciola mingrelica*, которое показало, что уровень АТФ в тканях *E. intestinalis* в 20 раз выше такового в тканях *C. barbata* [2]. Это согласуется с данными люминесцентного микроспектрального анализа и указывает на то, что высокий уровень параметра ξ в клетках *E. intestinalis* действительно характеризует высокий уровень энергопродукции.

Во второй серии опытов изучалось изменение состояния энергопроизводящего аппарата микрофитов при фенольной интоксикации. Как видно из рис. 4, состояние энергетической системы при действии фенола значительно изменяется. О характере изменений можно судить по величине, приобретающей по отношению к контролю ($\Delta\%$) колебательный характер. Последнее объясняется, по-видимому, адаптационной перестройкой энергопроизводящей системы макрофитов.

Наиболее устойчивыми к интоксикации оказались район точек роста и срединная часть верхней веточки (рис. 4, а, в), где были сильно выражены адаптационные колебания ξ . Величина ξ , рассчитанная по спектрам люминесценции, снятым в районе сочленения веточки с ветвью нижестоящего порядка, практически при всех испытаниях концентрации фенола ниже, чем в контроле (рис. 4, б). Полученные данные свидетельствуют о выраженном действии фенола на окислительно-вос-

становительные процессы в дыхательной цепи, о переходе энергетического аппарата макрофитов при действии фенола в состояние покоя, близкое к анабиозу.

На основании имеющихся данных судить о тонком механизме действия фенола на энергетическую систему макрофитов пока рано. Дело в том, что вопрос этот изучен слабо, а химическое разнообразие форм фенольных соединений велико и функции их весьма разнообразны. Наиболее верным будет предположение о неспецифичности действия фенолов на организм. Имеются, например, данные об использовании фенольных соединений наземными растениями в качестве энергетического материала, о функционировании фенольных соединений в качестве регуляторов в процессе роста, развития и репродукции у растений, антиоксидантов и т. п. [3].

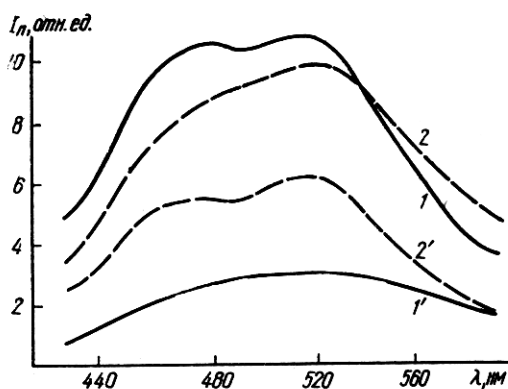


Рис. 3. Спектры люминесценции восстановленных пиридиннуклеотидов и окисленных флавопротеинов в талломах *E. intestinalis* в норме (1, 2) и после действия 2,4-динитрофенола (1', 2') в течение 5 мин.

Фенольные соединения могут легко образовывать водородные связи между электроотрицательными атомами, как правило, с кислородом или азотом. Особенно большое значение имеет образование водородных связей между пептидным кислородом и фенольной гидроксильной группой [3]. Окисление фенолов кислородом очень активно происходит в щелочной среде, а в анаэробных условиях — при действии солнечной радиации. Хинонные формы фенолов наиболее энергично взаимодействуют с белками, причем считается, что в первую очередь блокируются сульфгидрильные группы, а при избытке хинонов и некоторые аминокислоты, например аминокислоты лизина и аспарагиновой кислоты. Биологическое окисление осуществляется различными оксидазами, главным образом полифенолоксидазой и пероксидазой [3]. При окислении фенолов образуются свободные радикалы и большое разнообразие продуктов их взаимодействия. Не менее важным свойством фенолов является их способность к комплексообразованию с ионами тяжелых металлов. Следовательно, можно предположить, что при этом в первую очередь будут повреждаться ферментная и пигментная системы макрофитов.

Взаимодействие фенолов с ферментными белками было обнаружено еще в 1929 г. А. И. Опариним и А. Л. Курсановым. Ими было показано также, что инактивация ферментов в присутствии полифенолов *in vitro* носит неспецифический характер. Имеются сведения, полученные в опытах с митохондриями печени крыс, об изменении конфигурации ферментных белков при связывании полифенолов с белками [3]. На этом основании можно предположить, что при действии фенола на макрофиты также повреждаются белки, в том числе и апоферменты. Изменение структуры макромолекул и их функций позволяет предположить, что фенольные соединения могут выполнять роль аллостерических регуляторов ферментативных процессов.

Проведенные нами ранее работы с макрофитами *S. barbata* и *E. intestinalis* [1, 2] показали, что фенол вызывает нарушение основных параметров жизнедеятельности макрофитов. Эти нарушения проявляются как в адаптационной перестройке функциональных физиологических показателей (дыхание, циркадные ритмы), так и в изменении ка-

качественного и количественного состава биохимических компонентов макрофитов (АТФ, белок, пигменты). Кроме того, мы располагаем сведениями по изменению ферментативной активности АТФ-азы, полифенолоксидазы и пероксидазы. Все указанные изменения во времени имеют ярко выраженный по отношению к контролю колебательный

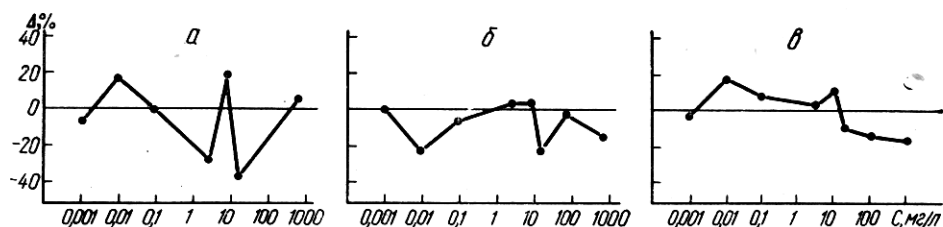


Рис. 4. Изменение (в процентах) к контролю (Δ , %) индекса активности энергетической системы ξ водоросли *C. barbata* при действии различных концентраций фенола: а — район точек роста; б — место сочленения верхней веточки с ветвью нижестоящего порядка; в — срединная часть верхней веточки.

характер. Уровень колебаний, как правило, определяется не только концентрацией фенола, но и, по-видимому, адаптационными свойствами исследуемой системы, причем токсикант играет, вероятно, только роль пускового механизма.

Резюмируя изложенное выше, следует отметить, что состояние энергопроизводящего аппарата макрофитов, а именно соотношение интенсивности люминесценции окисленных флавопротеинов к восстановленным пиридиннуклеотидам (ξ), может служить хорошим индикатором изменений функциональной активности клетки (организма) при действии токсикантов, в частности фенолов.

1. Ерохин В. Е. Содержание белка и уровень АТФазной активности в талломах макрофитов *Cystoseira barbata* (Good et Wood) Ag. и *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link при фенольной интоксикации. — Биология моря, Киев, 1977, вып. 41, с. 80—83.
2. Ерохин В. Е. Исследование дыхательного газообмена (по кислороду) и содержания АТФ в талломах *Cystoseira barbata* (Good et Wood) Ag. и *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link при фенольной интоксикации. — Биология моря, Киев, 1977, вып. 41, с. 78—80.
3. Запретнов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. — М.: Высш. школа, 1974. — 214 с.
4. Карнаухов В. Н. Спектральный анализ в изучении внутриклеточной регуляции обмена веществ и энергии. — Цитология, 1976, № 4, с. 408—418.
5. Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. — М.: Наука, 1978. — 207 с.
6. Карнаухов В. Н., Яшин В. А., Шамаров А. М., Дударев В. В. Микроспектрофлуориметр с интерференционным светофильтром переменной длины волны. — Цитология, 1975, № 4, с. 478—481.
7. Chance B., Schocner B. Fluorimetric studies of flavin component of the respiratory chain. — In: Flavins and flavoproteins: Amsterdam etc., 1966, p. 510—519.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР
Институт биологической физики
АН СССР

Поступила в редколлегию
16.04.79

ENERGY APPARATUS CONDITION IN MACROPHYTES IN NORM AND WITH PHENOL INTOXICATION

Summary

Experimental data are presented on the ratio of luminescence intensities of oxidized flavoproteins to reduced pyridine nucleotides (parameter ξ) in cells of two Black Sea macrophytes species. It is shown that ξ may serve as a good indicator of functional activity changes in the energy apparatus of macrophytes in norm and with phenol intoxication.

УДК 595.132:551.46.09:628:62—634.2(262.5)

Н. Г. СЕРГЕЕВА

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ВОЗМОЖНОСТИ ЗАСЕЛЕНИЯ НЕФТЯНЫХ АГРЕГАТОВ СВОБОДНОЖИВУЩИМИ НЕМАТОДАМИ

Нефть и нефтепродукты, попадая в моря и океаны, подвергаются действию различных физико-химических и биологических факторов. Вследствие этого токсичность некоторых нефтяных продуктов с течением времени уменьшается.

Наиболее распространенной и устойчивой формой пребывания нефти в морской среде являются так называемые нефтяные агрегаты. Распределяясь в поверхностных слоях морей и океанов, нефтяные комки служат субстратом для организмов неистонного перифитона, а также для оседания пелагических личинок некоторых донных животных (полихет, моллюсков). Недавно внутри нефтяных агрегатов были найдены типично бентосные организмы — свободноживущие нематоды, не имеющие стадии пелагической личинки [1, 2]. В этой связи представляет интерес проследить за возможностью заселения нематодами нефтяных агрегатов в экспериментальных условиях и за изменением последних в морской среде.

Методика исследования. Для наблюдения были использованы нефтяные агрегаты, выброшенные в районе юго-западного побережья Крыма и пролежавшие на берегу неопределенное время. Они представляли собой комки неправильной формы до 20—22 мм в диаметре и по внешнему виду и консистенции были условно разделены на две группы: I — комки черного цвета с прилипшими песчинками, мягкие, легко меняющие форму при надавливании пальцами, липкие внутри; II — комки коричневого цвета, относительно плотные, уплотненные, с незначительным количеством песчинок на поверхности, внутри почти не липкие¹.

Результаты анализов показали, что агрегаты отличаются не только внешними признаками, но и химическим составом. Агрегаты I группы содержат вдвое больше бензолных смол, почти в 3 раза больше спиртобензолных смол, в 2 раза меньше асфальтенов, по сравнению с агрегатами II группы (таблица). Кроме того, они отличаются качественным и количественным соотношением нормальных и разветвленных парафинов.

Отличие в химическом составе агрегатов может быть, вероятно, результатом различного происхождения исследованных нефтяных остатков или неодинаковой степени их выветривания.

¹ Анализ химического состава нефтяных агрегатов проведен сотрудником ИнБЮМ АН УССР Л. А. Георга-Копулос.