

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЕЯ

1871



29
—
1988

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ И САМООЧИЩЕНИЯ МОРЯ

УДК 591.148.577.472(26)

П. В. ЕВСТИГНЕЕВ

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СВЕТОИЗЛУЧЕНИЕ *NOCTILUCA MILIARIS*

Последние годы характеризуются интенсивным сбросом и накоплением в океане ряда токсических соединений, в том числе и тяжелых металлов, как правило, техногенного происхождения. Характерными чертами их миграции являются не только локальные поступления в среду со сточными водами рудничного, шахтного, металлообрабатывающего и перерабатывающих производств, но и глобальное загрязнение ими через атмосферу [5]. Большинство катионов металлов являются высокотоксичными и долгоживущими компонентами, вызывающими у живых организмов токсические эффекты различного характера, обратимость которых невелика. В некоторых случаях при комплексном загрязнении происходит синергическое действие тяжелых металлов на популяции фитопланктона и зоопланктона. Существует мнение, основанное на экспериментальных данных, о значительной степени опасности большинства из них для морских биоценозов уже при нынешних темпах поступления их в океан [7].

Основными задачами морской токсикологии являются разработка точных количественных критериев степени загрязнения среды, изучение реакции живых организмов различных уровней на то или иное загрязнение, исследование их резистентности к интоксикации. Прямые показатели токсического эффекта у организмов при воздействии на них солей металлов фиксируются на основе измерений выживаемости особей (оценки LD_{50} , LD_{100}), скорости роста и размножения. Указанные параметры — основные при аргументации того или иного биологического эффекта, однако часто получение данных характеристик связано с длительными и сложными экспериментами. Для косвенной оценки влияния токсикантов используют некоторые физико-биохимические методы (например, измерение фотосинтеза и дыхания), позволяющие проводить анализ в более короткие сроки [7].

В настоящей работе использованы биофизические критерии, в качестве которых приведены результаты исследования реакции биолюминесцентной системы массовой планктонной водоросли Черного моря *Noctiluca miliaris* на воздействие различных доз тяжелых металлов.

Биолюминесценция организмов — одно из звеньев в организации общего метаболизма живых систем, при этом ее биохимические механизмы несомненно испытывают определенные деформации при изменении внешних условий [13]. Экспрессивность получения информации с помощью данного теста при оценках токсикорезистентности живых форм — несомненное преимущество перед всеми названными выше критериями.

Эксперименты проводили в течение ряда лет (1979—1985 гг.) в стационарных и полевых условиях (91-й, 97-й рейсы нис «Академик Ковалевский» в Черном море). Методика сбора организмов и определения биофизических характеристик светоизлучения подробно описана в [1, 2]. При стандартном электрическом раздражении ($1 \text{ ма} \cdot \text{мм}^{-2}$, 50 мс, 1 гц) получали серию импульсов от одиночных клеток ночесветки. Ана-

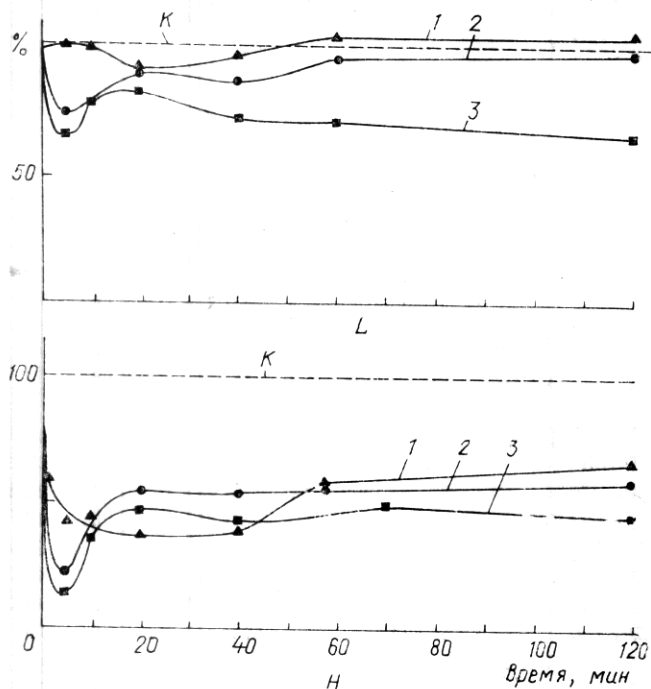


Рис. 1. Изменение продолжительности (L) и интенсивности (H) вспышек *N. miliaris* при экспозиции в среде, содержащей FeCl_3 :

1 — $5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, 2 — 10 , 3 — $20 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$.

лизировали амплитуду, интегральную энергию, среднюю интенсивность и общую продолжительность биолюминесцентных сигналов. Следует отметить, что каждая из фиксированных временных точек на представленных рисунках является средним показателем из 10–12 измерений, полученных соответственно от данного количества организмов в независимом эксперименте.

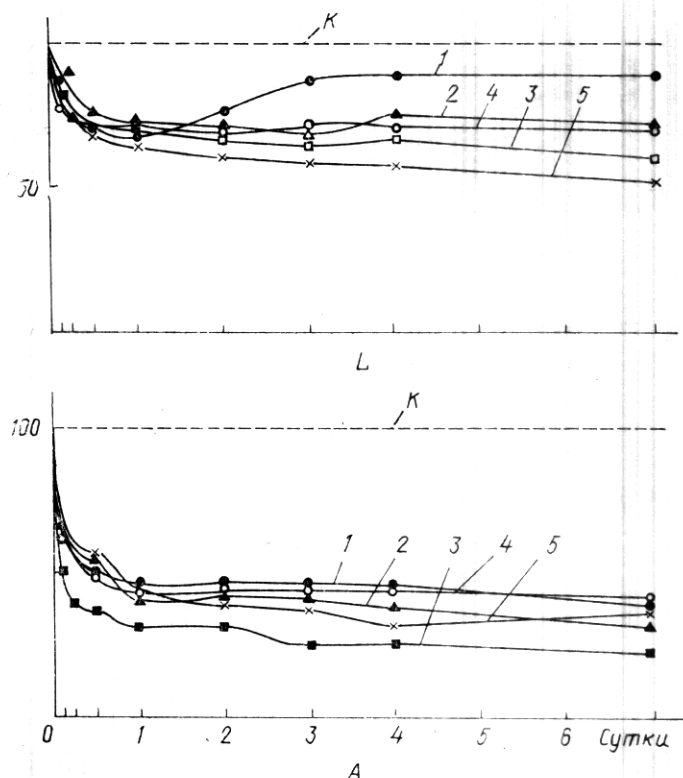
В качестве токсикантов использовали соли тяжелых металлов (FeCl_3 , ZnCl_2 , CuSO_4 , HgCl_2 , PbCl_2). Опыты в хроническом режиме проводили в фильтрованной воде без подкормки тестовой популяции.

Результаты исследований. Железо. Загрязнение морской воды соединениями железа носит локальный характер и, видимо, в настоящее время интоксикация его соединениями незначительна [7]. В наших опытах областью эффективных концентраций сульфата железа, оказывающих достоверное воздействие на биолюминесценцию ноктилюки, являлись единицы и десятки миллиграммов на литр. При столь высоких дозах токсиканта энергетические параметры вспышек составляют более 50% значений контроля в течении 2 ч экспозиции (рис. 1). Продолжительность светозлучения при этом заметно менее реагирует на присутствие катионов железа. Характерно поведение энергетики эмиссии света в первые минуты присутствия токсиканта в среде: происходит достаточно резкое падение их абсолютных величин с последующим восстановлением на более высоких уровнях. Степень выраженности данного процесса находится в зависимости от концентрации токсиканта в случае интенсивности и интегральной энергии вспышек. Следует предполагать, что в естественных условиях, где концентрация ионов железа составляет десятки-сотые доли миллиграмма на 1 л, влияние их на светозлучение планктонных водорослей невелико.

Цинк. Соединения цинка представляют значительную опасность для населения морских водоемов, однако распространение очагов повышенного содержания его в Мировом океане носит региональный характер [7]. Средняя повреждающая концентрация соединений цинка составляет $0,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, однако с рядом металлов, например медью и никелем, может проявляться синергическое действие [5]. В наших экспериментах исследовался широкий спектр концентрации хлорида цинка ($0,1$ – $10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$).

Рис. 2. Изменение продолжительности (L) и амплитуды (A) вспышек *N. miliaris* при экспозиции в среде, содержащей $ZnCl_2$:

1 — 1 $мкг \cdot л^{-1}$, 2 — 10, 3 — 100, 4 — 1000, 5 — 10 000 $мкг \cdot л^{-1}$



Длительность вспышек так же, как и в предыдущих экспериментах, испытывает меньшие отклонения от уровня контроля, однако в целом с увеличением концентрации токсиканта она снижается и при максимальных концентрациях ($10 \text{ мг} \cdot л^{-1}$) составляет приблизительно 60% продолжительности свечения контрольных форм (рис. 2). Такая закономерность отмечается на всем протяжении экспозиции, и лишь особи, содержащиеся при низких концентрациях цинка, светозлучают на третьи сутки с продолжительностью, близкой к контролю. Энергетические характеристики имеют тенденцию к снижению абсолютных значений в процессе экспозиции, причем этот процесс мало зависит от концентрации токсиканта (рис. 2). Видимо, цинк в несколько большей мере угнетает светозлучение *N. miliaris* по сравнению с катионами железа. Сравнение с литературными данными показывает, что, например, в верхнем 50-сантиметровом слое воды в Мировом океане концентрация этого токсиканта довольно высока и составляет в среднем $22 \pm 4 \text{ мкг} \cdot л^{-1}$, что сравнимо с уровнями, реально действующими на биолюминесцентную систему перидиней. Существует мнение [5] об увеличении токсичности этого катиона с уменьшением содержания кислорода, т. е. можно ожидать снижение уровней светозлучения водорослей с глубиной при прочих равных условиях.

С в и н ц. Концентрация соединений свинца в Мировом океане в среднем невелика и составляет $1 \text{ мкг} \cdot л^{-1}$ [6], однако в верхнем 50-сантиметровом слое может достигать до $13,5 \pm 3,5 \text{ мкг} \cdot л^{-1}$. Загрязнение свинцом носит глобальный характер [7] и представляет значительную опасность для населения водоемов.

Воздействие хлорида свинца на биолюминесцентную систему ночесветки представлено на рис. 3. Наиболее характерным ответом организма при экспозиции до 8 сут является наличие стимулирующего эффекта в диапазоне всех исследованных концентраций. Данная тенденция прослеживается в динамике всех параметров, но наиболее выражена в показателях амплитуды световых вспышек. Отличие от контроля

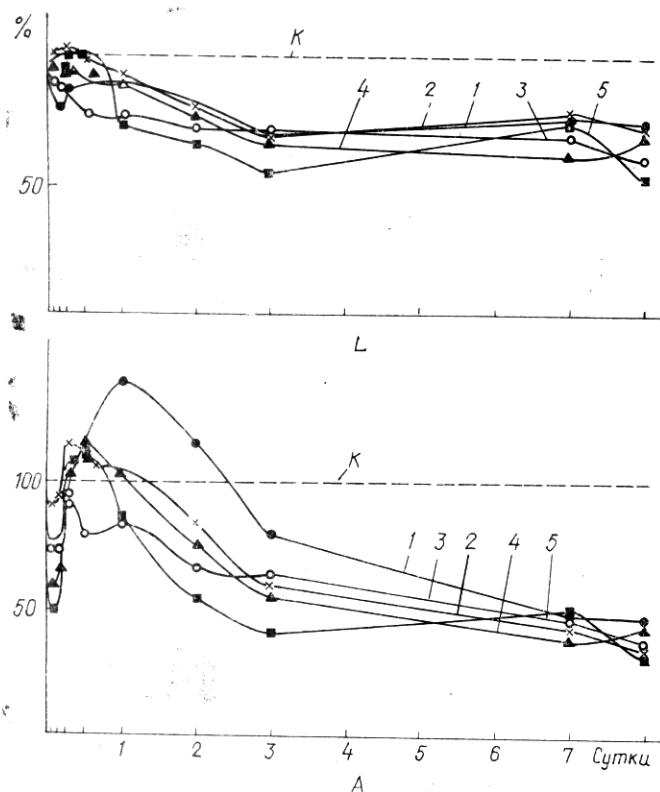


Рис. 3. Изменение продолжительности (L) и амплитуды (A) вспышек *N. miliaris* при экспозиции в среде, содержащей $PbCl_2$:

1 — 1 мкг·л⁻¹, 2 — 10, 3 — 100, 4 — 1000, 5 — 10 000 мкг·л⁻¹

через сутки экспозиции может достигать 350%. Более низкие концентрации $PbCl_2$ вызывают максимальную стимуляцию интегральной энергии свечения, но при минимуме эффекта по амплитуде свечения. Это объясняется тем, что большие концентрации свинца почти не влияют на длительность биоломинесценции, что отражается на общей энергии свечения, несмотря на максимальные величины амплитуды вспышек.

В первые часы экспозиции временные и энергетические параметры биоломинесценции ингибируются (рис. 3). Такое же ингибирование, необратимое в случае высоких концентраций свинца, имеет место и после периода увеличения свечения (более 4 сут экспозиции). Показательно, что аналогичные эффекты при суточной экспозиции отмечены и в динамике изменения интенсивности фотосинтеза одноклеточных водорослей *Dytilum brightwellii* и *Coscinodiscus granii*. При их многосуточной экспозиции и при тех же концентрациях токсиканта [7] стимулирующий эффект биоломинесценции *N. miliaris* оказывается выше. Совпадение в характере временной динамики относительной численности клеток в культурах *D. brightwellii*, *C. granii* и биоломинесценции *N. miliaris* отмечается практически при концентрации катионов свинца 100 и 1000 мкг·л⁻¹ и прекращается соответственно на 15-е и 20-е сутки, что идентично уменьшению численности клеток указанных видов водорослей в тех же временных пределах. Близкий характер реакции отмечается и для первичной продукции морских акваторий при загрязнении соединениями свинца [7]. Подтверждением существования стимулирующих эффектов является то, что при концентрации ионов свинца в среде менее 0,1 мг·л⁻¹ отмечается обильное развитие беспозвоночных, а также водных растений [5].

Таким образом, изменение параметров светоизлучения в ходе воздействия свинца на одноклеточные водоросли близко к эффектам, отмечаемым на уровне таких важных для жизнедеятельности процессов, как интенсивность фотосинтеза, численность клеток и первичная продукция. Однако реакция свечения, видимо, является более чувстви-

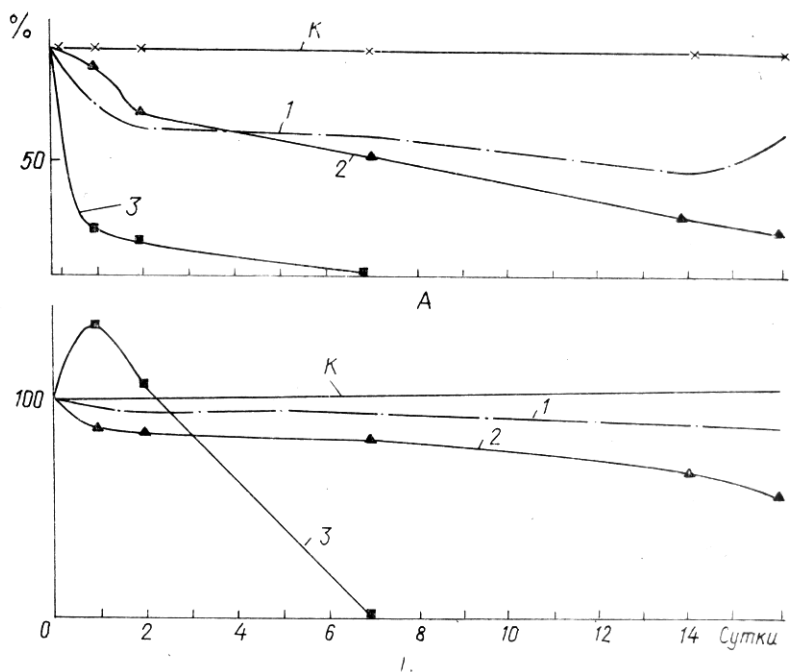


Рис. 4. Изменение продолжительности (L) и амплитуды (A) вспышек *N. miliaris* при экспозиции в среде, содержащей CuSO_4 :
1 — 10 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, 2 — 100, 3 — 1000 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$

ным индикатором свинцовой интоксикации. В данном случае присутствие свинца как микроэлемента, видимо, и способствует повышению интенсивности протекания основных метаболических реакций. При избыточном содержании этого элемента, как показывают литературные данные, отмечается повреждающее действие его ионов, приводящее к изменению осмотического давления в клетке и последующему ее лизису [14].

Медь. Соединения меди представляют значительную опасность для населения водоемов, однако загрязнение его в настоящий момент носит преимущественно региональный характер [7]. В большинстве случаев соединения меди поступают в среду после их применения в сельском хозяйстве в качестве ядохимикатов либо микроудобрений. При взаимном действии меди с некоторыми другими металлами, например с цинком, кадмием, происходит усиление токсического эффекта [5].

В экспериментах с ночесветной сульфат меди снижает энергетические параметры свечения в первые часы (рис. 4). При концентрации 1 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$ отмечено полное прекращение светоизлучения на 7-е сутки эксперимента. Даже при небольших дозах (10 $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) наблюдалось снижение энергетических характеристик биолюминесценции до 50%. Продолжительность светоизлучения клеток водорослей вначале увеличивается, а затем уменьшается (рис. 4).

Приведенные данные позволяют считать токсическими концентрациями соединений меди десятки $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, что согласуется с данными, полученными с помощью других тестов. Наши данные близки к результатам, полученным при изучении влияния соединений меди на относительную численность клеток *D. brightwellii* и *G. fissum* [7]. Как известно, катионы меди выступают в роли сильных ингибиторов клеточного метаболизма, что, видимо, и находит отражение в изменении скорости деления клеток и в снижении биолюминесценции, являющейся одним из звеньев общего метаболического цикла организма.

Ртуть. Наиболее сильную опасность для жизнедеятельности морских организмов и популяции в целом представляют соединения ртути.

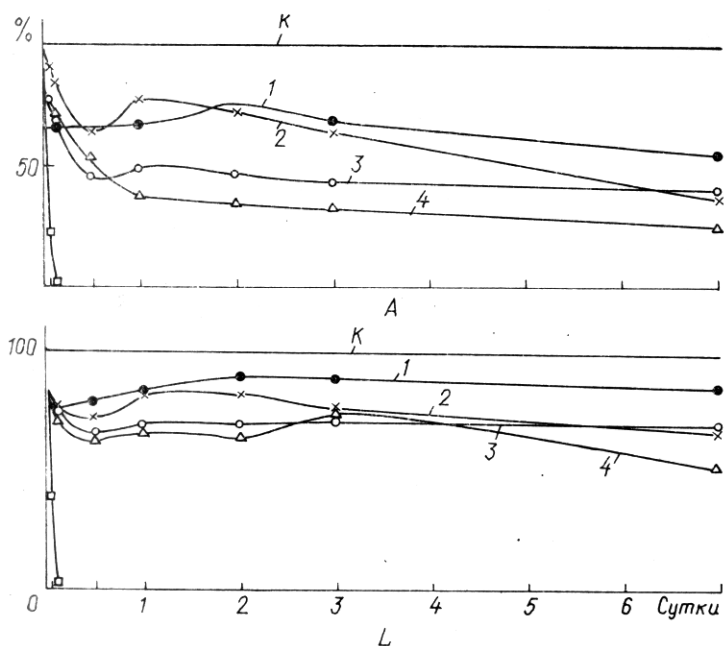


Рис. 5. Динамика изменения продолжительности (L) и амплитуды (A) вспышек *N. miliaris* при экспозиции в среде, содержащей $HgCl_2$:

1 — 0,1 мкг · л⁻¹, 2 — 1,0, 3 — 10, 4 — 100, 5 — 1000 мкг · л⁻¹ [5]

Распространенность этого токсиканта следует отнести к глобальной [7]. Спецификой воздействия соединений ртути на живые организмы является ярко выраженный синергический эффект взаимодействия с другими металлами и анионами. Уже единицы микрограмм заметно влияют на фотосинтетическую активность водорослей, дыхание рыб, численность клеток фитопланктона [5, 7].

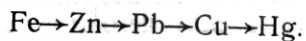
Характер изменения параметров биолюминесценции светозлучения напоминает указанный выше при действии ионов меди, однако чувствительность биолюминесцентной системы к ионам ртути существенно выше (рис. 5). Так, при концентрации 1000 мкг · л⁻¹ светозлучение полностью прекращается к исходу первых 3 ч (рис. 5). При концентрации 100 мкг · л⁻¹ амплитуда светозлучения составляет лишь 35% уровня контроля. Достоверные изменения в энергетических параметрах вспышек фиксируются и при наименьших использованных концентрациях (0,1 мкг · л⁻¹). Как и в случае, указанном для катионов Cu^{2+} , в первые моменты воздействия (до 1 ч) амплитуда вспышек ночесветки при действии ртути увеличивается и может отличаться от контроля до 2,5 раз. Однако уже к исходу 1 ч преобладает ингибирование, степень которого находится в прямой зависимости от концентрации вещества.

При сравнении наших и литературных данных выявлено аналогичное действие соединений ртути на численность клеток *Gyrodinium fissum* и *Nephrochloris salina* в многосуточных опытах. Можно отметить аналогичный характер воздействия ртути на биолюминесценцию и первичную продукцию в Балтийском и Красном морях [7].

Как известно, катионы ртути относятся к веществам, блокирующим сульфгидрильные и аминные группы белков. Это, в частности, приводит и к ингибированию ферментативных реакций [8]. Основная масса реакций в клетках водорослей, в том числе и формирующих биолюминесценцию, относятся к числу ферментативных, что, видимо, и находит отражение в снижении контролируемых функций.

Описанные выше результаты влияния тяжелых металлов на светозлучение черноморской ночесветки удобно представить в виде кон-

центрационного эффекта. Рис. 6 в определенной мере демонстрирует степень токсичности различных катионов металлов в зависимости от характера подавления ими реакции биолюминесценции за 1 сут. На основе экспериментов можно представить следующий ряд металлов по возрастающей степени их воздействия на свечение ноктилюки:



Результаты и обсуждение. Процесс воздействия тяжелых металлов на светоизлучение черноморской ночесветки можно рассматривать как традиционный пример внешнего воздействия на систему «черного ящика» с выходом в виде сигнала биолюминесценции. Закономерности между входом и выходом, а также их динамикой во времени отмечены выше. В большинстве случаев возникает определенный отказ по функции [3], приводящий к снижению эффективности функционирования в целом системы светоизлучения. Рассматривая характер подавления свечения с момента интоксикации, можно проследить пути формирования отказа в системе биолюминесценции.

Процесс биолюминесценции перидиниевых водорослей связан с деятельностью специфических образований типа сцинциллонов, локализованных в приповерхностных слоях цитоплазмы. Считается, что эмиссия квантов света происходит в ответ на протонный сдвиг, возникающий при снижении pH; последнее происходит в момент диффузии катионов водорода из примембранных слоев в сцинциллоны [9, 11]. В свою очередь, указанная диффузия, видимо, инициируется проходящим потенциалом действия, возникающим при раздражении организма извне. Таким образом, ионы водорода выступают посредником между потенциалом действия и световым сигналом [12]. В самом сцинциллоне ионы водорода вызывают освобождение медиатора, что приводит к его взаимодействию с субстратом и последующей эмиссии света. Таков, предположительно, механизм функционирования светоизлучательной системы ноктилюки.

Б. Силверберг [15] на примере некоторых диатомовых водорослей показал, что при избытке тяжелых металлов в среде они аккумулируются в приповерхностных слоях наружных мембран клеток. Присутствие катионов металлов здесь вызывает дегенеративные изменения структуры мембран. Так, уменьшение интенсивности сверхслабого свечения водных растений при действии солей тяжелых металлов связано с разрушением липопротеиновых структур, составляющих основу клеточных мембран [4]. Таким образом, вызываемая металлами деформация мембранных слоев, видимо, может влиять и на систему локализованных здесь сцинциллонов. Изменение физиологического состояния, например ухудшение (достаточно неопределенный термин) клеток, вызывает уменьшение числа сцинциллонов и, как следствие, снижение эмиссии света [9, 13].

С другой стороны, помимо количественного изменения числа источников биолюминесценции и нарушения примембранных слоев происходит подавление активности энзимов [8]. Реакция биолюминесценции у ночесветки является следствием функционирования фермент-субстратного комплекса, результатом которого является возникновение нестабильной компоненты, распадающейся с излучением кванта света.

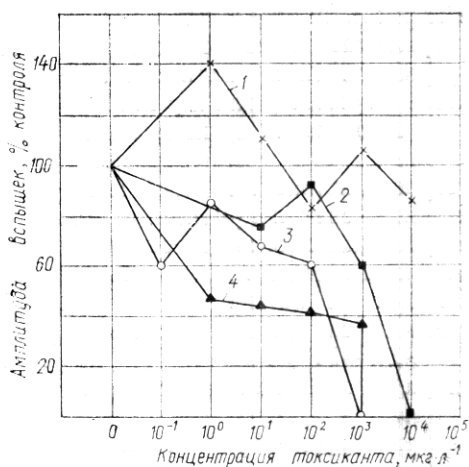


Рис. 6. Действие ионов свинца (1), меди (2), ртути (3) и цинка (4) на амплитуду светозлучения ночесветки при экспозиции 1 сут

Скорость протекания такой реакции существенно зависит от скорости ферментативного окисления субстрата — люциферина. Подавление ферментативной активности в присутствии тяжелых металлов отмечалось в гомогенатах и у живых форм [8, 10].

Выводы. 1. Соли тяжелых металлов оказывают ингибирующее действие на биолюминесценцию ночесветки. При малых концентрациях в первоначальный момент может происходить увеличение средних показателей светоизлучения. 2. Не отмечено специфичности в характере реагирования биолюминесцентной системы ночесветки на действие тех или иных катионов тяжелых металлов, однако степень их воздействия различается в зависимости от вида токсиканта, в силу чего можно представить следующий ряд по возрастанию ингибирования светоизлучения: $\text{Fe} \rightarrow \text{Zn} \rightarrow \text{Pb} \rightarrow \text{Cu} \rightarrow \text{Hg}$. 3. Анализ литературы показывает возможность двух путей подавления свечения: посредством уменьшения числа элементарных источников биолюминесценции (спинциллонов) и путем инактивации фермента. 4. Биолюминесценция *N. miliaris* — достаточно чувствительный критерий степени интоксикации внешней среды.

1. Битюков Э. П. Люминесценция *Noctiluca miliaris* и характеристика ее раздражимости // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. — 1966. — 2, № 5. — С. 452—456.
2. Гительзон И. И. Биолюминесценция моря. — М.: Наука, 1969. — 183 С.
3. Гродзинский Д. М. Надежность растительных систем. — Киев: Наук. думка, 1983. — 367 С.
4. Кочетов О. В., Тарусов В. Н. Сверхслабая хемилюминесценция листьев водных растений при действии солей тяжелых металлов // Биофизика. — 1975. — 10. — Вып. 3. — С. 537—539.
5. Метелев В. В., Ханаев А. И., Дзасохова Н. Г. Водная токсикология. — М.: Колос, 1971. — 248 С.
6. Морозов Н. П., Патин С. А., Демина Л. Л. Переходные и тяжелые металлы в водах Северной Атлантики // Тр. океаногр. ин-та. — 1975. — 127. — С. 77—94.
7. Патин С. А. Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность Мирового океана. — М.: Пищ. пром-сть, 1979. — 304 С.
8. Уэбб Д. Ингибиторы ферментов и метаболизма. — М.: Мир, 1966. — 350 С.
9. Eckert R., Reynolds G. T. The subcellular origin of bioluminescence in *Noctiluca miliaris* // J. Gen. Physiol. — 1967. — 50, N 5. — P. 1429—1458.
10. Hastings J. W., Bode V. C. Biochemistry of rhythmic systems // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1962. — N 98. — P. 876—889.
11. Henry J. P., Michelson A. M. Bioluminescence // Photochem. Photobiol. — 1978. — 27, N 6. — P. 855—858.
12. Nawata T., Sibaoka T. Coupling between action potential and bioluminescence in *Noctiluca*: effects of inorganic ions and pH in vacuolar sap // J. Comp. Physiol. — 1979. — 134. — P. 137—149.
13. Njus D., Swift E. Bioluminescence // Toxic Dinoflagellate Blooms. — New York, 1979. — P. 459—462.
14. Ribarov S. R., Benov L. C., Benchev I. C. Hemolysis and peroxidation // Experientia. — 1982. — 38. — P. 1354—1355.
15. Silverberg B. A. Ultrastructural localisation of lead in *Stigeochonium tenue* (Chlorophyceae, Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis // Phycologia. — 1975. — 1, N 14. — P. 265—274.

Ин-т биологии юж. морей

им. А. О. Ковалевского АН УССР, Севастополь

Получено 17.12.86

P. V. EVSTIGNEEV

THE EFFECT OF HEAVY METALS ON LUMINOUS RADIATION OF NOCTILUCA MILIARIS

Summary

Response of the bioluminescent system of the Black Sea *N. miliaris*, a mass bioluminescent of the littoral waters, to the action of heavy metal cations has been studied. It is stated that inhibitory action of the latter is determined by the species and concentration of the toxicant. The system of luminous radiation is the most sensitive to the action of mercury salts (units of μg) and less sensitive to iron salts (units of μg). It is concluded to be promising to use bioluminescence of peridineophyta as a test of the sea-water quality.