

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ

Журнал основан

в 1936 году.

Выходит 6 раз в год.

Москва

№ 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ • 1988

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

Е. Н. МИШУСТИН (главный редактор)

Г. К. Скрябин (зам. главного редактора), А. М. Смирнов (зам. главного редактора), Б. Ф. Ванюшин, О. Г. Газенко, В. А. Говырин, Б. В. Конюхов, Л. И. Малышев, Н. Н. Моисеев, А. С. Спирин, В. Е. Соколов, И. А. Тарчевский, Б. А. Ягодин

СОДЕРЖАНИЕ

Федоров А. К. Биология и продуктивность тритикале	5
Штейн-Марголина В. А., Сапоцкий М. В., Крылов А. В. Электронно-микроскопическое исследование растений, зараженных вирусом мозаики редиса	13
Озерецковская О. Л., Юрганова Л. А., Чалова Л. И., Ногайдели Д. Е., Чаленко Г. И., Караваева К. А. Метаболиты <i>Fusarium culmorum</i> сасс. как элисертеры образования фитоалексинов и сенсибилизации картофеля	22
Брайко В. Д., Бобкова А. Н., Добротина Г. А. Метаболиты ботриллюсов и их функциональная роль в сообществе	29
Вернер О. М., Синяк К. М., Волкова В. П. Состав жирных кислот <i>Bacillus anthracis</i> и других почвообитающих бацилл	36
Жданова Н. Н., Борисюк Л. Г., Степаниченко Н. Н., Тыщенко А. А., Рожко И. И., Дыль Д. А. Биологические особенности мутанта <i>Cladosporium cladosporioides</i>	42
Старовойтов И. И., Селифонов С. А., Нефедова М. Ю., Аданин В. М. Продукты катаболизма бифенила штаммом <i>Pseudomonas putida</i> , несущим плазмиду биодеградации pBS 241	51
Бобков Ю. И., Носова В. П., Фрелова Т. М., Шидловская Н. В. Влияние длительной блокады β -адренорецепторов на реологические свойства крови и адренореактивность сократительного миокарда при операционной травме (экспериментальное исследование)	58
Цыбышев В. П., Кузнецов А. Н. Восстановление феррицианида эритроцитами человека в присутствии переносчиков окислительно-восстановительных эквивалентов через мембрану	64

УДК 574.5 : 594.9 : 571.1

БРАЙКО В. Д., БОБКОВА А. Н., ДОБРОТИНА Г. А.

МЕТАБОЛИТЫ БОТРИЛЛЮСОВ И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ
В СООБЩЕСТВЕ

На протяжении 1979—1984 гг. в Севастопольской бухте изучали динамику оседания ботриллюсов (*Botryllus schlosseri*) и роль внешних метаболитов оболочников в функционировании ценоза обрастания. Установлено, что метаболиты ботриллюсов действуют на гидробионтов как репелленты, определяя олигомикстный характер сообщества. В состав репеллентов входит белково-углеводный комплекс, обладающий свойствами лектинов. Последние, как показали эксперименты, оказывают токсическое действие на наууплиусов баянусов, копепоид и жабры мидий. Обоснована целесообразность использования ботриллюсов как сырья для получения биоцидов и лектинов.

Все организмы в процессе жизнедеятельности выделяют органические и неорганические метаболиты, которые наряду с другими типами взаимодействий определяют межорганизменные связи в сообществе. Кроме продуктов азотистого и углеводного обмена во внешнюю среду выделяются высокоспециализированные соединения, так называемые биологически активные вещества (БАВ), изучение которых в настоящее время успешно ведется химической экологией.

Внешние метаболиты животных чрезвычайно разнообразны. В зависимости от их функциональной роли они были разделены различными исследователями (Киршенблат, 1974; Florkin, 1966; Bauchau, 1980, и др.) на отдельные типы и классы. Однако классификация БАВ у различных авторов не всегда совпадает. Нами принята терминология Р. Уиттекера и П. Фини (Wittaker, Feeny, 1971), согласно которой взаимоотношения в сообществе, определяемые внешними метаболитами, названы аллелохимическими, а сами вещества алломонами. Название «алломоны» было впервые предложено энтомологом В. Брауном (Brown, 1968).

Из класса алломонов наиболее перспективными с позиций изучения функционирования сообщества обрастаний являются репелленты (отпугивающие вещества). Это метаболиты, позволяющие организмам, их продуцирующим, повышать адаптационные возможности — защищать от хищников, паразитов, эпобионтов.

Настоящая статья посвящена изучению репеллентов ботриллюсов (*Botryllus schlosseri*, Tunicata), их роли в сообществе, а также возможного использования оболочников в качестве источника биоцидов и лектинов. Данные такого рода в литературе отсутствуют.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучение взаимодействий в сообществе обрастания на стадии доминирования ботриллюсов, а также наращивание их биомассы (для химических анализов) проводилось на стеклянных пластинах, экспонируемых в Севастопольской бухте. Наблюдения охватывали период

1979—1984 гг. В начале года в море устанавливали серии образцов, часть из которых ежемесячно снимали для биологических и биохимических исследований.

Полагая, что метаболиты оболочников представляют прежде всего сложный белковый комплекс, осаждение их из супернатанта производили общепринятыми реагентами: сульфатом аммония, этиловым спиртом или супернатант подвергали обработке активированным углем.

1. Свежесобранные колонии ботриллюсов тщательно отмывали, растирали в фарфоровой ступке или пропускали через мясорубку. Полученную кашку центрифугировали в течение 15 мин при 8 тыс. оборотов (ЦЛР-2).

Белковую фракцию из супернатанта осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Смесь помещали на холод на 2 ч, затем снова центрифугировали. Осадок ставили на диализ против 0,01 М фосфатного буфера до полного удаления из осадка аммония. Буфер менялся несколько раз. Все описанные операции производили на холоду. После диализа осадок подвергался лиофильной сушке.

2. Супернатант, полученный вышеописанным способом, диализовали с целью удаления низкомолекулярных соединений (0,05 М фосфатного буфера, pH 8,5). Часть образовавшегося диализата оставляли для анализов в исходном состоянии, часть лиофильно высушивали и часть предварительно обрабатывали этиловым спиртом (в конечной концентрации 60%), образовавшийся осадок подвергали лиофилизации.

Сырой диализат, раствор сухого диализата, раствор сухого спиртового осадка исследовали не только на токсичность, но и на содержание белков (по Lowry et al., 1951) и углеводов (Trevelayn, Harrison, 1952). Наряду с этим определяли агглютинирующую способность растворов, приготовленных из сухих осадков, по реакции оседания эритроцитов II группы крови человека (качественная реакция на наличие в исследуемой жидкости лектинов) (по Луцик с соавт., 1981).

3. Супернатант многократно пропускали через активированный уголь до получения бесцветной жидкости. Каждый раз измерялась активная реакция среды (pH). Чтобы разграничить возможное влияние метаболитов ботриллюсов и pH на гидробионтов, ставили параллельные опыты — проверяли на токсичность морскую воду с pH, аналогичной исследуемой жидкости. Кроме того, в полученном фильтрате определяли содержание белков и углеводов.

Степень токсичности, характер воздействия растворов веществ, полученных описанными выше способами, проверяли на личинках баянусов (*Balanus improvisus*), взрослых формах *Acartia clausi* (Copepoda) и жабрах мидий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сообществе обрастаний одну из стадий сукцессии завершают ботриллюсы, определяя видовой состав и особенности функционирования ценоза. Это наиболее продолжительная стадия в развитии первичной сукцессии. Длится она 5—8 мес, до момента естественной гибели колоний. Оседание ботриллюсов начинается с ранней весны и продолжается в зависимости от термического режима моря до глубокой осени (Брайко, 1985). Личинки их не реагируют на качество субстрата и способны оседать на любые поверхности, в равной мере как свободные, так и заселенные другими видами обрастателей.

Ботриллюсы обладают высоким темпом почкования зооидов. Численность их по мере увеличения продолжительности экспонирования образцов в море резко возрастает и достигает высоких значений (табл. 1). Колонии ботриллюсов сильно обводнены, в результате биомасса за 5—6 мес пребывания пластин в бухте в зависимости от степени развития мезоглеи составляет 10—30 кг·м⁻².

Таблица 1

Численность зооидов ботриллюсов ($1 \cdot 10^3$ экз. $\cdot$ м⁻²) в зависимости от продолжительности экспонирования образцов в море, Севастопольская бухта (1979—1984 гг.)

Месяцы	Экспозиция, мес	1979 г.	1980 г.	1981 г.	1982 г.	1983 г.	1984 г.
V	4	62,5 $\pm$ 3,5	187,5 $\pm$ 55,5	0,8	1,0	67,5 $\pm$ 16,3	377,0 $\pm$ 11,0
VI	5	2761,3 $\pm$ 104,3	1562,5 $\pm$ 10,3	249,3 $\pm$ 10	535,0 $\pm$ 120,3	1187,5 $\pm$ 54	902,5 $\pm$ 53,3
VII	6	2173,8 $\pm$ 388,3	142,8	70,0 $\pm$ 20,3	107,0	153,75 $\pm$ 21,2	1384,0 $\pm$ 18,2
VIII	7	1572,5		937,0	718,8 $\pm$ 54,8	575,2 $\pm$ 13,4	715,0 $\pm$ 13,7
IX	8	432,0		38,8 $\pm$ 4,0	232,5		740,0 $\pm$ 18,1
X	9	327,8 $\pm$ 26,8		14,5	123,6 $\pm$ 12,3		
XI	10	90,0 $\pm$ 24,8		164,8			
XII	11	141,3 $\pm$ 19,5					

В отличие от других организмов ценоза обрастания оболочники не имеют конкурентов. На протяжении всего периода роста и размножения ботриллюсов, исключая момент резкого спада метаболической активности, колонии их лишены эпибионтов, паразитов. Они не используются в пищу ни рыбами, ни беспозвоночными, являясь туниковой формой. Туники ботриллюсов обладают способностью к слиянию, поэтому ранее осевшие виды, оказавшиеся под их покровом, лишаются доступа пищи и кислорода. Спустя больший или меньший промежуток времени они погибают. Вагильные формы в большинстве своем уходят в другие биотопы. В результате это сообщество носит ярко выраженный олигомиктный характер.

В основе способности животных «защищать» себя от хищников, паразитов, эпибионтов, не имея специальных органов защиты, лежат различные адаптации. Так, у колониальных асцидий, обитающих в районе Бермудских островов, необрастаемость туники связана с низкой величиной pH (Stoecker, 1980). Необрастаемость колоний ботриллюсов обусловлена выделением специфических метаболитов, выполняющих, по всей вероятности, защитную функцию (Брайко, 1985).

Что представляют из себя репелленты ботриллюсов, каков механизм их воздействия на гидробионтов? Серии экспериментов по изучению токсичности растворов, их химического состава дали следующие результаты.

Действие на гидробионтов биоцидов, осажженных сульфатом аммония. В растворах белковой фракции, полученной путем осаждения ее аммонием, в концентрации 5 мг $\cdot$ мл⁻¹ сухого осадка науплии баянусов в течение 2—2,5 мин теряли активность и опускались на дно¹. При перенесении их в «чистую» морскую воду они не восстанавливались. В случае содержания в растворе 2,5 мг $\cdot$ л⁻¹ сухого осадка личинки оказывались на дне сосуда спустя полчаса. Однако в свежей воде они восстанавливали активность. Иными словами, в низких дозах биоцид ботриллюсов не вызывает гибель животных а оказывает влияние только на локомоторную функцию.

Влияние на гидробионтов диализатов. Биоцидное действие проявляли также растворы осадка, полученного в результате добавления спирта в сырой диализат. Для получения сравнительных характеристик были испытаны три продукта различной степени очистки, исходные их концентрации и различные разбавления: а) сырой диализат, раствор которого содержал 0,28 мг $\cdot$ мл⁻¹ углеводов и 0,8 мг $\cdot$ мл⁻¹ белков (табл. 2); б) растворы лиофильно высушенного диализата, в котором углеводы и белки соответственно составили 0,28 и 0,95 мг $\cdot$ мл⁻¹ (табл. 2); в) раст-

¹ Токсическое действие (NH₄)₂SO₄ полностью исключено.

Таблица 2

Содержание белков и углеводов в испытуемых растворах, мг·мл⁻¹

Растворы	Показатели		
	углеводы	белки	белки/ углеводы
Диализат сырой	0,28	0,8	2,8
Раствор сухого диализата, 10 мг·мл ⁻¹	0,28	0,95	3,4
Раствор спиртового осадка, 25 мг/мл ⁻¹	0,11	0,15	1,36

Таблица 3

Действие экстрактов тела ботриллюсов на гидробионтов и жабры мидий

Концентрация белка, мг·мл ⁻¹	Результаты испытаний
Сырой диализат	
0,8	2—3 мин воздействия вызывают потерю подвижности у акарций и науплиусов баянусов. Жабры живут
0,13	Гидробионты не реагируют
Раствор сухого диализата	
0,95	Науплиусы утратили подвижность
0,32	Науплиусы плавают
Раствор фракции, осажденной спиртом	
0,15	Науплиусы погибают мгновенно (100%)
0,01	Науплиусы и акарции погибают мгновенно (100%). Жаберная ткань мидий живет более 30 мин
0,002	Через 4—5 мин науплиусы прекращают движение; через 10 мин восстанавливаются. Акарции и жаберная ткань мидий не реагируют

воры осадка, осажденного спиртом, с содержанием углеводов 0,11 мг·мл⁻¹ и белков 0,15 мг·мл⁻¹ (табл. 3).

Растворы сухого диализата в исходной концентрации вызывали потерю локомоторной функции у акарций и науплиусов баянусов без последующего восстановления, даже в случае помещения их в «чистую» морскую воду. Разбавленный в 6 раз сырой диализат при содержании в нем белка 0,13 мг·мл⁻¹ не оказывал воздействия на гидробионтов (табл. 3).

В растворе лиофильно высушенного диализата (0,28 и 0,95 мг·мл⁻¹ углеводов и белка соответственно) науплии тотчас теряли подвижность. В случае 4-кратного разбавления исходного раствора (0,32 мг·мл⁻¹ белка) этология личинок не отличалась от контрольных опытов.

Высокотоксичным был раствор веществ, осажденных спиртом, хотя содержание в нем углеводов и белков, как видно из таблицы, в 2,5 и 6 раз соответственно было ниже, чем в сыром диализате. Науплии баянусов в растворе исходной концентрации погибали мгновенно. Исследуемая жидкость, разбавленная в 14 раз (содержание белка 0,01 мг·мл⁻¹), вызвала аналогичную реакцию — науплии и акарции тотчас погибали. Даже в растворе, разбавленном в 70 раз, с содержанием 0,002 мг·мл⁻¹ белка науплиусы через 4—5 мин теряли активность, но через 10 мин восстанавливали ее (табл. 3).

Таким образом, спиртом из диализата тела ботриллюсов осаждаются специфические белково-углеводные соединения, которые в низких концентрациях подавляют локомоторную функцию гидробионтов, тогда как в более высоких вызывают мгновенную гибель. Эти белково-углеводные комплексы вызывали агглютинацию эритроцитов крови II группы че-

Действие «фракции А» на копепоид

Таблица 4

Разбавление	Результаты опыта
Исходный раствор	Мгновенная 100%-ная гибель
1:2	То же
1:5	«
1:10	40—50% гибли в течение 2—2,5 ч
1:15	35—40% гибли в течение 2—2,5 ч
1:25	Копепоиды живут на протяжении всего опыта, 2,5 ч

Таблица 5

Действие супернатанта ботриллюсов и морской воды после многократной фильтрации через активированный уголь на науплиусов баянусов

рН	Показатели	
	морская вода	супернатант
6,90	Активны	100%-ная потеря подвижности мгновенно; 60% восстанавливаются
7,82	«	100%-ная потеря подвижности мгновенно; 70% восстанавливаются
8,11	«	100%-ная потеря подвижности мгновенно; 20% восстанавливаются
8,35	«	100%-ная потеря подвижности мгновенно; 20% восстанавливаются
8,55	«	100%-ная потеря подвижности (гибель) мгновенно; Не восстанавливаются
8,58	«	100%-ная гибель, не восстанавливаются
8,80	«	То же
8,85	«	«
8,91	100%-ная гибель, не восстанавливаются	

ловека. Такие гликопротеиды относятся к разряду лектинов, для которых характерно соотношение белков и углеводов, близкое к 1, т. е. аналогично тому, что отмечено нами для спиртового осадка (табл. 2). Все это дает основание считать, что ботриллюсы содержат в своем теле лектины.

Исходя из табл. 2 и 3 можно предположить, что в сыром диализате наряду с лектинами содержатся вещества, блокирующие их действие. Так, по данным ряда авторов (Standing et al., 1984), гомогенаты тканей кораллов *Gorgonaria* и *Pennatularia* и их диализаты содержат вещества, различающиеся по свойствам и молекулярному весу. Низкомолекулярные соединения $< (20\,000 \text{ Да})$ в лабораторных условиях ингибировали оседание циприсовидных личинок *Balanus amphitrite*, тогда как вещества большего молекулярного веса $> (20\,000 \text{ Да})$ индуцировали их оседание.

После осаждения спиртом белково-углеводной фракции и удаления ее центрифугированием из надосадочной жидкости был удален спирт (перегонкой). Оставшуюся жидкость, условно названную «фракция А», для выявления всех возможных подходов в получении биоцидов и силы их воздействия испытывали на токсичность наряду с другими растворами. Эта фракция (надосадочная жидкость после отгонки спирта) оказывала особенно сильное воздействие на гидробионтов. Даже в случае разбавления исходного раствора в 5 раз наблюдалась мгновенная гибель науплиусов (табл. 4). Биоцидное действие в этом случае, по всей вероятности, оказывали, перешедшие в диализат и оставшиеся в раст-

воре при добавлении в супернатант (не перешедшие в осадок) низкомолекулярные соединения.

Влияние фильтратов супернатанта на поведение гидробионтов. В супернатанте ботриллюсов после пропускания его через активированный уголь копеподы мгновенно теряли активность, и опускались на дно сосуда, но через несколько минут часть из них снова начинала активно плавать. Поведение таких животных было идентично контрольным. Число рачков, восстанавливающих локомоцию, сокращалось после каждой последующей фильтрации. После 5-кратного прохождения жидкости через уголь все копеподы (100%) теряли подвижность; не восстанавливалась она даже в случае перенесения животных в «чистую» морскую воду (табл. 5). Активная реакция среды после прохождения супернатанта через уголь сдвигалась в щелочную сторону (табл. 5). Однако гибель рачков ни в коей мере нельзя отнести за счет отклонения pH. В контрольных опытах (морская вода) летальный исход гидробионтов наблюдался по достижении pH 8,91 (табл. 5).

Супернатант, после обработки его углем, имел вид белой прозрачной жидкости, представляющей из себя раствор белково-углеводный комплекс. Скорее всего, это белки, обладающие свойствами лектинов, концентрированный раствор которых вызывал мгновенную гибель рачков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что ботриллюсы выделяют в окружающую среду белково-углеводный комплекс — лектины, обладающие репеллентными свойствами. Организмы, оказавшиеся в зоне воздействия метаболитов оболочников (в условиях моря), уходят в другие биотопы или временно теряют активность, которая быстро восстанавливается. Функциональная роль лектинов, вероятно, состоит в предотвращении процесса прикрепления эпibiонтов, обуславливая тем самым олигомикстный характер сообщества. Хотя не исключено, что у личинок ботриллюсов лектиноподобные молекулы, связанные с поверхностью клеток, обуславливают адгезию их к субстрату.

Следовательно, ботриллюсы, являясь тупиковой формой и образуя за короткий промежуток времени огромную биомассу, могут использоваться в качестве источника биоцидов. Добыча их не только не нарушит динамическое равновесие в сообществе, а приведет к увеличению численности других сессильных видов, особенно прикрепленных форм, личинки которых в массе (более 50%) погибают из-за отсутствия свободной для оседания поверхности. Использование биоцидов гидробионтов откроет принципиально новые аспекты в разработке способов защиты от обрастания, что позволит полностью исключить загрязнение среды и тотальную гибель личинок, роль которых в пелагиали морей и океанов, прежде всего бухт и прибрежий огромна. Это направление в химической экологии, несомненно, в скором будущем получит широкое развитие, поскольку метаболиты, обладающие репеллентными свойствами, имеются у многих других групп организмов. Американские исследователи (Standing et al., 1984) считают, что вещества, экскретируемые гидробионтами и служащие им химической защитой, могут быть использованы для предотвращения обрастания судов.

Наряду с источником биоцидов ботриллюсы могут рассматриваться как дешевое и широко доступное сырье для получения лектинов, имеющих огромное значение в молекулярной биологии и медицине.

ЛИТЕРАТУРА

- Брайко В. Д. Обрастание в Черном море. Киев: Наук. думка, 1985. 250 с.
Киришенблат Я. Д. Телергоны — химические средства взаимодействия животных. М.: Наука, 1974. 126 с.

- Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины Львов: Вища школа, 1981, с. 149.
- ✓ Bauchau A. O. Les pheromones animales//Rev. qust. Sci. 1980. V. 151. № 1. P. 57.
- ✓ Brown W. L. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in the ants//Amer. Naturalist. 1968. V. 102. № 924. P. 188.
- ✓ Florkin M. Aspecte moleculaires de l'adaptation et de la phylogenie. Collection G. P. B. № 2, Nasson, Paris, 1966, 259 s.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. Z., Farr G. A., Randall R. J. Protein measurement with the foliuphenol reagents//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 642.
- Standing J. D., Hooper I. R., Costlow J. D. Inhibition and induction of barnacle settlement by natural products present in octocorals//J. Chem. Ecol. 1984. V. 10. № 6. P. 823.
- Stoecker D. Relationships between chemical defense and ecology in benthic ascidians//Mar. Ecol. Progr. Ser. 1980. V. 3. № 3. P. 257.
- Trevelayn W. E., Harrison J. Z. Fractionation microdetermination of cell carbohydrates//J. Biochem. 1952. V. 50. P. 3.
- Whittaker R. H., Feeny P. P. Allelochemics: chemical intractions between species//Science. 1971. V. 171. № 3973. P. 757.

Институт биологии южных морей
АН УССР, Севастополь

Поступила в редакцию
5.VIII.1985

BRAIKO V. D., BOBKOVA A. N., DOBROTINA G. A.

BOTRYLLUS METABOLITES AND THEIR FUNCTIONAL ROLE IN COMMUNITY

*Institute of Biology of South Seas, Academy of Sciences
of the UkrSSR, Sevastopol*

Botryllus schlosseri settling dynamics and a role of tunicate outer metabolites in functioning of fouling cenosis were studied in Sevastopol Bay during 1979—1984. Stated, B. schlosseri metabolites impacted hydrobionts as repellents, assigning oligomixed character of the community. Repellents contain protein—carbohydrate complex having lectines properties. As experiments showed, the latter influenced toxically on balanus nauplii, copepods and mussel gills. Substantiated the expediency of botryllus utilization as raw material for getting biocides and lectines.