

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЕЯ



30

1988

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ И САМООЧИЩЕНИЯ МОРЯ

УДК 577.391:582.232

Д. Д. РЫНДИНА

НАКОПЛЕНИЕ И ФИКСАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ СТАБИЛЬНОЙ И РАДИОАКТИВНОЙ СЕРЫ ЧЕРНОМОРСКИМИ ВОДОРОСЛЯМИ

При изучении распределения стабильных и радиоактивных изотопов марганца, кобальта и цинка по биохимическим компонентам водорослей наше внимание привлек тот факт, что фракции *Cystoseira barbata*, *Ulva rigida*, содержащие производные серы (сульфолипиды, сульфополисахариды), концентрируют значительные количества этих элементов [7]. Вопрос о роли этих соединений в процессах жизнедеятельности макрофитов рассматривали немногочисленные авторы, вопрос о поступлении различных форм серы в морские водоросли и их последующая судьба в организме не изучены вовсе, хотя сера играет первостепенную роль в метаболизме водорослей и их морфогенезе.

Цель настоящего исследования — изучение накопления и фиксации различных форм серы $^{35}\text{S}^{-2}(\text{Na}_2\text{S})$ и $^{35}\text{S}^{+6}(\text{Na}_2\text{SO}_4)$ черноморскими водорослями, относящимися к различным систематическим группам (*Chlorophyta*, *Phaeophyta*), а также возможное участие их в ассимиляционном восстановлении сульфатов.

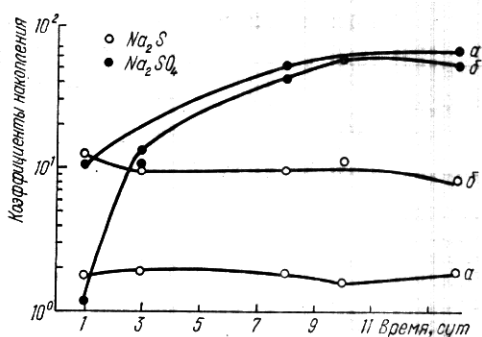
Материал и методика. Исследовали образцы водорослей, собранные в районе Херсонесской бухты в июне 1984 г. Молодые ветви *C. barbata* (взятые у вершины ствола), светло-зеленые слоевища *E. intestinalis* высотой 7—8 см и толщиной 0,15 см помещали в морскую воду (в количестве $2,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), в которую заранее вносили серу-35 в виде $\text{Na}_2^{35}\text{S}^{-2}$ или $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4^{+6}$ активностью 40 мБк·л. Содержание стабильных соединений серы в этих растворах составляло 0,00001 (Na_2S) и 1,22 мг·л (Na_2SO_4). Количество сульфатов в исходной морской воде превышало эти количества в $1,43 \cdot 10^8$ раз. Через определенные интервалы времени из каждого аквариума брали пробы воды и организмов. В дальнейшем пробы обрабатывали по методикам, описанным ранее [6]. Коэффициенты накопления выражали на сырую массу водорослей. Высушенные до постоянной массы (при $T=60^\circ\text{C}$) образцы растений последовательно обрабатывали растворами спиртов (95%, 80%, 50%, 25%-ной концентраций), углекислого натрия (1%), соляной кислоты (1%) и гидроксида натрия (4%). В экстрактах и остатках водорослей определяли содержание радионуклидов, различные формы серы (сульфосопряженную, неорганическую, белковую) по видоизмененной бензидиновой методике, используемой в медицине для диагностических исследований [4].

Для определения общего содержания серы образцы водорослей сжигали в смеси азотной и хлорной кислот ($3 \text{ н. HNO}_3 + 1 \text{ н. HCl}$), охлаждали до комнатной температуры, добавляли дистиллированную воду, 1—2 капли индикатора бромфенола синего, раствор гидроксида натрия до появления синего оттенка (рН 3), подкисляли соляной кислотой 0,1 н.) до желтого цвета, а затем снова приводили к бледно-синей окраске (с помощью NaOH). К раствору добавляли 5—8 мл ацетона, 2—3 мл бензидина ($4 \text{ г} + 150 \text{ мл воды} + 50 \text{ мл HCl}$), оставляли в покое 5—10 мин и отфильтровывали под небольшим вакуумом через фильтр «синяя лента». Осадок промывали ацетоном, спирто-эфирной смесью,

водой. Фильтр переносили в дистиллированную воду и кипятили на водяной бане в течение 20—25 мин. Полученную серную кислоту оттитровывали 0,02 н. раствором гидроксида натрия (при кипячении), используя в качестве индикатора 0,04% -ный спиртовой раствор бромтимола синего. По количеству затраченного раствора щелочи вычисляли содержание серной кислоты, а затем и серы. Неорганические сульфаты из раствора осаждали в виде сульфата бензидина, образующего при нагревании серную кислоту, которую определяли по методике, описанной ранее.

Для нахождения в растворах сульфосопряженной серы последние кипятили в течение 15 мин в 10%-ном растворе соляной кислоты. Образующиеся сульфаты осаждали разбавленным раствором бензидина и определяли после гидролиза (сульфатов бензидина). Количество сульфосопряженной серы вычисляли как разность между содержанием ее в кислотах и водных экстрактах. Для выяснения локализации серы в *C. barbata* и *E. intestinalis* из организмов извлекали белки, свободные α -аминокислоты, липиды, углеводы [5, 9]. В остатках водорослей и их отдельных фракциях определяли содержание стабильной и радиоактивной серы. Все радиометрические измерения проводили на установке Б-4 со счетчиком СБТ-13. Ошибка измерений не превышала 5%.

Результаты исследований и их обсуждение. Сравнение величин коэффициентов накопления различных форм серы морскими растениями показало, что ионы $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ активно транспортируются из окружающей



Изменение величин коэффициентов накопления различных форм серы (Na_2^{35}S , $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) в черноморских водорослях *Cystoseira barbata* (а) и *Enteromorpha intestinalis* (б)

Таблица 1. Экстракция различных форм серы из черноморских макрофитов, %*

Реагент	Условия проведения эксперимента	Количество экстрагируемой серы, %					
		Cystoseira barbata			Enteromorpha intestinalis		
		1	2	3	1	2	3
Этиловый спирт	Длительная обработка при $T=20^\circ\text{C}$ (проведена трижды)	0	0,26	0,40	0	15,67	6,36
95%-ный		78,63	0,17	0,20	100	9,32	6,49
80%-ный		21,46	7,40	3,30	0	21,45	13,15
50%-ный		0	89,75	94,1	0	5,49	21,64
25%-ный	Нагревание при $T=40$ и 90°C в течение 1 ч (проведена дважды), промывка дистиллированной водой до pH 7	0	1,71	0	0	36,43	25,44
1%-ный раствор углекислого натрия		0	0,69	2,00	0	4,66	4,22
1%-ный раствор соляной кислоты		0	0	0	0	1,14	22,69
1%-ный раствор гидроксида натрия		0	0	0	0	0	0
Нерастворимый осадок	Сушка при $T=60^\circ\text{C}$ до постоянной массы	0	0	0	0	0	0

* Содержание стабильной серы составляло для *C. barbata* 1,7990%, а *E. intestinalis* 2,7450% в расчете на сухую массу водорослей ($T=60^\circ\text{C}$). Здесь и в табл. 2 ^{35}S была внесена в морскую воду в виде $\text{Na}_2^{35}\text{S}^{-2}$ (1) и $\text{Na}_2^{35}\text{S}^{+4}\text{O}_4$ (2), 3 — распределение стабильной серы.

Таблица 2. Распределение различных форм серы по биохимическим компонентам черноморских водорослей, %

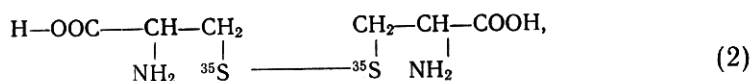
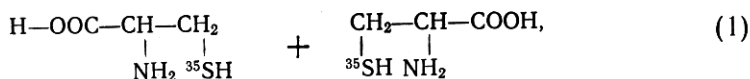
Биохимический компонент	Заряд иона серы	Cystoseira barbata			Enteromorpha intestinalis		
		1	2	3	1	2	3
Липиды	+6	0	0,26	0,40	0	15,67	6,36
Свободные α-аминокислоты	—2	78,14	0,17	0,20	100	9,32	6,49
Углеводы	+6	0	91,46	94,10	0	56,22	65,05
Белки	—2	21,46	7,46	3,30	0	27,79	28,58
Нерастворимые остатки	—	0	0	0	0	0	0
Кислотные экстракты	—	0	0,69	2,00	0	4,22	4,66

среды в ткани зеленых (*Enteromorpha intestinalis*) и бурых (*Cystoseira barbata*) водорослей (рисунок). Величины коэффициентов накопления ^{35}S в них достигают 4,1—6,7 ед. в расчете на сырую массу. Для стабильных изотопов они соответственно равны 5,1—6,3 ед. Попадая в ткани растений, ионы серы (+6) претерпевают изменения валентно-

Таблица 3. Распределение различных форм серы в экстрактах *Enteromorpha intestinalis*, %

Реагент	Серы		
	белковая (S^{-2})	сульфоспро- уженная (S^{+6})	неорганиче- ская (S^{+6})
Этиловый спирт			
95%-ный	0	0	6,36
80%-ный	5,53	0,96	0
50%-ный	1,75	11,40	0
25%-ный	13,44	8,20	0
1%-ный раствор углекислого натрия	5,15	20,29	0
1%-ный раствор соляной кислоты	0	4,22	0
4%-ный раствор гидроксида натрия	2,71	19,98	0
Нерастворимый остаток	0	0	0

сти. Так, у *C. barbata* во фракциях 50—80%-ного этилового спирта 6% серы-35 связывается с соединениями белковой природы (табл. 1, 2). С помощью нитропруссидата натрия ее удалось обнаружить в производных цистеина-цистина (табл. 3). По-видимому, в восстановленной форме ($^{35}\text{S}^{-2}$) ($^{35}\text{S}^{+6} + 8\text{e} \rightarrow ^{35}\text{S}^{-2}$) она включается в цистеин (1) и может обратно окисляться как в дисульфидную форму — цистин (2) — по схеме



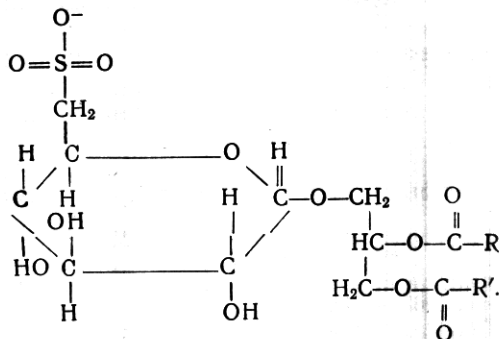
так и в β-аминоэтанолсульфоновую кислоту (таурин)



присутствие которой является типичным для водорослей, содержащих сульфаты полиоз [1]. Но основная часть [$^{35}\text{S} + ^6\text{O}_4$] $^{-2}$ включается в сульфатированные производные фукозы — фукоиданы, содержание ко-

торого в пробах составляло 3,4—6%. Вычисленные коэффициенты накопления ^{35}S в фукоидане *S. barbata* достигали 6683—12 562 ед. и были близки к коэффициентам накопления стабильной серы в этих же образцах — 5624—9631. Вероятно, фукоидан в цистозире является тем органическим веществом, которое обеспечивает не только поступление серы в водоросли, но и распределение ее по биохимическим компонентам.

Сера-35, попадая в *E. intestinalis* в виде ионов $[\text{S}^{+6}\text{O}_4]^{-2}$, способна также изменять валентность. Это подтверждает присутствие ее во фракциях свободных α -аминокислот, белков (S^0 , S^{-2}). Доля ^{35}S , связанной эфирной связью с углеводами, падает в 10,5 раза по сравнению с цистозирой. Одновременно возрастает содержание ее в липидных фракциях, представленных, согласно данным Бенеона и сотр., 6-сульфо — — — хиновопиранозил- (1'')-2,3-диацетилглицерином, относящимся к сульфоновым кислотам



Если учесть, что *E. intestinalis* содержит $3,3 \pm 0,4\%$ липидов, которые концентрируют 15,7% ^{35}S , поглощенной водорослью к 3—7-м суткам, можно с уверенностью сказать, что эта группа соединений является концентратором $[\text{S}^{+6}\text{O}_4]^{-2}$. И действительно, определение коэффициентов накопления стабильной и радиоактивной серы в липидных фракциях энтероморфы показало, что они близки по величинам и лежат в пределах 2635—2590 ед. в расчете на сухую массу водорослей.

Иной характер распределения наблюдался у радионуклида, внесенного в морскую воду в виде иона $^{35}\text{S}^{-2}$ (Na_2S). У *E. intestinalis* основная часть его связывалась со свободными α -аминокислотами, а у *S. barbata* распределялась между аминокислотной (78,6%) и белковой (21,46%) фракциями. Нарушался серный цикл в растениях, выпадало полностью и ассимиляционное восстановление сульфатов, происходящее предположительно по схеме $[\text{S}^{+6}\text{O}_4]^{-2} \xrightarrow{+2e} [\text{S}^{+4}\text{O}_4]^{-2} \xrightarrow{+2e} \text{S}^0 \xrightarrow{+2e} \text{S}^{-2}$ и сопровождающееся выделением энергии [2]. Переход наименее окисленной формы $[\text{S}^{35}\text{S}]^{-2}$ в сульфаты $[\text{S}^{+6}\text{O}_4]^{-2}$ крайне затруднен частично и потому, что для его осуществления необходимы дополнительные затраты энергии в количестве 87,5 эВ на 1 г-ион серы [8]. Таким образом, соединения шестивалентной серы метаболически подвижны. Попадая в ткани морских водорослей, они претерпевают изменения валентности и включаются в биохимические структуры — свободные α -аминокислоты, белки, образуют эфирно связанное соединение с полиозами (табл. 2, 3). Существенных отличий в распределении стабильной (природной) и радиоактивной серы (внесенной в эксперименте в виде ионов $^{35}\text{SO}_4^{-2}$) по биохимическим компонентам *S. barbata* и *E. intestinalis* обнаружить не удалось.

Ионы двухвалентной серы — $[\text{S}^{35}\text{S}]^{-2}$ вступают в реакции изотопного обмена. Локализуясь в веществах белковой природы, они теряют подвижность. Процессы окисления замедляются, о чем свидетельствует отсутствие радионуклида в структурах, содержащих серу в виде положительных ионов, а также в экстрактах водорослей, обогащенных сульфополисахаридами, липидами и нуклеиновыми кислотами.

Выводы. 1. Необходимую для жизнедеятельности серу зеленые (Chlorophyta) и бурые (Phaeophyta) водоросли извлекают из морской воды в форме ионов $[S^{+6}SO_4]^{-2}$, которые при включении в растение претерпевают изменение валентности ($S^{+6} + 6e^- \xrightarrow{0} S^{+2e^-} \xrightarrow{8e^-} S^{-2}$).

2. Существуют различные пути поступления ионов S^{+6} в водоросли, относящиеся к различным систематическим группам. Роль концентратора серы в *C. barbata* выполняют сульфатированные производные фукозы (фукоидан), а *E. intestinalis* — сульфолипиды. Величины коэффициентов накопления ^{35}S в этих соединениях соответственно равны 6683—12 362 и 2635—2590 ед. в расчете на сухую массу водорослей.

3. Процесс окисления ионов двухвалентной серы ($^{35}S^{-2} \xrightarrow{8e^-} ^{35}S^{+6}$), поступивших в *Cystoseira barbata* и *Enteromorpha intestinalis* из окружающей среды, крайне затруднен, о чем свидетельствует отсутствие радионуклида в соединениях, содержащих ее в виде шестивалентных ионов ($^{35}S^{+6}$).

4. Существование различных форм серы в водорослях (сульфосоединенной, белковой, неорганической) указывает на многообразие функций, выполняемых ее соединениями в период жизнедеятельности организмов.

1. Барашков Г. К. Сравнительная биохимия водорослей. — М.: Пищ. пром-сть, 1972. — 335 с.
2. Боннер Д., Варнер Д. Биохимия растений. — М.: Мир, 1968. — 624 с.
3. Бэйли Д. Методы химии белков. — М.: Мир, 1965. — 284 с.
4. Джорджеску П., Пэунеску Е. Биохимические методы диагноза и исследования. — Бухарест: Мед. изд-во, 1963. — 499 с.
5. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Под ред. А. В. Топачевского. — Киев: Наук. думка, 1975. — 246 с.
6. Рындина Д. Д. Роль некоторых высокомолекулярных соединений бурых водорослей в извлечении стронция-90 из морской воды // Гидробиол. журн. — 1973. — 9, № 3. — С. 34—39.
7. Рындина Д. Д., Поликарпов Г. Г. Роль отдельных групп органических соединений бурых и зеленых водорослей в концентрировании радионуклидов и их стабильных носителей из морской воды // Морская радиохимическая экология и проблема загрязнения. — Киев: Наук. думка, 1984. — С. 82—98.
8. Краткая химическая энциклопедия. — М.: Сов. энциклопедия, 1965. — Т. 4. — 1182 с.
9. Percival R., McDowell R. H. Chemistry and enzymology of marine algae polysaccharides. — London: New York: Acad. press, 1967. — 218 p.

Ин-т биологии юж. морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР,
Севастополь

Получено 17.04.87

D. D. RYNDINA

THE ACCUMULATION AND FIXATION OF VARIOUS FORMS OF STABLE AND RADIOACTIVE SULPHUR BY THE BLACK SEA ALGAE

Summary

Results of studies are presented to reveal the distribution of various forms of radioactive and stable sulphur according to biochemical components of sea algae *Cystoseira barbata* and *Enteromorpha intestinalis*. It is found that sulphur in the form of $[S^{+6}O_4]^{-2}$ ions accumulated in plant tissues is reduced to ions $^{35}S^{-2}$. The access of bivalent sulphur $^{35}S^{-2}$ to macrophytes from the environment is extremely difficult. Being localized in protein substances it loses mobility. The availability of various forms of sulphur (sulpho-conjugate, proteinaceous, inorganic) in the algae shows that sulphur compounds have diverse functions in the period of the organism vital activity.