

ПРОВ 2010

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

ПРОВ 98

БИОЛОГИЯ МОРЯ

Вып. 18

БИОЛОГИЯ ОБРАСТАНИИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»

КИЕВ — 1970

Г л о т о в В.Н., Г у р е в и ч Е.С., Г е й н е Е.И. Об ускоренных методах испытания необрастающих красок для морских судов. - Лакокрасочные материалы и их применение, 6, 1964.

Д о л г о п о л ь з к а я М.А. О методике биоконтроля эффективности противообрастающих покрытий. - В кн.: Тр. Севаст. биол. ст., 12, 1959.

Р а г г М. Защита судов от обрастания и коррозии. Изд-во судостроит. пром., Л., 1960.

Х а р в е й Х.В. Современные успехи химии и биологии моря. ИЛ, М., 1948.

А р б у з о в а К.С. и П а т р и к е е в В.В. Лабораторное испытание новых противообрастающих покрытий. - В кн.: Тр. Ин-та океанологии, 35. "Наука", М., 1967.

ДЕЙСТВИЕ МЕДИ НА МАКРОФИТЫ ОБРАСТАНИЯ И НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ, СНИЖАЮЩИЕ ЕЕ АЛЬГИЦИДНОСТЬ

Р.А.Полищук

Морские водоросли макрофиты в условиях освещения составляют существенную часть обрастания, и поэтому борьба с ними является частью общей проблемы защиты морских гидросооружений, На судах, буйах и других объектах отмечено свыше 127 видов водорослей семейства *Chlorophyta*, 58 - *Phaeophyta* и 205 видов *Phodophyta* (сб. Морские обрастания и борьба с ними, 1957).

Широкое использование в качестве средств защиты от обрастаний покрытий, содержащих токсические медные соединения, определило необходимость изучения механизмов взаимодействия морских растительных организмов с ядами. Несмотря на давнюю историю применения, медь как ингибитор клеточного метаболизма изучена недостаточно. Нечеткие сведения о совместном действии меди и некоторых пигментов, наторнителей необрастаемых красок на организмы обрастания. Между тем знание сущности процессов, протекающих при этом, необходимо для сознательного поиска новых и улучшения существующих противообрастающих средств.

Медь в зависимости от концентрации может действовать на одни и те же функции организма по-разному: либо подавлять их, либо стимулировать. В микроколичествах она усиливает фотосинтез на 65% (Bishop, 1964; Greenfield, 1942), а в концентрации, превышающей

10^{-6} М в опыте / Greenfield, 1942/, почти на столько же снижает его. Однако и стимулирующие, и ингибирующие нормы меди для различных организмов неодинаковы и зависят не только от свойств организмов, их адаптации, но и характера среды /освещенности, pH, солености, сопутствующих катионов и т.п./. Представляет интерес хорошо известный факт снижения противообрастаемых свойств краски, содержащей медь, при наличии в среде продуктов коррозии железа /сб. Морские обрастания и борьба с ними, 1957/. Объяснение этого явления только с точки зрения подавления растворения меди железом за счет изменений электрохимического режима среды является, по-видимому, недостаточно полным без учета реакции живых организмов на одновременное наличие в среде ионов железа и меди. Об антагонизме железа и меди — сложном взаимодействии ионов, заключающемся в снижении эффекта действия на организм одного элемента при наличии определенных количеств другого, известно давно, хотя причина этого явления до сих пор мало изучена. Токсическое действие тяжелых металлов объясняется высокой стабильностью их внутрикомплексных органических соединений. В частности, медь в процессе взаимодействия с живыми организмами может конкурировать с другими жизненно важными металлами, в том числе с Fe^{++} и Fe^{+++} . Возможно, поэтому под действием меди возникают симптомы железной недостаточности растений /Willis a. Piland, 1936; Школьник, Макарова, 1950; Smith a. Specht, 1953; Brown, Holmes a. Specht, 1955; Firson, 1955; De Kock, 1956; Шербаков, 1957; Олчаренко, 1965/.

В растительных организмах имеется большое разнообразие соединений железа с различными свойствами: комплексы двух- и трехвалентного железа, различные по прочности, растворимости и биологической роли. Основная биохимическая роль железа связана с функцией как геминных, так и негеминных комплексных соединений, в том числе цитохромоксидаз, флавиновых ферментов, ферредоксина, пероксидазы, каталазы, участвующих в окислительно-восстановительных превращениях веществ, усвоении и трансформации энергии света в хлоропластах. По степени стабильности некоторых внутрикомплексных соединений медь уступает только трехвалентному железу. Трехвалентное железо по сравнению с медью и другими металлами образует более стабильные комплексы с различными производными этилендиамина и уксусной кислоты /комплексонат/ /Martell, 1957/, кональбуминами /Klotz, 1954; Warner a. Weber, 1953в/, лимонной /Warner a. Weber, 1953/, винной /Fallab и др., 1956/ кислотами, рибофлавином /Albert, 1950/.

Медь дает более прочные комплексы с глутаминовой кислотой, гистидином, гистидилгистидином (Fallab, 1956), некоторыми металлосфлавопротеиновыми ферментами (Mahler a.Green, 1954), дериватами порфирина (Martell a.Kalvin, 1953). Однако если в живых системах образование комплексов регулируется величиной констант стабильности (при добавлении к комплексу одного металла — другого, координационно более сильного, происходит обмен и замещение слабого иона более сильным), то *in vivo* преимущественное образование того или иного комплекса зависит не только от констант стабильности комплексов, но и состояния организма, проницаемости мембран органоидов клетки, возможности синтеза тех или иных веществ (белков, жиров и углеводов), окислительно-восстановительного потенциала, экскреции. Эти факторы, вероятно, во многом определяют степень патологического поражения растений медью, способность организма к активной нейтрализации токсичности и адаптации. Несомненно, для растительных организмов свет определяет окислительно-восстановительный режим клеток, фотосинтез, дыхание, экскрецию. В связи с этим в работе наряду с исследованием реакции водорослей на одновременное наличие в среде железа и меди, а также каждого из этих компонентов в отдельности рассматривается вопрос о влиянии света на защитные свойства водорослей.

Объекты и методы исследований

Исследования проводились с февраля 1965 г. по июнь 1967 г. Испытывалось действие неорганической формы меди (CuSO_4) и ее комплекса с этилендиаминтетраацетатом ($\text{Cu} - \text{ЭДТА}$) в количестве $2,7 \cdot 10^{-5}$ — $3 \cdot 10^{-5}$ М Cu , обычно выделяющемся на поверхности необрастаемых красок. Концентрация железа, взятого в виде внутрикомплексного соединения $\text{Fe} - \text{ЭДТА}$ и сульфатной соли $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, составляла $2,7 \cdot 10^{-5}$ — $3 \cdot 10^{-5}$ М. В некоторых опытах исследовалось влияние трилона Б в такой же концентрации, как Fe и Cu . Реакции организмов на альгицидные дозы меди и железа определялись по изменению фотосинтезирующих пигментов. В опыте использовались зеленые водоросли — *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* (L.) L i n k., красные — *Ceramium rubrum* (H u x d s), *Callithamnion corymbosum* (S m i t h) L u n g b., бурые — *Scytosiphon lomentaria* (L u n g b.) I. Ag., *Ectocarpus* sp., т.е. те макрофиты, которые составляют наибольшую массу естественных растительных обрастаний в течение почти всего года.

Свежесобранные водоросли после тщательной промывки сортировались по видам и распределялись по 3-5 г в аквариумы соответственно с 3-5 л морской фильтрованной воды, куда добавлялось необходимое количество железа и меди. После добавления в растворенном виде солей металлов, предусмотренных схемой опыта, одну часть сосудов (параллельные варианты) помещали в темную камеру, другую - оставляли на свету (с нормальной сменой дня и ночи). Температура воды при освещении и в темноте поддерживалась за счет дополнительного подогревания воздуха темной камеры. Иногда для уравнивания температуры применялась водяная баня.

Время взаимодействия водорослей с растворами солей металлов - 12 - 48 час при температуре воды 16 - 22°C. Опыты проводились при искусственном и естественном освещении 320-3000 люкс. Хлорофиллы и каротиноиды извлекались из водорослей по общепринятой методике 90%-ным ацетоном (Richards, Thompson, 1955), фикокритрин - после суточной инкубации водорослей с дистиллированной водой и добавлением нескольких капель толуола (Красновский, Евстигнеев, 1952) при температуре 0-6°C.

Содержание пигментов измерялось на саморегистрирующем спектрофотометре СФ-10. Для удобства сравнения спектральных кривых плотности вытяжек вариантов отдельного опыта исходные экстракты разбавляли таким образом, что на каждый миллилитр рабочего раствора приходилось одно и то же количество сухого вещества. Это связано с тем, что при взвешивании свежего растительного материала из-за неодинаковой влажности (даже после просушивания водорослей фильтровальной бумагой) трудно отобрать (из расчета на сухое вещество) одинаковые навески. Поэтому отбор навесок для определения пигментов и сухого вещества производили одновременно. Данные о содержании сухого вещества использовались при работе разбавления экстрактов пигментов водорослей по вариантам каждого опыта. Такой прием обеспечивал более высокую точность данных, чем в том случае, когда отбирались одинаковые навески в сыром виде. На представленных рисунках, где показаны спектры поглощения пигментов водорослей, подвергнутых действию меди и железа, содержание пигментов водорослей по вариантам в каждом опыте соответствует одному и тому же количеству сухого вещества в единице объема вытяжки.

Результаты исследований

Данные, полученные в 1966 г., показывают, что под действием сульфата меди у зеленых водорослей *Ulva lactuca* концент-

рация пигментов резко падает (рис. 1). Плотность вытяжек в области 436 мкм (полоса поглощения каротиноидов) снизилась на 32-40%, в области поглощения хлорофилла (462 и 663 мкм) концентрация пигментов снизилась соответственно на 41-45 и 25-27% по сравнению с нормой. Аналогичные изменения в составе жирорастворимых пигментов под действием $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (вариант 2) произошли у красных водорослей *C. rubrum* (рис. 2). В области 436 мкм плотность вытяжек снизилась на 37-51%, на волне 480 мкм - на 20-41% по сравнению с контролем. Более резкие изменения отмечены в составе водорастворимых пигментов красных водорослей - фикоэритрина (область поглощения - 500, 565 мкм) и фикоцианина (620 мкм). Первоначальная концентрация фикоэритрина у *C. rubrum* снизилась на 60-66% в области 500 мкм, на 68-70% на волне 565 мкм, фикоцианина (620 мкм) - на 50%. Водоросли почти полностью теряли ярко-красную окраску.

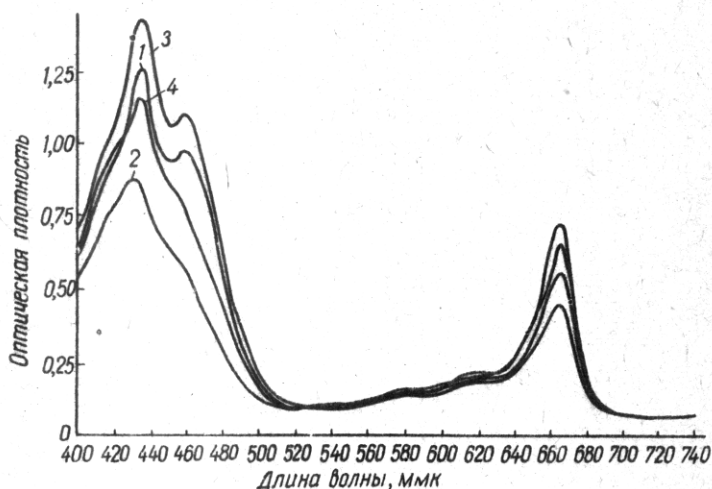


Рис. 1. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *E. intestinalis* под влиянием CuSO_4 (2), Cu-ЭДТА (4), $\text{Cu-ЭДТА+Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (3); контроль (1) (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,6 мг сухого вещества; кювета - 10 мм).

Менее токсичной для водорослей оказалась растворимая органическая форма меди - этилендиаминтетраацетат меди (вариант 4, рис. 1, 2, 3). При добавлении к раствору Cu-ЭДТА этилендиаминтетра-

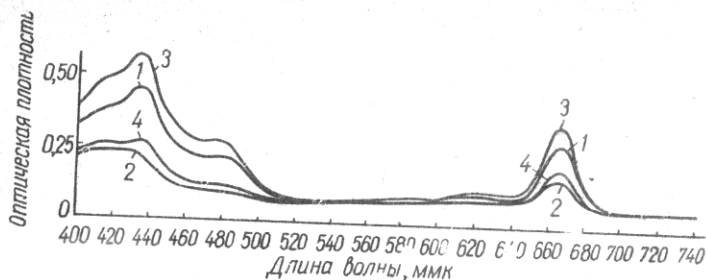


Рис. 2. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *S. corymbosum* под влиянием CuSO_4 (2), Cu-ЭДТА (4), $\text{Cu-ЭДТА}+\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (3); контроль (1) (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,4 мг сухого вещества; кювета - 10 мм).

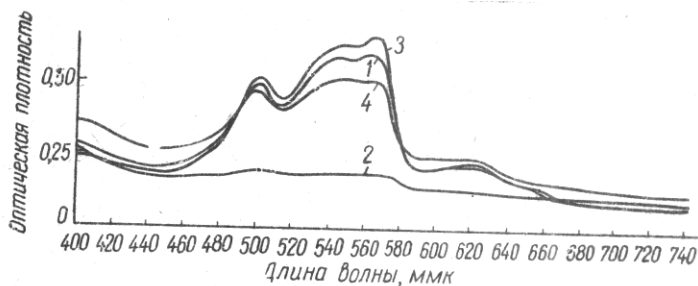


Рис. 3. Изменение содержания фикоэритрина *S. corymbosum* под влиянием CuSO_4 (2), Cu-ЭДТА (4), $\text{Cu-ЭДТА}+\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (3); контроль (1) (1 мл вытяжки пигментов соответствует 3 мг сухого вещества; кювета - 20 мм).

ацетата железа — Fe-ЭДТА состояние всех водорослей (красных и зеленых) резко улучшалось (вариант 3, рис. 1, 2, 3). Иногда содержание фотосинтезирующих пигментов превосходило норму (рис. 1, 2, 3).

Таким образом, добавление железа к среде, где содержалась медь, способствовало снижению ее альгицидной активности. В связи с резким улучшением состояния водорослей под влиянием добавления

железа к морской воде, содержащей медь, возникла необходимость проверить действие железа на макрофиты в чистой морской воде. Предполагалась возможность недостатка железа в среде. Как выяснилось, добавление железа к чистой морской воде не всегда стимулировало биосинтез пигментов. Так, у багрянки *S. corymbosum* (рис. 4) в условиях освещения комплексонат железа Fe-ЭДТА заметно стимулировал биосинтез пигментов (вариант 8с) по сравнению с контролем (вариант 5с). Определенная стимуляция синтеза пигментов под влиянием Fe-ЭДТА и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ отмечена и в некоторых других опытах. В то же время в условиях затемнения у *S. corymbosum* и других водорослей добавление железа тормозило синтез пигментов, хотя и не настолько сильно, как медь (рис. 5). В некоторых опытах с *E. intestinalis* добавление железа не вызвало никаких изменений по сравнению с контролем. В опытах, где добавление железа производилось и на свету и в темноте (рис. 4, 5), проявилась особенность водорослей к положительной реакции на железо в условиях освещения. Различия влияния органической Fe-ЭДТА и неорганической $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ форм железа в отношении макрофитов четко не проявились.

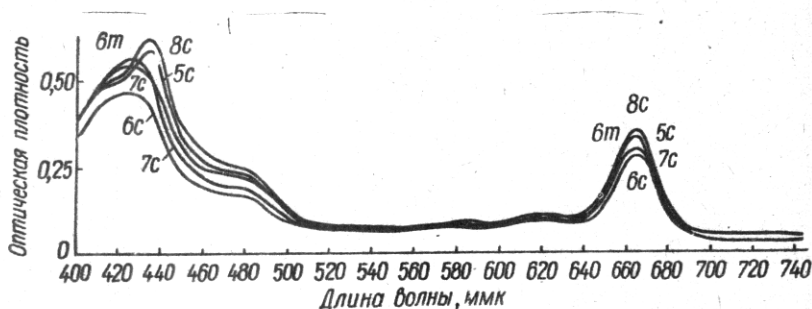


Рис. 4. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *S. corymbosum* в условиях освещения под влиянием CuSO_4 (6с), Cu-ЭДТА (7с), Fe-ЭДТА (8с); контроль - 5с (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета - 10 мм).

В 1966-1967 гг. проведены опыты по выявлению действия сернокислой меди в условиях темноты и нормальной смены дня и ночи.

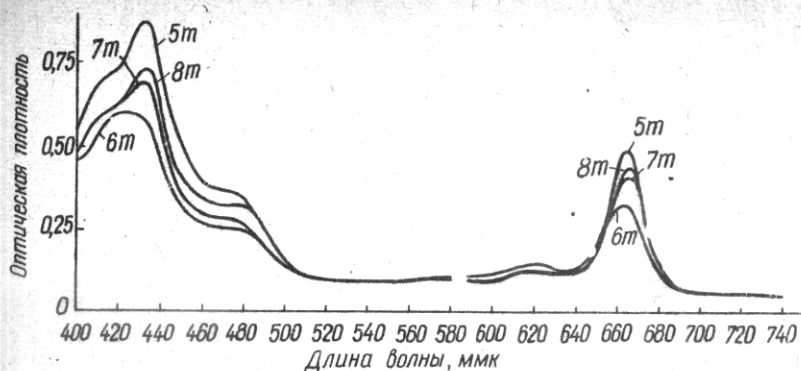


Рис. 5. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *C. corymbosum* в условиях темноты под влиянием CuSO_4 (6т), Cu-ЭДТА (7т), Fe-ЭДТА (8т); контроль - 5т (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета - 10 мм).

Результаты исследований показали, что в контроле при неполном затемнении количество хлорофилла, каротиноидов и фикоэритрина возрастало или оставалось в прежних пределах. При полном затемнении содержание пигментов в темноте заметно уменьшалось (рис. 6). При этом количество пигментов *E. intestinalis*, поглощающих в области 436 и 663 ммк, уменьшалось почти на 20%. То же происходит и с другими водорослями.

Под влиянием сернокислой меди содержание пигментов резко уменьшалось как в опытах 1965-1966 гг., так и в опытах 1967 г. В условиях освещения токсический эффект меди более высок, чем в темноте. В одном из опытов в условиях освещения поглощение пигментов *E. intestinalis* (рис. 7) в области 436 ммк под действием меди уменьшалось на 40%, в условиях темноты - только на 30%. Повышение устойчивости водорослей в отношении меди в условиях затемнения отмечалось для всех без исключения водорослей и во всех опытах.

Под действием меди на свету содержание пигментов бурой водоросли падало на 56,5%, в темноте - приближалось даже к соответствующему контролю. Оптическая плотность пигментов в области 434 ммк составляла 0,75, в варианте с применением меди в темноте - 0,30.

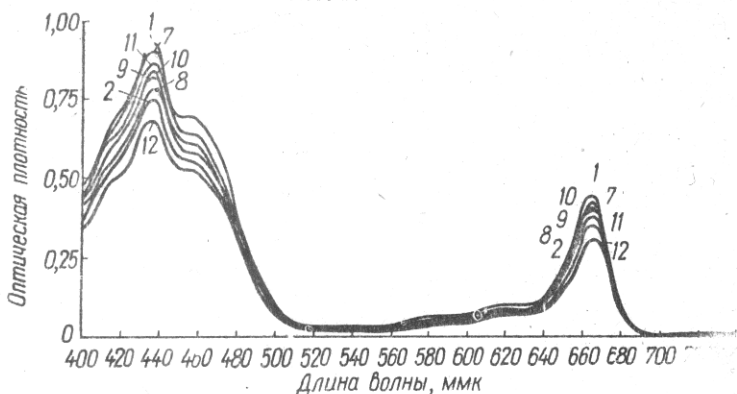


Рис 6. Изменение общего содержания пигментов (каротиноидов и хлорофилла а+b) *E. intestinalis* в условиях темноты и освещения под влиянием $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (свет)-7, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (темнота)-8, Fe-ЭДТА (темнота)-10, Fe-ЭДТА (свет)-9, Na_3 -ЭДТА (свет)-11, Na_3 -ЭДТА (темнота)-12; контроль (свет)-1, контроль (темнота)-2 (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета - 10мм).

У багрянок также повышалась устойчивость к сернистой меди в условиях затемнения. Количество пигментов в варианте, где водоросли подвергались действию сернистой меди в темноте, приближалось к уровню пигментов с Cu-ЭДТА на свету. Возможно, понижение токсического эффекта меди в темноте связано с уменьшением проницаемости клеток. Так, по данным Кука (цитируется по Узбу, 1966), отмечаемый им латентный период в действии меди обязан степени проницаемости ионов меди во внутрь клетки. Одновременно было показано, что проникновение меди происходит практически очень быстро. Тогда можно предположить, что медь подавляет какие-то специфические ферментативные центры, ответственные за первичные световые процессы фотосинтеза. Четкая стимуляция биосинтеза пигментов на свету под влиянием добавления железа, возможно, связана с усилением активности, а возможно, и синтеза ферредоксина, железосодержащего белка с группами SH, к которым особенно высокое сродство имеет медь. Выяснение этого явления и будет являться предметом

дальнейших исследований. Под действием меди в большей части опытов происходит смещение и прогиб кривых спектров поглощения пигментов: у красных водорослей в области 420-450 мкм, у зеленых - в области 476 мкм, у бурых - в области 430-440 мкм. Возможно, последнее связано с подавлением синтеза каротиноидов, предшественников витамина А, так как известно, что медь подавляет активность витамина А. (Bhattacharya a. Basu, 1954).

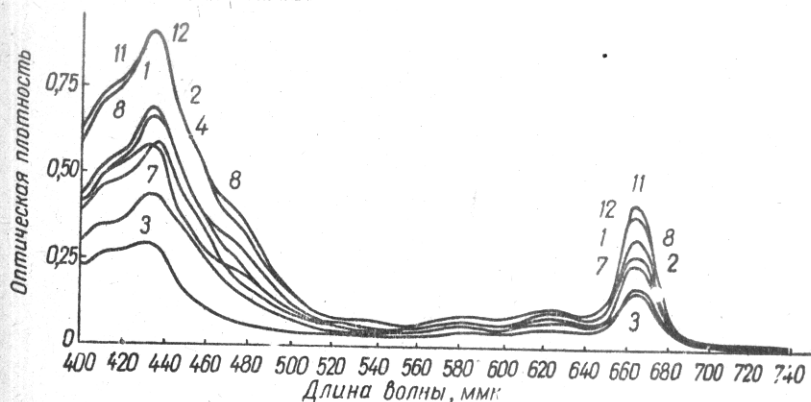


Рис. 7. Изменение общего содержания пигментов *S. lomentaria* под влиянием SiSO_4 (свет)-3, SiSO_4 (темнота)-4, Si -ЭДТА (темнота)-8, Na_3 -ЭДТА (свет)-11, Na_3 -ЭДТА (темнота)-12; контроль (свет)-1, контроль (темнота)-2. (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета - 10 мм).

Трилок Б (Na_3 -ЭДТА) в некоторых опытах с *S. lomentaria* в условиях темноты и освещения четко повышал содержание пигментов по сравнению с контролем (рис. 7).

ВЫВОДЫ

Сернокислая медь концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М является сильным альгицидом, значительно снижающим содержание хлорофиллов, каротиноидов у некоторых представителей красных, зеленых и бурых водорослей Черного моря. Фикоэритрин и фикоцианин разрушались при этом почти полностью.

Этилендиаминтетраацетат меди (Cu-ЭДТА), взятый в эквивалентной по отношению к CuSO_4 концентрации, обладает меньшим токсическим действием по сравнению с последней, несмотря на лучшую растворимость комплексоната в морской воде.

Добавление сернокислого железа к морской воде (в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М) четкого, положительного действия на биосинтез пигментов водорослей не оказало. Однако применение железа в качестве добавок к токсическим растворам сернокислой меди и Cu-ЭДТА способствовало повышению устойчивости водорослей во всех без исключения случаях.

Действие меди в условиях темноты и нормальной смены дня и ночи различно. При затемнении альгицидный эффект меди значительно понижался.

Л И Т Е Р А Т У Р А

Красчовский А.А., Евстигнеев В.В., Брин Г.П. и Гаврилова В.А. Выделение фикоэритрина из красных водорослей, его спектральные и фотохимические свойства. - ДАН СССР, 82, 6, 1952.

Морское обростание и борьба с ним. Воениздат, М., 1957.

Овчаренко Г.А. Влияние меди и молибдена на поступление железа в растения. - В кн.: Комплексоны как средство против известкового хлороза растений. "Наукова думка", К., 1965.

Узоб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. "Мир", М., 1966.

Школьник М.Я., Макарова Н.Я. Об антагонизме железа и меди. - ДАН СССР, 70, I, 1950.

Щербатов А.П. Явления физиологического антагонизма и синергизма магния, железа и микроэлементов в растениях гречихи. - Изв. АН СССР, 3, 1957.

Albert A. The metal-binding properties of riboflavin. - Bioch. J., 47, 3, 1950.

Bhattacharya S., Basu U.P. Studies on vitamin A in solution. P.VII, Effect of trace metals. - J. Indian Chem. Soc., 31, 3, 1954.

Bishop N.J. Site of action of copper in photosynthesis. - Nature, 204, 4954, 1964.

Brown J.C., Holmes R., Specht A.W. Iron, limiting element in a chlorosis. P.II. Copper-phosphorus induced chlorosis dependent upon plant species and varieties. - Plant Phys., 30, 5, 1955.

- D e⁸ K o c k P.C. Heavy-metal toxicity and iron chlorosis. -Ann.Bot., 20, 77, 1956.
- F a l l a b S., S c h u s t e r M., E r l e n m e y e r H. Zur biologischen Bedeutung Fe und Cu als Komplexbildner. -Experientia, 12, 6, 1956.
- G r e e n f i e l d S.S. Inhibitory effects of inorganic compounds on photosynthesis in Chlorella. -Am.J.Bot., 29, 2, 1942.
- K l o t z J.M. Thermodynamic and molecular properties of some metalprotein complexes. A Symposium on the mechanism of enzyme action, Baltimore, 1954.
- M a h l e r H.R., G r e e n D.E. Metallo-flavoproteins and electron transport. -Science, 120, 3105, 1954.
- M a r t e l l A.E., C a l v a n M. Chemistry of the metal chelate compounds. New York, 1953.
- M a r t e l l A.E. The chemistry of metal chelates in plant nutrition. -Soil Sci., 84, 1, 1957.
- P i r s o n A. Functional aspects in mineral nutrition of green plants. -Ann. Rev Plant Phys., 6, 1955.
- R i c h a r d s F.A., T h o m p s o n T.G. The estimation and characterization of plankton populations by pigments. -J. Marine Res., 11, 2, 1952.
- S m i t h P.F., S p e c h t A.W. Heavy-metal nutrition and iron chlorosis of citrus seedlings. -Plant. Physiol., 28, 5, 1953.
- W a r n e r R.G. a. W e b e r. The metal combining properties of conalbumin. -J. Amer. Chem. Soc., 75, 20, 1953.
- W i l l i s L.G., P i l a n d J.R. The function of copper in soils and its relation to the availability of iron and manganese. -J. Agric. Res., 52, 6, 1936.

ДЕЙСТВИЕ АЛГИЦИДНЫХ ДОЗ МЕДИ НА ОСЕДАНИЕ И ПРОРАСТАНИЕ СПОР НЕКОТОРЫХ МАКРОФИТОВ ЧЕРНОГО МОРЯ*

Р.А.Пелищук

В процессе обрастания любого субстрата в море наряду с другими организмами участвуют подвижные и неподвижные репродуктивные клетки красных, зеленых и бурых водорослей - зиготы, зооспоры, карпоспоры, тетраспоры и т.п. Использование для защиты от обрастания покрытий, содержащих медь, рассчитано на подавление оседания в момент освоения организмом субстрата. Известно, что применяем

* Рисунки к статье даны в Приложении в конце сборника.