

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

- De'Kock P.C. Heavy-metal toxicity and iron chlorosis. -Ann.Bot.,20,77,1956.
- Fallab S., Schuster M., Erlennmeyer H. Zur biologischen Bedeutung Fe und Cu als Komplexbildner.-Experientia,12,6,1956.
- Greenfield S.S. Inhibitory effects of inorganic compounds on photosynthesis in Chlorella.-Am.J.Bot.,29,2,1942.
- Klotz J.M. Thermodynamic and molecular properties of some metalprotein complexes.A Symposium on the mechanism of enzyme action,Baltimore, 1954.
- Mahler H.R., Green D.E. Metallo-flavoproteins and electron transport.-Science,120,3105,1954.
- Martell A.E., Calvin M. Chemistry of the metal chelate compounds. New York,1953.
- Martell A.E. The chemistry of metal chelates in plant nutrition.-Soil Sci.,84,1,1957.
- Pirson A. Functional aspects in mineral nutrition of green plants.-Ann.Rev Plant Phys.,6,1955.
- Richards F.A., Thompson T.G. The estimation and characterization of plankton populations by pigments.-J.Marine Res.,11,2,1952.
- Smith P.F., Specht A.W. Heavy-metal nutrition and iron chlorosis of citrus seedlings.-Plant.Physiol.,28,5,1953.
- Warner R.G. a. Weber. The metal combining properties of conalbumin.-J. Amer.Chem.Soc.,75,20,1953.
- Willis L.G., Piland 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 АЛГЫЦИДНЫХ ДОЗ МЕДИ НА ОСЕДАНИЕ И ПРОРАСТАНИЕ СПОР НЕКОТОРЫХ МАКРОФИТОВ ЧЕРНОГО МОРЕЯ*

Р.А.Пслищук

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.

для борьбы с обрастанием медь и ее препараты в концентрации, превышающей 10^{-5} М Cu, резко понижают рост и развитие многих одноклеточных водорослей и грибов (Greenfield, 1942; Brenes-Pomales, Lindegren и др., 1955; Kessler, 1962; Fitzgerald a. Faust, 1963). Подавление некоторых видовых функций организма, в частности размножения и роста, связано со специфическими и неспецифическими изменениями первичных биохимических реакций. Так, в результате большого сродства к меди рибонуклеиновых кислот и ферментов, ответственных за их биосинтез (Frieden и др., 1958; Бьюкенен, 1962; Eichorn, 1962), возникает нарушение нуклеинового обмена. Кроме того, медь является сильным антагонистом железа, подавляет его поступление в растение (Школьник и Макарова, 1950; Овчаренко, 1965). В свою очередь, недостаточное и нерегулярное снабжение растений железом также приводит к изменению содержания РНК (Агафонова, 1964).

Нарушения рибонуклеинового обмена, по-видимому, не может не отразиться на процессах роста и размножения макрофитов. Учитывая все это, представляло интерес сравнительное испытание состояния репродуктивных клеток в норме и при воздействии меди и железа. Одновременно была сделана попытка выяснить также значение света, обеспечивающего не только фотосинтез осевших спор и проростков, но и регулирующего их фототаксис в период, предшествующий оседанию. Для осевших спор при формировании ризоидальных и фотосинтезирующих клеток требуется, очевидно, большое количество пластического материала и поэтому протекание нормального фотосинтеза для них очень важно.

Методика постановки опыта была следующей: водоросли зеленые - *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link, *Ulva lactuca* L., красные - *Callithamnion corymbosum* (J.E. Smith) Longb., *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag., *Porphyra leucosticta* Thur. и бурые - *Scytosiphon lomentaria* (Longb.) J. Ag. соскребались со свай или камней Севастопольской бухты. После тщательной промывки их проточной водой отбирались готовые к репродукции экземпляры. Талломы водорослей осторожно разрезали на отдельные равноценные части (по 0,25-1 г сырого вещества) и помещали в вегетационные сосуды или кристаллизаторы (емкостью 0,250-1 л) с фильтрованной морской водой. На дно сосудов помещалось несколько предметных стекол для последующего оседания на них спор. В сосуды, согласно схеме опыта (см. таблицу), добавляли в растворенном

виде CuSO_4 , Cu-ЭДТА, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, Fe-ЭДТА из расчета $3 \cdot 10^{-5}$ М Cu и Fe. Затем одну часть сосудов (параллельные варианты) помещали в темноту, другую-выдерживали в условиях нормальной смены дня и ночи. Освещенность при этом была 400-3000 лк. Температура воды при освещении и в темноте поддерживалась в одних и тех же пределах - 18-20°C, иногда за счет дополнительного подогревания воздуха в темной камере. Через 12, 36, 48 час (а в одном случае с *Ceramium rubrum* - после 120 час) после начала опыта предметные стекла осторожно извлекали из воды и под микроскопом проводили учет осевших спор. Фотографирование спор производили с помощью микрофотоустановки МФН-2.

В процессе опытов было обнаружено, что содержание спор, осевших на стеклах в одном сосуде с водорослями, которые еще находились в хорошем состоянии, отрицательно сказывалось на росте и развитии проростков. Поэтому стекла после оседания и закрепления спор переносили в чашки Петри с фильтрованной морской водой. Проростки, закрепившиеся на стеклах и помещенные в проток или в чашки Петри, где менялась морская вода каждые 5-6 дней, хорошо росли в течение 30-60 дней.

Наблюдения показали, что стекла, извлеченные из сосудов с чистой морской водой, где в течение 12 час содержались красные водоросли *C. rubrum* и *C. coenobosum*, почти всегда были сплошь покрыты осевшими прикрепленными и некрепленными спорами. Уже после 3-4 час на стеклах находилось 20-30% начавших прикрепление спор. Вокруг спор у места прорастания ризоида появлялся ореол прозрачной студенистой массы. Струя морской воды со скоростью 1,5-2 л/мин и диаметром 1 см, направляемая вдоль предметного стекла сверху вниз в течение 5-10 мин, смывала 50-80% спор. Через сутки и больше споры, у которых началось вытягивание ризоидальной и деление яркоокрашенной фотосинтезирующей клеток, уже почти не смывались водой даже при более длительном воздействии струи. У *C. coenobosum* в некоторые периоды года большую часть осевших водорослей составляли обрывки талломов в 5-9 клеток. В течение нескольких часов они формировали крупные ризоидальные клетки и поэтому закреплялись на стекле значительно прочнее и быстрее, чем споры. Слоевища *C. rubrum* вегетативно почти не размножались. Вторичное прикрепление обрывка таллома *C. rubrum* наблюдалось всего один раз, причем диаметр ризоидальной клетки был в два раза меньше диаметра таллома.

ВОЗДЕЙСТВИЕ СОЛЕЙ ЖЕЛЕЗА И МЕДИ НА ОСЕДАНИЕ

Вариант опыта		Условия проведения опы- та		Время
		48 часов	48 часов	
		Scytosiphon lomentaria	Callithamnion corymbosum	
1. Контроль	Свет	Оседание очень активное, в поле зрения 2-3 скопления по 70-90 клеток	В поле зрения здоровых спор 15 и закрепившихся 2-3 обрывка таллома в 5-6 клеток	
2. Контроль	Темнота	Оседание заметно слабее, вар.1. На всем стекле намечено лишь 2-3 скопления по 20-40 клеток	Разрушенные споры, потерявшие фикс-эритрин	
3. CuSO_4	Свет	На стекле отдельные отмершие клетки	Оседание отсутствует	
4. CuSO_4	Темнота	Встречаются здоровые клетки и даже небольшие скопления спор	То же	
5. Cu-ЭДТА	Свет	Оседание подавлено слабее, чем в контроле (1) (около половины клеток мертвы)	-	
6. Cu-ЭДТА	Темнота	На стекле обнаружены отмершие и здоровые скопления в 10-20 клеток	-	
7. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	Свет	Оседание нормальное, как вар. I. Клетки крупные	Оседание нормальное, как в контроле	
8. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	Темнота	Оседание слабее, чем в контроле	Оседание значительно слабее, чем на свету	
9. Fe-ЭДТА	Свет	Оседание нормальное, близкое к контролю.	-	
10. Fe-ЭДТА	Темнота	То же	-	
11. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{CuSO}_4$	Свет	Оседание слабее, чем в контроле	-	
12. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{CuSO}_4$	Темнота	Оседание отсутствует	-	
13. Cu-ЭДТА+Fe-ЭДТА	Свет	Оседание есть, но значительно слабее, чем в контроле	-	
14. Cu-ЭДТА+Fe-ЭДТА	Темнота	-	-	

И ПРОРАСТАНИЕ СПОР В УСЛОВИЯХ ТЕМНОТЫ И ОСВЕЩЕНИЯ

ВОЗДЕЙСТВИЯ

120 часов	12 часов	48 часов
<i>Ceramium rubrum</i>	<i>Enteromorpha</i>	<i>E. intestinalis</i>
5-6 здоровых /3-4 клеточных/ проростков с хорошо развитыми ризоидами	В поле зрения 5-10 прикрепившихся спор. Большое количество подвижных	В поле зрения 1-2 скопления в 10-30 клеток
Проростков нет	-	Оседание подавлено /на всем стекле 1-2 скопления по 10-15 клеток/
То же	Попадают на стекле отдельные бесцветные клетки	Оседание не обнаружено
" "	-	Обнаружены отдельные живые споры
Обнаружены лишь мертвые клетки	Оседание нормальное	То же
То же	-	Обнаружены отдельные живые клетки
В поле зрения 5-6 проростков из 5-7 клеток с ризоидами	Оседание в норме, вар. I	Оседание очень активное /3-4 скопления по 20-40 спор/
Уродливые, необычной формы проростки	-	Оседание слабое, чем в вар. 7
Здоровые крупные проростки, как вар. 7	-	Оседание очень активное /3-4 скопления по 20-40 спор/
Проростки отсутствуют	-	Оседание слабее, чем на свету, вар. 9
Единичные проростки	Единичные споры	Оседание слабое
-	-	Оседание отсутствует
-	То же, что и в контроле /I/	Оседание слабее, чем в контроле /I/
-	-	То же

Бурые и зеленые водоросли в период размножения (см. таблицу, контроль) оседали значительно активнее, чем красные. Споры, как правило, формировали скопления в 10-40 и более клеток в течение 1 час. Выращивание проростков бурых и особенно зеленых водорослей, взятых из контрольных сосудов, в лабораторных условиях было легче, чем красных. Они росли в чашках Петри под протоком более продолжительное время (2-3 месяца) и достигали 5-20 мм длины.

При погружении готовых к репродукции слоевищ красных водорослей (*P. leucosticta*, *C. rubrum*, *C. corallinum*) в морскую воду, содержащую сернистую медь, в первые четыре часа еще наблюдалось выделение карпоспор и тетраспор, а в последующее время этот процесс полностью прекращался (рис. 1,2). Подобное явление наблюдалось и у других красных водорослей (см. таблицу, опыты 3,4). Таким образом, сернистая медь полностью подавляла размножение красных водорослей. Одновременно было отмечено, что под действием меди прекращается вегетативное размножение *C. corallinum*. Однако, несмотря на очень большое подавление медью процесса выделения спор, внешние изменения в структуре и окраске репродуктивных органов красных водорослей наступали значительно медленнее, и при полном обесцвечивании талломов клетки репродуктивных органов еще имели нормальную интенсивную окраску. Лишь после 48-60 час нахождения в растворе меди наступали внешние изменения в структуре и окраске репродуктивных органов. Клетки почти полностью теряли фикоэритрин и частично хлорофилл, происходило расслаивание клеток, изменялась структура их содержимого, в том числе и хроматофоров (рис. 3,4).

У зеленых (*Ulva lactuca* L., *E. intestinalis*) и бурых (*S. lomentaria*) водорослей даже при более длительном воздействии изменения структуры содержимого клеток и их окраски под влиянием меди проявлялись значительно слабее, чем у красных. Однако у зеленых водорослей действие меди в течение 2-4 час приводило не только к прекращению выделения репродуктивных клеток, но и к подавлению их подвижности. Зооспоры и гаметы теряли способность к оседанию (рис. 5). На рис. 5 видны здоровые, густорасположенные скопления осевших спор. В опыте с CuSO_4 стекло было свободно от оседания.

Бурая водоросль *S. lomentaria* в контроле давала очень активное оседание (таблица, опыты 1,2). На стеклах обнаруживались

многочисленные скопления в 70-90 клеток. Под действием серно-кислой меди оседание полностью прекращалось.

Органическая форма меди Cu-ЭДТА, несмотря на более высокую по сравнению с CuSO_4 растворимость в морской воде при pH 8, менее токсична. Комплексопат меди Cu-ЭДТА действует на процесс оседания значительно слабее. Особенно четко это проявлялось на *E. intestinalis* и *S. lomentaria* (табл., опыты I, 2, 5, 6). На стеклах, извлеченных из сосудов с *S. lomentaria*, *E. intestinalis*, куда добавляли Cu-ЭДТА, обнаружены отдельные живые споры.

Проводились также опыты по изучению влияния меди на проростки водорослей, предварительно проросших в нормальных условиях среды. Как оказалось, проростки водорослей более чувствительны к сернокислой меди, чем взрослые экземпляры. Особенно страдают при этом красные водоросли (рис. 6, 7). После суточного пребывания пятидневных проростков *S. corymbosum* в сосудах, содержащих раствор меди, наблюдались необратимый плазмолиз и расслоение клеток. Проростки теряли связь с субстратом и легко смывались струей воды (рис. 7). В контрольных сосудах здоровые проростки такого же возраста имели густо окрашенные яркие клетки и хорошо развитые ризоиды, позволявшие им прочно закрепляться на стекле и не смываться водой (рис. 6).

Под действием меди в первую очередь поражаются конечные клетки проростков. По-видимому, большое значение при этом имеет возраст клеток, величина поверхности контакта с токсическим раствором, а также определенная автономность последних. Известно, что интенсивность обрастания поверхности водорослями зависит от степени ее освещенности. Опыты, проведенные с водорослями *E. intestinalis*, *S. corymbosum*, *S. lomentaria* в условиях затемнения и нормальной смены дня и ночи, показали, что затемнение способствует снижению количества осевших у них спор. Так, в одном из опытов с *E. intestinalis* на стеклах, находившихся на свету в течение 4 час, осело 10-15 спор, в темноте - только 1-2. Размеры проростков, произраставших в темноте в течение 3-4 суток, были также значительно меньшими. На свету они состояли из 3-4 клеток, в темноте - из 1-2.

В темноте альгидность меди снижалась. В условиях темноты в сосудах, где водоросли подвергались действию сернокислой меди, в некоторых опытах наблюдалось небольшое оседание (таблица, опыты 2, 6), в то время как на свету во всех без исключения 25 проведенных опытах оседания не обнаруживалось.

Альгицидность меди в значительной степени определялась температурой воды. С повышением температуры чувствительность водорослей по отношению к меди возрастала. При температуре воды 16-18°C внешние изменения наступали через 48-60 час, при температуре 18-22°C изменения наступали через 24-36 час.

Добавление железа к морской воде в виде $\text{Fe}-\text{ЭДТА}$, FeSO_4 в большей части опытов не давало заметной стимуляции оседания по сравнению с контролем. Четкая стимуляция процессов оседания под действием солей железа обнаруживалась только в некоторых единичных опытах с *E.intestinalis*, *S.lomentaria*, *C.corymbosum*, талломы которых отбирались, как правило, не с камней набережной, а с буев и других металлических предметов. Возможно, сказывалась адаптация водорослей к более высокому содержанию железа в среде. Прибавление железа ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Fe}-\text{ЭДТА}$) к водорослям *C.corymbosum*, взятым с камней набережной, при содержании их в темноте в течение 5 суток способствовало сохранению жизнеспособных проростков, в то время как в контроле в условиях темноты они погибли. На свету в процессе более длительного роста проростков добавление железа очень часто стимулирует рост и развитие ризоидов и фотосинтезирующих клеток *C.rubrum* (таблица, вар. 9, 7, опыт 4).

Добавление железа к морской воде, содержащей медь, способствовало смягчению действия меди, восстановлению оседания, но менее четко, чем в опытах, в которых изучались воздействие добавления на биосинтез пигментов и другие биохимические показатели в течение более длительного времени (2-3 суток).

В заключение считаю своим приятным долгом поблагодарить сотрудника института Г.Н.Миронова за оказание помощи в освоении методики микрофотосъемки и за предоставление возможности проведения съемок на установке МФН-2 в отделе планктона.

Приношу благодарность ст. научн. сотруднику Л.А.Калугиной за определение видового состава водорослей и ценные советы при подготовке рукописи.

ВЫВОДЫ

Сернокислая медь в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М является сильным средством, подавляющим в первые часы воздействия репродуктивные процессы в красных, зеленых и бурых водорослях. Изменения содержания пигментов и структуры клеток репродуктивных органов наступали значительно позже.

Проростки водорослей, предварительно проросшие в нормальных

условиях среды, более чувствительны к сернистой меди, чем взрослые экземпляры. Особенно страдали красные водоросли, у которых после суточного пребывания в растворе меди наблюдался необратимый плазмолиз и расслоение клеток. Проростки теряли связь с субстратом и смывались водой. При этом поражались конечные клетки проростков. Большое значение при этом имеют, очевидно, возраст клеток и величина поверхности контакта с токсическим раствором.

Добавление сернистого железа к морской воде не всегда стимулировало оседание водорослей. Однако добавление железа к морской воде, содержащей медь, снижало альгидность последней. По-видимому, это и является проявлением антагонизма Cu и Fe — одной из причин оседания водорослей на токсических поверхностях, содержащих медь при наличии продуктов коррозии железа.

ЛИТЕРАТУРА

Агафонова А.Ф., Чаплыгина Н.С. К вопросу о связи между обеспеченностью растений железом и нуклеиновым обменом. — В кн.: Роль минеральных веществ в обмене веществ и продуктивности растений. "Наука", М., 1964.

Бьюкенен Дж. Нуклеиновые кислоты, Э. ИЛ, М., 1962.

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

Школьник М.Я., Макарова Н.Я. Об антагонизме железа и меди. — ДАН СССР, 70, 1, 1950.

Brenes-Romales A., Lindgren G., Lindgren C. Gene control of copper sensitivity in *saccharomyces*. — Nature, 176, 4487, 1955.

Eichorn G.L. Metal ions as stabilizers or destabilizers of the deoxyribonucleic acid structure. — Nature, 194, 4827, 1962.

Fitzgerald G.P., Faust S.G. Factors affecting the algicidal and algistatic properties of copper. — Applied Microbiology, 11, 4, 1963.

Frieden E.G., Alls G. Subtle interactions of cupric ion with nucleic acid and components. — Biol. chem., 230, 2, 1958.

Greenfield S.S. Inhibitory effects of inorganic compounds on photosynthesis in *Chlorella*. — Amer. J. Bot., 29, 2, 1942.

Kessler B., Engelberg N. Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. — Biochim. et Biophys. Acta, 55, 1/2, 1962.

Полищук Р. А.

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

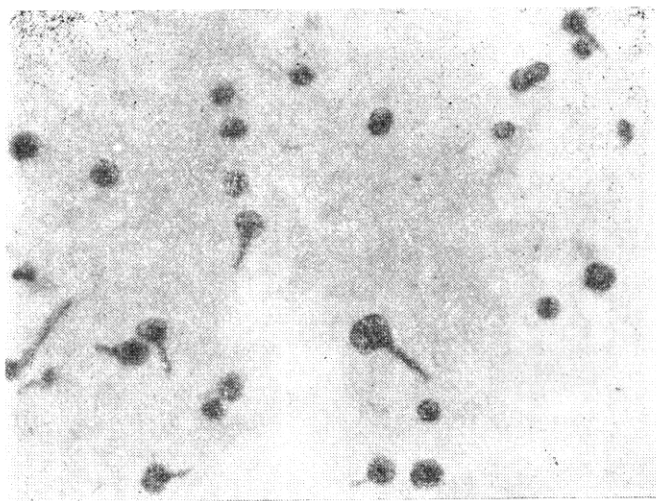


Рис. 1. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *E. intestinalis* под влиянием CuSO_4 (2), Cu-ЭДТА (4), $\text{Cu-ЭДТА} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (3); контроль — 1 (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,6 мг сухого вещества; кювета — 10 мм).

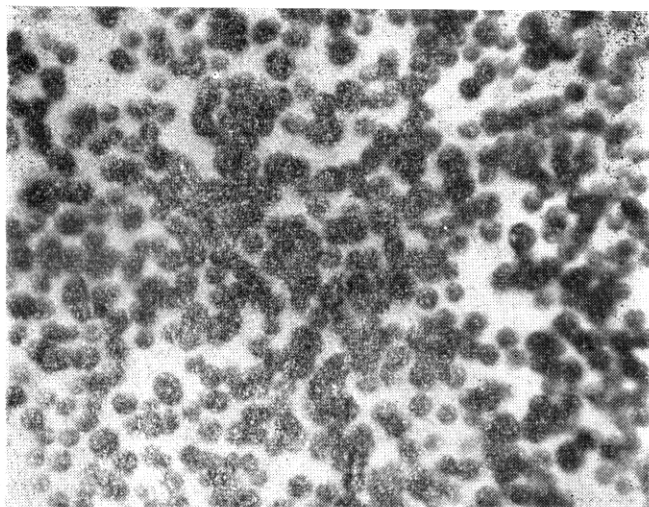


Рис. 2. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *S. corumbosum* под влиянием CuSO_4 (2), Cu-ЭДТА (4), $\text{Cu-ЭДТА} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (3); контроль — 1 (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,4 мг сухого вещества; кювета — 10 мм).



Рис. 3. Изменение содержания фикоэритрина *S. corumbosum* 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).

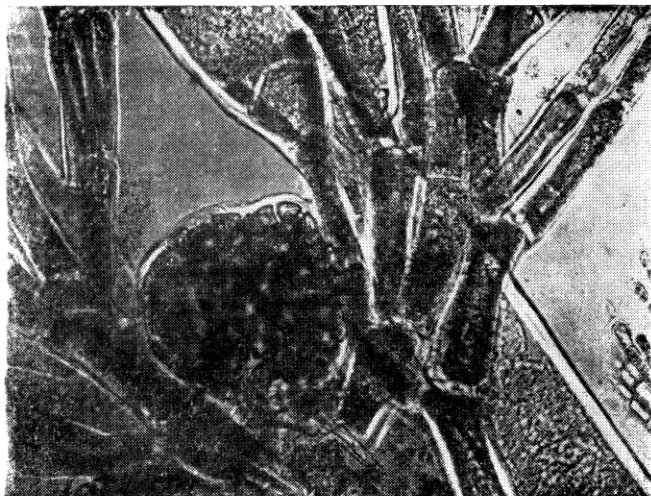


Рис. 4. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *S. coquimbosum* в условиях освещения под влиянием CuSO_4 (6с), Cu-ЭДТА (7с), Fe-ЭДТА (8с); контроль — 5с (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета — 10 мм).

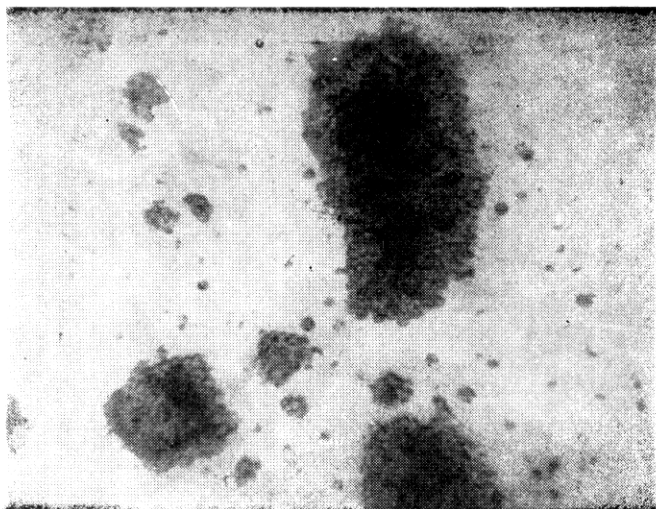


Рис. 5. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов *S. coquimbosum* в условиях темноты под влиянием CuSO_4 (6т), Cu-ЭДТА (7т), Fe-ЭДТА (8т); контроль — 5т (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета — 10 мм).



Рис. 6. Изменение общего содержания пигментов (каротиноидов и хлорофиллов а+в) *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 — 10 мм).

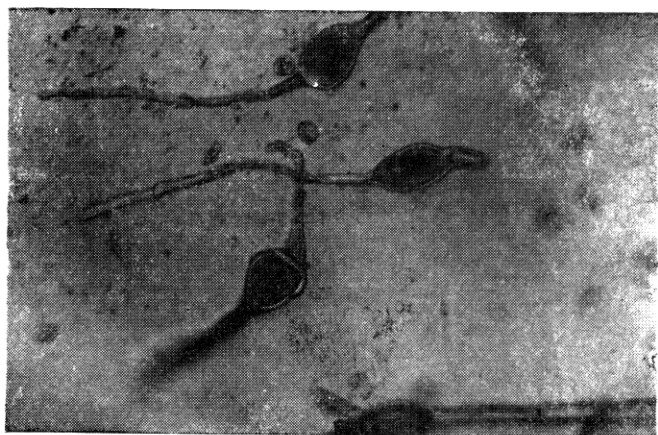


Рис. 7. Изменение общего содержания пигментов *S. lomentaria* под влиянием CuSO_4 (свет) — 3, CuSO_4 (темнота) — 4, Cu -ЭДТА (темнота) — 8, Na_3 -ЭДТА (свет) — 11, Na_3 -ЭДТА (темнота) — 12; контроль (свет) — 1, контроль (темнота) — 2 (1 мл вытяжки пигментов соответствует 0,5 мг сухого вещества; кювета — 10 мм).