УДК 547.963:582(232+273):54-145.15

С.И. ЛОСЬ

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
01001 Киев, Терещенковская, 2, Украина

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФИКОБИЛИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ ВОДОРОСЛЕЙ

Исследовано влияние мочевины на спектральные свойства фикобилипротеинов, выделенных из различных видов синезеленых и красных водорослей. Спектральные характеристики билипротеинов, полученные при высоких концентрациях мочевины, свидетельствуют о диссоциации фикобилиновых пигментов на субъединицы. Подтверждена важная роль белковой части молекулы фикобилипротеинов в проявлении их видоспецифических особенностей. Спектральные изменения фикобилиновых пигментов под воздействием мочевины могут служить индикатором уровня загрязнения водоемов аммонийным азотом и использоваться в экспресс-анализе. Большие количества аммиака, как продукта гидролиза мочевины вследствие высокой активности уреазы, отрицательно влияют на структуру и свойства фикобилиновых пигментов, что приводит к исчезновению синезеленых водорослей в экстремальных условиях и, возможно, является одним из механизмов смены видов водорослей в водоемах.

Ключевые слова: фикобилипротеины, фикоэритрин, фикоцианин, мочевина, водоросли.

Введение

Мочевина (карбамид) представляет собой конечный продукт белкового обмена у многих животных и человека, она обнаружена также в тканях некоторых растительных организмов. Мочевину также производят химическим путем и активно применяют в качестве концентрированного азотного удобрения для многих сельскохозяйственных культур, а также для увеличения продуктивности водоемов в рыбном хозяйстве. По разным каналам со сточными водами мочевина попадает в водоемы, что, в конечном итоге, влияет на «цветение» водоемов и качество воды. Содержание мочевины в поверхностных слоях воды составляет 20-30 % суммы органического азота, а в придонных водах над шельфом – 60-80 % (Клоченко и др., 2000). При обогащении водоемов аммонийным азотом вследствие загрязнения воды мочевиной существенно изменяются видовой состав растительности, рост и развитие фитопланктона, а также сложившиеся трофические цепи (Гончар, 1986).

Синезеленые водоросли наряду с другими водными организмами участвуют в гидролизе мочевины. Характер распада мочевины обусловлен биологическими особенностями видов и зависит от наличия разных ферментных систем (Упитис, 1983, Клоченко и др., 2001).

Так, синезеленые водоросли обладают высокой активностью уреазы, которая интенсивно расщепляет мочевину до ионов NH^+_4, накопление которых приводит к ингибированию и гибели этих водорослей. Напротив, зеленые хлорококковые водоросли, содержащие мочевинную амидазу, гидролизуют мочевину в меньшей степени, поэтому их развитие не угнетается аммиаком.

Следовательно, концентрация аммонийного азота в водоеме является регулирующим фактором в смене доминирующих видов водорослей, продуктивности водоемов и качества воды (Харитонова, 1984, Кло ченко и др., 1994; Сакевич и др., 1994; Усенко и др., 2000).

Синезеленые и красные водоросли отличаются наличием в их фитосинтетическом аппарате фикобилиновых пигментов, которые являются их главными фотосенсибилизаторами и выполняют роль основной светособирающей антенны в области 490-670 нм.

Присутствие этих пигментов дает преимущество соответствующим водорослям в отношении освоения экологических ниш, куда проникает желто-зеленая область солнечного спектра. Водоросли содержат большое количество фикобилиновых пигментов, которые имеют белковую природу и составляют до 40-60 % массы всех водорастворимых белков (Bennet, Bogorad, 1971; Бриттон, 1986; Судьїна та ін., 2007). Однако их содержание сильно зависит от вида водорослей и внешних факторов, таких как свет, питание, температура и др.

Фикобилипротеины принято считать «депо» белка в клетках водорослей, они разрушаются, в первую очередь, при азотном голодании, что является универсальной реакцией на стрессовое состояние (Stanier, 1973; Саут, Уиттик, 1990; Сегнетова и др., 2006).

Интересно было изучить влияние мочевины, как эффективного источника азота, на свойства фикобилипротеинов, поскольку, с одной стороны, мочевина идет на синтез этих пигментов, а с другой – избыток мочевины синтезирует фермент уреазу, при этом образуется аммиак, который губительно влияет на синезеленые водоросли. Исследование специфики реакции фикобилипротеинов разных видов водорослей на воздействие мочевины поможет выяснить причины смены водорослевых сообществ под влиянием карбамида.

В данной работе мы изучали влияние различных концентраций мочевины на спектральные свойства двух главных фикобилиновых пигментов (фикоцианина и фикоэритрина) из различных видов синезеленых и красных водорослей.

Материалы и методы

Альгологически чистые культуры синезеленых водорослей выращивали в лабораторных условиях, как было описано нами ранее (Лось, 1978). Красные водоросли были собраны в Черном море вблизи г. Севастополя.

Исходный раствор фикоцианина получали при растирании на холоде синезеленой водоросли *Anabaena cylindrica* Lemm. с добавлением 0,1 М натрий фосфатного буфера (pH 6). Аналогичным образом получали исходный раствор

фикоэритрина из синезеленой водоросли *Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot, шт. 81 и красных водорослей: *Ceramium ciliatum* (Ell.) Ducl., *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur., *Corallina mediterranea* Aresch. и *Grateloupia dichotoma* J.Ag. Для экстракции фикоэритрина использовали 0,05 М натрий фосфатный буфер с pH 6,8-7,0.

Для получения чистых растворов фикоцианина и фикоэритрина гомогенат центрифугировали при 8000 об./мин в течение 20 мин.

Спектральные свойства фикобилипротеинов исследовали при одинаковой концентрации раствора, которая составляла единицу оптической плотности.

Спектры поглощения билипротеинов определяли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» после воздействия мочевины (1 ч) на растворы данного пигмента.

Для определения влияния мочевины на фикоцианин использовали мочевину в концентрации 0,4-4 М, на фикоэритрин – в концентрации 4-8 М.

Результаты и обсуждение

Спектр поглощения фикоэритрина *Nostoc punctiforme* представлен главным максимумом при 564 нм (см. рисунок, *а*).

С увеличением концентрации мочевины интенсивность поглощения фикоэритрина постепенно снижается (см. таблицу). Так, при концентрации мочевины 4 М интенсивность поглощения этого максимума составляет 83 % интенсивности его в растворе без мочевины, при 6 М мочевины поглощение при 564 нм составляет 51 %, а начиная с концентрации мочевины 7 М максимум резко снижается до 19 %. Положение максимума фикоэритрина *N. punctiforme* существенно не менялось в исследуемых условиях, тогда как небольшое поглощение при 501 и 550 нм с увеличением концентрации карбамида становилось более выраженным.

Все фикоэритрины красных водорослей в спектре поглощения имеют три главных максимума в области 497-501, 544-551 и 563-570 нм (см. таблицу)

На рисунке (*б*) представлен типичный для красных водорослей 3-пиковый спектр поглощения фикоэритрина из *Ceramium ciliatum*, имеющий максимум при 500, 544 и 570 нм. Все максимумы уменьшались под воздействием мочевины примерно одинаково. Однако их оптическая плотность оставалась в се еще высокой (50-60 %) при концентрации мочевины 8 М и положение максимумов не изменялось.

Фикоэритрин *Gelidium latifolium* поглощает свет в области 501, 551 и 563 нм (см. таблицу). При концентрации мочевины 4 М коротковолновый максимум (501 нм) снижался до 90,5 %, а при 8 М – до 71,6 %. Однако под воздействием мочевины его положение также не изменялось. Интенсивность пиков при 551 и 563 нм значительно снижалась и при концентрации мочевины 8 М составляла лишь 1/3 исходной. Положение этих пиков значительно изменялось под влиянием исследуемого фактора, а именно: пик при 551 нм сдвигался в сторону коротких длин волн к 536 нм, а пик при 563 нм – в сторону длинных волн – к 570 нм.

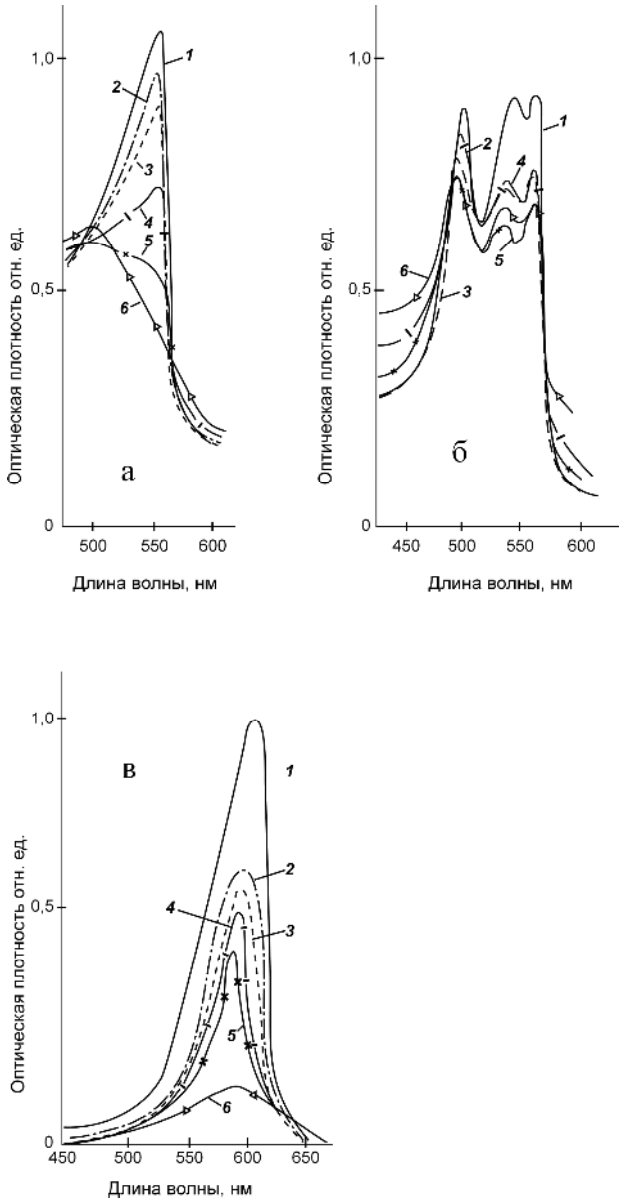

Рисунок. Зависимость интенсивности максимумов по глощения растворов фикоэритрина *Nostoc punctiforme* (*а*), *Ceramium ciliatum* (*б*) и фикоцианина *Anabaena cylindrica* (*в*) от концентрации мочевины

Фикоэритрин *Corallina mediterranea* имел три максимума поглощения: при 497, 550 и 568 нм (см. таблицу). Интенсивность последних двух максимумов резко снижалась при концентрации мочевины 6 М, соответственно, до 24 и 19 % и при концентрации мочевины 8 М они вовсе исчезали.

Таблица. **Зависимость интенсивности максимумов поглощения растворов фикоэритрина и фикоцианина от концентрации мочевины**

Концентрация мочевины, М	*Ceramium ciliatum*			*Gelidium latifolium*			*Corallina mediterranea*			*Grateloupia dichotoma*			*Nostoc punctiforme*	*Anabaena cylindrica*	
	Максимумы поглощения фикоэритрина, нм													Концентрация мочевины, М	Максимум оглощения фикоцианина, нм
	500	544	570	501	551	563	497	550	568	500	546	567	564		625
	Поглощение фикоэритрина (% контроля, без мочевины)*														Поглощение (% контроля, без мочевины)
4	92,6	76,0	82,0	90,5	67,1	66,2	78,4	70,2	66,6	72,9	58,3	54,2	83,0	0,4-0,7	64,5
5	85,0	72,0	69,0	88,6	60,0	57,4	68,6	47,4	44,4	59,5	40,5	34,0	76,0	0,8-1,0	58,9
6	73,5	64,0	70,0	79,2	44,3	39,7	56,8	24,5	19,4	51,3	30,9	25,5	51,9	2,0	54,4
7	76,4	61,3	66,6	73,6	38,6	31,0	52,9	19,3	11,1	50,2	28,5	25,5	29,8	3,0	45,6
8	60,0	50,6	53,8	71,6	35,7	30,0	47,0	–	–	43,2	–	–	19,1	4,0	13,3

*Контроль составляет 100 %.

Коротковолновый максимум (497 нм) составлял 47 % при наибольшей концентрации мочевины.

Под влиянием возрастающих концентраций мочевины интенсивность фикоэритрина при 546 и 567 нм у *Grateloupia dichotoma* снижалась вдвое (4 М), затем эти максимумы также исчезали. При концентрации мочевины более 4 М пик при 546 нм сдвигался в сторону коротких волн (539 нм), что может свидетельствовать о дезагрегации белковой части молекулы фикоэритрина. Наиболее устойчивый максимум при 500 нм под влиянием 8 М мочевины уменьшался более чем вдвое.

Мы исследовали также влияние мочевины на фикоцианин из синезеленой водоросли *Anabaena cylindrica*.

При концентрации мочевины 0,4-0,7 М интенсивность фикоцианина (625 нм) составляла 65 % интенсивности контроля и постепенно снижалась до 13 % при концентрации мочевины 4 М без изменения в положении этого максимума (см. таблицу, рисунок, *в*).

Итак, мочевина оказывает значительное влияние на спектральные свойства всех фикобилиновых пигментов, при этом обнаруживается различная чувствительность фикобилипротеинов, выделенных из разных водорослей.

Наиболее устойчив к воздействию мочевины фикоэритрин *Ceramium ciliatum* и *Gelidium latifolium*, тогда как у *Corallina meditestinales* и *Grateloupia dichotoma* высокий уровень мочевины приводил к деструктивным изменениям пигментов и, как следствие, к исчезновению длинноволновых максимумов при 546-550 и 567-568 нм.

Наши исследования белковой части молекулы фикоэритрина разных водорослей (Лось, 1986) свидетельствуют о том, что электрофоретический спектр фикобилинового комплекса *Carollina meditestinales* и *Grateloupia dichotoma* состоит всего из 2-3 зон белка, которые находятся в средней и более подвижной области относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). Эти данные объясняют нестабильность фикоэритрина соответствующих водорослей, которая проявляется под воздействием мочевины. Напротив, водоросли *Ceramium ciliatum* и *Gelidium latifolium* содержат 6-7 зон фикобилинового белка, в состав которых входят высокомолекулярные фракции, что подтверждает их значительную устойчивость к мочевине.

При сравнении фикоэритрина из синезеленой водоросли *Nostoc punctiforme* и из красных водорослей выявлена высокая спектральная устойчивость фикоэритрина ностока, сравнимая с *Ceramium ciliatum* при средних уровнях мочевины, однако высокие концентрации мочевины (6-8 М) приводят к значительному разрушению структуры этого пигмента.

Следует отметить большую устойчивость максимума при 501 нм по сравнению с длинноволновыми максимумами при 551 и 563-568 нм.

По данным С. Охеоха (O'heocha, 1965), действие мочевины подобно действию кислых растворов. Небольшие концентрации мочевины до 1 М нарушают в основном гидрофобные взаимодействия, но не вызывают плавления

водородных связей. Поэтому наблюдаемые спектральные эффекты, вероятнее всего, можно объяснить ослаблением межхромофорного взаимодействия, вызванного разобщением хромофоров в результате разворачивания белковой глобулы, что и вызывает значительное понижение исходных длинноволновых максимумов поглощения. Растворы 8 М мочевины, вызывающие разрыв водородных связей и диссоциацию белковой молекулы, приводят к эффектам, сходным с действием «крайних» pH. Данное исследование, а также наши предыдущие работы (Лось, 1989) свидетельствуют о том, что разные типы фикобилиновых пигментов резко отличаются по прочности своей структурной организации. Так, в целом для диссоциации фикоэритрина на субъединицы требуются более жесткие условия денатурации (pH 10 или pH 3, растворы 8 М мочевины, нагревание до 80-90 °С). Структура фикоцианина менее стабильна и диссоциация наступает при pH 9 или 4, в растворах 2 М мочевины, при нагревании до 60-70 °С).

Зависимость оптической плотности фикоцианина и фикоэритрина от кислотности среды, температуры и концентрации мочевины характеризуется резким переходом, который может указывать на кооперативный характер спектральных изменений, обусловленный диссоциацией этих белков на субъединицы.

Проведенные исследования дезагрегации пигментов под влиянием мочевины подтверждают наличие определенных особенностей фикобилипротеинов из разных водорослей, обусловленных, в частности, структурой белковой части молекулы.

Таким образом, спектральная характеристика фикобилиновых пигментов является экспресс-анализом и может служить индикатором загрязнения водоемов аммонийным азотом.

Несмотря на то, что мочевина не токсичное вещество, большие концентрации ее и аммиака, как продукта гидролиза мочевины, отрицательно влияют на структуру и свойства фикобилипротеинов. При этом особо чувствителен фикоцианин, который составляет основную светособирающую антенну пигментного аппарата синезеленых водорослей в пресных водоемах. Наши данные могут служить объяснением явлений исчезновения синезеленых водорослей под влиянием высоких концентраций мочевины (залповое загрязнение, катастрофы и пр.). Зеленые водоросли, не содержащие фикобилиновых пигментов, в этих условиях развиваются вполне нормально.

Таким образом, концентрация и динамика разложения мочевины под влиянием различных ферментных систем у разных водорослей является одним из механизмов смены видов водорослей в водоемах.

Заключение

Обнаружена деградация различных типов фикобилиновых пигментов под влиянием мочевины, которая зависит от видовой принадлежности водорослей.

Описанные спектральные изменения фикобилипротеинов могут служить индикатором загрязнения водоемов аммонийным азотом, использоваться в экспресс анализе и объясняют смену различных видов в экстремальных условиях.

S.I. Los

N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkovskaya St., 01601 Kiev, Ukraine

INFLUENCE OF UREA ON SPECTRAL PROPERTIES OF PHYCOBILIN PIGMENTS OF ALGAE

Influence of urea on spectral properties of phycobiliproteins isolated from different species of blue - green and red algae was investigated. Studies on the spectral properties of phycobiliproteins conducted with high concentration of urea play a significant role in the dissociation of phycobilin pigments to subunits. The protein part of a molecule of algal phycobiliproteins is confirmed as important in the manifestation of the species-specific peculiarities of these pigments. The obtained data indicate the expediency of using spectral characteristics of phycobilin pigments as indicators of soil or water pollution by ammonium nitrogen and may be used for express analysis.

K e y w o r d s: phycobiliproteins, phycoerythrin, phycocyanin, urea, algae .

Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.

Гончар М.Т. Экологические проблемы сельскохозяйственного пр оизводства. – Львов: Высш. шк., 1986. – 143 с.

Клоченко П.Д., Сакевич А.И., Шевченко Т.Ф., Беспалько С.М. Влияние нитратных и углеаммонийных удобрений на особенности развития планктонных и бентосных водорослей // Альгология. – 1994. – **4**, № 2. – С. 21-26.

Клоченко П.Д., Сакевич А.И., Усенко О.М., Шевченко Т.Ф. Изменение структуры фитопланктона под воздействием мочевины // Гидробиол. журн. – 2000. – **36**, № 6. – С. 62-74.

Клоченко П.Д., Борисова Е.В., Медведь В.А. и др. Трансформация мочевины в процессе роста некоторых синезеленых (*Cyanoprokaryota*) и зеленых (*Chlorophyta*, *Chlorococcales*) водорослей // Альгология. – 2001. – **11**, № 3. – С. 316-326.

Лось С.І. Порівняльна характеристика біліпротеїдів синьозелених водоростей (на підставі в ікової мінливості) // Укр. бот. журн. – 1978. – **35**, № 6. – С. 614-619.

Лось С.І. Фікобіліпротеїди червоних водоростей // Там же. – 1986. – **43**, № 3. – С. 14-18.

Лось С.І. Залежність властивостей фікобілінових пігментів водоростей від кислотност і середовища // Там же. – 1989. – **46**, № 5. – С. 63-67.

Сакевич А.И., Клоченко П.Д., Беспалько С.М., Шевченко Т.Ф. Влияние углеаммонийных солей на развитие планктонных водорослей // Гидробиол. журн. –1994. – **30**, № 6. – С. 41-49.

Саут Р., Уиттик А. Основы альгологии. – М.: Мир, 1990. – 595 с.

Сегнетова М.П., Маркелова А.Г., Лось Д.А. Влияние азотного голодания на ультраструктуру и пигментный состав хлоропластов ацидотермофильной микроводоросли *Galdieria sulphuraria* // Физиол. раст. – 2006. – **53**, № 2. – С. 172-181.

Судьїна О.Г., Шнюкова Є.І., Мушак П.О. та ін. Біохімія червоних водоростей. – К., 2007. – 320 с.

Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. – Рига: Зинатне, 1983. – 240 с.

Усенко О.М., Сакевич А.И., Клоченко П.Д. Участие фотосинтезирующих гидробионтов в разложении мочевины // Гидробиол. журн. – 2000. – **36**, № 4. – С. 20-29.

Харитонова Н.Н. Биологические основы интенсификации прудового рыбоводства. – Киев: Наук. думка, 1984. – 196 с.

Bennet A., Bogorad L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins // Biochemistry. – 1971. – **10**, N 19. – P. 3825-3634.

O'heocha C. Phycobilins // Chemistry and biochemistry of plant pigments. – London; New York: Acad Press, 1965. – P. 175-196.

Stanier R.Y. Autotrophy and heterotrophy in unicellular blue-green algae // The biology of blue-green algae. – Oxford: Black Sci. Publ, 1973. – P. 501-518.

Получена 11.07.08

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова