

УДК 502.51:504.5: 581.526.3

## ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛЛЮТАНТОВ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ЭЛОДЕИ

©2013 Н.В. Чукина, М.Н. Кислицина, М.Г. Малева, Г.Г. Борисова

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург

Поступила 05.06.2013

В модельных системах исследовали влияние органических поллютантов на антиоксидантный статус *Eloдея sp.* Выявлены изменения антиоксидантной активности элодеи при действии возрастающих концентраций мочевины (от 100 до 1000 мг/л) и монофенола (от 0,1 до 10 мг/л). Проведено сопоставление эффектов действия различных видов фенольных соединений (монофенола, гидрохинона, пирокатехина и резорцина) на антиоксидантную активность элодеи.

**Ключевые слова:** *Eloдея sp.*, мочевина, фенольные соединения, окислительный стресс, антиоксидантная система.

Проблема адаптации живых организмов к поллютантам различной химической природы является одной из важнейших проблем современной биологии в связи с неуклонным ростом антропогенных нагрузок на наземные и водные экосистемы. Среди органических поллютантов особое место занимают мочевина и фенольные соединения. Наибольшему воздействию подвержены водные экосистемы, поскольку значительные количества этих загрязняющих веществ поступают с хозяйственно-бытовыми и промышленными сточными водами, с коллекторными водами и ливневыми осадками.

Мочевина (карбамид), благодаря своей доступности и распространенности, может служить добавочным источником азота и органического углерода в гидроценозах. Это особенно важно для погруженных водных растений, обитающих в толще воды при пониженной освещенности и относительно низкой концентрации неорганического углерода [2]. В то же время избыточные количества мочевины могут влиять как на отдельные виды гидрофитов, так и на целые растительные сообщества. Высокие концентрации мочевины вызывают физиологические расстройства и приводят к снижению продуктивности у высших растений [8]. Продукт ее распада (аммиак), особенно при залповом загрязнении воды исследуемым амидом, может существенно влиять на качество воды, а также вызывать смену доминирующих видов в растительных сообществах [1, 7].

Фенольные соединения (ФС) в природных водах обычно находятся в растворенном состоянии в виде фенолятов, фенолят-ионов и свободных фенолов. Они могут вступать в реакции конденсации и полимеризации, образуя сложные структуры. К числу наиболее распространенных фенольных компонентов сточных вод относятся фенол, пирокатехин, гидрохинон и гваякол [11]. Техногенные фенолы, попадающие в водоемы и водотоки, вовлекаются в естественный круговорот веществ подобно природным фенолам.

Георгиевна, к.б.н., доцент, e-mail: maria.maleva@mail.ru; Борисова Галина Григорьевна, д.г.н., проф., e-mail: Borisova59@mail.ru

Однако в большинстве случаев сброс сточных вод, содержащих ФС, в водотоки и водоемы ухудшает их общее санитарное состояние, оказывая влияние на живые организмы не только за счет токсичности фенолов, но и в результате существенного изменения режима биогенных веществ и растворенных газов [6].

Водные растения, адаптируясь к изменяющимся условиям среды, в ходе эволюции выработали защитные механизмы, препятствующие проникновению поллютантов в клетку, либо обеспечивающие их внутриклеточную детоксикацию. Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что механизмы устойчивости высших растений к мочеине и фенольным соединениям исследованы недостаточно. О способности этих поллютантов вызывать окислительный стресс практически ничего не известно.

Цель работы – оценить степень окислительного повреждения растений (на примере элодеи) при действии разных доз мочевины и фенольных соединений и исследовать влияние органических поллютантов на антиоксидантную активность листьев элодеи.

Изучение ответных реакций гидрофитов на загрязнение среды органическими поллютантами необходимо для понимания их роли в процессах самоочищения водных объектов, для разработки научно обоснованных методов интенсификации фиторемедиационных технологий и прогнозирования трансформации этих поллютантов в водных экосистемах.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены в модельных системах. В качестве объекта исследований использовали элодею: *Eloдея densa* Planch. (элодея густолиственная) и *Eloдея canadensis* L. (элодея канадская).

Для выявления действия мочевины на показатели антиоксидантного статуса побеги элодеи (длиной 6–10 см) инкубировали в течение 5 суток на 5% среде Хогланда-Арнона I с добавлением возрастающих концентраций мочевины: 0 (контроль); 100; 500; 1000 мг/л при естественном освещении. Для оценки влияния монофенола побеги элодеи инкубировали в течение 4 суток на дистиллированной воде с добавлением

Чукина Надежда Владимировна, к.б.н., ассистент кафедры, e-mail: nady\_dicusag@mail.ru; Кислицина Мария Николаевна, аспирант, e-mail: mariyakislitsina@yandex.ru; Малёва Мария

монофенола в градиенте концентраций: 0 (контроль); 0,1; 1,0; 10 мг/л. Для выявления действия на антиоксидантную активность элодеи разных видов фенольных соединений растения в течение 2 суток инкубировали на среде с добавлением монофенола, гидрохинона, пирокатехина и резорцина (в концентрации 1 мг/л).

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов определяли в усредненных пробах листьев, которые гомогенизировали на льду в 0,1 М К/Na-фосфатном буфере (рН=7,4). Определение интенсивности ПОЛ проводили в бутанольном экстракте, по содержанию малонового диальдегида (МДА) как основного продукта липопероксидации, реагирующего с тиобарбитуровой кислотой [17]. Активность гваяколспецифичной пероксидазы (ГП) оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [11]. Активность аскорбатпероксидазы (АП) измеряли с помощью модифицированного метода Nakano, Asada [15]. Активность полифенолоксидазы (ПФО) определяли титриметрическим методом с использованием аскорбиновой кислоты [9]. Определение аскорбиновой кислоты, содержание флавоноидов и общее содержание водорастворимых антиоксидантов в листьях растений определяли спектрофотометрическими методами [13, 10].

Статистическую обработку проводили в прикладных программах Excel 7.0 и Statistica 6.0. Усредненную пробу листьев каждого вида отбирали не менее

**Таблица 1.** Влияние возрастающих концентраций мочевины на содержание МДА, аскорбата, активность аскорбат- и гваяколовой пероксидаз (АП и ГП) в листьях элодеи

Концентрация мочевины, мг/л	МДА, мкмоль/г сухой массы	Аскорбат, мг/г сухой массы	АП, ммоль/(мг белка мин)	ГП, ммоль/(мг белка мин)
0	122,24 ± 2,49 <i>a</i> *	2,60 ± 0,03 <i>a</i>	0,69 ± 0,04 <i>a</i>	0,66 ± 0,01 <i>a</i>
100	173,42 ± 6,67 <i>b</i>	3,51 ± 0,05 <i>b</i>	0,83 ± 0,04 <i>b</i>	0,72 ± 0,05 <i>ab</i>
500	225,17 ± 8,13 <i>c</i>	1,56 ± 0,01 <i>c</i>	0,68 ± 0,04 <i>ac</i>	1,30 ± 0,09 <i>c</i>
1000	248,29 ± 5,87 <i>d</i>	0,98 ± 0,01 <i>d</i>	0,36 ± 0,01 <i>d</i>	1,31 ± 0,04 <i>cd</i>

\*Разными буквами отмечены достоверно различающиеся данные ( $p < 0,05$ ).

Обнаружено, что при низкой концентрации мочевины (100 мг/л) происходил усиленный синтез аскорбата в листьях элодеи. Количество аскорбиновой кислоты увеличивалось на 35% от контроля. Однако при возрастании концентрации мочевины в 5 раз (до 500 мг/л), количество аскорбата снижалось на 40% от контроля. Дальнейшее возрастание концентрации мочевины в среде (до 1000 мг/л) приводило к еще большему окислению этого антиоксиданта (на 60% от контроля).

Обнаружена высокая корреляция между содержанием аскорбата в листьях элодеи и активностью аскорбатпероксидазы ( $r=0,90$ ;  $n=12$ ;  $p<0,001$ ). Активность этого фермента повышалась лишь при низкой концентрации мочевины (на 20% от контроля). Высокая концентрация поллютанта (1000 мг/л) угнетала активность аскорбатпероксидазы на 48%. Известно, что при участии аскорбатпероксидазы окисляется аскорбиновая кислота и при этом восстанавливается перекись водорода [16]. Вероятно, при высоких концентрациях мочевины происходит

истощение пула восстановленного аскорбата, что приводит к уменьшению активности этого фермента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под действием различных стрессоров в клетках живых организмов возникает окислительный стресс. Защиту от этого стресса обеспечивает антиоксидантная система, состоящая из различных компонентов, включая ферменты-антиоксиданты и низкомолекулярные антиоксиданты. Как правило, более высокая антиоксидантная активность клеток коррелирует с более высокой устойчивостью к стрессу [3].

Одной из универсальных реакций на изменение условий обитания, включая загрязнение, является индукция свободнорадикальных процессов и, в частности, перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Исследования показали, что мочевины, уже при низкой концентрации в среде (100 мг/л), вызывала окислительный стресс в листьях элодеи из-за образования повышенного количества активных форм кислорода (АФК), о чем свидетельствовала активация ПОЛ (табл. 1). Обнаружена прямая корреляция между концентрацией мочевины и содержанием МДА в листьях элодеи ( $r=0,98$ ,  $n=12$ ,  $p<0,001$ ). Мочевина в концентрации 1000 мг/л приводила к увеличению продуктов ПОЛ более чем в 2 раза.

Исследования показали значительное увеличение активности ГП при действии повышенных концентраций мочевины (в 2 раза по сравнению с контролем). Особенность ГП заключается в том, что она восстанавливает пероксид водорода за счет окисления фенольных соединений. Этот факт позволяет рассматривать ГП с двух позиций: как фермент, принимающий участие в окислении органических ксенобиотиков, в том числе фенолов, так и как фермент-антиоксидант, ликвидирующий пероксиды [5].

Детоксикация поллютантов фенольной природы происходит также благодаря деятельности полифенолоксидазы (ПФО), или дифенолоксидазы.

При исследовании эффектов действия монофенола в градиенте концентрации показано, что активность ГП и ПФО при добавлении в среду монофенола уменьшалась по сравнению с контролем (табл. 2). Наиболее значительное снижение наблюдалось при

концентрациях 0,1 и 1,0 мг/л. Содержание водорастворимых антиоксидантов при возрастании концентрации монофенола уменьшалось, что, очевидно, мо-

жет быть обусловлено их расходом на обезвреживание активных форм кислорода.

**Таблица 2.** Влияние возрастающих концентраций монофенола на активность гваяколовой пероксидазы (ГП), полифенолоксидазы (ПФО) и содержание водорастворимых антиоксидантов в листьях элодеи

Концентрация монофенола, мг/л	ГП, мкМ/(г сухой массы мин)	ПФО, мкМ/(г сухой массы мин)	Водорастворимые антиоксиданты, мг/г сухой массы
0	0,42±0,03 <i>a*</i>	205,1±0,0 <i>a</i>	3,99±0,46 <i>a</i>
0,1	0,22±0,01 <i>b</i>	102,2±0,2 <i>b</i>	2,67±0,73 <i>b</i>
1,0	0,23±0,02 <i>bc</i>	117,2±16,9 <i>bc</i>	2,60±0,52 <i>bc</i>
10,0	0,39±0,01 <i>d</i>	166,0±19,5 <i>d</i>	2,53±0,13 <i>d</i>

\*Разными буквами отмечены достоверно различающиеся данные ( $p < 0,05$ ).

К настоящему времени механизмы действия экзогенных ФС на функционирование растений и их вторичный метаболизм изучены слабо. В связи с этим были проведены исследования, нацеленные на выявление эффектов влияния различных ФС на некоторые биохимические показатели.

Установлено, что все экзогенные фенольные со-

единения в концентрации 1 мг/л оказывали токсическое действие на элодею, что привело к снижению активности ПФО в ее листьях по сравнению с контролем (табл. 3). Однако степень токсичности исследованных фенольных соединений различалась, что можно объяснить их физико-химическими особенностями.

**Таблица 3.** Содержание МДА, флавоноидов и активность полифенолоксидазы (ПФО) в листьях элодеи при инкубировании в среде с различными фенольными соединениями

Вариант опыта	МДА, мкмоль/г сухой массы	Флавоноиды, мг/г сухой массы	ПФО, мкМ/(г сухой массы мин)
Контроль	370±20 <i>a*</i>	6,7±0,5 <i>a</i>	224,5±17,7 <i>a</i>
Монофенол, 1 мг/л	380±40 <i>ab</i>	5,5±0,4 <i>b</i>	164,8±11,9 <i>b</i>
Гидрохинон, 1 мг/л	360±20 <i>abc</i>	8,8±1,3 <i>c</i>	140,3±6,1 <i>c</i>
Пирокатехин, 1 мг/л	260±20 <i>d</i>	4,2±0,3 <i>d</i>	100,8±0,0 <i>d</i>
Резорцин, 1 мг/л	300±20 <i>e</i>	5,1±0,4 <i>be</i>	99,2±4,7 <i>de</i>

\*Разными буквами отмечены достоверно различающиеся данные ( $p < 0,05$ ).

Фенольные соединения неоднозначно влияли на интенсивность пероксидации липидов. Как показали исследования, наименьшее содержание МДА было обнаружено в листьях элодеи, инкубированной с пирокатехином. Снижение интенсивности ПОЛ по сравнению с контролем на 30% при действии пирокатехина свидетельствует либо об очень сильной активации антиоксидантной защиты, либо, что наиболее вероятно, уже о частичном разрушении МДА под действием токсиканта, в результате чего продукты липопероксидации были обнаружены в меньшем количестве. Это говорит о высокой токсичности пирокатехина для данного растения.

Содержание флавоноидов в листьях элодеи за двое суток инкубирования в вариантах с пирокатехином, резорцином и фенолом понизилось на 38; 23 и 24% соответственно, в варианте с гидрохиноном – возросло на 32% по сравнению с контролем.

Такое поведение флавоноидов можно объяснить, исходя из физико-химических особенностей исследованных ФС. Известно, что пирокатехин обладает слабой летучестью, вследствие чего его элиминация из среды инкубирования выражена значительно слабее, чем у монофенола. Кроме того, пирокатехин способен образовывать активные промежуточные продукты окисления, в частности, бензохиноны, которые обладают несопоставимо более высокой реакционной способностью, чем соответствующие им фенольные соединения [6].

Физико-химические свойства гидрохинона сходны с некоторыми свойствами резорцина, однако, судя по увеличению содержания флавоноидов в листьях растений, гидрохинон является менее токсичным для растений по сравнению с другими исследованными фенольными соединениями.

Наибольшее снижение активности ПФО в листьях элодеи происходило под влиянием пирокатехина и резорцина (на 55% и 56% соответственно), наименьшее – при добавлении монофенола и гидрохинона (на 27% и 37% соответственно). Известно, что монофенол является летучим соединением и очень легко подвергается биохимическому окислению. Очевидно, что на 2-е сутки инкубирования значительная часть монофенола была элиминирована из водной среды, поэтому его фактическая концентрация в среде была существенно ниже 1 мг/л.

Как было уже отмечено, в листьях элодеи, инкубированной с резорцином, активность ПФО снижалась на 56%, а интенсивность ПОЛ – почти на 20% (табл. 3). Следовательно, резорцин оказывал не менее токсичное действие на элодею, чем пирокатехин. Известно, что резорцин не подвергается окислению полифенолоксидазой, т.е. токсическое действие резорцина не связано с образованием хинонов. Имеются данные [4], что некоторые фенольные соединения токсичны для растений из-за повышенных электроноакцепторных свойств в связи с их способностью образовывать хелатные комплексы и выступать в роли де-

натурирующих агентов или биологических депрессантов. По-видимому, в некоторых случаях фитотоксичность фенольных соединений может отражать суммарный эффект, который определяется одновременно различными свойствами молекулы.

Установлено, что мочевина, несмотря на относительно низкую токсичность и важную роль в качестве дополнительного источника азота, может представлять угрозу для растений при повышенных концентрациях так же, как и ФС. Высокие концентрации мочевины приводят к истощению пула низкомолекулярных антиоксидантов. При этом антиоксидантный статус растений поддерживается за счет высокой активности некоторых ферментов-антиоксидантов, например, гваяколовых пероксидаз.

Изучение токсичности разных ФС по их влиянию на интенсивность пероксидации и содержание флавоноидов, а также активность полифенолоксидазы в листьях элодеи показало, что наименее токсичным из исследованных фенолов является гидрохинон.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что такие органические поллютанты, как мочевина и фенольные соединения, могут оказывать повреждающий эффект на растения как непосредственно, так и опосредованно, провоцируя образование АФК и развитие окислительного стресса. Важную роль при этом играют низкомолекулярные и высокомолекулярные компоненты антиоксидантной системы защиты, активация которых обеспечивает устойчивость растений к стрессовым факторам.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 14.А18.21.0203 «Молекулярно-генетические и морфофизиологические подходы к оценке разнообразия и устойчивости биологических систем» и частичной финансовой поддержке молодых ученых УрФУ в рамках реализации «Программы развития УрФУ», договор № 2.1.2.1./29.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вредные химические вещества. Азотсодержащие органические соединения: Справ. изд. / Под ред. Б.А. Курьянского и др. Л.: Химия, 1992. 432 с.

2. Горышина Т.К. Экология растений: учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1979. 368 с.
3. Деву С.Р., Прасад М.Н.В. Антиокислительная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 2. С. 233-237.
4. Запаметов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993. 272 с.
5. Квеситадзе Г.И., Хатисаивили Г.А, Садунишвили Т.А. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 198 с.
6. Курсо У.Э., Стом Д.И., Белых Л.И., Ирха Н.И. Превращение канцерогенных и токсических веществ в гидросфере. Таллин: Валгус, 1988. 271 с.
7. Клоченко П.Д., Сакевич А.И., Усенко О.М., Шевченко Т.Ф. Изменение структуры фитопланктона под воздействием мочевины // Гидробиологический журнал. 2000. Т. 36. № 6. С. 62-74.
8. Мокроносов А.Т., Ильных З.Г., Шуколюкова Н.И. Ассимиляция мочевины растениями картофеля // Физиология растений. 1966. Т. 13. № 5. С. 798-806.
9. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наук. Думка, 1976. 234 с.
10. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии: учебно-методическое пособие. СПб.: Изд-во «Лань», 2006. 256 с.
11. Стом Д.И., Тимофеева С.С., Белых Л.И., Буторов В.В. Роль харовых водорослей и других водных растений в процессах деструкции фенольных соединений // Водные ресурсы. 1978. № 4. С. 105-111.
12. Chance B., Maehly A.C. Assay catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 1955. P. 764-775.
13. Hewitt E.J., Dickes G.J. Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues // Biochem. J. 1961. V. 78. P. 384-391.
14. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1981. V. 22. P. 867-880.
15. Prasad K.V.S.K., Saradhi P.P., Sharmila P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea* // Environ. Exper. Bot. 1999. V. 42. P. 1-10.
16. Uchiyama M., Mihara M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test // Anal. Biochem. 1978. V. 86. P. 287-297.

## EFFECT OF ORGANIC POLLUTANTS ON ANTIOXIDANT STATUS OF ELODEA

© 2013 N.V. Chukina, M.N. Kislitshina, M.G. Maleva, G.G. Borisova

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg

In model systems the effects of organic pollutants on the antioxidant status of *Elodea sp.* were studied. It was showed the changes of *Elodea* antioxidant activity during the increasing concentrations of urea (from 100 to 1000 mg/l) and monophenol (0,1 to 10 mg/l). The effects of various types of phenolic compounds (monophenol, hydroquinone, catechol and resorcin) on the antioxidant activity *Elodea* were compared.

**Keywords:** *Elodea sp.*, urea, phenolic compounds, oxidative stress, antioxidant system.

Nadezhda Chukina Candidate of Biology, assistant of chair, e-mail: nady\_dicusar@mail.ru; Maria Kislitsina, postgraduate student; Maria Maleva, Candidate of Biology, associate

professor, e-mail: maria.maleva @ mail.ru; Galina Borisova, Doctor of geology, professor, e-mail: Borisova59@mail.ru