

УДК 556.18:581.5

**АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ГИДРОФИТОВ
С РАЗЛИЧНОЙ АККУМУЛЯТИВНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ
(НА ПРИМЕРЕ *Potamogeton alpinus* Balb.
И *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch.)**

© 2014 г. Н. В. Чукина, Г. Г. Борисова, М. Г. Малева

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,
620000 г. Екатеринбург, ул. Ленина, 51,
e-mail: nady_dicusar@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2013 г.

Изучена антиоксидантная активность двух широко распространенных видов высших водных растений (*Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch. и *Potamogeton alpinus* Balb.) с различной “аккумулятивной стратегией”. Показано, что листья *Batrachium trichophyllum* накапливали металлы в больших количествах и отличались более высокой интенсивностью про- и антиоксидантных процессов по сравнению с *Potamogeton alpinus*.

Ключевые слова: высшие водные растения, тяжелые металлы, аккумулятивная способность, антиоксидантный статус.

DOI: 10.7868/S0320965214040226

ВВЕДЕНИЕ

Погруженные высшие водные растения (гидрофиты), значительно различаясь поверхностью соприкосновения листьев с водой, характеризуются высокой поглотительной способностью [2, 9]. В процессе жизнедеятельности они извлекают из водных объектов не только биогенные элементы, но и различные токсические вещества, в том числе тяжелые металлы (ТМ) [6, 8, 18].

Избыток ТМ в среде обитания, как правило, приводит к их повышенному накоплению растительными организмами, однако величина и характер аккумуляции у разных видов растений имеют свою специфику [15]. В зависимости от “стратегии” поглощения металлов можно выделить виды-аккумуляторы, виды-индикаторы и виды-отражатели [19].

Тяжелые металлы в повышенных количествах вызывают накопление в клетках растений и других живых организмов активных форм кислорода (АФК), защиту от которых обеспечивают различные компоненты антиоксидантной системы [14].

Имеется немало данных об активности антиоксидантных ферментов и содержании низкомолекулярных антиоксидантов у растений в условиях окислительного стресса, индуцированного действием ТМ [4, 11, 13]. В меньшей степени изучена зависимость между антиоксидантной активностью растений и их “аккумулятивной стратегией”.

Выявление закономерностей проявления окислительного стресса и механизмов работы антиоксидантной системы (АОС) у растений представляется особенно актуальным, поскольку функционирование этой системы – одним из путей неспецифической устойчивости к стрессовым воздействиям.

Цель работы – изучение антиоксидантного статуса у погруженных высших водных растений с различной способностью аккумулировать ТМ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований были *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch. и *Potamogeton alpinus* Balb. – погруженные высшие водные растения с разной аккумулятивной способностью, которые отбирали из одного и того же местообитания.

Выбор объектов исследований для достижения поставленной цели проведен на основе сопоставления аккумулятивной способности наиболее распространенных в водоемах и водотоках Свердловской области видов гидрофитов. Установлено, что высокой аккумулятивной способностью по отношению к ТМ отличался *Batrachium trichophyllum*, в то время как наименьшее содержание в листьях ТМ было характерно для *Potamogeton alpinus* [15], поэтому именно эти виды выбраны в качестве объектов исследования.

Таблица 1. Содержание ТМ в поверхностных водах р. Ревда, листьях растений и коэффициенты биологического накопления

Показатель	Cu	Fe	Ni	Zn	Mn
	Поверхностные воды				
ТМ, мг/л	0.010	0.170	0.300	0.012	0.022
ПДК, мг/л	0.001	0.100	0.010	0.010	0.010
	Листья <i>Potamogeton alpinus</i>				
ТМ, мг на 1 кг сухой массы	11.8	558.9	10.8	110.3	370.5
КБН	1179	3288	36	9234	16842
	Листья <i>Batrachium trichophyllum</i>				
ТМ, мг на 1 кг сухой массы	85.3	14128.2	72.00	416.2	4804.0
КБН	8531	83107	240	34688	218366

Далее приведена краткая характеристика видов [7].

Batrachium trichophyllum (Chaix) Bosch. (Шелковник волосистый). Темно-зеленое, опушенное в верхней части растение, листья подводные, сидячие, влагалищные, длиной 3–5 см, обычно втроекратно трехраздельные, сегменты с широким и волосистым ложным влагалищем у основания листа. Цветки 12–15 мм в диаметре. Цветет летом. Встречается в реках и старицах.

Potamogeton alpinus Valb. (Рдест альпийский). Стебель ветвистый, листья стеблеобъемлющие, все погруженные в воду, тупые. Плоды снаружи острокилеватые. В сухом состоянии все части растения приобретают обычно красноватый оттенок, по которому его легко узнать. Растет в прудах, речках и болотах.

Гидрофиты для проведения исследований отбирали в июле 2011 г. в период их цветения из одного и того же местообитания – р. Ревда (Свердловская обл.). Одновременно взяты пробы воды путем смешивания разных образцов до глубины 0.5 м.

Река Ревда – левобережный приток р. Чусовой (бассейн р. Камы), образуется из слияния большого числа малых речек. Река используется как для снабжения населения питьевой водой, так и для обеспечения технической водой промышленных предприятий [3].

Содержание металлов в листьях гидрофитов и нефильтрованной речной воде определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после мокрого озоления 70%-ной азотной кислотой [5]. Коэффициент биологического накопления (КБН) рассчитывали как отношение содержания металла в биомассе растения к валовой концентрации этого металла в воде.

Содержание растворимого белка в листьях растений определяли по методу Шактерле [23]. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидант-

ных ферментов определяли в усредненных пробах листьев (масса навески 0.5 г), которые гомогенизировали на холоде в 0.1 М К/Na-фосфатном буфере (рН 7.4) и центрифугировали. Полученный супернатант использовали для определения ПОЛ, активности супероксиддисмутазы (СОД) и гваякол-специфичной пероксидазы (ГП).

Определение интенсивности ПОЛ проводили в бутанольном экстракте по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реагирующих продуктов) [24]. Активность СОД определяли методом, основанным на измерении ингибирования фотохимического восстановления нитросинего тетразолия [21]. Активность ГП оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при длине волны 470 нм в результате окисления гваякола [22].

Содержание пролина определяли по общепринятой методике [20] с использованием ациднин-гидринового реактива. Определение аскорбиновой кислоты и глутатиона проводили из одной усредненной навески листьев трилонометрическим методом путем параллельного титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолом и йодатом калия [17]. Содержание флавоноидов определяли в спиртовой (96%-ный этанол) вытяжке с использованием лимоннокислого борного реактива на спектрофотометре при длине волны 420 нм [12].

Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$. В таблицах представлены средние арифметические значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты определения содержания ТМ в поверхностных водах и коэффициентов их биологического накопления в листьях исследованных гидрофитов р. Ревда приведены в табл. 1.

Таблица 2. Содержание растворимого белка, интенсивность ПОЛ и активность ферментов АОС в листьях исследованных гидрофитов

Вид растения	Содержание растворимого белка, мг на 1 г сухой массы	Интенсивность ПОЛ, мкмоль на 1 г сухой массы	Активность СОД, ед. на 1 г сухой массы в минуту	Активность ГП, мкмоль на 1 г сухой массы в минуту
<i>Potamogeton alpinus</i>	63.3 ± 2.1	90 ± 4.0	383 ± 42	518 ± 13
<i>Batrachium trichophyllum</i>	159.3 ± 6.8	1300 ± 20	1282 ± 34	811 ± 33

Таблица 3. Содержание неферментативных антиоксидантов в листьях исследованных гидрофитов

Вид растения	Флавоноиды, мг на 1 г сухой массы	Аскорбат	Глутатион	Пролин
		мкг на 1 г сухой массы		
<i>Potamogeton alpinus</i>	9.8 ± 0.8	179.1 ± 12.8	812.3 ± 12.2	279.0 ± 5.8
<i>Batrachium trichophyllum</i>	70.5 ± 1.0	319.7 ± 22.0	2296.4 ± 55.0	585.5 ± 9.0

В период проведения исследований концентрации исследованных металлов в водах реки превышали предельно допустимые значения концентраций (ПДК) для водных объектов рыбохозяйственного назначения. В наибольшей степени это характерно для соединений меди и никеля, кратность превышения по которым составила соответственно 10 и 30 ПДК.

Результаты оценки накопления ТМ в листьях исследованных гидрофитов отражают значительные различия между двумя видами: количество всех изученных металлов в листьях *Batrachium trichophyllum* было в несколько раз (либо на порядок) выше, чем в листьях *Potamogeton alpinus* (табл. 1). Кратность превышения по цинку составила 4, по меди и никелю – 7, по марганцу – 13, по железу – 25.

Интенсивность процессов ПОЛ в листьях *Batrachium trichophyllum* была на порядок выше, чем таковая у *Potamogeton alpinus* (табл. 2).

Активность СОД и ГП – ключевых ферментов антиоксидантной системы, в листьях *Batrachium trichophyllum* была существенно выше (соответственно в 3.4 и 1.6 раза) (табл. 2). Содержание растворимого белка в листьях этого вида растений также в 2.5 раза превышало его количество в листьях *Potamogeton alpinus*.

Содержание неферментативных антиоксидантов в листьях водных растений различно (табл. 3). *Batrachium trichophyllum* – гидрофит с высокой аккумулятивной способностью, отличался от *Potamogeton alpinus* значительно более высоким содержанием всех исследованных низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы растений. Так, содержание аскорбата в листьях *Batrachium trichophyllum* было выше в 1.8, пролина –

в 2, глутатиона – в 2.8, флавоноидов – в 7 раз, чем в листьях *Potamogeton alpinus*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Физиолого-биохимические эффекты окислительного стресса, индуцированного действием ТМ, и способы защиты от него с помощью антиоксидантных систем активно изучаются. Результаты проведенных теоретических и экспериментальных исследований свидетельствуют о значительном разнообразии антиоксидантных механизмов живых систем, что обеспечивает их устойчивость и надежность функционирования.

Характер взаимодействия между компонентами системы антиоксидантной защиты остается недостаточно изученным. Слабо исследовано на современном этапе функционирование компонентов антиоксидантной системы у растений в динамике и в градиенте нагрузки, а также соотношение вклада в защиту от АФК различных компонентов антиоксидантной системы. Остаются нерешенными и другие вопросы, связанные с формированием устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям. В связи с этим не теряют своей актуальности исследования, направленные на расширение и углубление представлений о функционировании антиоксидантной системы растений и других живых организмов и изменении активности ее компонентов в условиях стресса. Особенно важно изучение антиоксидантного статуса живых систем, направленное на оценку возможности его использования для комплексной диагностики их устойчивости к антропогенному воздействию.

Поверхностные воды р. Ревда, как и большинства других водных объектов Свердловской обл.,

характеризуются повышенными концентрациями ТМ. Этот факт, с одной стороны, — отражение геохимических особенностей территории, связанных с залеганием полиметаллических руд и их добычей, с другой, — следствие высокой степени урбанизированности и поступления сточных вод от промышленных предприятий [3].

Анализ коэффициентов биологического накопления ТМ у изученных видов показал, что у *Potamogeton alpinus* значения КБН составили восходящий ряд: Ni < Cu < Fe < Zn < Mn. Такой же характер накопления металлов наблюдался у большинства изученных ранее видов гидрофитов [15]. Однако у *Batrachium trichophyllum* КБН по железу был выше, чем по цинку.

Результаты исследований позволяют предположить, что увеличение интенсивности ПОЛ у растений с повышенной аккумулятивной способностью (*B. trichophyllum*) связано с активным накоплением металлов, избыток которых вызывал усиленную генерацию АФК. Это приводило к активизации компонентов АОС, т.е. повышение интенсивности липопероксидации могло инициировать индукцию адаптационных механизмов, направленных на предотвращение дальнейшего развития окислительного стресса, включая повышение активности антиоксидантных ферментов и увеличение количества низкомолекулярных антиоксидантов.

СОД выполняет роль первичного рубежа против активных АФК. Активация СОД при неблагоприятных воздействиях — ответ на увеличение продукции радикалов супероксида в этих условиях, что обеспечивает защиту клеток и тканей от окислительных повреждений. В реализации адаптационного потенциала растений особая роль отводится также пероксидазе — полифункциональной ферментной системе, способной реагировать на широкий спектр факторов, приводящих к нарушению метаболических процессов [14].

Увеличение активности антиоксидантных ферментов при действии ТМ может быть обусловлено активацией их латентных форм и(или) синтезом новых молекул. В состав СОД могут входить такие металлы, как железо, медь, марганец, цинк, обязательный компонент пероксидаз — железо [14]. Можно предположить, что накопление этих ТМ в клетках растений приводило к повышению активности СОД и ГП. Активизации антиоксидантных ферментов могло также способствовать накопление низкомолекулярных антиоксидантов. В частности, в литературных источниках [1] имеются данные о регулирующем действии на активность СОД глутатиона. Восстановленный глутатион индуцировал экспрессию гена цитозольной СОД в листьях табака, хотя механизмы этого эффекта не установлены [1].

Увеличение скорости антиоксидантных процессов, катализируемых ферментами-антиоксидантами, обусловлено не только активизацией антиоксидантных ферментов, но и их образованием в повышенных количествах при развитии окислительного стресса. Об увеличении скорости синтеза ферментов-антиоксидантов при накоплении ТМ свидетельствует более высокое содержание растворимого белка в листьях *B. trichophyllum*.

Более высокая активность антиоксидантных ферментов и повышенное содержание низкомолекулярных антиоксидантов в листьях *B. trichophyllum* можно рассматривать как неспецифическую адаптивную реакцию, обеспечивающую высокий уровень устойчивости этих растений к поглощению и накоплению большого количества ТМ.

Один из известных способов защиты растений от вредного влияния ТМ — биосинтез низкомолекулярных белков и пептидов, обогащенных SH-группами (металлотионеинов и фитохелатинов). Металлсвязывающие белки и пептиды синтезируются в норме в незначительном количестве. Их содержание в клетке резко возрастает при повышении концентрации ТМ в питательном субстрате [14].

Batrachium trichophyllum из местообитания с более высокой техногенной нагрузкой, вследствие которой в речных водах и в листьях растений наблюдалось повышенное количество ТМ, отличался более значительным синтезом SH-содержащих соединений по сравнению с растениями того же вида из “относительно чистого” местообитания [16]. Количество тиоловых групп при загрязнении среды обитания ТМ достоверно увеличивалось в растворимых и в мембранно-связанных белках. Инактивация ТМ в клетках растений при их избыточном поступлении из среды обитания способствовала повышению толерантности к действию ТМ. Повышенный уровень неферментативных антиоксидантов в листьях *B. trichophyllum*, вероятно, опосредован накоплением АФК. Так, аскорбиновая кислота выступает в роли восстановителя, повышая тем самым устойчивость растений к АФК. Образовавшийся дегидроаскорбат может восстанавливаться до аскорбиновой кислоты за счет ферментативного и неферментативного окисления глутатиона. Глутатион служит также основным субстратом для образования фитохелатинов. Таким образом, повышение содержания глутатиона и образование в дальнейшем фитохелатинов у видов растений с высокой аккумулятивной способностью — один из механизмов детоксикации ТМ.

Увеличение содержания водорастворимых белков в листьях растений, различающихся высоким уровнем накопления ТМ, вероятно, обусловлено не только необходимостью синтеза новых молекул ферментов-антиоксидантов, индуцируемого уси-

лением прооксидантных реакций, но и образованием различных защитных металлсвязывающих белков. Это подтверждают результаты работ [10, 16], свидетельствующие об увеличении содержания мембранно-связанных белков в листьях растений при загрязнении водной среды ТМ.

Изучение антиоксидантного статуса гидрофитов в связи с их аккумулятивным потенциалом, особенно в условиях антропогенного воздействия, способствует выявлению связей между физиолого-биохимическими характеристиками растений и их адаптивными возможностями.

Выводы. Коэффициенты биологического накопления пяти изученных металлов (Cu, Fe, Ni, Zn, Mn) в листьях *Batrachium trichophyllum* были в несколько раз выше, чем в листьях *Potamogeton alpinus*. Сопоставление антиоксидантного статуса у этих двух видов показало, что накопление металлов в листьях *Batrachium trichophyllum* сопровождалось усилением процессов пероксидации липидов, активизацией супероксиддисмутазы и гваяколспецифичной пероксидазы и увеличением содержания низкомолекулярных антиоксидантов: флавоноидов, аскорбата, глутатиона и пролина. Активация ферментов-антиоксидантов и накопление неферментативных антиоксидантов — один из механизмов защиты от действия ТМ, которые способствуют выживанию растительного организма и его адаптации к повышенному содержанию металлов в водной среде. Именно антиоксидантные системы, обеспечивающие функционирование неспецифических механизмов устойчивости, играют решающую роль в формировании адаптационного потенциала растений к металлам. Исследования накопления ТМ гидрофитами и путей их адаптации к загрязнению среды обитания — основа для разработки более эффективных технологий очистки загрязненных вод, а также совершенствования методов биомониторинга водных экосистем.

Исследование выполнено при поддержке Программы повышения конкурентоспособности Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина (соглашение 02.A03.21.0006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бараненко В.В. Супероксиддисмутазы в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
2. Власов Б.П., Гигевич Г.С. Использование высших водных растений для оценки и контроля за состоянием водной среды: Методические рекомендации. Минск: Беларус. гос. ун-т, 2002. 84 с.
3. Водные ресурсы Свердловской области. Екатеринбург: Изд-во АМБ, 2004. 432 с.
4. Деви С.Р., Прасад М.Н. Антиокислительная активность *Brassica juncea*, подвергнутых действию вы-
- соких концентраций меди // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 2. С. 233–237.
5. Ермаченко Л.А., Ермаченко В.М. Атомно-абсорбционный анализ с графитовой печью. М.: Изд-во ПАИМС, 1999. 220 с.
6. Ипатова В.И. Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды. М.: Графи-кон-принт, 2005. 224 с.
7. Кокин К.А. Экология высших водных растений. М.: Изд-во МГУ, 1982. 158 с.
8. Куриленко В.В., Осмоловская Н.Г. Эколого-биогеохимическая роль макрофитов в водных экосистемах урбанизированных территорий (на примере малых водоемов Санкт-Петербурга) // Экология. 2006. № 3. С. 163–167.
9. Лукина Л.Ф., Смирнова Н.Н. Физиология высших водных растений. Киев: Наук. думка, 1988. 186 с.
10. Макурина О.А., Удиванкин А.В. Некоторые биохимические показатели *Potamogeton perfoliatus* L. как индикаторы антропогенного загрязнения Саратовского водохранилища тяжелыми металлами // Вестн. Самар. гос. ун-та. Естеств.-науч. сер. 2006. № 7. С. 134–138.
11. Малева М.Г., Некрасова Г.Ф., Борисова Г.Г. и др. Влияние тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат и антиоксидантный статус элодеи // Физиология растений. 2012. № 2. С. 216–224.
12. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии. СПб.: Лань, 2006. 256 с.
13. Холодова В.П., Волков К.С., Кузнецов В.В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации // Физиология растений. 2000. Т. 52. № 6. С. 848–858.
14. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. 244 с.
15. Чукина Н.В., Борисова Г.Г. Структурно-функциональные показатели высших водных растений из местообитаний с разным уровнем антропогенного воздействия // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 49–56.
16. Чукина Н.В., Малева М.Г., Борисова Г.Г. Роль SH-соединений в детоксикации тяжелых металлов и их значение для биоиндикации загрязнения водных экосистем // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем II. СПб.: Любавич, 2011. С. 36–41.
17. Чупахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений. Калининград: Изд-во Калинингр. ун-та, 2000. 59 с.
18. Шашуловская Е.А. О накоплении тяжелых металлов в высшей водной растительности Волгоградского водохранилища // Поволж. экол. журн. 2009. № 4. С. 357–360.
19. Baker A.J.M. Accumulators and excluders—strategies in response of plants to heavy metals // J. Plant Nutr. 1981. V. 3. P. 643–654.
20. Bates L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.

21. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276–287.
22. *Chance B., Maehly A.C.* Assay catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology.* N.Y.: Acad. Press, 1955. P. 764–775.
23. *Shakterle T.R., Pollack R.L.* A simplified method for the quantities assay of small amounts of protein in biological material // *Anal. Biochem.* 1973. V. 51. № 2. P. 654–655.
24. *Uchiyama M., Mihara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 287–297.

**Antioxidant Status of Hydrophytes with Different Accumulative Ability
(Illustrated by: *Potamogeton alpinus* Balb.
and *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch.)**

N. V. Chukina, G. G. Borisova, M. G. Maleva

Ural Federal University, 620000 Ekaterinburg, ul. Lenina, 51, Russia

The antioxidant activity of two common species of aquatic plants (*Batrachium trichophyllum* (Chaix.) Bosch and *Potamogeton alpinus* Balb.) with different “accumulation strategy” was studied. It is shown that the leaves of *Batrachium trichophyllum* which accumulate a large quantities of metals have a higher intensity of pro- and antioxidant processes in comparison with *Potamogeton alpinus*.

Keywords: higher aquatic plants, heavy metals, accumulative ability, antioxidant status

Сдано в набор 4.08.2014 г.	Подписано к печати 2.10.2014 г.	Дата выхода в свет 15 кв.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 12.0	Усл. кр.-отт. 1.6 тыс.	Уч.-изд. л. 12.0
	Тираж 130 экз.	Зак. 752	Бум. л. 6.0
		Цена свободная	

Учредители: Российская академия наук, Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997, Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6