

УДК 582.671:581.5

**ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ
И АСКОРБИНАТОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ
В ТКАНЯХ ВОДНОГО ПОГРУЖЁННОГО РАСТЕНИЯ
*CERATOPHYLLUM DEMERSUM***

С. А. Розина, О. Н. Макурина, А. С. Гончарук

*Самарский государственный университет
Россия, 443011, Самара, Ак. Павлова, 1
E-mail: makurina.on@mail.ru*

Поступила в редакцию 07.05.13 г.

Влияние ксенобиотиков на полифенолоксидазную и аскорбинатооксидазную активность в тканях водного погружённого растения *Ceratophyllum demersum*. – Розина С. А., Макурина О. Н., Гончарук А. С. – Рассматривается влияние сочетанного действия ионов тяжёлого металла (Pb^{2+}) и катионных синтетических поверхностно-активных веществ на полифенолоксидазную и аскорбинатооксидазную активность в тканях *Ceratophyllum demersum*.

Ключевые слова: полифенолоксидаза, аскорбинатооксидаза, ионы тяжёлых металлов, поверхностно-активные вещества, *Ceratophyllum demersum*.

Xenobiotic effects on polyphenoloxidase and ascorbate oxidase activities in the water-submerged plant *Ceratophyllum demersum*. – Rozina S. A., Makurina O. N., and Goncharuk A. S. – The paper considers the combined effects of heavy metal ions (Pb^{2+}) and synthetic cationic surfactants on polyphenoloxidase and ascorbate oxidase activities in the water-submerged plant *Ceratophyllum demersum*.

Key words: polyphenoloxidase, ascorbate oxidase, heavy metal ions, cationic surfactant combination, *Ceratophyllum demersum*.

ВВЕДЕНИЕ

Количества химических элементов, поступающих в окружающую среду в результате техногенеза, в ряде случаев значительно превосходят уровень их естественного поступления. Включаясь в природные циклы миграции, антропогенные потоки приводят к быстрому распространению загрязняющих веществ в природных компонентах городского ландшафта. Объемы ксенобиотиков – чужеродных для живых организмов химических веществ, не входящих в естественный круговорот, ежегодно возрастают и наносят ущерб природной среде, подрывают существующее экологическое равновесие (Трахтенберг, 1994). К наиболее распространённым ксенобиотикам относят тяжёлые металлы (ТМ) – химические элементы, имеющие плотность более 5 г/см^3 и атомную массу свыше 40 Да, обладающие свойствами металлов (Кузнецов, Дмитриева, 2006). В международных документах по проблемам загрязнения окружающей среды более 10 тяжелых металлов признаны опасными для живых организмов, а самыми токсичными из них являются ртуть, свинец и кадмий (Титов и др., 2007). Соединения свинца являются наиболее распространёнными поллютантами, поступающими в окружающую среду с выхлоп-

ными газами и отходами различных производств, ПДК свинца для пресноводных водоёмов составляет 0.006 мг/л (Филенко, Михеева, 2007).

Другая разновидность ксенобиотиков – поверхностно-активные вещества (ПАВ) – широко применяются в промышленности и содержатся во многих средствах бытовой химии, их производство ежегодно увеличивается. Только немногие ПАВ считаются безопасными (алкилполиглюкозиды), так как продуктами их деградации являются углеводы. Действие ПАВ зависит от заряда молекул. Катионные ПАВ проявляют большую цитотоксичность, чем анионные (Эрнандес и др., 2008). Токсическое действие ПАВ на клетку может проявляться по-разному: изменение физико-химических свойств воды, снижение содержания кислорода, повышение трюфности (Филенко, Михеева, 2007).

Таким образом, ПАВ и ионы тяжёлых металлов – два наиболее распространённых поллютанта окружающей среды, актуально изучение их сочетанного действия. В работах наших соотечественников изучено действие катионных и анионных СПАВ в сочетании с ионами меди и кадмия на биохимические показатели высшего водного растения *Egeria densa* (Мурзин и др., 2010), влияние ионов меди, кадмия и цинка на эколого-физиологические и биохимические показатели высшего водного растения *Hydrilla verticillata* (Розенцвет и др., 2011). В работах зарубежных учёных (Paczkowska et al., 2007; John et al., 2008) было исследовано влияние ионов свинца и кадмия в концентрациях от 10 до 40 мг/л на морфометрические показатели *Lemna polyrrhiza* L. и *Lemna minor* L. Данные значения были применены и в настоящей работе для возможности сравнения результатов исследования.

Объектом исследования был выбран пресноводный макрофит с широким ареалом обитания *Ceratophyllum demersum*, факторы воздействия – сочетание широкодоступного катионного СПАВ (ополаскиватель «Дося») и ионов свинца, одного из самых широко распространённых поллютантов среди ТМ. Являясь растением-концентратором (Keskinan et al., 2004; Mishra et al., 2006), *C. demersum* перспективен в доочистке сточных вод: растение не укрепляется в грунте, быстро растёт и развивается при диапазоне температур от 12 до 30°C. Поэтому длительность инкубации в настоящей работе составляет трое суток – время, удобное при применении *C. demersum* для доочистки сточных вод.

Настоящая работа направлена на изучение аскорбинатоксидазной и полифенолоксидазной активности в условиях воздействия сочетания ионов свинца и катионных СПАВ с последующей реабилитацией. Медьсодержащая аскорбинатоксидаза (АО) способствует ликвидации активных форм кислорода и участвует в защитных реакциях организма растения в борьбе с окислительным стрессом. АО участвует в расщеплении перекиси водорода, используя в качестве донора электронов аскорбиновую кислоту. Медьсодержащая полифенолоксидаза (ПФО) участвует в дыхании растений (Чупахина, 2000). Ионы ТМ вызывают окислительный стресс, а катионные СПАВ создают условия гипоксии, эффект сочетанного действия можно будет оценить по морфометрическим показателям, АО активность будет косвенно отражать уровень окислительного стресса, а ПФО активность – уровень гипоксии.

ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ

Целью данной работы стало сравнительное изучение ПФО и АО активности водного погружённого растения *C. demersum* при сочетанном воздействии катионного СПАВ (в составе ополаскивателя для белья «Dosis», 1%-ный водный раствор) и ионов свинца (100 мкМоль ацетата свинца) с последующей реабилитацией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был выбран пресноводный макрофит роголистник погружённый (*Ceratophyllum demersum* L.) (Жизнь растений, 1980).

Эксперимент проводился в лабораторных условиях при одинаковой интенсивности и регулярности светового потока, а также при постоянной температуре (20°C). Для этого в опыте была использована комбинация люминесцентных ламп и установлен постоянный период освещения, равный 18 ч.

В ходе эксперимента растения были разделены на 2 группы, различающиеся средой выращивания. Контрольная группа растений находилась в среде отфильтрованной водопроводной воды, опытная инкубировалась в присутствии 1%-ного катионного СПАВ и водного раствора $Pb(CH_3COO)_2$ с концентрацией 100 мкМ/л. Непосредственно перед началом исследований фрагменты растений длиной до 50 мм, считая от точки роста, помещали в стеклянные ёмкости объемом 1 дм³.

Продолжительность воздействия поллютантов составила 3 суток. По истечении указанного периода экспозиции часть растений из каждой группы отбирали на исследования, а часть переносили в чистую отфильтрованную воду для реабилитации (длительностью 5 суток). После реабилитации также проводили измерения биохимических показателей.

Активность аскорбинатоксидазы определяли по методу, предложенному Д. К. Асаповым, С. Т. Рахимовой, основанному на свойстве аскорбиновой кислоты поглощать свет с максимумом при длине волны 265 нм. Об активности фермента судили по уменьшению величины оптической плотности, учитывая, что степень окисления аскорбиновой кислоты пропорциональна количеству фермента (Ермаков и др., 1987). Активность полифенолоксидазы определяли спектрофотометрическим методом, который основан на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении пирокатехина за определённый промежуток времени (Ермаков и др., 1987). Статистическую обработку данных (среднее значение, стандартное отклонение) проводили с использованием стандартных статистических методов и компьютерных программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После трёх дней инкубации *C. demersum* в среде с сочетанием поллютантов наблюдались признаки хлороза, произошла фрагментация растения на небольшие участки стебля с мутовками листьев. Следует отметить, что при воздействии только ионов свинца наблюдались признаки хлороза (Макурина и др., 2012), а при воздействии только катионных СПАВ были необратимые повреждения – полная фрагментация растения (Розина и др., 2012). Таким образом, сочетанное действие поллютантов привело к комплексу нарушений морфометрических показателей, включающему признаки токсического действия ионов свинца и катионных СПАВ.

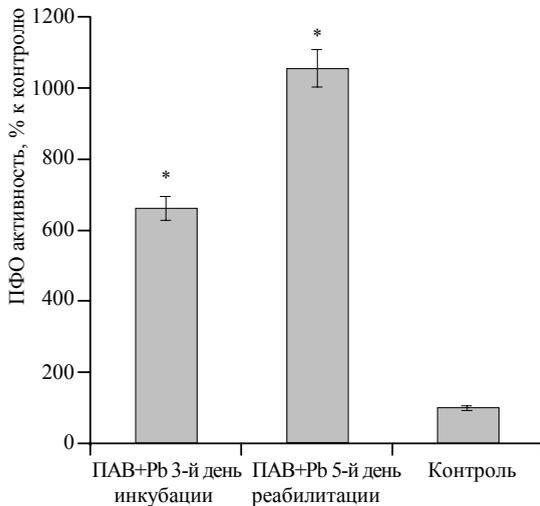


Рис. 1. Динамика ПФО активности под влиянием сочетанного действия 100 мкМоль ионов свинца и 1% катионных СПАВ в тканях *Ceratophyllum demersum* (в % к контролю, контроль принят за 100%); * – степень достоверности $p < 0.001$

что воздействие ионов свинца приводит к снижению ПФО и АО активности (Макурина и др., 2012), а влияние катионных СПАВ – к резкому возрастанию ферментативной активности (Розина и др., 2012). Можно сделать вывод, что при сочетанном действии токсикантов ведущая роль отводится катионным СПАВ.

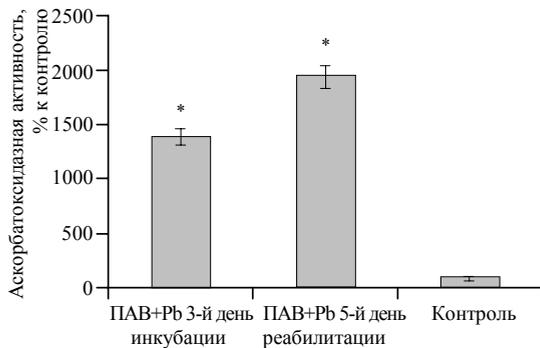


Рис. 2. Динамика АО активности под влиянием сочетанного действия 100 мкМоль ионов свинца и 1% катионных СПАВ в тканях *Ceratophyllum demersum* (в % к контролю, контроль принят за 100%); * – степень достоверности $p < 0.001$

занный белок, дезактивирующий свободные радикалы и особенно синглетный кислород, потому вероятной причиной повышения её активности было высвобождение

Важно отметить, что фрагментация на части стебля с листьями для *C. demersum* не является негативным последствием, так как растение успешно размножается делением стебля на части.

Сочетанное действие поллютантов привело к многократному возрастанию ПФО и АО активности. На третьи сутки инкубации ПФО активность возросла в 6.6 раз, АО активность – в 14 раз, после периода реабилитации ПФО активность возросла в 10 раз, АО активность – в 20 раз (рис. 1, 2). Сходные результаты – многократное повышение АО и ПФО активности при воздействии катионных СПАВ – были получены в работах И. Р. Мурзина на *Egeria densa* (Мурзин, 2010, 2011). Ранее было установлено, что воздействие ионов свинца приводит к снижению ПФО и АО активности (Макурина и др., 2012), а влияние катионных СПАВ – к резкому возрастанию ферментативной активности (Розина и др., 2012). Можно сделать вывод, что при сочетанном действии токсикантов ведущая роль отводится катионным СПАВ.

Возможно, многократное повышение активности ПФО – ответ клетки на возросшие потребности в дыхании, так как катионные СПАВ образуют плёнку на стеблях и листьях, препятствуя проникновению кислорода внутрь. Однако высокая ПФО активность сохраняется и после реабилитации, что может косвенно указывать на механическое разрушение целостности тканей и клеток.

Аскорбинатоксидаза представляет собой мембранно-связанный белок, дезактивирующий свободные радикалы и особенно синглетный кислород, потому вероятной причиной повышения её активности было высвобождение

ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ

дение из мембран после их разрушения и активная работа по устранению свободных радикалов. Однако более высокие значения ферментативной активности сохраняются и после периода реабилитации, что может свидетельствовать о недостаточности пяти суток реабилитации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди эффектов сочетанного действия ксенобиотиков преобладают повреждения, свойственные влиянию катионных СПАВ (фрагментация растения на участки стебля с мутовками листьев, образование плёнки на поверхности воды и на стеблях и листьях). Повышение ПФО активности, вероятно, связано с возросшими потребностями в кислороде из-за образования плёнки катионных ПАВ на поверхности тела растения. Возрастание АО активности происходило, возможно, вследствие разрушения мембранных структур и работы фермента по устранению образовавшихся вследствие этого свободных радикалов. Вероятно, пяти суток реабилитации было недостаточно для полного восстановления *C. demersum*, которое возможно по истечении несколько большего периода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П., Перуанский Ю. В., Луковникова Г. А., Иконникова М. И. Методы биохимического исследования растений. Л. : Агропромиздат, 1987. С. 43 – 45.

Жизнь растений : в 6 т. Т. 5, ч. 1. Цветковые растения / под ред. А. Л. Тахтаджяна. М. : Просвещение, 1980. С. 188 – 190.

Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. М. : Высш. шк., 2006. 742 с.

Макурина О. Н., Розина С. А. Влияние ионов свинца на полифенолоксидазную и аскорбатоксидазную активность в тканях водного погружённого растения *Ceratophyllum demersum* // Теоретические и прикладные проблемы современной науки и образования. Курск : Изд-во Курск. ин-та социального образования, 2012. С. 143 – 147.

Мурзин И. П. Влияние катионных синтетических поверхностно-активных веществ на активность аскорбинатоксидазы в тканях элодеи бразильской (*EGERIA DENSA*) // Социальные и медико-биологические вопросы адаптации : материалы II Междунар. науч.-практ. конф. Курск : Изд-во Курск. ин-та социального образования, 2011. С. 170 – 172.

Мурзин И. П. Особенности влияния различных моющих средств на полифенолоксидазную активность тканей элодеи бразильской (*Egeria densa*) // Физиологические механизмы становления и поддержания функций организма : материалы Междунар. науч.-практ. конф. Сухум : Изд-во Абхазск. гос. ун-та., 2010. С. 220 – 226.

Мурзин И. П., Макурина О. Н., Косицына А. А., Розенцвет О. А. Особенности действия загрязнителей различной химической природы на содержание водорастворимых белков в тканях водного погруженного растения *Egeria densa* // Вестн. Самар. гос. ун-та. Естественно-научная сер. 2010. № 78. С. 191 – 199.

Поверхностно-активные вещества : справочник / под ред. А. А. Абрамзона, Г. М. Гаевого. Л. : Химия. Ленингр. отд-ние, 1979. 376 с.

Розенцвет О. А., Нестеров В. Н., Синюткина Н. Ф. Эколого-физиологические и биохимические аспекты влияния тяжёлых металлов на водное растение *Hydrilla verticillata* // Поволж. экол. журн. 2011. № 2. С. 185 – 192.

Розина С. А., Гончарук А. С., Макурина О. Н. Динамика аскорбатоксидазной активности в тканях водного погружённого растения *Ceratophyllum demersum* под влиянием кати-

онных поверхностно-активных веществ и ионов свинца // Теоретические и прикладные проблемы современной науки и образования. Курск : Изд-во Курск. ин-та социального образования, 2012. С. 134 – 138.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжёлым металлам / Ин-т биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск : Изд-во Карельск. науч. центра РАН, 2007. 172 с.

Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы во внешней среде : современные гигиенические и токсикологические аспекты. Минск : Наука и техника, 1994. 286 с.

Филенко О. Ф., Михеева И. В. Основы водной токсикологии. М. : Колос, 2007. 140 с.

Чупахина Г. Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений : практикум. Калининград : Изд-во Калинингр. гос. ун-та, 2000. 59 с.

Эрнандес Э. А., Марголина А. А., Петрухина А. В. Липидный барьер кожи и косметические средства. М. : Косметика и медицина, 2008. 80 с.

John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in Lemna polyrrhiza L. // Plant Soul Environ. 2008. Vol. 54, № 6. P. 262 – 270.

Keskinan O., Goksu M. Z. L., Basibuyuk M., Forster C. F. Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*) // Bioresource Technology. 2004. Vol. 92. P. 197 – 200.

Mishra S., Srivastava S., Tripathi R. D., Kumar R., Seth C. S., Gupta D. K. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation // Chemosphere. 2006. Vol. 65. P. 1027 – 1039.

Paczkowska M., Kozłowska M., Golinski P. Oxidative stress enzyme activity in Lemna minor L. exposed to cadmium and lead // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. 2007. Vol. 49, № 2. P. 33 – 37.