

УДК 502.51:581.526.3

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МОЧЕВИНЫ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (Ni^{2+} и Cu^{2+}) НА ВОДНЫЕ МАКРОФИТЫ (НА ПРИМЕРЕ *Egeria densa* Planch.)

© 2015 г. М.Г. Малева, Г.Г. Борисова, Н.В. Чукина

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», г. Екатеринбург

Ключевые слова: мочевины, тяжелые металлы, водные макрофиты, *Egeria densa*, окислительный стресс, фотосинтетические пигменты, уреазы.



М.Г. Малева



Г.Г. Борисова



Н.В. Чукина

В модельных системах исследовано влияние повышенных концентраций мочевины и тяжелых металлов (Ni^{2+} и Cu^{2+}) на содержание фотосинтетических пигментов, интенсивность перекисного окисления липидов и активность фермента уреазы в листьях погруженного водного макрофита – *Egeria densa* Planch. Показано, что добавление металлов в среду с мочевиной усиливало ее токсическое действие на растения. Установлено, что инкубирование растений в среде с мочевиной и никелем в течение четырех суток приводит к развитию окислительного стресса в листьях элодеи. Концентрация меди 100 мкмоль/л для растений оказалась летальной.

Введение

В природных водных экосистемах растения подвержены комплексному действию поллютантов органической и неорганической природы, которые могут оказывать как синергическое, так и антагонистическое влияние на различные физиолого-биохимические показатели. Среди органических поллютантов особое место занимает мочевины (карбамид). Она является продуктом

Водное хозяйство России № 1, 2015

Водное хозяйство России

естественных биохимических процессов – метаболизма уреолитических животных и распада отмерших организмов с образованием пуриновых и пиримидиновых оснований, которые в свою очередь разлагаются за счет микробиологических процессов до мочевины и аммиака [1]. Вместе с тем мочевина может продуцироваться растениями, грибами, бактериями в результате связывания аммиака, образующегося в процессе диссимилиации белков. Под действием специфического фермента уреазы она распадается до аммонийного иона и потребляется водными растительными организмами [2].

Мочевину часто используют как минеральное удобрение наравне с фосфатами, аммонием, калием и нитратами для повышения плодородия почвы или продуктивности водоемов в системе прудового рыбного хозяйства. Однако при ливневых осадках значительная часть внесенной под сельскохозяйственные растения мочевины смывается в реки и пруды, загрязняя гидросистемы [3]. Продукт ее распада – аммиак, особенно при залповом загрязнении, может существенно влиять на качество воды, ухудшая кислородный режим водоемов, что приводит к изменению видового состава сообществ [1, 3]. Известно, что высокие концентрации мочевины вызывают физиологические расстройства и снижают продуктивность растений [4].

О способности мочевины вызывать окислительный стресс у растений практически ничего неизвестно, хотя избыток этого соединения вызывает денатурацию белков, а некоторые ее производные обладают гербицидным действием [5]. Ранее было показано, что повышенная концентрация мочевины может подавлять активность уреазы и негативно воздействовать на фотосинтетическую функцию водных растений [6, 7].

Тяжелые металлы (ТМ), в частности, никель и медь, в небольших количествах необходимы для нормальной жизнедеятельности высших растений. Известно, что никель входит в состав уреазы, активизирует нитратредуктазу, гидрогеназу и другие ферменты; оказывает стабилизирующее влияние на структуру рибосом; участвует в обеспечении азотом растительных тканей [8]. Медь, являясь незаменимым микроэлементом, входит в состав многих ферментных систем, однако в повышенных концентрациях она – сильнейший токсикант. Этот металл с переменной валентностью может непосредственно участвовать в создании высокотоксичных гидроксильных радикалов в реакциях Фентона и Хабера–Вейса [9], активируя цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к окислительному стрессу и повреждению клеточных мембран.

К настоящему времени влияние загрязняющих веществ на содержание фотосинтетических пигментов и развитие про- и антиоксидантных реакций в листьях водных макрофитов изучено недостаточно, а совместное действие органических и неорганических поллютантов на растения в литературе практически не освещено.

Цель исследований – оценить влияние повышенных концентраций мочевины, никеля и меди (при раздельном и совместном действии) на состояние пигментной системы, интенсивность повреждения мембран и уреазную активность в листьях *Egeria densa*.

Объекты и методы исследований

Исследования проводили на побегах *Egeria densa* Planch. (элодеи густолиственной) из сем. *Hydrocharitaceae* (водокрасовые). Этот погруженный гидрофит неприхотлив при выращивании в лабораторных условиях, не требует обязательного укоренения, быстро наращивает биомассу, поэтому часто используется в качестве модельного объекта.

Побеги *E. densa* инкубировали в течение 2 и 4 сут в питательной среде (УНИФЛОР аква-7, Россия, ООО «Зоомир») при естественном освещении и комнатной температуре. В опытные сосуды добавляли мочевины (5 ммоль/л); Ni^{2+} (100 мкмоль/л); мочевины + Ni^{2+} (5 ммоль/л + + 100 мкмоль/л); Cu^{2+} (100 мкмоль/л); мочевины + Cu^{2+} (5 ммоль/л + + 100 мкмоль/л). Все ионы металлов вносили в форме сульфатов. После инкубации побеги трижды промывали. Контролем служили растения, инкубированные в среде без добавления поллютантов.

Содержание фотосинтетических пигментов определяли в спиртовой вытяжке (96 %) спектрофотометрически при 664, 649 и 470 нм. Расчет количества хлорофиллов и каротиноидов проводили согласно Н. Lichtenthaler [10].

Интенсивность ПОЛ определяли по количеству малонового диальдегида (МДА) – одного из продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [11]. Количество пигментов и малонового диальдегида определено в сыром растительном материале, затем пересчитано через отношение сырой массы к сухой и выражено в соответствующих единицах на 1 г сухого вещества.

Активность уреазы (ЕС 3.5.1.5) измеряли согласно методу [12], основанному на спектрофотометрическом определении с реактивом Несслера аммиачного азота, образовавшегося в результате взаимодействия фермента с мочевиной, и рассчитывали в мкмоль азота на 1 мг растворимого белка в минуту.

Все опыты проведены в трех биологических повторностях, каждая из которых представлена выборкой из 10–15 растений. Для проверки достоверности полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни при $p < 0,05$. На рисунках и в таблице показаны средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

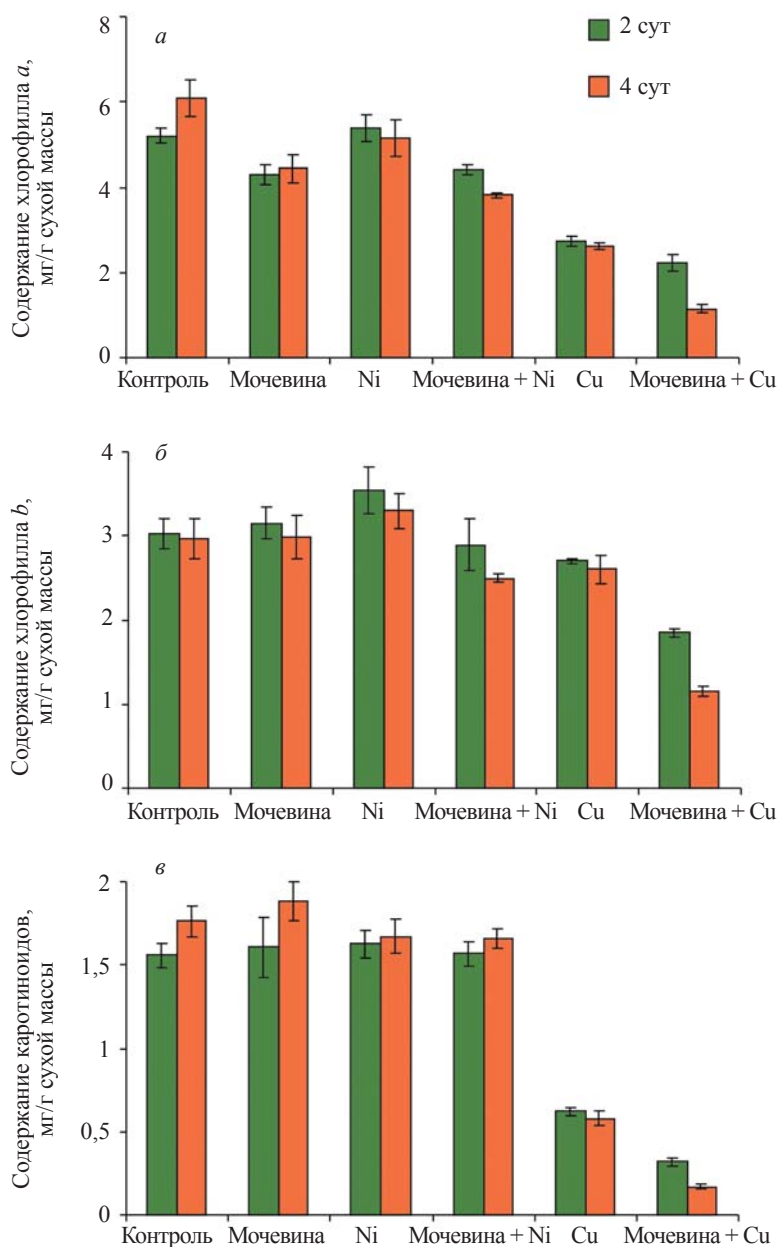
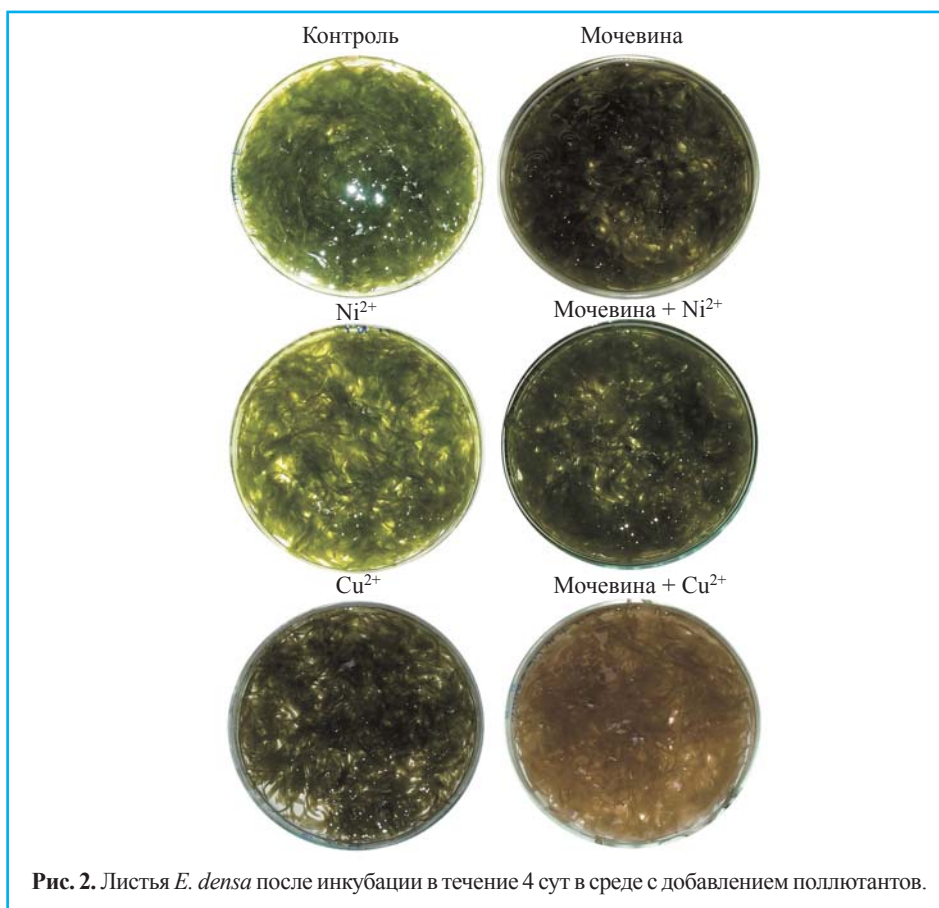


Рис. 1. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях *E. densa* после инкубации в течение 2 и 4 сут в среде с добавлением загрязнителей.

Результаты исследований и обсуждение

Известно, что изменения в количестве и соотношении фотосинтетических пигментов могут использоваться в качестве индикаторов стрессового воздействия у растений. Содержание хлорофиллов может существенно влиять на функционирование фотосинтетического аппарата и на метаболизм целого растения, поэтому является важным фактором в оценке токсичности и стресса.

Исследования показали, что повышенные концентрации мочевины существенно не повлияли на состояние пигментной системы *E. densa*, за исключением хлорофилла *a*, содержание которого снизилось (рис. 1а). Добавление никеля в среду не отразилось на содержании пигментов, однако инкубация растений в течение 4 сут в присутствии никеля с мочевиной привела к уменьшению концентрации хлорофиллов в среднем на 30 % от контроля (рис. 1а, б).



Инкубация растений в присутствии меди вызвала резкое снижение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов, в то время как содержание хлорофилла *b* снизилось менее значительно. Негативное влияние меди усилилось в присутствии мочевины и при более продолжительной инкубации. Обнаружено значительное уменьшение количества хлорофилла *a* (на 80 %), хлорофилла *b* (на 60 %) и практически полная деградация каротиноидов (на 90 % от контроля) в этом варианте (рис. 1). Совместное действие меди с мочевиной привело к развитию хлороза листьев *E. densa* (рис. 2).

Известно, что изменения в соотношении хлорофиллов свидетельствуют о различных нарушениях в фотосинтетическом аппарате [13]. Исследования показали, что во всех опытных вариантах отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* снижалось, но в большей степени в вариантах с медью и при добавлении меди к мочедине (рис. 3а). По-видимому, это происходило

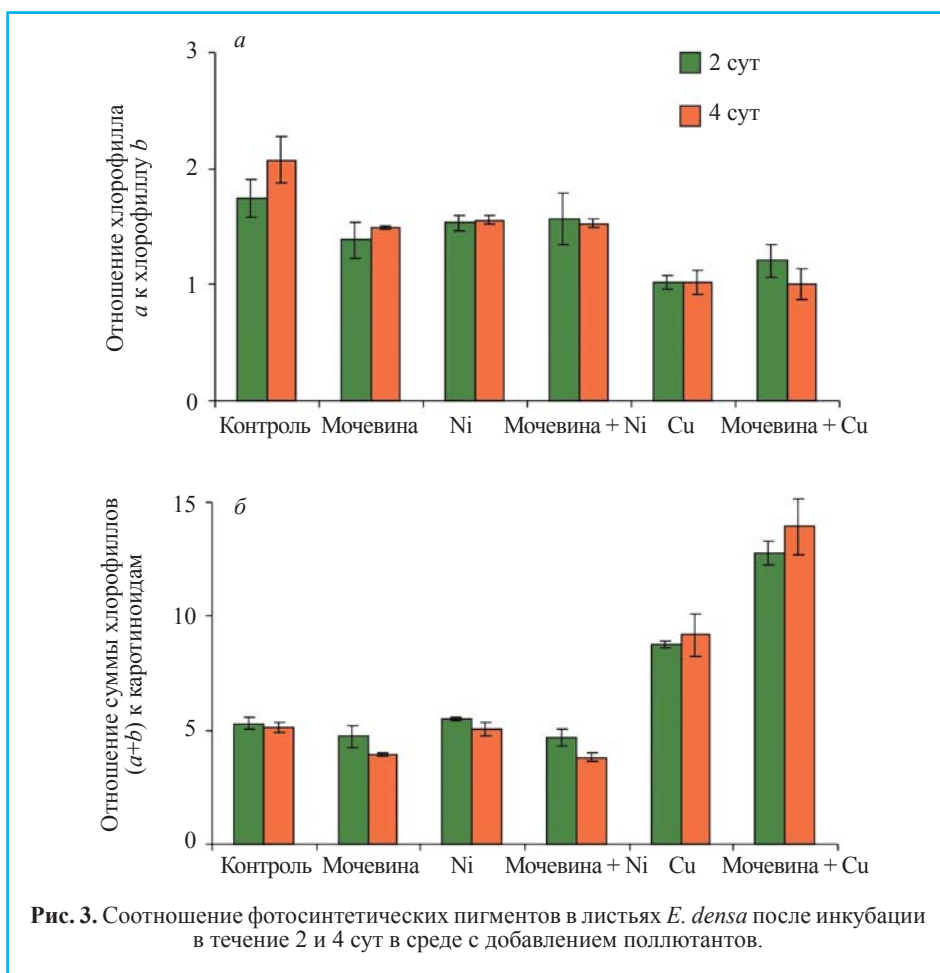


Таблица. Влияние повышенных концентраций мочевины, никеля и меди на содержание малонового диальдегида и активность уреазы в листьях *E. densa*

Варианты	Содержание МДА, мкмоль/г сухой массы		Активность уреазы, мкмоль N/(мг белка мин)	
	2 сут	4 сут	2 сут	4 сут
Контроль	7,22±0,27	5,86±0,29	0,044±0,003	0,042±0,003
Мочевина	6,59±0,69	8,65±0,43	0,058±0,003	0,057±0,004
Ni^{2+}	8,47±0,20	10,27±0,51	0,041±0,004	0,027±0,001
Мочевина + Ni^{2+}	6,93±0,20	9,42±0,47	0,068±0,006	0,079±0,005
Cu^{2+}	5,43±0,42	3,68±0,18	0,027±0,003	0,015±0,001
Мочевина + Cu^{2+}	4,72±0,25	3,48±0,17	0,021±0,001	0,009±0,000

из-за большей устойчивости хлорофилла *b*. Известно, что хлорофилл *a* входит в состав реакционных центров и светособирающих комплексов обеих фотосистем, в то время как хлорофилл *b* преимущественно является компонентом светособирающего комплекса фотосистемы II.

Отношение суммы хлорофиллов (*a+b*) к каротиноидам в листьях растений при добавлении мочевины и ионов никеля почти не изменялось по сравнению с контролем. Однако оно значительно возросло при добавлении меди и особенно при совместном присутствии меди и мочевины – в среднем в 1,7–2,6 раза (рис. 3б). Вероятно каротиноиды, как липофильные антиоксиданты, подвергались более сильному токсическому воздействию меди как редокс-активного металла и разрушались быстрее, чем хлорофиллы.

Часто первичной мишенью стрессовых воздействий являются клеточные мембраны, в результате чего происходит перекисное окисление липидов с образованием малонового диальдегида и других конечных метаболитов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [13].

Обнаружено, что количество МДА зависело от времени воздействия. Более длительная экспозиция (4 сут) *E. densa* в среде с мочевиной и Ni^{2+} по отдельности, а также при совместном присутствии этих поллютантов вызывала сильный окислительный стресс. Количество МДА возрастало в 1,5–1,7 раза по сравнению с контролем (см. таблицу). В то же время действие меди и добавление ионов Cu^{2+} к мочевины приводило к деградации продуктов ПОЛ. Вероятно, выбранная концентрация Cu^{2+} (100 мкмоль) оказалась летальной для *E. densa*.

Как известно, основным путем усвоения мочевины у большинства растений является гидролиз при участии уреазы и последующая ассимиляция азота и углерода в обычных метаболических процессах [2–4]. Уреаза является никель-зависимым ферментом и катализирует реакцию гидролити-

ческого разложения мочевины до аммиака и углекислого газа, причем как в процессе жизнедеятельности организмов, так и в течение определенного времени после их отмирания. Она широко распространена у растений, бактерий, грибов, у некоторых беспозвоночных [2].

Отмечено достоверное увеличение активности уреазы в варианте с мочевиной, а также при совместном действии мочевины и никеля по сравнению с контролем. Поскольку Ni^{2+} входит в состав активного центра уреазы, предполагалось, что добавление этих ионов будет стимулировать ее активность. Однако ионы никеля не оказывали влияния на активность уреазы при экспозиции в течение 2 сут или подавляли ее активность при более длительном воздействии (см. таблицу). Медь снижала активность фермента более чем в 2, а в присутствии мочевины в среднем в 3 раза. Эти результаты подтверждают приведенные выше данные, свидетельствующие о высокой токсичности меди (100 мкмоль/л). Причем токсическое действие ионов меди усиливалось при добавлении мочевины.

Заключение

Растения обладают различными механизмами приспособления к неблагоприятным факторам среды обитания, которые проявляются в изменении структурно-функциональных характеристик фотосинтетического аппарата, повышении активности ферментов, скорости синтеза низкомолекулярных антиоксидантов и т. д.

В результате проведенных исследований установлено, что мочевина в выбранной концентрации не оказывала существенного влияния на физиолого-биохимические показатели *E. densa*. Однако добавление металлов в среду с мочевиной усиливало ее токсическое действие. Повышенные концентрации мочевины и исследованных металлов негативно влияли на состояние пигментной системы *E. densa*, что наиболее отчетливо проявилось при добавлении ионов меди, концентрация которых оказалась летальной для растений. В присутствии меди резко снижалась уреазная активность растений, особенно при добавлении мочевины. Полученные данные свидетельствуют о проявлениях синергизма между исследованными поллютантами.

Изучение ответных реакций водных растений на сопряженное действие поллютантов различной природы представляет научный и практический интерес, поскольку способствует выявлению связей между физиолого-биохимическими характеристиками растений и их адаптивными возможностями, позволяет оценить пределы толерантности растений к загрязнению среды обитания и прогнозировать изменения в фитобионтном звене гидроценозов при усилении техногенного воздействия на водные экосистемы.

Авторы статьи выражают благодарность студенту А.В. Александину за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Sirko A., Brodzik R. Plant ureases: Roles and regulation // Acta Bioch. Polon. 2000. Vol. 47. № 4. P. 1189–1195.
3. Усенко О.М., Сакевич А.И., Клоченко П.Д. Участие фотосинтезирующих гидробионтов в разложении мочевины // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36. № 4. С. 20–29.
4. Мокроносков А.Т., Ильиных З.Г., Шуколюкова Н.И. Ассимиляция мочевины растениями картофеля // Физиология растений. 1966. Т. 13. № 5. С. 798–806.
5. Rossky P.J. Protein denaturation by urea: Slash and bond // PNAS. 2008. Vol. 105. № 44. P. 16825–16826.
6. Малева М.Г., Борисова Г.Г., Чукина Н.В., Некрасова Г.Ф. Влияние мочевины на содержание фотосинтетических пигментов и уреазную активность в листьях элодеи // Водное хозяйство России. 2012. № 5. С. 61–68.
7. Maleva M.G., Borisova G.G., Chukina N.V., Nekrasova G.F., Prasad M.N.V. Influence of exogenous urea on photosynthetic pigments, $^{14}\text{CO}_2$ uptake and urease activity in *Elodea densa* – environmental implications // Envir. Sci. Poll. Res. 2013. Vol. 20. P. 6172–6177.
8. Андреева И.В., Говорина В.В., Виноградова С.Б., Ягодин Б.А. Никель в растениях // Агрохимия. 2001. № 3. С. 82–94.
9. Демидчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи современной биологии. 2001. Т. 121. № 5. С. 511–525.
10. Lichtenthaler H. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // Methods Enzymol. 1987. Vol. 148. P. 350–382.
11. Heath R. L., Packer L. Photooxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. Vol. 125. P. 189–198.
12. Jayaraman J. Laboratory Manual in Biochemistry. Wiley Eastern Ltd.: New Delhi, India, 1981. 64 p.
13. Попова И.А., Маслова Т.Г., Попова О.Ф. Особенности пигментного аппарата растений различных ботанико-географических зон // Эколого-физиологические исследования фотосинтеза и дыхания растений. Л.: Наука, 1989. С. 115–129.

Сведения об авторах:

Малева Мария Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Институт естественных наук, 620000, Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: maria.maleva@mail.ru

Борисова Галина Григорьевна, д-р геогр. наук, профессор, ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Институт естественных наук, 620000, Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: Borisova59@mail.ru

Чукина Надежда Владимировна, канд. биол. наук, ассистент, ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Институт естественных наук, 620000, Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: nady_dicusar@mail.ru