

АДАПТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ С РАЗНОЙ АККУМУЛЯТИВНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ*

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

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

Ключевые слова: гидроэкосистемы, водные макрофиты, *Ceratophyllum demersum* L., *Potamogeton alpinus* Valb., тяжелые металлы, аккумулятивная способность, адаптации, антиоксидантные системы, фиторемедиационный потенциал.



Г.Г. Борисова



Н.В. Чукина



М. Г. Малева

Рассмотрены экологические аспекты, связанные с оценкой адаптивных механизмов высших водных растений. Проведен сравнительный анализ физиолого-биохимических показателей двух широко распространенных видов высших водных растений с различной аккумулятивной стратегией. Показано, что у растений с более высокой аккумулятивной способностью имеются более совершенные антиоксидантные системы, обеспечивающие их устойчивость к загрязнению водной среды и более высокий фиторемедиационный потенциал.

Введение

Высшая водная растительность является важнейшим автотрофным компонентом гидроэкосистем. Наряду с фитопланктоном она активно участвует в создании первичной продукции и, следовательно, в биогеохимическом круговороте химических элементов. Способность

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.; ГК № 14.А18.21.0203).

водных макрофитов к накоплению, утилизации, трансформации многих токсических соединений является мощным фактором, способствующим биологическому самоочищению водных объектов [1].

Отличаясь значительной поверхностью соприкосновения листьев с водой, погруженные и плавающие макрофиты характеризуются высокой поглотительной способностью. Благодаря своим анатомическим особенностям (слабо развитая кутикула, тонкая листовая пластинка, множество мелких пор) водные растения могут поглощать из воды и аккумулировать значительные количества химических элементов, в том числе тяжелых металлов (ТМ). ТМ представляют серьезную угрозу для биоты вследствие их токсичности для организмов и постепенного накопления в окружающей среде до опасного уровня. Многие растения обладают способностью аккумулировать ТМ в количестве, во много раз превышающем их содержание в окружающей среде, и являются основным источником поступления металлов в пищевые цепи [2]. Высшие водные растения способны накапливать ТМ до уровней, намного превышающих их физиологические потребности, причем накопление металлов пресноводными растениями на порядок (и более) выше, чем морскими [3]. Избыток ТМ в среде обитания, как правило, приводит к повышенному их накоплению растительными организмами, однако величина и характер накопления у разных видов растений имеют свою специфику.

По способности накапливать ТМ растения можно разделить на три группы [4]:

- аккумуляторы, накапливающие металлы главным образом в надземных органах как при низком, так и высоком содержании их в среде обитания;
- индикаторы, в которых концентрация металла отражает его содержание в окружающей среде;
- отражатели (исключители), у которых поступление металлов в побег ограничено, несмотря на их высокую концентрацию в среде обитания.

Адаптируясь к изменяющимся условиям среды, водные растения, как и другие растительные организмы, выработали защитно-приспособительные механизмы. Одни из них препятствуют проникновению поллютантов в клетку, другие обеспечивают их внутриклеточную детоксикацию за счет функционирования в клетке антиоксидантной системы.

Изучение поглотительной способности и антиоксидантной активности водных макрофитов, особенно в условиях антропогенного воздействия, представляет научный интерес, поскольку способствует выявлению связей между физиолого-биохимическими характеристиками и адаптивными возможностями растений, позволяет оценить пределы толерантности макрофитов к стрессовым факторам, их фиторемедиационный потенциал. Цель работы – исследование физиолого-биохимических особенностей водных макрофитов с разной аккумулятивной способностью и ответных реакций растений на действие повышенных концентраций ТМ.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований были высшие водные растения: роголистник погруженный (*Ceratophyllum demersum* L.) и рдест альпийский (*Potamogeton alpinus* Balb.). Проведенные ранее исследования показали [5], что роголистник погруженный отличается высокой аккумулятивной способностью по отношению к ТМ. Наименьшее содержание в листьях ТМ (даже при повышенных их концентрациях в водной среде) характерно для рдеста альпийского. Поэтому как типичные представители водных макрофитов с разной аккумулятивной стратегией именно эти виды выбраны в качестве объектов исследования.

Отбор макрофитов для исследований осуществляли в июле 2011 г. в период их цветения. Растительный материал отбирали из одного и того же местообитания (р. Исеть, пос. Двуреченск Свердловской области). Параллельно с отбором растительного материала проводили отбор речных вод для определения концентрации ТМ. Река Исеть, левый приток р. Тобол, имеет важное социально-экономическое значение как источник водоснабжения населения, предприятий промышленности и сельского хозяйства.

Содержание металлов в листьях макрофитов и поверхностных водах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после мокрого озоления 70 % азотной кислотой [6]. Коэффициент биологического накопления (КБН) рассчитывали как отношение содержания металла в биомассе растения (на единицу сухой массы) к валовой концентрации этого металла в воде того же объема.

Содержание общего азота и фосфора измеряли колориметрически после мокрого озоления растительного материала смесью кислот: H_2SO_4 и $HClO_4$. Определение общего азота проводили с помощью реактива Несслера, а фосфора – с молибдатом аммония в кислой среде.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов определяли в усредненных пробах листьев, которые гомогенизировали на холоде в 0,1 М К/Na-фосфатном буфере (рН = 7,4). Гомогенат использовали для определения ПОЛ, активности супероксиддисмутазы (СОД) и гваякол-специфичной пероксидазы. Определение интенсивности ПОЛ проводили в бутанольном экстракте по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [7].

Активность СОД определяли путем измерения скорости ингибирования фотохимического восстановления нитросиногетразолия [8]. Активность пероксидазы оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [9]. Содержание пролина определяли по общепринятой методике [10] с

использованием ациднингидринового реактива. Определение аскорбиновой кислоты и глутатиона проводили из одной усредненной навески листьев трилонометрическим методом [11]. Содержание флавоноидов и общее содержание водорастворимых антиоксидантов в листьях растений определяли спектрофотометрическим методом [12].

Помимо сравнительной оценки биохимических показателей двух видов макрофитов с разной аккумулятивной стратегией, взятых непосредственно из природного местообитания, были проведены исследования в модельных условиях для оценки содержания водорастворимых антиоксидантов у растений при действии ионов ТМ. Растения роголистника погруженного и рдеста альпийского из одного и того же местообитания (р. Исеть, п. Двуреченск, Свердловской области) инкубировали в течение суток в дистиллированной воде при добавлении кадмия и марганца в разных концентрациях (0,1 мг/дм³, 0,5 мг/дм³). Выбор данных металлов был обусловлен их различной природой: марганец – эссенциальный элемент, кадмий является токсичным даже в малых концентрациях. Соответствующие концентрации были подобраны экспериментальным путем, поскольку в модельных условиях не оказывали сильного токсического действия на растения. Металлы вносили в форме сульфатов. Для контроля использовали растения, инкубированные в дистиллированной воде без добавления металлов. Определение биохимических показателей проводили в трех аналитических повторностях. Достоверность различий оценивали по критерию Манна–Уитни.

Результаты исследований и обсуждение

Как известно, водные макрофиты способны поглощать из воды значительные количества ТМ и удерживать их в своих тканях в течение длительного времени. Приведенные в табл. 1 результаты определения содержания металлов в листьях исследованных макрофитов показывают, что количество ТМ в листьях роголистника было в несколько раз выше по сравнению с рдестом альпийским. Исключение составил никель, содержание которого в листьях роголистника лишь в 1,5 раза превосходило соответствующий показатель у рдеста. Максимальное различие наблюдалось по содержанию марганца, уровень накопления которого в листьях у роголистника был почти в 8 раз выше, чем у рдеста альпийского. Значительные различия между видами связаны с такими анатомо-морфологическими особенностями роголистника, как отсутствие корней, рассеченная листовая пластинка, крупные клетки, хорошо развитая аэренхима. Эти особенности обеспечивают высокую поглотительную и аккумулятивную способность роголистника, в листьях которого накапливается значительно больше ТМ и других элементов, в то время как

у рдеста альпийского поглотительную функцию осуществляют в основном корневища, а транспорт веществ в листья затруднен.

Известно, что водные растения отличаются от наземных более высоким содержанием ТМ, а следовательно, и более высокими значениями КБН [13, 14]. Это обусловлено наличием физиологического барьера со стороны корневой системы, который препятствует транспорту ТМ в надземные органы растений. К тому же в отличие от наземных растений, водные макрофиты способны накапливать ТМ всей поверхностью.

В процессе жизнедеятельности высшие водные растения поглощают большое количество биогенных элементов, способствуя снижению уровня эвтрофирования водоемов и водотоков.

Исследования показали, что у роголистника, как у макрофита с повышенной аккумулятивной способностью, содержание общего азота и фосфора было существенно выше, чем у рдеста альпийского (рис. 1).

Азот является для живых организмов одним из основных макроэлементов, т. к. входит в состав важнейших органических веществ: нуклеотидов, белков, аминокислот, амидов, алкалоидов и других. Фосфор – компонент фосфолипидов и нуклеотидов, отвечает за энергетический обмен и участвует в регуляции активности белков. Повышенное накопление биогенных элементов в листьях водных макрофитов, с одной стороны, является следствием более высокой поглотительной способности, с другой – адаптацией к неблагоприятным условиям произрастания, в частности, к высоким концентрациям ТМ в окружающей среде [1, 15].

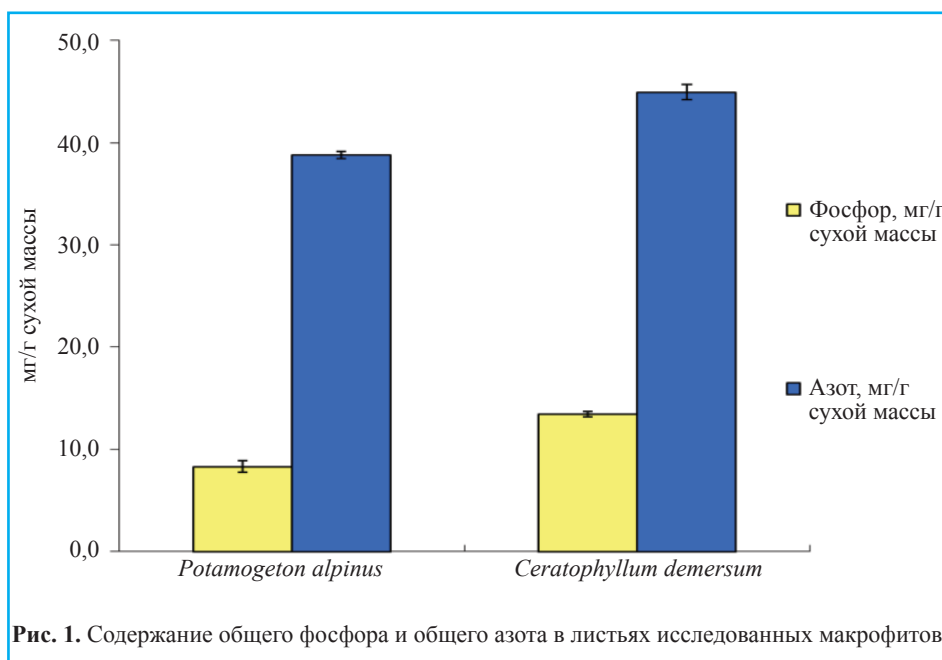


Рис. 1. Содержание общего фосфора и общего азота в листьях исследованных макрофитов.

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

Показатель, единицы измерения	Cu	Fe	Ni	Zn	Mn
Содержание ТМ в поверхностных водах, мкг/дм ³	7,0	351,2	3,9	25,5	67,4
<i>Ceratophyllum demersum</i>					
Содержание ТМ в листьях, мг/кг сухой массы	43,5	1706,2	16,6	372,6	2977,3
КБН	6214,3	4858,2	4256,4	14611,8	44173,6
<i>Potamogeton alpinus</i>					
Содержание ТМ в листьях, мг/кг сухой массы	13,2	577,3	11,3	84,1	378,4
КБН	1885,7	1643,8	2897,4	3298,0	5614,2

При действии на растения различных неблагоприятных факторов в их клетках происходит накопление активных форм кислорода (АФК). В нормальных условиях роста и развития растений концентрация свободных радикалов и инициированное ими перекисное окисление липидов находятся на некотором относительно постоянном уровне. В неблагоприятных условиях происходит накопление свободных радикалов, вследствие чего возрастает интенсивность процессов ПОЛ.

В результате исследования процессов перекисидации липидов установлено, что интенсивность ПОЛ в листьях роголистника была в 3,4 раза выше по сравнению с листьями рдеста альпийского. Очевидно, увеличение интенсивности ПОЛ у растений с повышенной аккумулятивной способностью, с одной стороны, является показателем развития окислительного стресса, с другой – способствует повышению антиоксидантной активности. Иными словами, наблюдавшийся нами «окислительный взрыв» мог инициировать включение направленных на предотвращение развития окислительного стресса адаптационных механизмов. Одним из них является увеличение активности ферментов антиоксидантной системы.

В табл. 2 представлены данные по активности у исследованных водных макрофитов двух ферментов-антиоксидантов: супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы.

Таблица 2. Активность ферментов антиоксидантной защиты в листьях исследованных видов макрофитов

Виды макрофитов	Активность СОД, ед/г сухой массы	Активность пероксидазы, мкМ/г сухой массы в минуту
<i>Potamogeton alpinus</i>	114,6±3,3	45,2±1,1
<i>Ceratophyllum demersum</i>	130,7±8,9	361,1±20,8

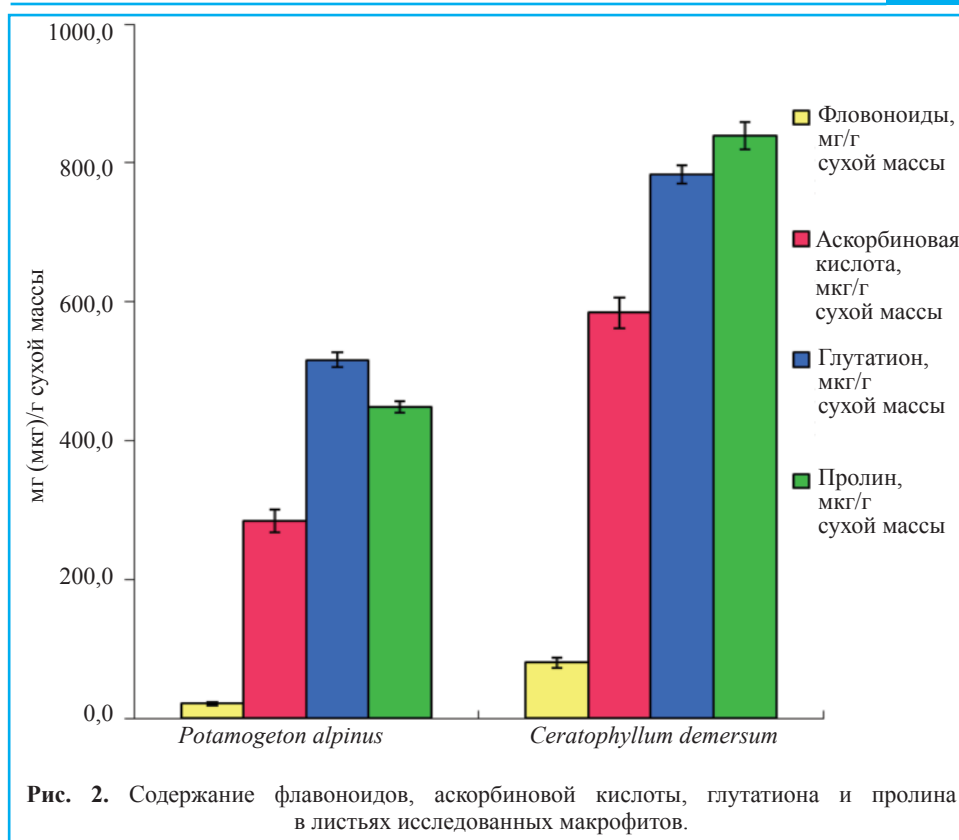
При неблагоприятных воздействиях активация ферментов антиоксидантной защиты является ответом на увеличение продукции АФК, что обеспечивает защиту клеток и тканей от окислительных повреждений.

Как показали результаты исследований, минимальными значениями активности СОД и пероксидазы отличались листья рдеста альпийского, содержание ТМ в которых было существенно ниже, чем у роголистника. Особенно большие различия (в 8 раз) наблюдались по активности пероксидазы. Активация «ферментов стресса» является механизмом защиты от действия ТМ. Этот неспецифический защитный механизм обеспечивает выживание растительного организма и его адаптацию к условиям среды.

Помимо ферментов антиоксидантной защиты важную роль в защите живых организмов от разрушительного действия АФК играют неферментативные антиоксиданты, большинство которых представлено низкомолекулярными соединениями. В процессе исследований проведен сравнительный анализ содержания в листьях макрофитов таких антиоксидантов, как флавоноиды, аскорбат, глутатион и пролин.

Флавоноиды – обширный класс низкомолекулярных многоатомных фенолов растительного происхождения. Они способны реагировать со свободнорадикальными соединениями, образующимися в результате окислительного стресса. Аскорбиновая кислота выступает в роли восстановителя, повышая устойчивость растений. Глутатион – трипептид, защитное действие которого сопровождается окислением его сульфгидрильной группы и превращением в дисульфид глутатиона. Глутатион также может участвовать в поддержании пула восстановленного аскорбата как в растительных, так и в животных клетках. Пролин может выступать в качестве эффективного «тушителя» синглетного кислорода, ингибитора ПОЛ и стабилизатора белков [16].

Результаты определения содержания неферментативных антиоксидантов в листьях водных растений, приведенные на рис. 2, показывают, что роголистник погруженный, макрофит с высокой аккумулятивной способностью, отличался от рдеста альпийского значительно более высоким уровнем накопления всех исследованных низкомолекулярных компонентов

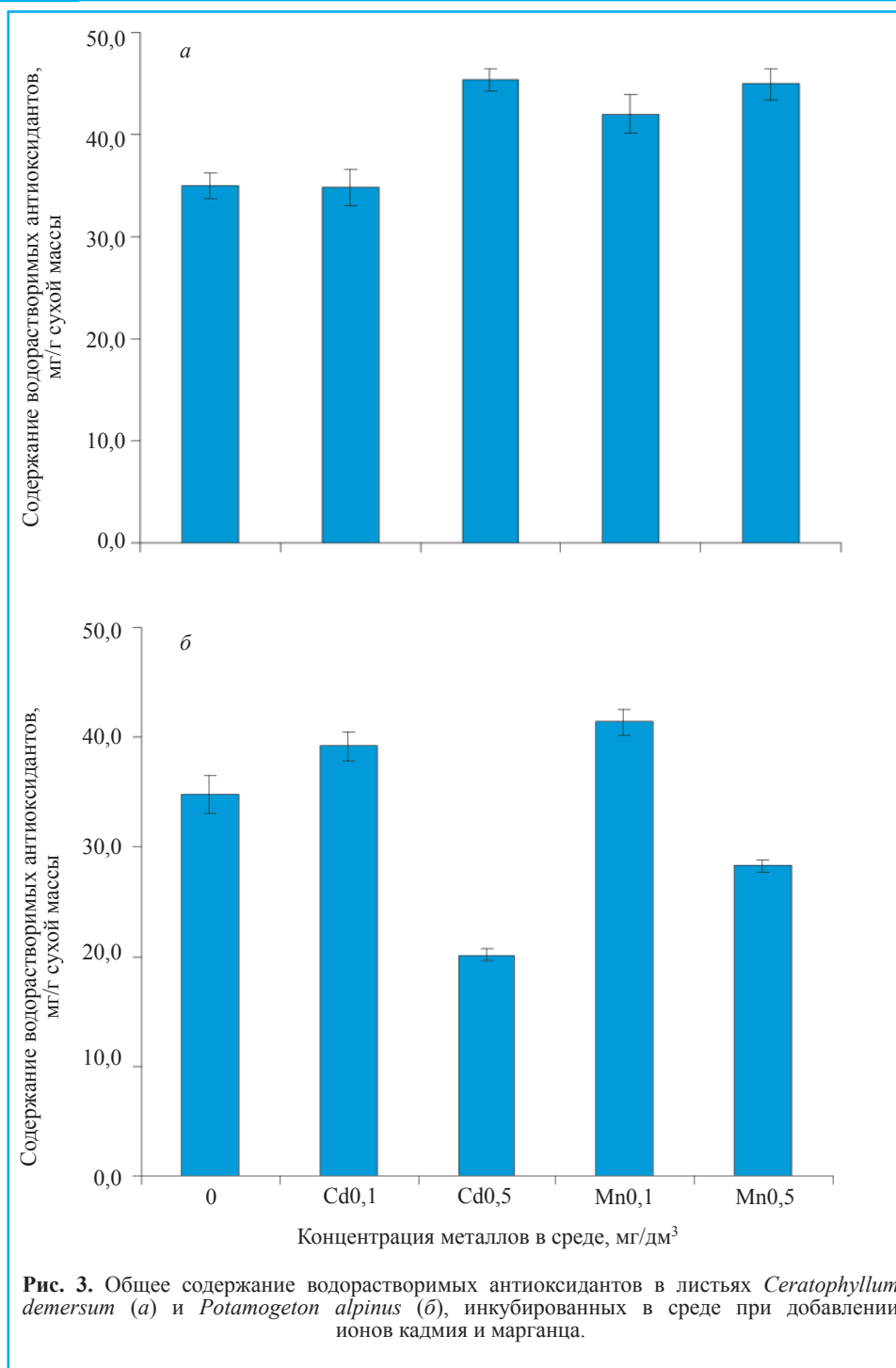


антиоксидантной системы растений. Так, содержание глутатиона в листьях роголистника было выше в 1,5; аскорбата и пролина – в 2, а флавоноидов – в 4 раза по сравнению с рдестом альпийским.

Увеличение содержания флавоноидов, аскорбата, глутатиона и пролина при накоплении ТМ в листьях роголистника можно рассматривать как неспецифическую адаптивную реакцию, обеспечивающую высокий уровень толерантности растений к неблагоприятным условиям. Это заключение подтверждается результатами исследований, проведенных в модельных условиях.

Модельные исследования показали (рис. 3), что в листьях роголистника при инкубировании в среде с ионами кадмия и марганца во всех вариантах опыта общее содержание водорастворимых антиоксидантов повышалось по сравнению с контролем.

В наибольшей степени содержание водорастворимых антиоксидантов у роголистника возрастало при более высоких ($0,5 \text{ мг/дм}^3$) концентрациях кадмия и марганца. Очевидно, что по мере усиления стресса у исследованных растений повышалась антиоксидантная активность.



У рдеста альпийского при концентрациях ТМ 0,1 мг/дм³ синтез водорастворимых антиоксидантов усиливался (см. рис. 3). Однако действие кадмия и марганца в концентрации 0,5 мг/дм³ приводило к снижению содержания антиоксидантов по сравнению с контролем на 40 и 20 % соответственно. Вероятно, пятикратное повышение концентрации этих металлов в среде оказало более выраженное токсическое действие на растение и привело к нарушению процессов синтеза антиоксидантов.

Полученные результаты позволяют заключить, что образование водорастворимых антиоксидантов способствует снижению токсического действия ТМ на растения. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что у растений с повышенной аккумулятивной способностью имеются более совершенные механизмы детоксикации ТМ. Поэтому именно растения-аккумуляторы являются наиболее перспективными видами для использования в фиторемедиационных технологиях, направленных на очистку сточных вод и восстановление водных экосистем.

Выводы

В результате проведенных исследований выявлены существенные различия между двумя видами водных макрофитов по накоплению тяжелых металлов, содержанию общего азота и фосфора, активности про- и антиоксидантных процессов, отражающие их видовую специфику и разные адаптивные механизмы.

Устойчивость растений с высокой аккумулятивной способностью к ТМ обусловлена комплексом биохимических показателей. Однако решающую роль в формировании адаптационного потенциала растений, очевидно, играют антиоксидантные системы, функционирование которых является проявлением неспецифических механизмов устойчивости.

Исследования накопления тяжелых металлов макрофитами и путей адаптации к загрязнению среды обитания являются основой для разработки более эффективных технологий очистки загрязненных вод, совершенствования методов биоиндикации и биомониторинга водных объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукина Л.Ф., Смирнова Н.Н. Физиология высших водных растений. Киев: Наукова Думка, 1988. 186 с.
2. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 439 с.
3. Саенко Г.Н. Металлы и галогены в морских организмах. М.: Наука, 1992. 199 с.
4. Baker A.J.M. Accumulators and excluders-strategies in response of plants to heavy metals // J. Plant Nutr. 1981. V. 3. P. 643–654.

5. *Chukina N.V., Borisova G.G.* Structural and functional induces of higher aquatic plants from habitats differing in levels of anthropogenic impact // *Inland Water Biology*. 2010. V. 3. P. 44–50.
6. *Ермаченко Л.А., Ермаченко В.М.* Атомно-абсорбционный анализ с графитовой печью. М.: Изд-во ПАИМС, 1999. 220 с.
7. *Uchiyama M., Mihara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 287–297.
8. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276–287.
9. *Chance B., Maehly A.C.* Assay catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 1955. P. 764–775.
10. *Bates L.S.* Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant Soil*. 1973. V. 39. P. 205–207.
11. *Чупахина Г.Н.* Физиологические и биохимические методы анализа растений. Калининград: Изд-во Калинингр. ун-та, 2000. 59 с.
12. *Рогожин В.В.* Практикум по биологической химии: уч.-метод. пос. СПб.: Изд-во «Лань», 2006. 256 с.
13. *Ларионов М.В., Ларионов Н.В.* Особенности накопления тяжелых металлов в почвенных экосистемах Саратовского Поволжья // *Вестник ОГУ*. 2010. № 1. С. 110–114.
14. *Власов Б.П., Гигевич Г.С.* Использование высших водных растений для оценки и контроля за состоянием водной среды: Методические рекомендации. Минск: БГУ, 2002. 84 с.
15. *Ипатов В.И.* Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды. М.: Изд-во ООО «Графикон-принт», 2005. 224 с.
16. *Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В.* Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 5. С. 721–730.

Сведения об авторах:

Борисова Галина Григорьевна, д. г. н., профессор кафедры физиологии и биохимии растений, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Институт естественных наук, департамент «Биологический факультет», 620000, г. Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: Borisova59@mail.ru

Чукина Надежда Владимировна, к. б. н., ассистент кафедры физиологии и биохимии растений, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Институт естественных наук, департамент «Биологический факультет», 620000, г. Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: nady_dicusar@mail.ru

Малева Мария Георгиевна, к. б. н., доцент кафедры физиологии и биохимии растений, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Институт естественных наук, департамент «Биологический факультет», 620000, г. Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: maria.maleva@mail.ru