

УДК 502.51:581.526.3

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И УРЕАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В ЛИСТЯХ ЭЛОДЕИ*

© 2012 г. М.Г. Малева, Г.Г. Борисова, Н.В. Чукина,
Г.Ф. Некрасова

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

Ключевые слова: водные объекты, загрязнение, мочевины, водные макрофиты, *Elodea canadensis*, фотосинтетические пигменты, уреазная активность.

Обсуждаются экологические аспекты влияния мочевины на состояние гидрорезервуаров и функционирование гидробионтов. В модельных условиях при инкубировании элодеи в присутствии мочевины показано, что низкие концентрации мочевины стимулировали накопление фотосинтетических пигментов и активизировали работу фермента уреазы, в то время как высокие концентрации оказывали подавляющее действие на эти процессы. Обоснована необходимость контроля за потоками мочевины и других азотсодержащих соединений в водные объекты.

Введение

В условиях существенного роста антропогенной нагрузки на водные экосистемы все более актуальной становится проблема адаптации гидробионтов к поллютантам. Особое место среди них занимает мочевины (карбамид). Мочевина может накапливаться в водоемах и водотоках в результате естественных биохимических процессов. Она продуцируется растениями, грибами, бактериями и другими гидробионтами как продукт связывания аммиака, образующегося в процессе диссимилиации белков. Мочевина образуется также при распаде отмерших организмов как следствие микробиологических процессов метаболизации пуриновых и пиримидиновых оснований до мочевины и аммиака. Значительные количества мочевины поступают в водные объекты с хозяйственно-бытовыми сточными водами, с коллекторно-дренажными водами, а также с поверхностным стоком при использовании ее в качестве азотного удобрения.

В поверхностных слоях количество мочевины составляет, как правило, 20–30 %, а в придонных 60–80 % от суммы органического азота [1]. Разложение мочевины в водной среде осуществляется, главным образом, в

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П1301).

результате деятельности ферментов бактерий и растений, особой активностью из которых обладает уреазы. Этот фермент катализирует гидролиз мочевины до углекислого газа и аммиака, который в последующем участвует в аминировании кетокислот или окисляется до нитритов и нитратов.

Благодаря своей доступности и распространенности, мочевина может служить дополнительным источником азота и углерода в гидроценозах. Это особенно важно для погруженных водных растений, обитающих в толще воды при пониженной освещенности и невысокой концентрации неорганического углерода [2]. В то же время избыточные количества мочевины могут влиять как на целые растительные сообщества, так и на отдельные виды макрофитов.

Известно, что высокие концентрации мочевины вызывают физиологические расстройства и снижение продуктивности у высших растений [3], приводят к диссоциации фикобилиновых пигментов на субъединицы у разных видов синезеленых и красных водорослей [4]. Имеются данные о том, что при залповом загрязнении гидроценозов мочевиной изменяется качество воды, ухудшается кислородный режим водоемов, происходит смена видового состава популяций [1, 5]. Вместе с тем способы утилизации экзогенной мочевины растениями и механизмы ее влияния на структурно-функциональные показатели гидробионтов изучены недостаточно.

Цель исследований – выявление ответных реакций водных макрофитов (на примере элодеи) на действие мочевины в градиенте концентраций.

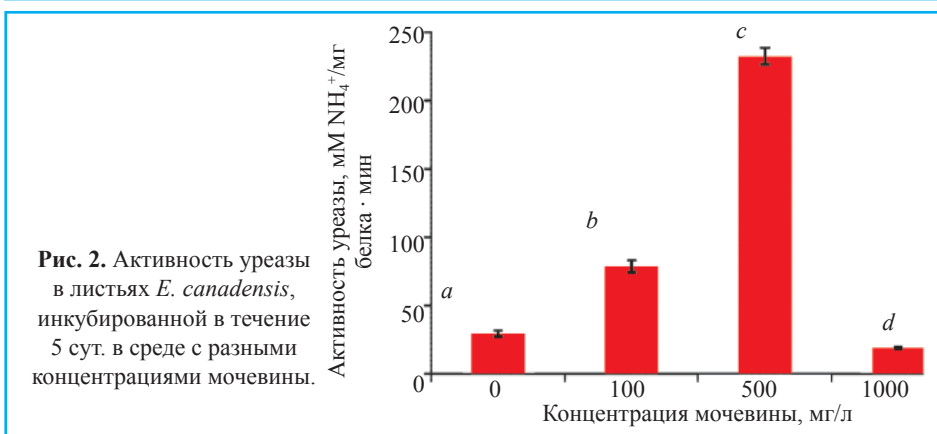
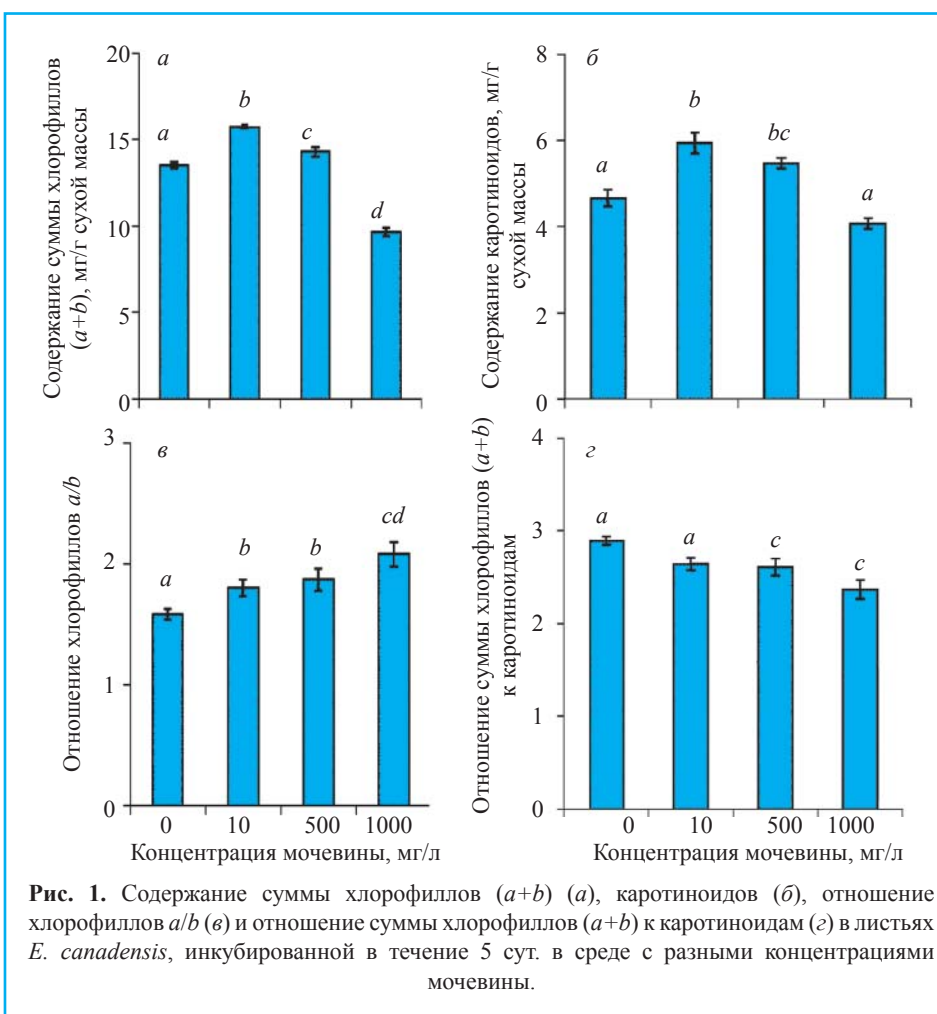
Объекты и методы исследований

Объектом исследований была элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx.), собранная в р. Сысерть Свердловской области в период цветения макрофита. Исследования проводили в модельных условиях. Элодею в течение 5 сут. инкубировали на среде Арнона с различными концентрациями мочевины: 0 (контроль), 100, 500 и 1000 мг/л при естественной освещенности.

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях элодеи определяли спектрофотометрически. Расчет хлорофиллов проводили по формуле Vernon, содержание каротиноидов рассчитывали по Wettstein [6]. Для экстрагирования пигментов из листьев использовали 80 % водный раствор ацетона.

Для определения уреазной активности 0,5 г сырых листьев гомогенизировали в 5 мл охлажденного до 2–4 °С 0,03 М К/Na-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 1 мМ ЭДТА-Na и 2 % поливинилпирролидон. Активность уреазы (ЕС 3.5.1.5) измеряли колориметрическим методом [7].

Все опыты проведены в повторностях, каждая из которых представлена выборкой из 10–15 растений. Достоверность различий между вариантами определяли по непараметрическому критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. На рис. 1, 2 показаны средние арифметические значе-



ния из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки. Разными буквами отмечены достоверно различающиеся значения.

Результаты исследований и обсуждение

Фотосинтез – одна из ведущих функций растений, обеспечивающих их необходимыми для роста и развития субстратами и энергией. Состояние фотосинтетического аппарата растений является важнейшим фактором, от которого зависит эффективность ассимиляции углекислого газа. В ходе адаптации к условиям среды у растений происходят такие изменения структуры фотосинтетического аппарата, которые способны обеспечить их оптимальное функционирование.

Результаты исследований показали, что содержание фотосинтетических пигментов в листьях элодеи, которую инкубировали в среде в градиенте концентраций мочевины, существенно зависело от концентрации данного поллютанта. Это свидетельствует о том, что листья элодеи легко поглощали экзогенную мочевины.

Воздействие малыми концентрациями мочевины (100 мг/л) стимулировало образование хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов: оно возрастало на 15–30 % от контроля. При повышении ее концентрации до 500 мг/л количество фотосинтетических пигментов снижалось, однако оставалось выше контроля (рис. 1*a*, *b*). При максимальных концентрациях мочевины (1000 мг/л) количество хлорофиллов (*a+b*) уменьшалось до значений, которые были существенно ниже по сравнению с контролем. Содержание каротиноидов при этом тоже убывало, но не столь значительно (до уровня контроля).

Повышение количества хлорофилла в листьях элодеи при увеличении концентрации мочевины в среде, очевидно, обусловлено тем, что в состав хлорофилла входит значительное количество азота, поэтому добавление мочевины в небольших количествах привело к усилению синтеза хлорофилла вследствие лучшего обеспечения растений азотом. Увеличение содержания каротиноидов в листьях макрофитов в присутствии мочевины является закономерным явлением, которое объясняется способностью каротиноидов взаимодействовать с активными формами кислорода, подавляя процесс их накопления и препятствуя, таким образом, окислительному стрессу [8].

Уменьшение количества хлорофиллов и каротиноидов в листьях элодеи при повышенном содержании мочевины, вероятно, связано с сильным окислительным стрессом в клетках данного макрофита. Под действием высоких концентраций мочевины происходит окисление органических молекул и повреждение клеточных мембран. Очевидно, именно окислительным разрушением фотосинтетических пигментов обусловлено уменьшение их содержания в листьях элодеи при высоком уровне мочевины.

Отношение хлорофилла a к хлорофиллу b в листьях элодеи при возрастании концентрации мочевины увеличивалось (рис. 1*в*). Хлорофилл a является основным фотосинтетическим пигментом растений. В неблагоприятных условиях произошло увеличение его доли при уменьшении доли хлорофилла b , что свидетельствует о его более высокой устойчивости к действию высоких концентраций мочевины.

Отношение суммы хлорофиллов ($a+b$) к каротиноидам менялось незначительно (рис. 1*г*), однако наблюдалась тенденция к его уменьшению, т. е. возрастанию в фотоассимиляции роли каротиноидов как вспомогательных фотосинтетических пигментов.

Вопрос о путях ассимиляции мочевины в растительных тканях до сих пор не имеет единого решения. Как известно, основным путем усвоения у большинства растений является гидролиз мочевины под действием уреазы и последующая ассимиляция в обычных реакциях азотного и углеродного обмена. Уреаза катализирует реакцию гидролитического разложения мочевины на аммиак и углекислый газ, причем как в процессе жизнедеятельности организмов, так и в течение определенного времени после их отмирания [9]. Она широко распространена у растений, бактерий, грибов и некоторых беспозвоночных.

Исследования показали, что при повышении в среде концентрации мочевины до 500 мг/л уреазная активность в листьях элодеи существенно возрастала (почти в 8 раз). Это можно объяснить стимулирующим действием мочевины на активность уреазы как субстрата данного фермента. Однако в присутствии мочевины в среде в концентрации 1000 мг/л активность фермента резко падала, опускаясь даже ниже контрольных значений, что свидетельствует о токсических эффектах мочевины, которые проявляются при ее высоком уровне.

Известно, что мочевина может накапливаться корнями растений непосредственно и ассимилироваться в клетках корня [10], однако высокие концентрации мочевины приводят к денатурации белковых молекул [11]. Мочевина способна взаимодействовать как с полярными, так и неполярными группировками белков, приводя к разрушению их третичной структуры. Обнаружено, что мочевина может непосредственно разрывать водородные связи в белковых молекулах. Поэтому мочевину можно считать стрессовым фактором для растений наряду с другими поллютантами.

Значительные количества мочевины могут поступать в водные объекты с сельскохозяйственных угодий при использовании ее в качестве удобрения. Мочевина является одним из лучших азотных удобрений и по эффективности равноценна аммиачной селитре. Ее можно применять как основное удобрение или в качестве подкормки под все культуры и на различных почвах. Мочевина непосредственно растениями не усваивается, только после

разложения ее почвенными уробактериями она становится доступной. На богатых гумусом почвах это превращение происходит за 2–3 дня, на песчаных и болотистых несколько медленнее. При поверхностном размещении удобрения возможны потери азота вследствие улетучивания аммиака из карбоната аммония, легко разлагающегося в воздухе. Значительные потери в форме аммиака могут происходить при использовании мочевины в качестве подкормки на лугах и пастбищах, поскольку дернина обладает высокой уреазной активностью.

В связи с увеличением доли мочевины в промышленном производстве и структуре азотных удобрений возникает необходимость обоснования режимов использования мочевины. В периоды интенсивного снеготаяния и ливневых осадков значительная часть внесенной под сельскохозяйственные растения мочевины смывается в реки и водоемы. Следовательно, целесообразно применять мочевины в качестве основного удобрения, а также для ранневесенней подкормки озимых и пропашных культур при немедленной заделке в почву.

Существенный вклад в ухудшение экологического состояния водных объектов и их загрязнение мочевиной и другими азотсодержащими веществами вносят объекты животноводства. Стоки животноводческих комплексов характеризуются высокой загрязненностью: содержание взвешенных веществ в них может достигать 29 г/л; общего сухого остатка до 4 г/л; азота общего до 2 г/л; азота аммиачного до 0,8 г/л; величина БПК₅ 10 г/л [12, 13].

Проведенными в США исследованиями установлено [12], что на средней по размеру и поголовью животных откормочной площадке в накапливаемом за год навозе содержится 25 т азота, 59 % этого количества удаляется с территории площадки в процессе уборки и вывоза навоза; 10,1 % теряется вместе со стоком за холодный период года; 1,3 % – летом. Остальная часть азота попадает в почву в виде нитратов, аммония и органических соединений или улетучивается в атмосферу. Особую угрозу для близлежащих водных объектов представляет образование в периоды весеннего половодья и летних ливневых паводков на территории комплексов навозосодержащих сточных вод, которые, как правило, неорганизованным путем поступают в природные воды, вызывая их загрязнение.

Для предотвращения накопления мочевины и продуктов ее распада в поверхностных водах необходим комплекс мер, направленных на сокращение потоков органических и неорганических азотсодержащих соединений: строгий контроль за соблюдением экологически обоснованных правил и требований при использовании мочевины в качестве удобрения; регламентирование основных показателей функционирования животноводческих предприятий, эффективное обезвреживание и утилизация образующихся отходов, предотвращение поступления в природные воды навозосодержа-

щих сточных вод, образующихся на территориях комплексов в периоды повышенной водности.

Выводы

Исследования по оценке влияния экзогенной мочевины на некоторые физиологические показатели водных макрофитов (на примере элодеи) показали следующее.

1. Присутствие в инкубационной среде мочевины в концентрациях 100 и 500 мг/л стимулировало синтез хлорофиллов и каротиноидов в листьях элодеи. Активность уреазы существенно возросла по сравнению с контролем.

2. Возрастание концентрации мочевины от 500 до 1000 мг/л вызывало уменьшение количества пигментов и снижение уреазной активности в листьях элодеи.

Таким образом, мочевина и продукты ее гидролиза могут не только вызывать эвтрофирование природных вод, ухудшая тем самым экологическое состояние гидрэкосистем, но и оказывать токсическое действие на жизнедеятельность водных макрофитов и других гидробионтов, что предопределяет необходимость постоянного контроля за поступлением азотсодержащих веществ в водные объекты с водосборной территории, а также осуществления комплекса мероприятий по сокращению этих потоков.

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. Горышина Т.К. Экология растений: Учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1979. 368 с.
3. Мокронос А.Т., Ильиных З.Г., Шуколюкова Н.И. Ассимиляция мочевины растениями картофеля // Физиология растений. 1966. Т. 13. № 5. С. 798–806.
4. Лось С.И. Влияние мочевины на спектральные свойства фикобилиновых пигментов водорослей // Альгология. 2009. Т. 19. № 1. С. 25–32.
5. Антропогенное воздействие на малые озера. Л.: Наука, 1980. 172 с.
6. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 1975. 392 с.
7. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1975. 334 с.
8. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 244 с.
9. Усенко О.М., Сакевич А.И., Клоченко П.Д. Участие фотосинтезирующих гидробионтов в разложении мочевины // Гидробиологический журнал. 2000. Т. 36. № 4. С. 20–29.
10. Rossky P.J. Protein denaturation by urea: slash and bond // PNAS. 2008. V. 105. № 44. P. 16825–16826.

11. Lima W. K., Rosgen J., Englander S.W. Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group // PNAS. 2009. V. 106. № 8. P. 2595–2600.
12. Фокина В.Д. Охрана окружающей среды от загрязнения отходами животноводства (Обзорная информация). М.: ВНИИТЭИСХ, 1980. 52 с.
13. Редька И.И. Поверхностный сток с территории животноводческих комплексов // Охрана вод от загрязнения поверхностным стоком. Харьков: ВНИИВО, 1983. С. 69–72.

Сведения об авторах:

Малева Мария Георгиевна, к. б. н., ассистент, кафедра физиологии и биохимии растений, Институт естественных наук, департамент: «Биологический факультет», Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, 620002, г. Екатеринбург, Мира, 19; e-mail: maria.maleva@mail.ru

Борисова Галина Григорьевна, д. г. н., профессор, кафедра физиологии и биохимии растений, Институт естественных наук, департамент: «Биологический факультет», Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, 620002, г. Екатеринбург, Мира, 19; e-mail: bogisova59@mail.ru

Чукина Надежда Владимировна, к. б. н., ассистент, кафедра физиологии и биохимии растений, Институт естественных наук, департамент: «Биологический факультет», Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, 620002, г. Екатеринбург, Мира, 19; e-mail: nady_dicusag@mail.ru

Некрасова Галина Федоровна, к. б. н., доцент, кафедра физиологии и биохимии растений, Институт естественных наук, департамент: «Биологический факультет», Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, 620002, г. Екатеринбург, Мира, 19