

***ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ НА ВОДНЫЕ РАСТЕНИЯ**

© 2010 г. Г.Г. Борисова, М.Н. Кислицина, Н.В. Чукина

Уральский государственный университет, г. Екатеринбург

Ключевые слова: водные объекты, загрязнение водных объектов, фенольные соединения, водные макрофиты, *Elodea densa*, токсичность, фенол, пирокатехин, резорцин, гидрохинон, полифенолоксидаза, флавоноиды, перекисное окисление липидов.

Представлены материалы модельных исследований по оценке влияния экзогенных фенольных соединений на анатомо-морфологические и биохимические показатели водных растений (на примере *Elodea densa*). В результате проведенных исследований установлено, что наиболее токсичными являются резорцин и пирокатехин. Показано, что выявление ответных реакций водных растений на действие фенольных соединений необходимо для прогнозирования их трансформации в водных объектах и разработки технологий фиторемедиации.

Фенольные соединения (ФС) – вещества ароматической природы, содержащие одну, две или несколько гидроксильных групп у ароматического кольца.

Присутствующие в поверхностных водах ФС по происхождению можно разделить на три группы: компоненты промышленных сточных вод и поверхностного стока, поступающие в результате первичного загрязнения; продукты, образующиеся в ходе процессов вторичного загрязнения; биогенные фенольные соединения, образуемые гидробионтами [1].

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК П2364.

ФС относят к числу наиболее опасных и распространенных загрязняющих веществ в водных объектах России [2]. Они нарушают естественный круговорот органических веществ в водоемах и водотоках и ухудшают условия функционирования большинства гидробионтов.

Концентрации фенольных соединений в поверхностных водах нередко многократно превышают значения предельно допустимых концентраций (ПДК) для водных объектов рыбохозяйственного назначения. Так, в морской части устья р. Урал концентрации фенолов достигали 0,030 мг/л (30 ПДК) [3]. По данным работы [4], на территории Свердловской области наибольшая концентрация фенолов наблюдалась в бассейне р. Тавда: в створе ниже г. Новая Ляля их содержание составляло 13 ПДК. Согласно данным государственного мониторинга [5], за последние годы повторяемость случаев превышения ПДК по фенолам в водах рек Свердловской области Исеть, Пышма и Чусовая варьировалась от 10–29 до 50–100 %.

По объему, концентрации, токсичности и трудности очистки фенолсодержащие сбросы занимают среди стоков многих производств одно из первых мест [6].

Фенолы используются для дезинфекции, изготовления клеев и фенолформальдегидных пластмасс; они входят в состав выхлопных газов бензиновых и дизельных двигателей; присутствуют в больших количествах в сточных водах нефтеперерабатывающих, лесохимических, аминокрасочных и ряда других предприятий. Высокими концентрациями этих соединений отличаются сточные воды коксохимических производств, в которых уровни содержания летучих фенолов достигают 250–350 мг/л, многоатомных фенолов – 100–140 мг/л.

В продуктах термического разложения каменных углей содержатся преимущественно фенол и его моно- и диалкилпроизводные – крезолы и ксиленолы. Содержание полифенолов ограничено небольшой долей резорцина и пирокатехина. В продуктах пирогающей переработки бурых углей и торфа содержание и набор многоатомных фенолов увеличиваются за счет производных пирокатехина [6]. В продуктах термического разложения горючих сланцев содержание многоатомных фенолов, в частности, резорцина и его алкилпроизводных, доходит до 80–94 % от суммарной смеси фенолов [7]. Кроме того, источником поступления фенолов в водоемы и водотоки служат сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов, содержащие лигнин. В водном гидролизате лигнина обнаружено более 20 различных фенолов [8].

В самоочищении водных объектов от органических соединений, в том числе от ФС, участвуют следующие группы факторов [9]:

- гидродинамические (смещение, разбавление);
- физико-химические (химическое окисление, превращения веществ, коагуляция, сорбция, хемоседиментация);
- биологические (биохимические превращения, биологическое окисление, фотосинтез, фильтрация).

Многими авторами отмечено [10–15], что некоторые высшие и низшие водные растения могут активно участвовать как в процессах самоочищения водных объектов, так и очистке сточных вод от поллютантов антропогенного происхождения, в том числе от фенолов. Эту положительную роль водных растений обуславливает суммарный результат нескольких процессов, таких как:

- улучшение кислородного режима водных объектов за счет фотосинтетической деятельности;
- создание благоприятных условий для развития как эпифитных, так и обитающих в водной среде микроорганизмов;
- снижение концентрации токсикантов в воде за счет их аккумуляции в корневых системах;
- метаболизация загрязняющих веществ непосредственно в растительных клетках с участием ферментных систем или их трансформация под действием биологически активных метаболитов, выделяемых растениями в среду обитания.

Воздействие первых двух факторов является косвенным, а другие связаны с непосредственным участием водных макрофитов в элиминировании токсикантов. Очевидно, в реальных условиях имеет место комплексное действие факторов с преобладающим эффектом того или иного.

К настоящему времени механизмы действия экзогенных ФС на функционирование растений и их вторичный метаболизм изучены слабо: в литературе имеются лишь единичные сведения по этому вопросу [6, 16].

В связи с этим целью данной работы было исследование в модельных условиях влияния различных ФС на некоторые биохимические (активность фермента полифенолоксидазы, содержание флавоноидов, интенсивность перекисного окисления липидов) и анатомо-морфологические показатели *Elodea densa* Planchon.

Объекты и методы исследований

Elodea densa – погруженный в воду, заносный многолетний макрофит, растущий в водоемах и водотоках со стоячей или медленно текущей водой. Растение имеет ветвистые длинные стебли, листья по 3–6 в мутовке линейно-ланцетные, лист достигает 25 мм длины и 2–5 мм ширины. Элодея может формировать очень плотные заросли. Родиной этого растения является Южная Америка, но оно распространилось по водным объектам всего мира. Известно, что *Elodea densa* обладает способностью к биотрансформации тринитротолуола [16], однако сведения о взаимодействии элодеи с другими ФС отсутствуют.

Для исследования влияния ФС на биохимические показатели водных макрофитов были взяты пять сосудов объемом 3 литра. В каждый сосуд помещали по три растения *Elodea densa* и в течение двух суток инкубировали в дистиллированной воде с добавлением монофенола, гидрохинона, пирокатехина и резорцина соответственно. Концентрация каждого из экзогенных ФС составляла 1 мг/л. Контролем служили растения, инкубированные в дистиллированной воде.

Определение активности полифенолоксидазы (ПФО) в листьях растений проводили объемным методом с использованием аскорбиновой кислоты [17].

Содержание флавоноидов определялось спектрофотометрически после проведения реакции, основанной на способности флавоноидов реагировать с лимоннокислым борным реактивом с образованием окрашенного комплекса [18]. Для максимального извлечения флавоноидов из биологического материала использовался раствор 96 % этанола с 1 % тритоном X-100, способным извлекать из мембранных структур не растворимые в воде соединения.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определялась спектрофотометрическим методом, основанным на способности продуктов ПОЛ реагировать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [19].

Каждое определение проводили в усредненной пробе листьев в трех биологических и трех аналитических повторностях.

Для исследования влияния ФС на анатомо-морфологические параметры растений верхушки побегов *Elodea densa* длиной 6 см помещались в сосуды с 5 % средой Хогланда. Сосуд № 1 использовался в качестве контроля, а в остальные сосуды был добавлен гидрохинон в концентрации 0,1; 1,0 и 10 мг/л, соответственно. Растения инкубировали в среде с гидрохиноном в течение 60 дней при естественном освещении.

Новые побеги, которые сформировались за этот период, были зафиксированы в 3,5 % растворе глутарового альдегида для последующего определения анатомо-морфологических показателей листа.

Размеры клеток верхнего и нижнего эпидермиса определяли с использованием компьютерной установки и программного обеспечения Siam Mesoplant в 30-кратной повторности.

Математическая обработка данных осуществлялась при помощи программ MS Excel, Statistica 6.0. Достоверность результатов оценивалась при уровне значимости $p < 0,05$. Для оценки достоверности различий использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Известно, что в условиях загрязнения водных экосистем у макрофитов формируются защитные механизмы, благодаря которым исключается проникновение поллютантов в клетку, либо осуществляется их детоксикация, которая способствует активизации ряда ферментов, в том числе полифенолоксидазы (ПФО), или дифенолоксидазы. ПФО (1.14.18.1) – медьсодержащий фермент, обладающий монофенолазной и дифенолазной активностью. Считается, что этот фермент окисляет ортодифенолы, но не активен в отношении пара- и метадифенолов [6].

Как показали наши исследования, все экзогенные ФС в концентрации 1 мг/л оказывали токсичное действие на *Elodea densa*, что проявлялось в снижении активности ПФО в ее листьях по сравнению с контролем (табл. 1). Однако степень токсичности исследованных ФС различалась, что можно объяснить их физико-химическими особенностями. Наибольшее снижение активности ПФО в листьях элодеи происходило под влиянием пирокатехина и резорцина (на 55 и 56 %, соответственно), наименьшее – при добавлении монофенола и гидрохинона (на 27 и 37 %, соответственно). Известно, что монофенол является летучим соединением и очень легко подвергается биохимическому окислению. Очевидно, что на вторые сутки инкубирования значительная часть монофенола была элиминирована из водной среды, поэтому его фактическая концентрация в среде была существенно ниже 1 мг/л. Подтверждением этому служат проведенные нами ранее эксперименты с инкубированием растений в водной среде с разными концентрациями монофенола. В результате этих экспериментов установлено, что при исходной концентрации в воде не

только 1 мг/л, но и 10 мг/л, монофенол не обнаруживался уже через 7 суток (даже в контрольных вариантах, при отсутствии растений).

Таблица 1. Активность полифенолоксидазы, содержание флавоноидов и содержание ТБК-реагирующих продуктов в листьях *Eloдея densa* при инкубировании в водной среде с различными фенольными соединениями

<i>Вариант опыта</i>	<i>Активность полифенолоксидазы, мкМ/г сухой массы·мин</i>	<i>Содержание флавоноидов, мг/г сухой массы</i>	<i>Содержание ТБК-реагирующих продуктов, мМ/г сухой массы</i>
Контроль	224,5±17,7	67,1±4,5	0,37±0,02
Монофенол, 1 мг/л	164,8±11,9	50,7±3,7	0,38±0,04
Гидрохинон, 1 мг/л	140,3±6,1	88,3±13,4	0,36±0,02
Пирокатехин, 1 мг/л	100,8±0,0	41,8±3,3	0,26±0,03
Резорцин, 1 мг/л	99,2±4,7	51,2±3,9	0,30±0,02

Примечание: ± ошибка среднего.

Характерной реакцией высших растений на действие абиотических стрессоров является накопление флавоноидов (природные биологически активные соединения, представляющие собой гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце) в различных компартментах растительной клетки. Флавоноиды в растительных организмах выполняют целый ряд функций, включая и защитную. Значительное повышение концентрации флавоноидов может свидетельствовать о наличии негативного воздействия на организм растения [20]. Как правило, в растениях, способных адаптироваться к действию стрессора, наблюдается более значительное их накопление по сравнению с растениями, отличающимися низкой резистентностью и, соответственно, слабой адаптивной реакцией.

Содержание флавоноидов в листьях элодеи за двое суток инкубирования в вариантах с пирокатехином, резорцином и фенолом понизилось на 38, 23 и 24 %, соответственно, в варианте с гидрохиноном – возросло на 32 % по сравнению с контролем (табл. 1).

Такое поведение флавоноидов можно объяснить, исходя из физико-химических особенностей исследованных ФС. Известно, что пирокатехин обладает слабой летучестью, вследствие чего его элиминация из среды инкубирования выражена значительно слабее, чем у монофенола. Кроме того, пирокатехин способен образовывать промежуточные продукты окисления, в частности, бензохиноны, которые обладают несопоставимо более высокой реакционной способностью, чем соответствующие им ФС. Хиноны с большой скоростью вовлекаются в реакции присоединения, окислительной конденсации или окислительно-гидролитического распада с различными веществами, находящимися как в водных растениях, так и в окружающей их среде, включая ФС, вследствие чего происходит снижение их токсичности. Вместе с тем, при высоких концентрациях токсикантов в среде обитания повреждаются сами растения, а также ослабляется их способность удалять ФС. При этом угнетение физиологических процессов макрофитов проявляется тем сильнее, чем интенсивнее идет превращение ФС в хиноны [6].

В нашем исследовании содержание флавоноидов в листьях *Elodea densa*, инкубированной с пирокатехином, уменьшилось на 38 %, по сравнению с контролем, активность ПФО упала на 55 %.

Существенную роль в откликах растений на действие неблагоприятных факторов играют липиды, участвующие в адапционных механизмах клеток как непосредственно, так и через многообразные метаболические пути. Одной из универсальных реакций на изменение условий обитания, включая загрязнение, является индукция свободнорадикальных процессов и, в частности, перекисного окисления липидов (ПОЛ). В результате активации ПОЛ в клетке накапливаются гидропероксиды, диеновые конъюгаты, кетодиены, ТБК-реагирующие продукты, шиффовы основания, обладающие выраженным токсическим эффектом [1].

Как показали исследования (табл. 1), в листьях *Elodea densa*, инкубированной с пирокатехином, не только упала активность ПФО и уменьшилось содержание флавоноидов, но и снизилась интенсивность ПОЛ (на 30 %).

Снижение ПОЛ по сравнению с контролем, вероятно, свидетельствует о частичном разрушении ТБК-реагирующих продуктов под действием пирокатехина, в результате чего они были обнаружены в меньшем количестве, чем было образовано в действительности. Все это свидетельствует о высокой токсичности пирокатехина для данного растения.

Хиноидный путь – лишь один из возможных путей проявления токсичности ФС. Как было уже отмечено, содержание флавоноидов в листьях *Elodea densa*, инкубированной с резорцином, уменьшилось на 23% по сравнению с контролем, активность ПФО упала на 56%, интенсивность ПОЛ снизилась на 19% (табл. 1). Следовательно, резорцин оказывал не менее токсичное действие на *Elodea densa*, чем пирокатехин. Известно, что резорцин не подвергается окислению ПФО, то есть токсическое действие резорцина не связано с образованием хинонов. Имеются данные [6], что некоторые ФС токсичны для растений из-за повышенных электроноакцепторных свойств в связи с их способностью образовывать хелатные комплексы и выступать в роли денатурирующих агентов или биологических депрессантов. Очевидно, в некоторых случаях фитотоксичность ФС может отражать суммарный эффект, который определяется одновременно различными свойствами молекулы. Вопрос о том, какие именно свойства резорцина лежат в основе его фитотоксичности, остается не совсем ясным.

Содержание флавоноидов в листьях *Elodea densa*, инкубированной с гидрохиноном, возросло на 32 %, по сравнению с контролем, активность ПФО уменьшилась на 37 %, интенсивность ПОЛ осталась на уровне контроля. Физико-химические свойства гидрохинона сходны с некоторыми свойствами резорцина, однако, судя по увеличению содержания флавоноидов в листьях растений, гидрохинон является менее токсичным для *Elodea densa* по сравнению с другими ФС.

Подтверждением этому служат проведенные нами эксперименты с инкубированием *Elodea densa* в течение двух месяцев с разными концентрациями гидрохинона. Было обнаружено, что данное растение проявляло резистентность к гидрохинону: при всех концентрациях токсиканта был отмечен интенсивный рост новых побегов (табл. 2). При концентрации гидрохинона 10 мг/л прирост побегов элодеи за два месяца был в 3 раза выше по сравнению с контролем. Площадь поверхности и объем клеток в завершивших рост и дифференцировку функционально активных листьях средней части вегетативных побегов *Elodea densa* также возрастали с увеличением концентрации гидрохинона (табл. 2).

Следует отметить, что, согласно имеющимся в литературе данным [6], интенсивный рост побегов в присутствии ФС был отмечен и на *Elodea canadensis*. Известно, что для обеспечения длительной вегетации элодеи канадской необходимо поступление извне органических веществ, пусть даже таких, как фенолы.

Интенсивные исследования детоксикационных способностей растений, проводимые в разных странах, наглядно показывают возможность эффективного использования растительности для создания ряда качественно новых фитотехнологий. Однако подавляющая часть исследований, проводимых в этом направлении, посвящена изучению роли растений в аккумуляции и детоксикации тяжелых металлов, в то время как по органическим поллютантам в литературе имеются лишь разрозненные сведения.

Таблица 2. Анатомо-морфологические параметры побегов *Elodea densa*, выросших при различных концентрациях гидрохинона

Показатель, единицы измерения	Контроль	Концентрация гидрохинона, мг/л		
		0,1	1,0	10,0
Площадь поверхности клетки листа, тыс. мкм ²	12,30±0,81	15,76±0,86	22,70±1,18	22,11±1,75
Объем клетки листа, тыс. мкм ³	120,62±12,53	165,61±14,33	285,70±25,74	304,00±36,83
Прирост побегов, см	2,50±0,61	5,20±1,17	5,50±0,76	7,30±0,34

± ошибка среднего

Проведенные нами исследования по выращиванию элодеи в среде с гидрохиноном, в результате которых отмечены усиление прироста побегов и увеличение размеров клеток, свидетельствуют о способности водных растений не только адаптироваться к высоким концентрациям в воде некоторых ФС, но и использовать их в процессе своей жизнедеятельности.

Для повышения эффективности биологической очистки или доочистки вод от ФС необходимо знать, для какой конкретной ситуации и каких токсикантов, использование каких видов макрофитов окажется оптимальным.

Следует отметить, что ФС обладают синергическим эффектом при воздействии на объекты окружающей среды: совместное токсическое действие нескольких соединений может превышать сумму эффектов отдельных соединений [1]. Поэтому при разработке фиторемедиационных технологий, направленных на очистку вод от ФС, необходимо также учитывать их совместный эффект.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали следующее:

1. Под действием всех исследованных экзогенных фенольных соединений активность ПФО в листьях *Elodea densa* снижалась по сравнению с контролем.

2. Изменения, вызванные действием фенольных соединений на содержание флавоноидов в листьях элодеи, оказались неоднозначными: инкубирование растений в присутствии большинства экзогенных ФС привело к снижению содержания флавоноидов, в то время как под влиянием гидрохинона их количество возрастало. Значения анатомо-морфологических показателей побегов, выросших в присутствии гидрохинона, также увеличились.

3. При инкубировании *Elodea densa* с фенолом и гидрохиноном интенсивность ПОЛ не изменялась, тогда как при инкубировании с резорцином и пирокатехином происходило снижение содержания ТБК-реагирующих продуктов.

4. На основании полученных данных можно заключить, что пирокатехин и резорцин более токсичны для растений по сравнению с монофенолом и гидрохиноном.

5. Выявление биохимических основ взаимовлияния водных растений и ФС представляется важным для понимания роли макрофитов в процессах самоочищения водных объектов, для разработки научно обоснованных методов интенсификации фиторемедиационных технологий и для прогнозирования трансформации ФС в водоемах и водотоках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. 400 с.
2. Вода России. Экосистемное управление водопользованием / под ред. А.М. Черняева; ФГУП РосНИИВХ. Екатеринбург: Изд-во «АКВА-ПРЕСС», 2000. 356 с.
3. Общая экология: уч. пос. / под ред. А.С. Степановских [и др.]. М.: ЮНИТИ, 2000. 510 с.
4. Водные ресурсы Свердловской области / под ред. Н.Б. Прохоровой; ФГУП РосНИИВХ. Екатеринбург: АМБ, 2004. 432 с.

5. Государственный доклад о состоянии окружающей среды и влиянии факторов среды обитания на здоровье населения Свердловской области в 2008 году. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2009. 354 с.
6. Кирсо У.Э., Стом Д.И., Белых Л.И., Ирха Н.И. Превращение канцерогенных и токсических веществ в гидросфере. Таллин: Валгус, 1988. 271 с.
7. Лилле Ю.Э., Кундель Х.А. Добыча и переработка горючих сланцев. Вып. 16. Л.: Недра, 1967. 250 с.
8. Никитин В.М., Оболенская А.В., Щеголев В.П. Химия древесины. М.: Лесн. пром-сть, 1978. 368 с.
9. Попов А.Н., Сапрыкина А.Ю. Влияние физико-химических и биохимических факторов на процессы деградации водорастворимой фракции нефти в воде // Водное хозяйство России. 2002. Т. 4. № 6. С. 530–536.
10. Винберг Г.Г., Сивко Т.Н. Участие фотосинтезирующих организмов планктона в процессах самоочищения загрязненных вод // Гидробиология и ихтиология внутренних водоемов Прибалтики. Рига. 1963. С. 34–39.
11. Телитченко М.М. О возможности управления процессами самоочищения биологическими методами // Теория и практика биологического самоочищения загрязненных вод. М. 1972. С. 29–34.
12. Филимонова Н.А. Бактериопланктон и бактериальный перифитон в различных биотопах Сямозера // Микробиология. 1965. Т. 34. № 1. С. 133–139.
13. Кузьменко М.И., Станшевская Т.Ю. Пероксидазное окисление экзогенных метаболитов в культуре *Nostoc muscorum* (Ag) Elenk // Гидробиологический журнал. 1977. Т. 13. № 3. С. 67–73.
14. Кравец В.В. Интенсификация процессов доочистки и обеззараживания сточных вод в биологических прудах и их санитарная оценка // Водные ресурсы. 1976. № 5. С. 205–209.
15. Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей. М.: Пищ. промышленность. 1972. 335 с.
16. Tront Jacqueline M. Plant activity and organic contaminant processing by aquatic plants: dissertation presented to the academic faculty. Georgia. 2004. 341 p.
17. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. 334 с.
18. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии: уч. пос. СПб: Лань, 2006. 256 с.

19. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189–198.
20. Храмова Е.П., Тарасов О.В., Крылова Е.И., Сыева С.Я. Особенности накопления флавоноидов у растений в условиях радиоактивного загрязнения // Вопросы радиационной безопасности. 2006. № 4. С. 13–20.

Сведения об авторах

Борисова Галина Григорьевна, д. г. н, профессор кафедры физиологии и биохимии растений, Уральский государственный университет им. А.М.Горького (УрГУ), 620083, г. Екатеринбург, пр. Ленина 51, УрГУ, биологический факультет, кафедра физиологии и биохимии растений; e-mail: borisova59@mail.ru;

Кислицина Мария Николаевна, магистрант кафедры физиологии и биохимии растений УрГУ, г. Екатеринбург; e-mail: Kislitsina@KM.ru;

Чукина Надежда Владимировна, ассистент кафедры физиологии и биохимии растений УрГУ, г. Екатеринбург; e-mail: nady_dicusar@mail.ru.