

УДК 581.526:581.17:581.132

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РОГОЛИСТНИКА ПОГРУЖЕННОГО НА ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

© К.А. Поморцева, Г.Г. Борисова

Исследовали ответные реакции роголистника погруженного (*Ceratophyllum demersum* L.) при действии сульфата кадмия в условиях гипотермии и экстремальных значений pH. Определены показатели интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность пероксидазы и содержание водорастворимых антиоксидантов. Инкубация растений при 4° С в течение 48 ч приводила к снижению интенсивности ПОЛ и активности пероксидазы. Содержание водорастворимых антиоксидантов при этом увеличивалось. У растений при одновременном действии кадмия и низких положительных температур наблюдалось уменьшение интенсивности ПОЛ. Однако активность пероксидазы и содержание антиоксидантов повышались. В эксперименте с pH установлено, что интенсивность ПОЛ и активность пероксидазы в листьях *C. demersum* зависели не столько от действия ионов кадмия, сколько от варьирования значений кислотности.

Ключевые слова: *Ceratophyllum demersum* L., стрессовые факторы, кадмий, низкая положительная температура, pH, малоновый диальдегид, гваяколовая пероксидаза, низкомолекулярные антиоксиданты.

Живые организмы в естественных условиях обитания подвергаются, как правило, влиянию комплекса факторов окружающей среды. В литературе имеется достаточно много данных о действии отдельных факторов на растения на клеточном уровне организации [1–3], что нельзя сказать про исследования по влиянию разных стрессоров при одновременном действии. Это связано со сложностью моделирования эффектов нескольких факторов, а также трудностями при разграничении их влияния при сопряженном действии.

В связи с этим в настоящее время особенно актуальными являются вопросы изучения адаптации и устойчивости живых организмов, в том числе растений, к сопряженному действию неблагоприятных факторов. В данном исследовании акцент ставился на определение вклада стрессоров при действии кадмия в условиях гипотермии и экстремальных значений pH. Изучение гипотермии как фактора, способного вызывать стресс, значимо вследствие того, что Урал является терри-

торией, подверженной возврату холодов. Исследования реакций растений по влиянию pH важны по причине возрастающей техногенной деятельности, которая ведет к выпадению кислотных осадков, следовательно, к подкислению почв и вод. Это сказывается как на наземных, так и на водных растениях. Данных о действии поллютантов на водные растения в условиях гипотермии немного, а сведения о действии разных значений pH на растения вообще единичны.

Целью работы являлась оценка ответных реакций высших водных растений на действие комплекса неблагоприятных факторов в модельном эксперименте.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования был роголистник погруженный (*Ceratophyllum demersum* L.). Первая серия экспериментов была направлена на изучение влияния Cd^{2+} и гипотермии (по отдельности и совместно) на показатели антиоксидантного статуса роголистника.

ПОМОРЦЕВА Ксения Алексеевна, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, e-mail: pomor-a.kseniia@list.ru

БОРИСОВА Галина Григорьевна – д.г.н., Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, e-mail: borisova59@mail.ru

Растения инкубировали в течение 2-х суток в дистиллированной воде с добавлением сульфата кадмия в концентрации 1 мг/л (в расчете на ион) при комнатной температуре и в условиях гипотермии (4°С). Условия гипотермии были смоделированы путем экспозиции опытных образцов растений в холодильной камере. В качестве контрольных вариантов использовали растения, инкубированные в дистиллированной воде при комнатной температуре.

Во второй серии экспериментов растения инкубировали в дистиллированной воде при разных значениях рН (4; 6; 8) с добавлением соли кадмия в течение 24 ч. В качестве контрольных вариантов использовали растения, инкубированные в дистиллированной воде при тех же значениях рН без поллютанта. После инкубации растительный материал гомогенизировали, центрифугировали и определяли ПОЛ, активность пероксидазы и содержание водорастворимых антиоксидантов.

Определение интенсивности ПОЛ проводили в супернатанте по содержанию малонового диальдегида (МДА) [4].

Активность гваяколовой пероксидазы определяли по увеличению оптической плотности реакционной среды при длине волны 470 нм каждые 10 с на спектрофотометре [5]. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов (ВАО) проводили по методике Рогожина [6], основанной на способности хлорного железа (Fe³⁺) окислять антиоксиданты.

Каждое определение проводили в трехкратной аналитической повторности. Математическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2007. В табл. 1 и 2 представлены средние значения показателей и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение. Степень стресса у роголистника погруженного на действие неблагоприятных факторов оценивали по изменению физиолого-биохимических показателей, отражающих его антиоксидантную активность.

Интенсивность ПОЛ относительно контроля снижалась во всех вариантах, что свидетельствует об уменьшении повреждения мембран в связи с адаптацией растений к комплексу неблагоприятных факторов. В среде с добавлением кадмия в условиях гипотермии низкие положительные температуры, возможно, уменьшали токсический эффект действия кадмия (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Содержание МДА и активность пероксидазы в листьях роголистника при инкубировании в среде с кадмием в условиях гипотермии

Определяемые показатели	25°С	4°С
Среда без внесения кадмия		
Содержание МДА, мМ/г сухой массы	0,08 ± 0,005	0,06 ± 0,003
Активность пероксидазы, мкМ/г сухой массы·мин	3,42 ± 0,071	2,44 ± 0,089
Среда с кадмием		
Содержание МДА, мМ/г сухой массы	0,04 ± 0,004	0,03 ± 0,001
Активность пероксидазы, мкМ/г сухой массы·мин	1,82 ± 0,069	2,39 ± 0,065

В варианте без внесения кадмия при 4°С наблюдалось снижение активности пероксидазы по сравнению с контролем. Вероятно, это связано с ингибированием фермента в условиях гипотермии. Однако добавление сульфата кадмия при пониженной температуре сопровождалось возрастанием активности данного фермента по сравнению с его активностью при комнатной температуре. Это можно объяснить тем, что при сочетании неблагоприятных факторов наблюдался окислительный стресс, что повлекло за собой усиление работы ферментативного аппарата, направленного на ликвидацию активных форм кислорода. Содержание ВАО увеличивалось по сравнению с контролем как при действии гипотермии и кадмия по отдельности, так и при одновременном их влиянии.

Следует отметить, что при окислительном стрессе ферментативная антиоксидантная система иногда может становиться неэффективной. Причины этого – быстрая инактивация конститутивного пула ферментов

свободными радикалами, а также значительное время, необходимое для индукции их синтеза [7]. В этих условиях повышается роль низкомолекулярных неферментативных антиоксидантов.

Таким образом, снижение активности исследуемого фермента на фоне уменьшения ПОЛ может быть связано с непосредственным участием антиоксидантов в нейтрализации поллютантов и наступлении стадии адаптации.

На поглощение металлов растениями из среды обитания, избыток которых может привести к накоплению активных форм кислорода, существенное влияние оказывает значение pH. Результаты эксперимента по изучению действия кадмия при разных значениях pH представлены в табл. 2.

Инкубирование растений при разных значениях pH вызывало изменения антиоксидантной активности. Установлено, что наибольшая интенсивность ПОЛ в контроле (без внесения кадмия) наблюдалась при pH=8,0, в то время как при pH=4,0 была на таком же уровне, как при pH=6,0. Следует отметить, что в контрольном варианте при pH=8,0 на фоне возрастания повреждения мембран не происходило повышения активности пероксидазы (см. табл. 2). По-видимому, это может быть связано с развитием окислительного стресса, который является одним из ранних ответов на стрессовое воздействие любой природы. Растения в этом опыте инкубировали 24 ч, поэтому система антиоксидантной защиты не успела за такой короткий промежуток времени активироваться, и не произошло разрушение продуктов ПОЛ. Активность пероксидазы в варианте с кадмием при pH=6,0 была максимальной. Добавление кадмия в среду инкубирования при pH=8,0 привело к возрастанию активности фермента по сравнению с контролем, а при pH=4,0 – к ее снижению. За счет работы пероксидазы происходило снижение содержания пероксида, что, очевидно, приводило к уменьшению интенсивности ПОЛ.

Содержание МДА и активность пероксидазы в листьях роголистника при инкубировании в среде с добавлением кадмия при разных значениях pH

Определяемые показатели	pH 4,0	pH 6,0	pH 8,0
Контроль (без внесения кадмия)			
Содержание МДА, мМ/г сухой массы	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,009	0,07 ± 0,002
Активность пероксидазы, мкМ/г сухой массы·мин	8,90 ± 2,380	10,42 ± 0,014	7,51 ± 0,066
Среда с кадмием			
Содержание МДА, мМ/г сухой массы	0,08 ± 0,009	0,05 ± 0,016	0,03 ± 0,006
Активность пероксидазы, мкМ/г сухой массы·мин	6,56 ± 0,061	10,63 ± 0,381	10,21 ± 0,135

Заключение. Установлено, что при одновременном действии сульфата кадмия и гипотермии наблюдалось изменение физиолого-биохимических показателей роголистника погруженного. Происходило уменьшение ПОЛ, при этом усиливалась активность пероксидазы и увеличивалось содержание водорастворимых антиоксидантов. Активация этих звеньев антиоксидантной защиты, вероятно, может служить индикатором сильного действия такого токсического соединения, как кадмий. При сопряженном действии кадмия и pH основное влияние на изменение показателей оказывало значение кислотности среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.
2. Крылова Е.Г. Влияние солей никеля, меди и цинка на прорастание семян и начальные этапы онтогенеза поручейника широколистного (*Sium latifolium* L.) и камыша лесного (*Scirpus sylvaticus* L.) // Биология внутренних вод. 2011. № 4. С. 72–78.
3. Попова А.С., Кузьмина С.С., Павлова А.С. Последствие низких положительных температур на антиоксидантную защиту проростков растений // Наука и образование. 2005. № 2(38). С. 33–37.

4. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 287–297.

5. Chance B., Maehly A.C. Assay catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. N.Y.: Academic Press. 1955. P. 764–775.

6. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии: уч.-метод. пособие. СПб.: Лань, 2006. 256 с.

7. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // *Успехи современной биологии*. 1993. Т. 113, № 4. С. 456–470.



THE RESPONSE OF *CERATOPHYLLUM DEMERSUM* L. TO THE COMBINED IMPACT OF MULTIPLE STRESSORS

© К.А. Pomortseva, G.G. Borisova

Studies have been performed to assess the response of *Ceratophyllum demersum* L. to the impact of cadmium sulphate under hypothermia and at extreme values of pH. We have determined the lipid peroxidation intensity, peroxidase activity and the content of water-soluble antioxidants. Incubation of plants at 4°C for 48 hours resulted in a decrease in the lipid peroxidation intensity and peroxidase activity. Water soluble antioxidants therewith showed an increase in their content. A decrease in the lipid peroxidation intensity of the plants was observed under the simultaneous impact of cadmium and low positive temperatures. In this case the peroxidase activity and antioxidant content increased. It was found in the experiment with pH that lipid peroxidation and peroxidase activity in the leaves of *C. demersum* depended not so much on the impact of cadmium ions, as on varying acidity.

Key words: *Ceratophyllum demersum* L., stressor, cadmium, low positive temperature, pH, malondialdehyde, guaiacol peroxidase, low molecular weight antioxidants.