

На правах рукописи



КИСЛИЦИНА МАРИЯ НИКОЛАЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ**

Специальности 03.02.08 – экология (биология)

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тольятти – 2017

Работа выполнена на кафедре экспериментальной биологии
и биотехнологий Уральского федерального университета
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина

- Научный руководитель:** **Борисова Галина Григорьевна,**
доктор географических наук, профессор кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург)
- Официальные оппоненты:** **Соловьева Вера Валентиновна,**
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биологии, экологии и методики обучения Самарского государственного социально-педагогического университета (г. Самара)
- Алябышева Елена Александровна,**
кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры экологии Марийского государственного университета (г. Йошкар-Ола)
- Ведущая организация:** **Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (г. Сыктывкар)**

Защита состоится **31 мая 2017 г. в 12³⁰ ч.** на заседании диссертационного совета Д 002.251.02 при Институте экологии Волжского бассейна РАН по адресу: 445003, Самарская обл., г. Тольятти, ул. Комзина, 10.

Тел.: 8(8482) 489977, e-mail: ievbras2005@mail.ru

Диссертационный совет Д 002.251.02: тел: 8 (8482) 48-95-76, e-mail: dis-sovietievb@mail.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ИЭВБ РАН, на сайте ИЭВБ РАН по адресу <http://www.ievbras.ru> и на сайте ВАК <http://www.vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



А.Л. Маленев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время значительная часть водных объектов подвергается постоянному техногенному воздействию. Среди компонентов сточных вод различных производств особую опасность из-за широкой распространенности, токсичности и трудности очистки представляют фенольные соединения (ФС) (Стом, 1982). Для ряда регионов Российской Федерации характерно многокомпонентное загрязнение окружающей среды. Наряду с ФС доминирующими поллютантами являются тяжелые металлы (ТМ) (Государственный доклад..., 2014). Находясь вместе, токсичные вещества способны оказывать более сильное воздействие на живые организмы, по сравнению с отдельно взятыми (Янин, 2004; Моисеенко, 2009).

Несмотря на десятки лет поступления ФС в гидроэкосистемы, проблема загрязнения водных объектов остается нерешенной. Недостаточно исследованы механизмы адаптации водных макрофитов к действию ФС. Практически отсутствуют сведения о совместном влиянии ФС и ТМ. Между тем, водные растения в значительной степени определяют биологическую продуктивность гидроценоза, а следовательно, его успешное существование. В связи с этим, изучение воздействия приоритетных загрязняющих веществ представляется актуальным и может быть полезным для прогнозирования реакций видов в случае техногенных аварий и при разработке технологий фиторемедиации.

Цель исследования: выявить ответные реакции высших водных растений на действие экзогенных ФС для оценки адаптационных возможностей макрофитов к существованию в загрязненной фенолами среде обитания.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести исследование воздействия экзогенных фенолов на анатомо-морфологические параметры водных макрофитов из природных местообитаний и в модельных системах.
2. Изучить физиолого-биохимические показатели водных макрофитов, подвергающихся действию ФС.
3. Исследовать эффекты совместного влияния разных экзогенных ФС на водные макрофиты.
4. Изучить совместное влияние ФС и ТМ на структурно-функциональные показатели водных макрофитов.

Научная новизна. Впервые проведен комплексный анализ эколого-физиологических параметров водных макрофитов, подверженных фенольному загрязнению. Показано, что загрязнение водной среды ФС вызывает формиро-

вание защитных реакций у водных макрофитов, связанных с увеличением размеров клеток и хлоропластов, количества хлоропластов и толщины листа, а также возрастанием содержания растворимых белков и снижением активности фермента дифенолоксидазы. Впервые установлено, что адаптация водных макрофитов к действию комплекса экзогенных ФС приводит к увеличению устойчивости к их повышенным концентрациям при последующем воздействии. Впервые исследовано совместное действие ФС и ТМ на мезоструктуру и физиолого-биохимические показатели водных макрофитов. Выявлены эффекты синергизма и антагонизма между некоторыми изученными ФС и ТМ.

Теоретическая и практическая значимость. Выявлены анатомо-морфологические и физиолого-биохимические адаптивные реакции водных растений к действию экзогенных ФС. Определена зона резистентности к действию резорцина и гидрохинона для *Elodea canadensis*, *Lemna minor*, *Batrachium trichophyllum*, *Potamogeton perfoliatus*. Исследование ответных реакций водных макрофитов на действие ФС представляет практический интерес. Выявление видов растений, обладающих повышенными адаптационными возможностями, необходимо для повышения эффективности технологий биологического мониторинга и фиторемедиации водных объектов. Материалы диссертационной работы использованы в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии стресса и вторичному метаболизму растений. Разработана компьютерная программа «Контур-Шейд», позволяющая определять площадь проекции растительных объектов по фотографии или сканированному изображению, что существенно облегчает исследование морфометрических характеристик растений и позволяет проводить исследования в полевых условиях, не повреждая само растение. Это дает возможность отследить рост или степень повреждения листьев растений в динамике при проведении долгосрочных экспериментов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Водные макрофиты способны существовать в условиях фенольного загрязнения за счет формирования морфофизиологических реакций, направленных на детоксикацию или предотвращение повреждающего воздействия ФС.
2. Устойчивость к резкому повышению концентрации ФС во внешней среде выше у макрофитов из загрязненной среды обитания.
3. Эффекты совместного влияния ФС на водные макрофиты зависят от их комбинации, концентрации, способности подвергаться трансформации.
4. ФС при одновременном действии с ТМ могут проявлять эффекты синергизма или антагонизма.

Степень достоверности и апробация результатов. Надежность полученных результатов обусловлена использованием комплекса классических и современных методов исследования, большим объемом фактического материала и статистическим анализом полученных данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 2009), «Актуальные проблемы экологии» (Белоруссия, Гродно, 2014); на международных конгрессах: «Eurobiotech 2010» (Польша, Краков, 2010), «Tropical Ecology Congress 2014» (Индия, Нью-Дели, 2014); на международных симпозиумах: «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012; 2015), «Oxidative stress and cell death in plants: mechanisms and implications» (Италия, Флоренция, 2013), на всероссийских конференциях: «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013), «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015).

Поддержка исследований. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»: ГК № П2364, № П1301 и при поддержке Минобрнауки РФ (гос. задание № 4.1663.2011).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 26 работ, в том числе 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК. Получено свидетельство РФ о регистрации программы расчета площади объектов на плоскости «Контур-Шейд».

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 3-х глав, заключения, выводов и списка использованных источников. Изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 46 рисунков. Библиографический список включает 212 источников, из которых 76 – изданы за рубежом.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность д.г.н. Г.Г. Борисовой за помощь в проведении экспериментальной части исследования и ценные советы на протяжении всей работы над диссертацией, а также всем преподавателям и сотрудникам кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Обзор литературы

В данной главе приводится общая характеристика экзогенных ФС, обобщаются сведения об их фитотоксичности (Стом и др., 1978; Stom & Roth, 1981; Запрометов, 1993; Park et al., 2012; Saerong et al., 2015).

Рассмотрены механизмы поглощения, транспорта и метаболизации ФС водными макрофитами (Roy et al., 1994; Hafez et al., 1998; Квеситадзе и др., 2005; Tront, 2009; Быкова и др., 2011). Обобщены литературные данные, описывающие ответные реакции макрофитов на фенольное загрязнение (Стом, 1970; 1982; Ensley et al., 1994; Roy & Hanninen, 1994; Barber et al., 1995; Ensley et al., 1997; Sharma et al., 1997; Day, 2002; Квеситадзе и др., 2005).

2 Объекты и методы исследования

2.1 Характеристика района исследований

Для решения поставленных задач были выбраны водотоки Свердловской области: р. Ляля и р. Сысерть. Река Ляля характеризуется высокой степенью загрязнения ФС на участке русла ниже производственных стоков Новолялинского целлюлозно-бумажного комбината (НЦБК): в отдельные годы их концентрация достигала 52 ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения (Доклад об экологической ситуации... 2011; 2012; Государственный доклад..., 2014). Основные характеристики воды из р. Ляля представлены в табл. 1. Отбор водных макрофитов из р. Ляля производили выше ($59^{\circ} 02'$ с.ш. $60^{\circ} 33'$ в.д.) и ниже ($59^{\circ} 03'$ с.ш. $60^{\circ} 36'$ в.д.) производственных стоков НЦБК. Для проведения модельных экспериментов использовали растения из р. Сысерть ($56^{\circ} 36'$ с.ш. $61^{\circ} 05'$ в.д.; $56^{\circ} 35'$ с.ш. $61^{\circ} 03'$ в.д.) и из фонового участка р. Ляля, где превышения ПДК по ФС отмечено не было (условно чистые местообитания).

Таблица 1

Характеристика воды р. Ляля выше и ниже производственных стоков НЦБК

Параметр	Зона 1	Зона 2	Параметр	Зона 1	Зона 2	Параметр	Зона 1	Зона 2
pH	6,6	7,1	ХПК, мг $O_2/дм^3$	14,4	39,2	Фенолы, мг/ $дм^3$	Не обна- ру- жены	0,01
Цветность в градусах	86	160	Растворен- ный O_2 , мг/ $дм^3$	8,40	8,9	СПАВ, мг/ $дм^3$	0,02	0,07

Параметр	Зона 1	Зона 2	Параметр	Зона 1	Зона 2	Параметр	Зона 1	Зона 2
Прозрачность в см	29	25	Сухой остаток, мг/дм ³	114,8	152,7	Фосфаты мг/дм ³	0,02	0,03
Запах в баллах	0	1	Взвешенные вещества, мг/дм ³	3,6	7,4	Азот аммонийный, мг/дм ³	0,46	0,7
Окисляемость, мг О ₂ /дм ³	6,67	18,63	Сульфаты, мг/дм ³	11,1	16,4	Нитриты, мг/дм ³	0,02	0,04
БПК ₅ , мг О ₂ /дм ³	2,07	10,41	Железо, мг/дм ³	0,7	0,8	Нитраты, мг/дм ³	0,92	1,21
БПК ₂₀ , мг О ₂ /дм ³	3,36	13,78	Нефтепродукты, мг/дм ³	0,11	0,21	Хлориды, мг/дм ³	2,11	3,03

Примечание. Зона 1 – р. Ляля выше производственных стоков НЦБК, зона 2 – р. Ляля ниже производственных стоков НЦБК.

2.2 Характеристика исследованных макрофитов

Объектами изучения были водные и прибрежно-водные макрофиты: *Elo-dea canadensis* Michx., *Egeria densa* Planch., *Potamogeton crispus* L., *Potamogeton alpinus* Balb., *Potamogeton perfoliatus* L., *Lemna gibba* L., *Lemna minor* L., *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch, *Sagittaria natans* Pall., *Sagittaria sagittifolia* L., *Alisma plantago-aquatica* L., *Sparganium emersum* Rehm.

2.3 Методы исследований

Отбор растительного материала осуществляли в июне–июле 2008–2013 гг. Исследования были проведены как на растениях из природной среды обитания, так и выращенных в аквакультуре (*E. densa*, *L. minor*). Использование моно- и дифенолов для модельных экспериментов обусловлено тем, что данные соединения являются доминирующими поллютантами сточных вод НЦБК. Выбор изучаемых параметров основан на том, что они достаточно чувствительны к воздействию экзогенных ФС в концентрации от 0,1 до 10 мг/л и обуславливают выполнение жизненно важных функций растений, метаболизацию ФС или проявляют антиоксидантные свойства, защищая растения от повреждения. При

действии стрессовых факторов ответные физиолого-биохимические реакции растений формируются достаточно быстро, что определило использование краткосрочных экспериментов (2–4 сут). Для изменения анатомо-морфологических характеристик требуется большой временной диапазон, поэтому для их оценки были проведены длительные эксперименты (30–60 сут). При исследовании физиолого-биохимических показателей прибрежно-водных растений использовали только плавающие листья. В эколого-физиологической части исследования проанализировано и обработано 852 пробы. При исследовании флуктуирующей асимметрии *P. perfoliatus* и *S. natans* собрано 210 листовых пластинок каждого вида и произведено 2100 промеров выбранных параметров. Методы исследования представлены ниже.

Активность о-дифенолоксидазы (ДФО) определяли титриметрическим методом с использованием аскорбиновой кислоты (Починок, 1976), а остальные физиолого-биохимические показатели – спектрофотометрическим. **Активность гваякол-специфичной пероксидазы (ГП)** оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола (Chance, Maehly, 1955). **Содержание растворимого белка** в растительном материале определяли по методике Брэдфорд (Bradford, 1976). **Содержание флавоноидов** оценивали в спиртовой (96 % этанол) вытяжке при длине волны 420 нм после проведения реакции с лимоннокислым борным реактивом (Рогожин, 2006). **Содержание водорастворимых антиоксидантов** определяли после проведения реакции, основанной на способности антиоксидантов реагировать с фенантролином (Рогожин, 2006). При определении **содержания аскорбиновой кислоты** за основу взят метод, разработанный Hewitt с соавторами (Hewitt et al., 1961). **Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ)** оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) (Uchiyama, 1978). **Содержание свободного пролина** определяли по методике (Bates, 1973) в модификации (Калинкина, 1990). **Содержание общего азота и фосфора** измеряли колориметрически после мокрого озоления растительного материала смесью кислот: H_2SO_4 и $HClO_4$ (Унифицированные методы..., 1973). Определение общего азота проводили с помощью реактива Несслера по методу Кьельдаля, фосфора – по методу Бриггса. В основе метода определения фосфора лежит реакция этого элемента с молибдатом аммония в кислой среде. **Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов** определяли в ацетоновой вытяжке (80 %) спектрофотометрически. Расчет хлорофиллов проводили по формуле Vernon, содержание каротиноидов рассчитывали по Wettstein (Гавриленко, 2003). **Определение показателей мезоструктуры** макрофитов проводили на растительном

материале, фиксированном в 3,5 % растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7,2) согласно методике, разработанной в УрГУ (Мокроносов, Борзенкова, 1978). Для **оценки величины коэффициента флуктуирующей асимметрии (ФА)** водных макрофитов применяли интегральный показатель – среднее относительное различие между сторонами на признак (Захаров, Крысанов, 1996). Измерения проводили с помощью электронного штангенциркуля ШЦЦ-1-125-0.01 с точностью до 0,01 мм. **Определение площади листьев макрофитов (фрондов ряски) и степени их депигментации** осуществляли с помощью компьютерной программы обработки изображений «Контур-Шейд» (Кислицина, Еремеев, 2015). Программа позволяет обвести контуры всего листа (фронда) или его поврежденной части на фотографии и автоматически получить значение площади внутри обозначенного контура.

Статистическая обработка данных. Биологическая повторность составляла не менее 10 растений, аналитическая – не менее 3. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel 2007 и Statistica 8.0. Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Средние значения показателей и их стандартные ошибки представлены в таблицах и рисунках.

3 Результаты исследований и их обсуждение

3.1 Исследование токсичности экзогенных фенолов на основе анализа анатомо-морфологических параметров водных макрофитов. Эффекты воздействия дифенолов зависели от концентрации, вида поллютанта, времени экспозиции и видовой принадлежности растений (табл. 2). Исследования показали, что для всех изученных макрофитов гидрохинон был токсичнее резорцина.

Флуктуирующая асимметрия водных макрофитов, подверженных действию ФС. Известно, что при антропогенном воздействии показатель ФА растений имеет более высокие значения (Изотов, 2003). Наши исследования показали, что достоверных различий по отдельным признакам и интегральному показателю ФА листьев *P. perfoliatus* и *S. natans* из загрязненной и условно чистой среды обитания не наблюдалось. Индекс ФА не превышал 0,04, что соответствует условной норме.

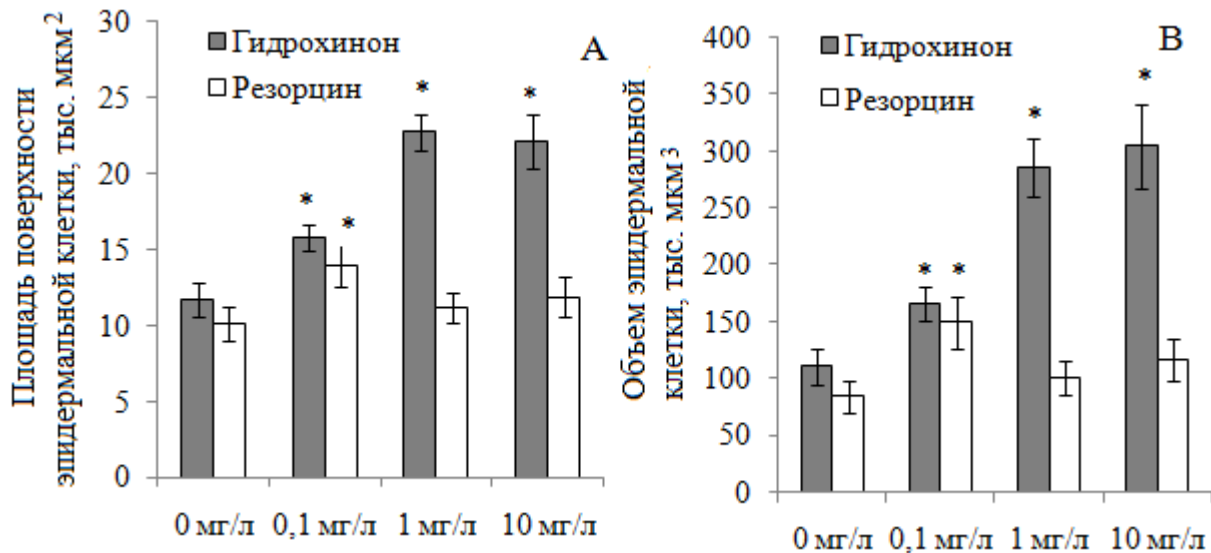
Изменение морфометрических характеристик водных макрофитов при инкубировании с ФС

Показатель	<i>L. minor</i>	<i>B. trichophyllum</i>	<i>E. canadensis</i>	<i>P. perfoliatus</i>
	Контроль (Без ФС)			
Количество корней, шт на растение	–	$\frac{0,0 \pm 0,0}{1,2 \pm 0,2}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{1,3 \pm 0,1}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{2,4 \pm 0,2}$
Длина основного побега, см	–	$\frac{15,0 \pm 0,0}{12,9 \pm 1,0}$	$\frac{15,0 \pm 0,0}{18,9 \pm 1,0}$	$\frac{15,0 \pm 0,0}{12,4 \pm 2,0}$
Количество листьев, шт на растение	–	$\frac{5,0 \pm 0,0}{4,0 \pm 0,2}$	–	$\frac{9,0 \pm 1,2}{5,0 \pm 0,2}$
Депигментация листьев (фрондов), % от общей поверхности	$\frac{0,5 \pm 0,0}{18,4 \pm 0,6}$	–	–	$\frac{0,0 \pm 0,0}{10,0 \pm 1,9}$
Гидрохинон, 1 мг/л				
Количество корней, шт на растение	–	$\frac{0,0 \pm 0,0}{\text{гибель растений}}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{0,9 \pm 0,2}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{2,0 \pm 0,2}$
Длина основного побега, см	–	$\frac{15,0 \pm 0,0}{\text{гибель растений}}$	$\frac{15,0 \pm 0,0}{21,4 \pm 1,1}$	$\frac{15,0 \pm 0,0}{9,4 \pm 0,5}$
Количество листьев, шт на растение	–	$\frac{5,0 \pm 0,0}{\text{гибель растений}}$	–	$\frac{8,8 \pm 1,2}{1,8 \pm 0,4}$
Депигментация листьев (фрондов), % от общей поверхности	$\frac{0,5 \pm 0,0}{25,0 \pm 1,2}$	–	–	$\frac{2,0 \pm 0,0}{81,3 \pm 5,2}$
Резорцин, 1 мг/л				
Количество корней, шт на растение	–	$\frac{0,0 \pm 0,0}{\text{гибель растений}}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{1,5 \pm 0,2}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{0,9 \pm 0,1}$
Длина основного побега, см	–	$\frac{15,0 \pm 0,0}{\text{гибель растений}}$	$\frac{15,0 \pm 0,0}{20,9 \pm 1,2}$	$\frac{15,0 \pm 0,0}{14,4 \pm 0,5}$
Количество листьев, шт на растение	–	$\frac{5,0 \pm 0,0}{\text{гибель растений}}$	–	$\frac{8,8 \pm 1,2}{1,8 \pm 0,5}$
Депигментация листьев (фрондов), % от общей поверхности	$\frac{0,2 \pm 0,0}{20,1 \pm 1,0}$	–	–	$\frac{14,6 \pm 0,9}{86,7 \pm 7,4}$

Примечание. Над чертой – показатели, полученные через 1 сут. инкубирования с ФС, под чертой – через 20 сут. Прочерк – данные отсутствуют

Влияние экзогенных дифенолов на мезоструктуру листа водных макрофитов. Исследование анатомических параметров листьев *E. densa* проводили на побегах, выращенных в течение 60 сут. на среде Хогланда–Арнона с добавлением гидрохинона или резорцина. Показано, что площадь поверхности (рис.

1А) и объем клеток (рис. 1В) в листьях *E. densa* возрастали по сравнению с контролем при всех концентрациях гидрохинона, а в случае с резорцином – при концентрации 0,1 мг/л. Количество хлоропластов при действии дифенолов также возрастало. Обнаружено, что при концентрации гидрохинона или резорцина 1 мг/л количество хлорофилла *a* возрастало в 1,5, а содержание каротиноидов – в 1,3–1,8 раза в сравнении с контролем. Анализ толщины листа, площади поверхности и объема хлоропластов *E. densa* не выявил различий.



* достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$

Рис. 1. Площадь поверхности (А) и объем клеток (В) *E. densa* при различных концентрациях гидрохинона и резорцина

Таким образом, выявлены изменения в мезоструктуре листа *E. densa* при действии ФС, которые можно рассматривать как защитно-приспособительные реакции, направленные на повышение устойчивости к действию дифенолов.

Изменение параметров мезоструктуры листа водных макрофитов из природных местообитаний, подверженных действию ФС. Показано, что *V. trichophyllum* и *P. perfoliatus* из импактного участка русла отличались более высокими значениями по всем изучаемым характеристикам (толщина листа, площадь поверхности, объем эпидермальных клеток и клеток мезофилла, количество хлоропластов на клетку). У *S. natans* размеры эпидермальных клеток, количество хлоропластов и толщина листа были больше, чем в фоновом участке. У *A. plantago-aquatica* отмечено увеличение толщины листа, объема эпидермальных клеток и хлоропластов. Уменьшение параметров мезоструктуры растений из загрязненного участка реки отмечено у *E. canadensis*, *S. emersum*, *S. sagittifolia*. Возрастание значений изученных характеристик, вероятно, следует считать морфофизиологическими адаптациями к загрязнению среды обитания.

Изменение параметров мезоструктуры листа водных макрофитов при совместном действии ФС и ТМ. Многие ФС в своих комбинациях с металлами могут проявлять как синергизм, так и антагонизм. Среди тяжелых металлов Ni^{2+} наименее изучен по своему влиянию на высшие водные растения (Малева, 2006). Исследование анатомо-морфологических параметров листьев *E. densa* проводили на побегах, выращенных в течение 60 сут. на среде Хогланда–Арнона с добавлением гидрохинона, резорцина (0,1–10 мг/л), сульфата никеля (0,05 мг/л Ni^{2+}) и их комбинаций. В результате исследования установлено, что гидрохинон и резорцин способны ослаблять токсическое действие Ni^{2+} , что проявлялось в увеличении прироста побегов, площади и объема клеток, количества хлоропластов в клетках *E. densa* при его совместном действии с ФС.

3.2. Физиолого-биохимические параметры водных макрофитов при действии ФС. Показано, что водные растения реагировали на хроническое загрязнение ФС по-разному (табл. 3). Тем не менее, для всех изученных растений были выявлены сходные физиолого-биохимические реакции, имеющие, очевидно, адаптивное значение. В частности, снижение **активности ДФО** позволяет растениям замедлить окисление *o*- и *n*-фенолов до еще более токсичных хинонов и экономить ресурсы организма на процессы репарации. Увеличение **содержания растворимого белка** в листьях *S. emersum*, *S. natans*, *A. plantago-aquatica* обусловлено защитной функцией белков, а также необходимостью «корректировки» процессов метаболизма растений в условиях загрязнения. Снижение **содержания свободного пролина** в листьях *E. canadensis*, *S. natans* и *A. plantago-aquatica* из импактного участка реки может свидетельствовать о том, что пролин принимал участие в нейтрализации активных форм кислорода, а также мог включиться в состав белков и пептидов (Макаренко и Левицкий, 2012).

Роль адаптации водных макрофитов к хроническому фенольному загрязнению в формировании устойчивости к действию экзогенных ФС. В наших исследованиях растения *S. emersum*, взятые из р. Ляля выше и ниже впадения фенолсодержащих сточных вод, были подвергнуты дополнительному действию монофенола (0,1; 1 и 10 мг/л) в течение 2 суток.

Установлено, что активность ДФО и ГП (рис. 2 А, В) в листьях *S. emersum* из импактного участка реки при всех концентрациях монофенола возрастала. Это свидетельствует о том, что *S. emersum* обладал лучшими детоксикационными способностями к монофенолу вследствие адаптации к хроническому загрязнению, которая могла сформироваться в естественной среде обитания *S. emersum*.

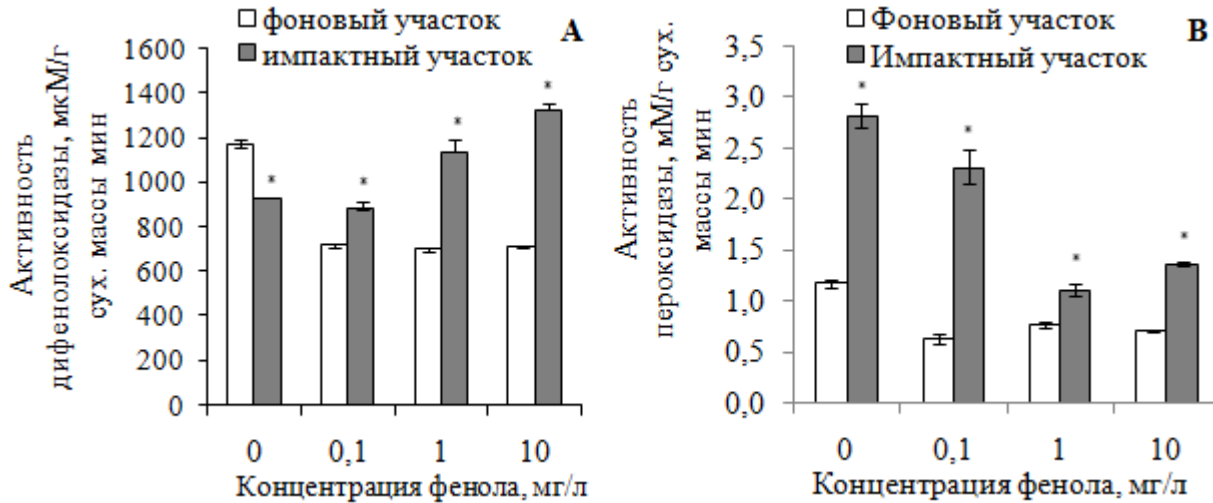
Таблица 3

Физиолого-биохимические показатели водных растений из фонового и импактного участков р. Ляля

Параметр	<i>Elodea canadensis</i>	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	<i>Sparganium emersum</i>	<i>Sagittaria natans</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>
Содержание МДА, мкМ/г сухой массы	$\frac{0,41 \pm 0,11}{0,44 \pm 0,10}$	$\frac{0,01 \pm 0,00^*}{0,13 \pm 0,06}$	$\frac{0,06 \pm 0,01^*}{0,74 \pm 0,02}$	$\frac{0,09 \pm 0,04^*}{0,28 \pm 0,06}$	$\frac{0,01 \pm 0,00^*}{0,80 \pm 0,03}$
Активность гваякол-специфичной пероксидазы, мМ/г сухой массы • мин	$\frac{0,70 \pm 0,03^*}{0,82 \pm 0,04}$	$\frac{2,35 \pm 0,02^*}{1,96 \pm 0,17}$	$\frac{3,04 \pm 0,18^*}{1,92 \pm 0,10}$	$\frac{2,95 \pm 0,11^*}{1,61 \pm 0,00}$	$\frac{0,54 \pm 0,10^*}{3,26 \pm 0,25}$
Активность дифенолоксидазы, мкМ/г сухой массы • мин	$\frac{69,24 \pm 9,89}{64,80 \pm 13,23}$	$\frac{256,50 \pm 0,00^*}{207,00 \pm 20,62}$	$\frac{403,17 \pm 26,02^*}{216,33 \pm 19,67}$	$\frac{173,33 \pm 6,93^*}{148,75 \pm 12,27}$	$\frac{986,10 \pm 0,00^*}{112,45 \pm 8,65}$
Содержание флавоноидов, мг/г сухой массы	$\frac{65,27 \pm 5,49^*}{79,29 \pm 2,29}$	$\frac{22,82 \pm 1,17^*}{18,84 \pm 0,83}$	$\frac{48,80 \pm 1,37}{46,87 \pm 4,77}$	$\frac{60,59 \pm 1,20^*}{74,84 \pm 2,26}$	$\frac{74,74 \pm 1,19^*}{63,16 \pm 3,90}$
Содержание растворимого белка, мг/г сухой массы	$\frac{222,95 \pm 2,88}{205,41 \pm 12,01}$	$\frac{102,46 \pm 3,23}{103,09 \pm 2,76}$	$\frac{213,94 \pm 5,23^*}{232,39 \pm 7,21}$	$\frac{148,86 \pm 4,33^*}{169,98 \pm 2,05}$	$\frac{170,82 \pm 0,91^*}{205,15 \pm 10,41}$
Содержание свободного пролина, мкМ/г сухой массы	$\frac{5,52 \pm 0,13^*}{4,87 \pm 0,16}$	$\frac{2,46 \pm 0,02}{2,59 \pm 0,09}$	$\frac{6,07 \pm 0,37}{6,86 \pm 0,50}$	$\frac{5,55 \pm 0,27^*}{4,40 \pm 0,10}$	$\frac{11,77 \pm 0,42^*}{4,70 \pm 0,11}$
Содержание аскорбата, мкМ/г сухой массы	$\frac{13,11 \pm 0,28^*}{10,70 \pm 0,18}$	$\frac{4,33 \pm 0,01^*}{5,11 \pm 0,03}$	$\frac{23,36 \pm 1,38^*}{15,34 \pm 0,21}$	$\frac{15,74 \pm 0,12^*}{11,96 \pm 0,08}$	$\frac{17,90 \pm 0,44^*}{14,63 \pm 0,82}$

Примечание. Над чертой – фоновый участок р. Ляля, под чертой – импактный участок р. Ляля.

* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при $p < 0.05$



* достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$

Рис. 2. Активность дифенолоксидазы (А) и гваяколовой пероксидазы (В) в листьях *S. emersum*

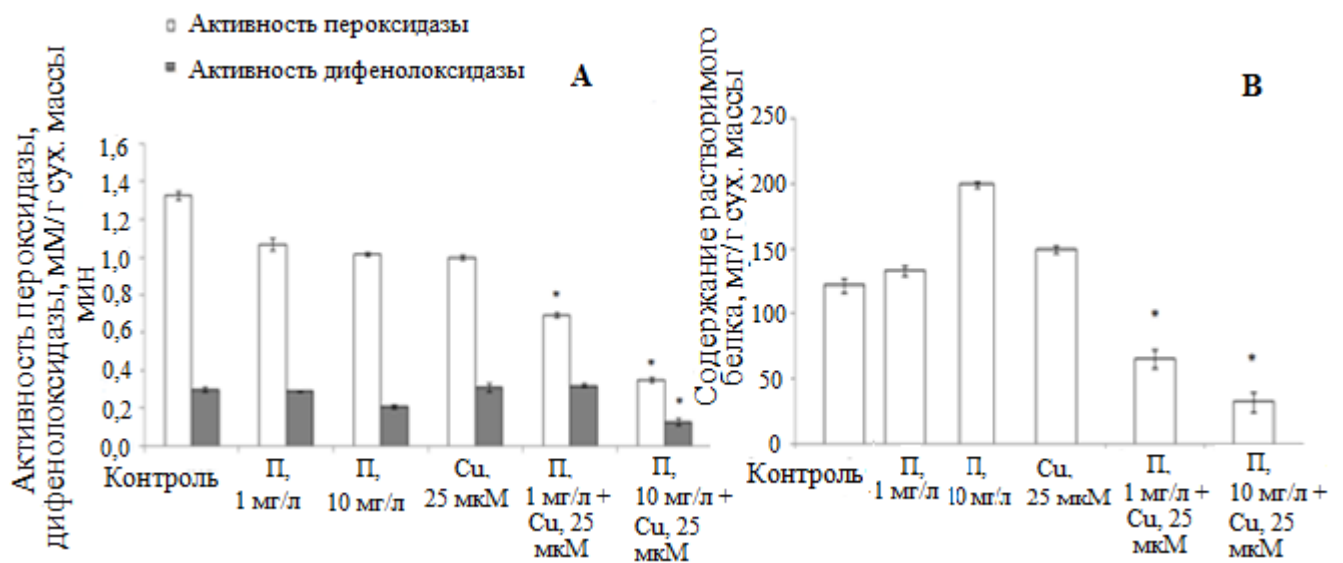
Содержание флавоноидов в листьях *S. emersum* из импактного участка реки при инкубировании с монофенолом в концентрации 0,1 мг/л и 1 мг/л было выше в 1,3–4 раза по сравнению с листьями растений из фонового участка реки, инкубированных при тех же концентрациях монофенола. При концентрации монофенола 10 мг/л содержание флавоноидов снижалось в 2 раза, что может быть связано с ингибирующим эффектом высоких концентраций монофенола на активность ферментов биосинтеза флавоноидов или истощением их пула при нейтрализации активных форм кислорода. Таким образом, способность к повышению активности ДФО и ГП и накоплению флавоноидов в листьях растений из импактного участка реки, вероятно, связана с тем, что растения за время существования в естественной среде обитания выработали устойчивость к токсическому действию экзогенных ФС.

Ответные реакции макрофитов на раздельное и совместное действие ФС. Изучение влияния экзогенных ФС на активность ДФО показало, что через 48 часов инкубирования совместное действие дифенолов в концентрации 1 мг/л приводило к снижению активности фермента у *P. crispus* в 1,2–5,6 раз по сравнению с отдельно взятыми ФС. Вероятно, при повышении суммарных концентраций ФС происходило субстратное ингибирование ДФО.

Активность ГП в листьях *P. crispus* при инкубировании в среде, содержащей пары: гидрохинон 1 мг/л + резорцин 1 мг/л или гидрохинон 1 мг/л + пирокатехин 1 мг/л была выше на 24–28%, чем в листьях, инкубированных в присутствии одного гидрохинона. Это свидетельствует о меньшей чувствительно-

сти ГП к действию ФС (по сравнению с ДФО) и указывает на возможное снижение токсичности дифенолов при их совместном действии.

Ответные реакции водных макрофитов на раздельное и совместное действие ФС и ТМ. Совместное действие ФС и ТМ было изучено на примере пирокатехина и Cu^{2+} (в форме сульфата). Через 48 часов инкубирования активность ДФО и ГП (рис. 3А), а также содержание растворимого белка (рис. 3В) в листьях растений снижались при совместном действии пирокатехина и Cu^{2+} сильнее, чем когда поллютанты действовали по отдельности. Вероятно, действие пирокатехина и ионов меди вызывало развитие окислительного стресса. В результате этого избыточное количество H_2O_2 могло ингибировать активность ГП (Аронбаев, 2015).



* достоверность отличий от вариантов, когда пирокатехин и ионы меди действовали по отдельности при $p < 0,05$

Рис. 3. Активность гваяколовой пероксидазы, дифенолоксидазы (А) и содержание растворимого белка (В) в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии пирокатехина (П) и ионов меди

Механизм инактивации ДФО окончательно не выяснен. Приводятся сведения о том, что хиноны обладают «дубящими» свойствами, а также способны взаимодействовать со свободными аминогруппами фермента (Wood, 1965; Ренсон, 1968). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о развитии эффекта синергизма, когда совместное воздействие поллютантов усиливает негативный эффект, оказываемый ими по отдельности.

Выводы

1. Показано, что экзогенные ФС в концентрации 0,01–10 мг/л способны вызывать изменение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата водных макрофитов (увеличение размеров клеток и хлоропластов, тол-

щины листовой пластинки, количества хлоропластов), что можно рассматривать как защитно-приспособительные реакции, направленные на повышение устойчивости растений к существованию в загрязненной среде обитания.

2. Выявлены сходные тенденции в изменении физиолого-биохимических параметров водных макрофитов при действии экзогенных ФС в концентрации 0,01–10 мг/л: повышение уровня ПОЛ, возрастание содержания растворимых белков, уменьшение содержания свободного пролина. Изменения активности ДФО и ПО, содержания фотосинтетических пигментов, аскорбиновой кислоты, флавоноидов под действием ФС носили видоспецифичный характер.

3. Эффекты совместного влияния экзогенных ФС могут различаться в зависимости от их комбинации, концентрации, способности подвергаться окислительному превращению.

4. При совместном действии ФС и ТМ выявлены разнонаправленные изменения эколого-физиологических параметров водных макрофитов. В определенных концентрациях гидрохинон, резорцин (0,1–10 мг/л) и Ni^{2+} (0,05 мг/л) проявляли антагонистический эффект. Пирокатехин (1–10 мг/л) и Cu^{2+} (1,6 мг/л), напротив, выступали в роли синергистов.

5. Способность к регуляции активности окислительно-восстановительных ферментов (ПО и ДФО), увеличению содержания низкомолекулярных АО, растворимых белков и изменению мезоструктурных характеристик листа повышает адаптивные возможности высших водных растений и их устойчивость к загрязнению среды обитания ФС.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из изданий, рекомендованных ВАК:

1. Борисова, Г.Г. Исследование токсического действия фенольных соединений на водные растения / Г.Г. Борисова, **М.Н. Кислицина**, Н.В. Чукина // Водное хозяйство России. – 2010. – № 4. – С. 94–103.

2. Борисова, Г.Г. Изменение структурно-функциональных характеристик элодеи при загрязнении водной среды / Г.Г. Борисова, **М.Н. Кислицина**, М.Г. Малева, Н.В. Чукина // Водное хозяйство России. – 2011. – № 5. – С. 42–49.

3. Чукина, Н.В. Влияние органических поллютантов на антиоксидантный статус элодеи / Н.В. Чукина, **М.Н. Кислицина**, М.Г. Малева, Г.Г. Борисова // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15. – № 3 (5). – С. 1506–1509.

4. Чукина, Н.В. Особенности фотосинтетического аппарата *Elodea canadensis* при действии поллютантов различной природы / Н.В. Чукина, **М.Н.**

Кислицина, Г.Г. Борисова, М.Г. Малева, Ю.А. Левченко, М.Н.В. Прасад // Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т.19. – № 4. – С. 1189–1191.

5. **Кислицина, М.Н.** Изменение анатомических и физиолого-биохимических показателей водных растений под влиянием сточных вод целлюлозно-бумажного комбината / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Биология внутренних вод. – 2015. – № 1. – С. 98–102.

6. **Кислицина, М.Н.** Ответные реакции *Lemna minor* L. на действие экзогенных фенольных соединений / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2016. – № 4 (157). – С. 54–58.

Коллективная монография:

7. **Кислицина, М.Н.** Устойчивость водных растений к фенольным соединениям. Анатомио-морфологические и физиолого-биохимические аспекты / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова. – Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing. – 2012. – 70 с.

Статьи в других журналах и материалах конференций:

8. Борисова, Г.Г. Исследование механизмов детоксикации фенолов гидробионтами / Г.Г. Борисова, **М.Н. Кислицина**, О.В. Крашенинникова, Н.В. Чукина, Н.Д. Судакова // Матер. I Междунар. конф. «Эколого-биологические проблемы Сибири и сопредельных территорий». – Нижневартовск: Изд-во Нижневартовского ун-та, 2009. – С. 63–67.

9. **Кислицина, М.Н.** Влияние фенольных соединений на активность полифенолоксидазы и содержание флавоноидов в листьях *Elodea densa* Planch. / М.Н. Кислицина, Н.В. Чукина, Г.Г. Борисова // Материалы докл. I (VII) Междунар. конф. по водным макрофитам «Гидробиотаника 2010». – Ярославль: «Принт Хаус», 2010. – С. 152–154.

10. **Кислицина, М.Н.** Изменение параметров мезоструктуры листа *Elodea densa* Planch. под действием органических и неорганических загрязнителей / М.Н. Кислицина, Н.В. Чукина, Г.Г. Борисова // Матер. Всерос. конф. с междунар. участ. молодых ученых «Биология будущего: традиции и инновации». – Екатеринбург: АМБ, 2010. – С. 124–126.

11. Борисова, Г.Г. Действие пирокатехина и меди на активность пероксидазы и полифенолоксидазы в листьях *Potamogeton crispus* / Г.Г. Борисова, **М.Н. Кислицина** // Материалы докладов VII съезда ОФР. – Нижний Новгород. – 2011. – С. 105–106.

12. Борисова, Г.Г. Исследование роли макрофитов в очистке водных экосистем от фенольных соединений / Г.Г. Борисова, **М.Н. Кислицина**, Н.В. Чу-

кина, М.Г. Малева // Матер. Междунар. конф. «Чистая вода России-2011». – Екатеринбург, 2011. – С. 15–16.

13. **Кислицина, М.Н.** Действие поллютантов и низких положительных температур на физиолого-биохимические показатели *Potamogeton crispus* L. / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова, Д.В. Колыгина // Матер. конф. с междунар. участием. – Самара, 2012. – С. 188–190.

14. **Кислицина, М.Н.** Изменение антиоксидантного статуса водных растений при действии пирокатехина в условиях гипотермии / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова, Д.В. Колыгина // «Природноресурсный потенциал, экология и устойчивое развитие регионов России»: сборник статей X Междунар. конф. – Пенза, 2012. – С. 62–64.

15. **Кислицина, М.Н.** Исследование адаптаций *Potamogeton gramineus* к поллютантам сточных вод сульфатцеллюлозных предприятий / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Матер. IV Всерос. конф. с междунар. участием «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования». – Нижний Тагил, 2012. – С. 236–237.

16. **Кислицина, М.Н.** Изменения анатомо-морфологических показателей водных растений в условиях промышленного загрязнения / М.Н. Кислицина // Матер. II Всерос. с междунар. участ. молодежной научной школы-конф.: «Биология будущего: традиции и новации». – Екатеринбург, 2012. – С. 64–66.

17. **Кислицина, М.Н.** Действие монофенола на показатели антиоксидантного статуса водных растений / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Матер. V Междунар. конф. «Современные проблемы контроля качества природной и техногенной сред». – Тамбов, 2012. – С. 26–28.

18. **Кислицина, М.Н.** Исследование влияния тяжелых металлов и экзогенных фенолов на содержание флавоноидов в листьях водных растений / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: матер. VII Междунар. симпозиума. – М., 2012. – С. 314–317.

19. **Кислицина, М.Н.** Ответные реакции водных растений на действие сточных вод целлюлозно-бумажного комбината / М.Н. Кислицина // Антропогенная трансформация природной среды.: матер. Междунар. школы-семинара молодых ученых. – Пермь, 2012. – С. 211–214.

20. **Кислицина, М.Н.** Исследование влияния фенольных соединений и тяжелых металлов на анатомо-морфологические показатели *Elodea densa* Planch / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Сборник матер. XII Междунар. симпозиума «Чистая вода России». – Екатеринбург, 2013. – С. 146–147.

21. **Кислицина, М.Н.** Исследование фотосинтетического аппарата водных растений в условиях загрязнения / М.Н. Кислицина // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 34–36.

22. **Кислицина, М.Н.** Исследование влияния фенольных соединений на анатомо-морфологические показатели *Elodea densa* Planch. / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Матер. Всерос. конф. «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде». – Иркутск, 2013. – С. 335–336.

23. **Кислицина, М.Н.** Роль макрофитов в процессе самоочищения реки Ляля в условиях загрязнения сточными водами целлюлозно-бумажного комбината / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Матер. X Междунар. конф. «Актуальные проблемы экологии». – Гродно, 2014. – ч. 2. – С. 94–96.

24. **Кислицина, М.Н.** Устойчивость водных растений к сточным водам целлюлозно-бумажного комбината / М.Н. Кислицина // Симбиоз-Россия 2014: материалы VII Всерос. конгр. биологов. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – С. 53–56.

25. **Кислицина, М.Н.** Влияние гидрохинона и резорцина на морфометрические характеристики *Elodea canadensis* Michx. и *Potamogeton perfoliatus* L. / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник матер. IX Междунар. симпозиума. – М.: ИФР РАН, 2015. – С. 292–295.

26. **Кислицина, М.Н.** Влияние экзогенных дифенолов на морфологические характеристики водных макрофитов / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Сборник матер. Всерос. науч. конф. с междунар. участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. – С. 254.

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ:

27. **Кислицина, М.Н.** Программа расчета площади объектов на плоскости «Контур-Шейд» / М.Н. Кислицина, М.С. Еремеев. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2015662124. Заявка № 2015618128 от 01.09.2015. Зарег. 17.11.2015.